



HAL
open science

Radiosensibilité des sous-populations lymphocytaires T et sénescence radio-induite

Hoang Quy Nguyen

► **To cite this version:**

Hoang Quy Nguyen. Radiosensibilité des sous-populations lymphocytaires T et sénescence radio-induite. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT: 2019SACLS242 . tel-03225636

HAL Id: tel-03225636

<https://theses.hal.science/tel-03225636>

Submitted on 12 May 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.

Radiosensibilité des sous-populations lymphocytaires T et sénescence radio-induite

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'université Paris Sud
École doctorale 582
Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

Thèse présentée et soutenue à Créteil, le 18 Septembre 2019 par

Hoang-Quy NGUYEN

Composition du Jury :

Paul-Henri ROMEO

DR, Université Paris Saclay (Inserm UMR967)

Président

David AZRIA

PU-PH, Université de Montpellier (Inserm U1194)

Rapporteur

Georges NOËL

PU-PH, Université Strasbourg (UMR7071 IPHC)

Rapporteur

Carl MANN

DR, Université Paris Saclay (CNRS UMR 9198)

Examineur

Yazid BELKACEMI

PU-PH, Université Paris-Est Créteil (Inserm U955)

Directeur de thèse

Sabine LE GOUVELLO

MCU-PH, Université Paris-Est Créteil (Inserm U955)

Co-Directrice de thèse

Françoise HOFFSCHIR

Chercheur, Université Paris Saclay (Inserm UMR967)

Invitée

A mes parents

« Vu Lan báo hiếu – 8/2019 »

Remerciements

A mes directeurs de ma thèse

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements les plus sincères au Docteur Sabine LE GOUVELLO et au Professeur Yazid BELKACEMI qu'ils soient remerciés de leurs soutiens, leurs disponibilités, leurs patiences, leurs encouragements, et leurs conseils, pour m'avoir initié à la recherche fondamentale, et à la recherche translationnelle. Sans vous, ce travail n'aurait jamais pu se faire. Mon souhait serait, à mon retour au Vietnam de pouvoir continuer à collaborer avec vous pour des futurs projets. Je vous souhaite le meilleur à venir afin de continuer de diriger des étudiants après moi. C'est pour moi un grand honneur d'avoir été votre étudiant. Soyez assurés de toute ma gratitude et de mon profond respect.

Mes remerciements et ma profonde reconnaissance vont à Madame le Docteur Sabine LE GOUVELLO ma codirectrice de thèse pour son aide précieuse dans le domaine de l'immunologie, la sénescence avec une grande pédagogie. Je vous remercie d'avoir été disponible et de m'avoir soutenu tout au long de mes travaux. Vous m'avez accompagné dans mes choix, motivé dans les moments de doute, soutenue dans les difficultés. Soyez remercié sincèrement de m'avoir confié ce travail et de m'avoir guidé avec délicatesse et pertinence dans l'élaboration de cette thèse.

J'exprime ma plus profonde et sincère gratitude à Monsieur le Professeur Yazid BELKACEMI mon directeur de thèse, pour m'avoir permis de mener mes recherches au sein de l'équipe 7, Inserm U955 ainsi que de m'avoir accueilli dans son service de radiothérapie. Qu'il soit remercié de m'avoir donné confiance tout au long de ce travail de thèse, et d'avoir financé mon projet de thèse. Votre expertise a été d'un grande aide dans le domaine de la toxicité radio-induites et de la radiosensibilité individuelle. Je vous exprime ma profonde gratitude pour mes collègues vietnamiens et moi-même d'avoir fait le lien entre nos deux pays

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie vivement le Professeur David AZRIA et le Professeur Georges NOËL qui en tant que rapporteurs, ont accepté de passer du temps à lire et d'évaluer ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Paul Henri ROMEO pour sa participation en tant qu'examineur de ma thèse, pour votre accueil chaleureux au sein de son équipe, pour la collaboration, et pour son expertise dans le domaine de radiobiologie, pour ses conseils, ses commentaires tout au long de mon travail.

Je tiens à remercier le Docteur Carl MANN pour sa participation en tant qu'examineur, pour son expertise sur la sénescence et surtout de H2A.J, pour ses conseils, encouragements, et commentaires de ce travail.

Je tiens à remercier le Docteur Françoise HOFFSCHIR pour son expertise sur l'immunofluorescence de H2A.X et caspase-3, pour ses conseils et encouragements, et pour ses aides précieuses.

Je tiens aussi à remercier tout spécialement le Professeur Nigel CROMPTON, le Professeur E. Mahmut ÖZSAHIN, le Docteur Pascale BERTRAND, le Docteur Jean-Luc PERFETTINI, qui, en tant que membres de mon comité de thèse d'avoir examiné l'avancée du projet avec expertise

Je tiens aussi à adresser ma plus vive reconnaissance au Professeur Alexandre DE LA TAILLE, directeur de l'équipe 7 pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant ces 3 années de thèse. Je tiens à remercier les acteurs principaux de l'équipe 7, mon équipe de résidence : Mohamed, Francis, Jean, Sylvain, Marc, Frank, Yamina, Virginie, Damien, Pascale S, Pascale M, Nanor, Jennifer, Julia, Claudia, Claudine, Véronique, et plus particulièrement Patricia et Eric ainsi que tous les étudiants de l'équipe 7, Ishan, Charly, Mickaël, Grégoire, Victoria, Mickaël, Florian, Jane, Louise, Léa, Arthur. Toutes ces personnes rencontrées durant ces années m'ont permis d'améliorer mon vocabulaire français et ont partagé mon quotidien au laboratoire.

Je tiens aussi à adresser un grand merci à Stéphane pour son expertise en biologie sur les lymphocytes Th17, pour son partage ses connaissances en immunologie, pour son aide dans les manipulations, pour ses encouragements. Je tiens aussi à remercier le Docteur Julien MAFILLE dans la mise au point du panel de cytométrie en flux. De plus, je tiens aussi à le remercier Adeline, Aurélie, et Odile pour les triées cellulaires, Xavier pour leurs conseils et la formation sur la microscopie, et Mathieu pour les manipulations de Luminex. Je tiens aussi à remercier Côté Laurance, Nora pour ses encouragements.

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe de «Réparation et Transcription dans les cellules souches hématopoïétiques» au sein de l'unité mixte de recherche Inserm U967 pour leur aide sur l'irradiation des cellules, leur conseils, et plus particulièrement : Stéphanie, Marion, Annaïs, Germain, Jacqueline, et Anne.

Je tiens à exprimer mes remerciements au Docteur Thu-Ha DAO pour son aide dans la recherche d'un laboratoire d'accueil, et ses encouragements. Je tiens à remercier mes amis et compatriotes Dr Hanh, Dr Trung, Dr Tien et particulièrement mon meilleur ami Anh Tuan (SCTV).

Je remercie également l'équipe médicale au sein du service de radiothérapie oncologique à l'hôpital Henri Mondor, particulièrement Madame JOUHAUD, Fadila, et Caroline.

Je tiens à remercier mes collègues qui travaillent dans le département de l'oncologie à l'université de médecine à Ho Chi Minh ville pour leurs encouragements, surtout le Pr Tuyet Anh, Dr Linh, Dr Phuc, et Dr Diep à l'hôpital d'oncologie à Ho Chi Minh ville. J'ai une pensée particulière pour mon ancien chef de département Pr Thiep, malheureusement parti trop tôt...

Maman, Papa, mon frère, je vous adresse un immense merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, vous me soutenez depuis maintenant 32 ans. Votre amour a boosté mon système immunitaire afin que je puisse grandir dans les meilleures conditions, vous avez toujours su comprendre mes souhaits et trouver les mots pour consolider mes espoirs tout au long de ma scolarité. Vous avez su m'aider à m'orienter vers un métier passionnant, merci de m'avoir transmis la passion des sciences naturelles et médicales. Je vous dédie cette thèse.

Sommaire.....	1
Index des figures et tables.....	6
Abréviations.....	9
Avant-propos.....	13
Partie 1 : Synthèse Bibliographique	

1. Radiobiologie	16
1.1. Caractéristiques des rayonnements ionisants	16
1.2. Effets des rayonnements ionisants	17
1.2.1. Etapes physique et chimique.....	17
1.2.1.1. Etape physique.....	17
1.2.1.2. Etape chimique.....	17
1.2.2. Effets cellulaires.....	18
1.2.2.1. Effets directs des rayonnements ionisants.....	18
1.2.2.2. Effets indirects des rayonnements ionisants.....	18
1.2.3. Mécanismes de réparation de l'ADN et interactions avec les voies signalisation...19	
1.2.4. Mort cellulaire.....	22
1.2.4.1. Apoptose radio-induite.....	22
1.2.4.1.1. La voie apoptotique intrinsèque.....	23
1.2.4.1.2. La voie apoptotique extrinsèque.....	24
1.2.4.1.3. La voie apoptotique du stress membranaire.....	24
1.2.4.2. Mort cellulaire par nécrose.....	24
1.2.4.3. Catastrophe mitotique radio-induite.....	25
1.2.5. Sénescence radio-induite.....	25
1.2.6. Autophagie radio-induite.....	25
1.3. Sensibilité des cellules immunitaires aux rayonnements ionisants.....	26
2. Toxicité radio-induite et processus biologiques.....	27
2.1. Généralités sur la toxicité radio-induite.....	27
2.2. D'un point de vue biologique.....	28
2.2.1. Généralités sur la fibrose.....	28
2.2.2. Fibrose radio-induite.....	28
2.2.2.1. Cellules impliquées dans le développement de la fibrose radio-induite...29	
2.2.2.2. Facteurs impliqués dans le développement de fibrose radio-induite.....29	
2.2.2.2.1. TGF- β	29
2.2.2.2.2. Modifications de la signalisation du TGF- β par les espèces réactive de l'oxygène (ERO) dans la fibrose radio induite.....	30
2.2.2.3. La fibrose est favorisée par la sénescence accélérée radio-induite.....	31
2.2.3. Exemples de toxicités radio-induites.....	32

2.2.3.1. Fibrose cutanée radio-induite : de la biologie à la clinique.....	32
2.2.3.1.1. Biologie.....	32
2.2.3.1.2. Manifestations cliniques et pathologiques des lésions cutanées radio-induites.....	32
2.2.3.2. Fibrose pulmonaire radio-induite : de la biologie à la clinique	33
2.2.3.2.1. Biologie.....	33
2.2.3.2.2. Manifestations cliniques et pathologiques des lésions pulmonaires radio-induites.....	33
2.2.3.3. Toxicité gastro-intestinale radio-induite : de la biologie à la clinique.	
2.2.3.3.1. Biologie.....	34
2.2.3.3.2. Manifestations cliniques et pathologiques des lésions gastro-intestinales radio-induites.....	34
2.2.4. La réponse immunitaire dans le développement de la fibrose.....	35
2.2.4.1. Les lymphocytes T CD4 ⁺ (LT CD4 ⁺).....	36
2.2.4.2. Les sous-populations de lymphocytes CD4 ⁺	37
2.2.4.2.1. Les lymphocytes Th1.....	38
2.2.4.2.2. Les lymphocytes Th2.....	39
2.2.4.2.3. Les lymphocytes Th17.....	39
2.2.4.2.4. Les lymphocytes T régulateurs (Treg).....	42
2.2.4.3. Les lymphocytes T CD4 ⁺ et la fibrose.....	42
2.2.4.3.1. Les lymphocytes Th1 et la fibrose.....	43
2.2.4.3.2. Les lymphocytes Th2 et la fibrose.....	43
2.2.4.3.3. Les lymphocytes Th17 et la fibrose.....	44
2.2.4.3.4. Les lymphocytes Treg et la fibrose	44
2.2.4.2.5. Récepteur de chimiokine CCR6.....	45
3. Sénescence.....	46
3.1. Sénescence.....	46
3.1.1. Sénescence répllicative.....	47
3.1.2. Sénescence prématurée.....	47
3.1.3. Caractéristiques des cellules sénescents.....	48
3.1.3.1. Transformation morphologique.....	48
3.1.3.2. Résistance à l'apoptose.....	49
3.1.3.3. Inhibiteurs de la kinase dépendant de la cycline (CDK) et l'arrêt du cycle cellulaire.....	49
3.1.3.4. Augmentation de l'activité β-galactosidase.....	49
3.1.3.5. Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP).....	50
3.1.3.5.1. Composition du SASP.....	50
3.1.3.5.2. Les voies de signalisation régulant l'expression du SASP.....	51

3.1.3.6. Persistance des dommages à l'ADN.....	52
3.1.3.7. Accumulation de l'histone de H2A.J.....	53
3.2. Sénescence immunitaire.....	53
3.2.1. Caractérisation.....	53
3.2.2. La sénescence lymphocytaire n'équivaut pas à l'épuisement lymphocytaire.	
3.2.3. Implication des voies de signalisation dans la sénescence des lymphocytes T.....	54
4. Radiosensibilité individuelle.....	55
4.1. Réponse individuelle des tissus sains aux rayonnements ionisants.....	55
4.2. Maladies génétiques associées à la radiosensibilité	55
4.2.1. Syndromes de radiosensibilité par défaut de réparation des CDB de l'ADN.....	55
4.2.2. Syndromes de radiosensibilité sans défaut direct de réparation des CDB de l'ADN.....	55
4.3. Test de la radiosensibilité individuelle.....	55
4.3.1. Tests de mort cellulaire.....	56
4.3.1.1. Test de survie clonogénique des fibroblastes.....	56
4.3.1.2. Test d'apoptose radio-induite des lymphocytes T.....	57
4.3.2. Tests de formation des micro-noyaux et des comètes.....	57
4.3.3. Tests utilisant des marqueurs de dommages de l'ADN.....	58
4.3.3.1. Test d'évaluation des foyers de γ H2AX.....	58
4.3.3.2. Test de translocation cyto-nucléaire d'ATM.....	59
4.3.4. Radiogénomique.....	59
5. Article 1.....	61
“Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review”	
Nguyen HQ, To NH, Zadigue P, Kerbrat S, De La Taille A, Le Gouvello S, Belkacemi Y.	
Crit Rev Oncol Hematol. 2018 Sep;129:13-26. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.06.012. Epub 2018 Jun 22.	
Partie 2 : Hypothèses et objectifs.....	76
Partie 3 : Matériels et méthodes.....	78
1. Objectif n°1 : Comparaison de la sensibilité des lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th17 et Treg à la sénescence induite par des rayonnements ionisants par rapport à celle des lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th et CCR6^{neg} Treg du sang périphérique.....	78

2. Objectif n°2 : Etude de la proportion de la sous-population de lymphocytes T périphériques CD4⁺CCR6⁺Th17 par rapport à celle des lymphocytes T CD4⁺CCR6^{neg}Th ou CD4⁺CCR6⁺Th17/Th1, Th2, Th1 ou CD4⁺CCR6⁺Treg.....	78
2.1. Prélèvements.....	79
2.2. Anticorps.....	79
2.3. Cytométrie en flux.....	79
2.3.1. Principe.....	79
2.3.2. Cytomètre de flux.....	80
2.3.3. Panels d'anticorps.....	82
2.3.3.1. Rationnel du choix des différents marqueurs membranaires des lymphocytes T CD4 ⁺	82
2.3.3.2. Analyse des données brutes.....	84
2.3.4. Titration d'anticorps	88
2.3.5. Protocole de marquage des échantillons.....	88
2.3.5.1. Protocole général.....	88
2.3.5.2. Contrôle « Fluorescence Minus One ».....	89
2.3.5.3. Contrôle des compensations.....	90

Partie 4 : Résultats.....91

1. Article 2.....92

“High sensitivity of human CCR6⁺Th17 lymphocytes to radiation-induced senescence: a potential target for prevention of radiation-induced toxicity”

Nguyen HQ*, Belkacemi Y*, Mann C, Hoffschir F, Kerbrat S, Surenaud M, Zadigue P , De La Taille A, Romeo PH, Le Gouvello S.

Manuscrit sous la forme d'un article original soumis à *l'International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*

2. Etude par cytométrie en flux de l'association entre la proportion des lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺ Th17 par rapport aux autres lymphocytes T CD4⁺ périphériques, et la toxicité radio-induite ≥ Grade 3 chez les patients après radiothérapie.....115

Etude comparée de la répartition des sous-populations de lymphocytes Th1/Th2/Th17/Th1-17/Treg au sein des lymphocytes TCD4⁺CD45RO « mémoire » chez les patients atteints de fibrose de grade ≥ 3 post-RT par rapport aux sujets sains.....115

Partie 5 : Discussion.....118

1. Sensibilité des lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th17 à la sénescence radio-induite.....118

2. Le ratio des lymphocytes CD4⁺CCR6⁺Th17 / CD4⁺CCR6⁺Treg pourrait être utilisé comme marqueur de la radiosensibilité intrinsèque individuelle.....119

Partie 6 : Conclusions et perspectives.....121

Références.....122

Annexes.....143

Annexe 1 : CURRICULUM VITAE..... 144

Annexe 2 : Article “Stroma in normal and cancer wound healing”.....145

Huet, E. , Jaroz, C. , Nguyen, H.Q., Belkacemi, Y. , Taille, A. , Stavrinides, V. and Whitaker, H. FEBS J. 2019 Aug;286(15):2909-2920. doi: 10.1111/febs.14842. Epub 2019 Apr 15. Review.

Index des figures

Figure 1 : Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants.....	17
Figure 2 : Radiolyse de l'eau et production d'espèces réactives.....	18
Figure 3: Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants.....	19
Figure 4 : Les quatre voies principales de réparation de l'ADN.....	20
Figure 5 : Les voies de réparation des CDB de l'ADN.....	21
Figure 6 : Schéma général des Voies de signalisation en radiobiologie.....	22
Figure 7 : Les voies de signalisation de mort cellulaire après exposition aux RI.....	23
Figure 8 : Mécanismes de fibrose : les lésions, l'inflammation et la réparation jouent chacun un rôle dans la fibrose radio-induite.....	28
Figure 9 : Rôle central du TGF- β dans la fibrose radio-induite.....	30
Figure 10 : Les RI induisent la génération des ERO et la fibrose.....	30
Figure 11 : Fibrose et Sénescence accélérée radio-induite.....	31
Figure 12 : Fibrose cutanée radio-induite.....	32
Figure 13 : Fibrose pulmonaire radio-induite.....	33
Figure 14 : Rectite radio-induite en endoscopie.....	34
Figure 15 : Effets des RI sur la réponse immunitaire.....	35
Figure 16 : Différenciation des lymphocytes CD4 ⁺ naïfs en lymphocytes effecteurs ou mémoire /mémoire centrale.....	37
Figure 17 : Différenciation des lymphocytes LT CD4 ⁺ en fonction du microenvironnement cytokinique.....	38
Figure 18 : Rôle des lymphocytes Th17 dans l'immunité tumorale.....	40
Figure 19 : Plasticité des lymphocytes Th17.....	41
Figure 20 : La réponse immunitaire adaptative dans la fibrose.....	43
Figure 21 : Fonctions immunitaires pléiotropes de l'axe CCR6-CCL20.....	45
Figure 22 : Vue d'ensemble de la sénescence répllicative et de la sénescence prématurée.....	46
Figure 23 : Facteurs de stress et agents dommageables activateurs des inhibiteurs du cycle cellulaire et du facteur suppresseur de tumeur Rb.....	48
Figure 24 : Marqueurs et phénotypes associés à la sénescence.....	50
Figure 25 : Différentes voies d'induction du SASP dans la sénescence cellulaire.....	51
Figure 26 : Phosphorylation de l'histone H2AX après la réponse aux dommages de l'ADN.....	52
Figure 27 : Principales techniques d'évaluation de la radiosensibilité.....	56
Figure 28 : Schéma du test des comètes et des tests cytogénétiques.....	58
Figure 29 : La sénescence prématurée radio-induite dans les sous-populations de LT CD4 ⁺ (Th1/Th2/Th17/Treg) pourrait promouvoir la fibrose.....	76
Figure 30 : Protocole expérimental de l'étude de la sensibilité à la sénescence radio-induite des lymphocytes T CD4 ⁺	78
Figure 31 : Principaux composants d'un cytomètre de flux.....	80

Figure 32 : Configuration optique du cytomètre LSR Fortessa (BD).....	81
Figure 33 : Stratégie de «gating» des sous-populations lymphocytaires T CD4+.....	85
Figure 34 : Indice de fluorescence d'un anticorps titré.....	88
Figure 35 : Etude par cytométrie en flux des sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ périphériques chez 3 patients avec fibrose de grade ≥ 3 post-RT.....	115
Figure 36 : Etude par cytométrie en flux des sous-populations de lymphocytes T CCR6 ⁺ Th17 périphériques en fonction de l'expression de CD161 et CD90.....	116
Figure 37 : Ratios Th17 / Treg en fonction de l'expression du récepteur CCR6.....	117

Index des tables

Tableau 1 : Principaux organes à risque en radiothérapie et complications cliniques associées..	27
Tableau 2 : Description des panels d'anticorps utilisés.....	82
Tableau 3 : Différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺	87
Tableau 4 : Description des tubes d'anticorps utilisés comme contrôle FMO.....	89

Abréviations

A

ADN : acide désoxyribonucléique

APAF1 : apoptotic protease activating factor 1

APC : Antigen-Presenting Cell / cellule présentatrice d'antigène

ATM : protéine mutée de l'ataxie télangiectasie

B

Bcl 2: B-cell lymphoma 2

Bcl2 L1 (Bcl 2-like 1 ou Bcl-XL)

BER : base excision repair / réparation par excision de base

C

CD : clusters de différenciation / classes de différenciation

CDB : cassure double brin / double strand break

CDK : kinases dépendantes des cyclines / cyclin-dependent kinase

CDKN2A : kinase cycline-dépendante 2A

CMV : cytomégalovirus

CREB : cAMP response element-binding protein

CSB : cassure simple brin / single strand break

CSM : cellules souches mésenchymateuses

Caspase : cysteinyl aspartate-specific proteinase

CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

D

DAMP : damage-associated molecular pattern

DD : domaine de mort / death domain)

DDB2: DNA damage binding protein 2

DDR : DNA damage response / réponse aux dommages de l'ADN

DISC : complexe de signalisation induisant la mort / death-inducing signaling complex

DR : récepteur de mort / death receptor

E

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

EMC / MEC : Extracellular matrix / matrice extra-cellulaire

EMT : transition épithélio- mésenchymateuse / Epithelial to Mesenchymal Transition

EndMT : transition endothélio-mésenchymateuse / Endothelial to Mesenchymal Transition

F

FADD : Fas -associated death domain

FGF : le facteur de croissance des fibroblastes / fibroblast growth factor

FMO : fluorescence minus one

FSC: diffusion aux petits angles / forward scatter

G

GITR: glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-related receptor

GM-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages/ Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor.

Gy: Gray

GWAS: genome-wide association studies

H

H• : hydrogène simple

HO₂• : anion perhydroxyle

H₂O : L'eau

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HR/RH : homologous recombination / recombinaison homologue

hTERC : human telomerase RNA component

γ-H2A.X : forme phosphorylée de H2A.X

I

IFN : Interféron

IL : Interleukine

K

α-KG : α-cétoglutarate

L

LAG-3: lymphocyte activation gene

LTCD4⁺ : lymphocytes T CD4⁺

M

mTOR (mammalian target of rapamycin)

N

NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide

NER : nucleotide excision repair / réparation par excision de nucléotide
NHEJ : nonhomologous end joining / ligature des extrémités non homologues
NOX : NADPH oxydase

O

O₂^{•-} : anionsuperoxyde
•OH : l'hydroxyle
OIS : Oncogene-induced senescence

P

p38MAPK : p38-Mitogen-Activated Protein Kinase
PD-1: Programmed cell death 1
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes / Platelet-Derived Growth Factor
PKC : protéine kinase C
PROUST : Prospective Registration of morbidity and mortality, individual radioSensitivity and radiation Technique
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

R

R• : radicaux organiques
Rb : protéine du rétinoblastome
RI : rayonnements ionisants
RA : acide rétinoïque
RILA : Radiation-induced lymphocyte apoptosis / Apoptose lymphocytaire radio-induite
RO₂• : radicaux peroxydes
ROS / ERO : reactive oxygen species / espèces réactives de l'oxygène
RNS / ERN : reactive nitrogen species / espèces réactives de l'azote
RT : radiothérapie

S

SA-β-Gal : β-galactosidase associée à la sénescence
SAM : S-adénosylméthionine
SASP : senescence-associated secretory phenotype / phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SF2 : fraction de survivants à une dose de 2 Gy / surviving fraction at 2 Gy
SIPS : stress-induced premature senescence / sénescence prématurée induite par le stress
SMS : senescence-messaging secretome
SNP : single nucleotide polymorphism
SSC : diffusion aux grands angles / side scatter

T

T-bet : T-box expressed in T cells

TCM : lymphocytes T «centrale mémoire»

TCR : T cell receptor

T_{EFF} : lymphocytes T effecteurs

T_{EM} : lymphocytes «effecteurs mémoires»

TGF- β : transforming growth factor-beta

Th : T helper / T auxiliaire

TIM-3 : T cell immunoglobulin mucin 3

TIMPs : tissue inhibitors of metalloproteinases

TLR : Toll-like

T_N : lymphocytes T naïfs

TNF : tumor necrosis factor

TNFR : tumor necrosis factor receptor

TNFRSF10b : TNF Receptor Superfamily Member 10b

TRAIL : tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

Treg: lymphocytes T régulateurs

V

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Avant-propos

En 2018, près de 382 000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués en France. En moyenne 60 % de patients reçoivent une radiothérapie (RT) durant l'histoire de leur maladie. L'exposition des tissus sains à une irradiation quelle que soit la dose et le fractionnement peut être à l'origine d'effets secondaires tardifs, le plus souvent irréversibles. Entre 5 et 20 % des patients présentent des toxicités radio-induites précoces et/ou tardives le plus souvent irréversibles selon l'organe à risque concerné. Le ratio entre le bénéfice de la RT et le risque de toxicité constitue un objectif systématique des cliniciens pour établir un schéma personnalisé tenant compte de la dose délivrée à la cible et les contraintes pour les organes à risque environnants.

Du point de vue de la radiobiologie, les rayonnements ionisants (RI) induisent des dommages à l'ADN qui se traduisent par une variété de dommages cellulaires et de leur microenvironnement aboutissant à la sénescence, la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. Avant cette étape ultime, les phénomènes inflammatoires radio-induits peuvent être à l'origine d'un déséquilibre de l'homéostasie cellulaire qui peut être délétère pour la fonction des tissus normaux entourant la tumeur.

La sénescence est un état d'arrêt irréversible de la prolifération cellulaire avec maintien du métabolisme, en réponse à différents stress environnementaux. La sénescence peut être soit répliquative et être provoquée par un raccourcissement des télomères, soit accélérée en réponse à un stress de la cellule : dommages à l'ADN, stress par des agents thérapeutiques, activation d'oncogène, stress oxydant. Les cellules sénescents ont diverses caractéristiques, parmi lesquelles une sensibilité réduite à l'apoptose, une augmentation de l'expression des facteurs pro-inflammatoires conduisant au phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP : senescence-associated secretory phenotype), et dans certains cas, une modification de la réponse aux dommages de l'ADN. De plus, les RI peuvent induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO/ROS : reactive oxygen species) qui provoquent des lésions indirectes de l'ADN dans les tissus non ciblés par les RI, et des effets systémiques associés à la sénescence et à l'inflammation. Des données récentes de la littérature ont montré que la sénescence accélérée radio-induite pouvait provoquer une fibrose tissulaire via les facteurs pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques sécrétés par les cellules sénescents.

Au plan clinique, la recherche de facteurs prédictifs de fibrose chez les patients irradiés constitue un défi important pour la connaissance préalable de la radiosensibilité intrinsèque des malades visant à personnaliser le schéma d'irradiation et améliorer le ratio bénéfice/risque de la radiothérapie. L'un des tests le plus développé est basé sur l'évaluation de la sensibilité à l'apoptose radio-induite lymphocytaire (RILA : Radiation-induced lymphocyte apoptosis). De nombreuses études prospectives d'évaluation du test RILA ont été faites chez des patients atteints par divers types de cancer. Les auteurs ont montré qu'un faible taux d'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ (LTCD4⁺) ou LTCD8⁺ était corrélé avec une fibrose radio-induite.

Cependant, les auteurs n'ont pas évalué la contribution du ratio de sous-populations de LTCD4⁺ ou LTCD8⁺ à ces résultats. En effet, ces sous-populations lymphocytaires pourraient avoir une sensibilité différente à l'apoptose radio-induite, qui leur conférerait un rôle important dans la réaction inflammatoire à la base de la toxicité tissulaire radio-induite. En effet, dans un modèle murin, il a été montré que l'accumulation pulmonaire de lymphocytes inflammatoires Th17, l'une des sous-populations de lymphocytes CD4⁺, a été corrélée positivement avec la fibrose pulmonaire après une exposition pulmonaire aux RI (Paun et al., 2015, 2017). L'hypothèse d'une forte résistance à l'apoptose radio-induite des lymphocytes Th17 comme explication à l'accumulation pulmonaire observée de ces cellules n'a pas été évaluée dans ces travaux.

En conséquence, nous nous sommes intéressés spécifiquement aux sous-populations lymphocytaires de LT CD4⁺CCR6⁺(Th17) avec l'ambition d'améliorer la spécificité des marqueurs biologiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle à partir des LT CD4⁺. Notre hypothèse de travail est que les LT CD4⁺CCR6⁺Th17 pourraient être augmentés chez les patients présentant une forte fibrose après-RT en raison de leur plus grande résistance à l'apoptose, elle-même due à une plus sensibilité à la sénescence radio-induite plus importante que les autres LT CD4⁺. Notre étude est ciblée sur les LT CD4⁺CCR6⁺Th17. En effet, l'expression du récepteur CCR6 confère aux lymphocytes T CD4⁺ une capacité de migration dans les tissus inflammatoires exprimant le ligand de ce récepteur, la chimiokine CCL20. La migration de LT CD4⁺CCR6⁺(Th17) rendus sénescents par les RI, du fait de leur sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, pourrait contribuer à la fibrose des tissus sains proches de la zone irradiée.

Le premier objectif de ce travail de thèse était d'évaluer chez des sujets volontaires sains la sensibilité à la sénescence radio-induite des LT CD4⁺CCR6⁺Th17 par rapport aux autres LTCD4⁺ du sang périphérique.

Le second objectif de ce travail est d'évaluer la proportion de LT CD4⁺CCR6⁺Th17 périphériques chez les patients ayant des toxicités radio-induites \geq grade 3 inclus dans le protocole PROUST (PROUST : Prospective Registration of mOrbidity and mortality, individUal radioSensitivity and radiation Technique) et de les comparer aux sujets sains jamais irradiés et ceux ayant reçu une radiothérapie mais n'ayant pas développé de toxicité \geq grade 3.

La première partie de ce manuscrit fait une revue de la littérature décrivant la radiobiologie cellulaire et les processus de mort cellulaire qui seront potentiellement impliqués dans nos recherches. Nous nous sommes focalisés particulièrement sur la sénescence radio-induite, en décrivant les caractéristiques des cellules sénescents et la relation entre sénescence des cellules immunitaires et toxicité radio-induite. Ceci a fait l'objet d'une publication l'année dernière "Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review" dans *Critical Reviews in Oncology and hematology* (DOI : 10.1016/j.critrevonc.2018.06.012). La deuxième partie du manuscrit décrit l'hypothèse et les objectifs de mon travail. Dans la troisième partie, nous avons décrit les « matériels et méthodes » pour l'évaluation de la sensibilité à la sénescence des LTCD4⁺ d'une part, et d'autre part pour la

mise au point de panel d'anticorps pour des analyses de cytométrie en flux, et la stratégie d'évaluation de la proportion des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ au sein de prélèvements de sang périphérique. Les résultats de ces travaux sont présentés dans la quatrième partie du manuscrit sous la forme d'un article original soumis à *l'International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, et incluant les résultats concernant la sensibilité à la sénescence des différentes sous-populations de LTCD4⁺. Les résultats préliminaires concernant l'analyse comparée des proportions des différentes sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ du sang périphérique chez l'individu sain et chez 3 patients ayant reçu une radiothérapie et ayant développé une toxicité \geq grade 3 sont également présentés dans cette quatrième partie. L'ensemble des résultats est discuté en regard de la littérature dans la cinquième partie de ce document. Le manuscrit termine par une conclusion générale et quelques perspectives.

Faisant suite à ma formation médicale réalisée à la Faculté de Médecine d'Ho Chi Minh Ville (Vietnam), et un Master d' « Oncologie, Pharmacologie » effectué à l'université d'Aix-Marseille (France) (C.V. en annexe 1), cette thèse a été réalisée dans le cadre de l'école doctorale de « Cancérologie Biologie Santé » de l'université Paris Saclay. Une partie du travail expérimental de thèse a été réalisé au sein de l'équipe 7 de l'unité Inserm U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB) à la faculté de médecine de l'Université Paris Est, sous la direction du Professeur Yazid BELKACEMI (Equipe 7 ; responsable : Professeur Alexandre de la TAILLE) et du Docteur Sabine LE GOUVELLO (Equipe 4 ; responsables : Professeur Jorge BOCZKOWSKI et Docteur Sophie LANONE). Une autre partie du travail expérimental a été réalisé sous la direction du Docteur Sabine LE GOUVELLO au sein de l'équipe de « Réparation et Transcription dans les cellules souches hématopoïétiques » de l'unité mixte de recherche Inserm U967/CEA (responsable : Docteur Paul-Henri ROMEO) au sein de l'Institut de Recherche en Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (IRCM) du CEA (Fontenay-aux-Roses).

Ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier du projet PROUST (Plan Cancer 2014-2019 – Institut National du Cancer), du CEA, de l'AP-HP (C.H.U Henri Mondor), de l'AREFOR (Association pour la REcherche et pour la Formation en Oncologie-Radiothérapie), du Ministère de l'Education et de la Formation du Vietnam dans le cadre du programme 911.

Partie I : Synthèse Bibliographique

1. Radiobiologie

1.1. Caractéristiques des rayonnements ionisants

On distingue deux types de RI : les rayonnements primaires (électriquement chargés) directement ionisants (les rayonnements α et β), et les rayonnements non chargés ou indirectement ionisants, tels que les photons (rayons X et γ) ou encore les neutrons. Les RI comprennent les rayonnements électromagnétiques de haute énergie, les unités d'énergie sont les eV, keV et MeV ($1 \text{ keV} = 10^3 \text{ eV} = 1,602177 \times 10^{-16} \text{ J}$, $1 \text{ MeV} = 10^6 \text{ eV} = 1,602177 \times 10^{-13} \text{ J}$). La dose reçue par la matière vivante se mesure en gray (Gy) : 1Gy correspond à un transfert d'énergie de 1 joule à 1 kilogramme de matière (Islam, 2017).

Le rayonnement alpha (α) : Le rayonnement alpha a une portée dans l'air de quelques centimètres et ne pénètre que de quelques fractions de millimètres dans le corps humain. Le rayonnement alpha est généralement arrêté par l'air et les vêtements. Les émissions α surviennent lors de la désintégration du radon 222, de l'uranium 238 et du plutonium 239 (Bargues et al., 2010)

Le rayonnement bêta (β) : Les rayons β sont plus pénétrants mais moins ionisants que les rayons α . Une grande partie du rayonnement bêta est généralement arrêtée par les feuilles d'aluminium avant d'atteindre la peau. Le rayonnement β , émis par un atome radioactif, est un faisceau d'électrons (Bargues et al., 2010).

Le rayonnement gamma (γ) : Une désintégration α ou β s'accompagne souvent de la production de rayons γ qui sont des rayonnements électromagnétiques comme les rayons X et la lumière du soleil. Les rayons X ont été découverts en 1895 par Wilhelm Röntgen qui a reçu pour cela le premier prix Nobel de physique. Les rayons gamma et les rayons X ne peuvent jamais être totalement arrêtés. Ils font sentir leur effet au-delà des couches de la peau à l'intérieur du corps (Islam, 2017).

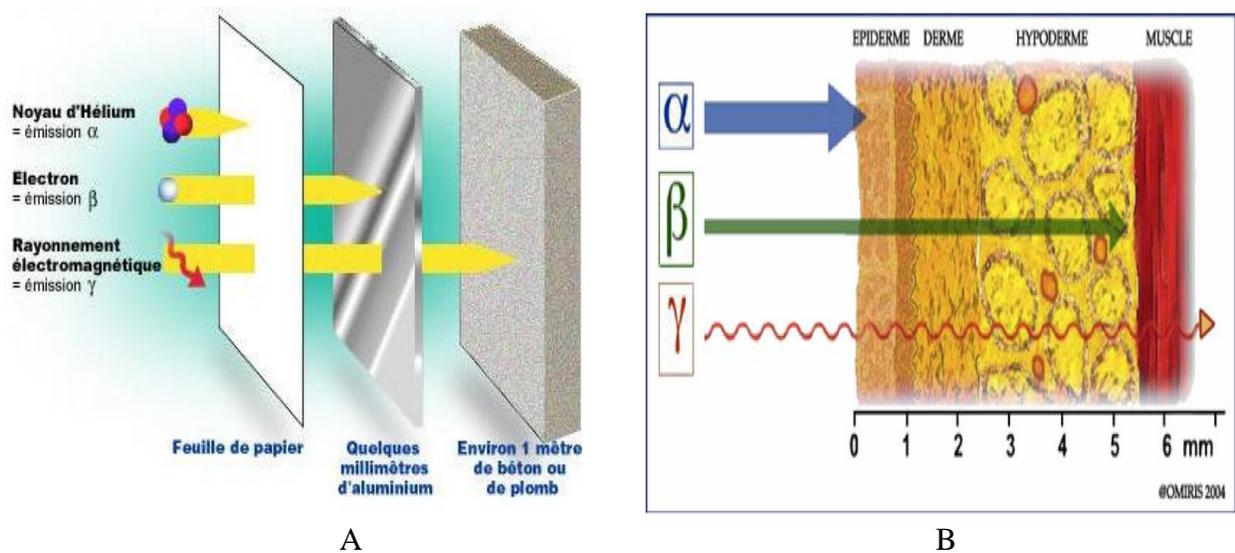


Figure 1 : Pouvoir de pénétration des rayonnements ionisants.

A. Du point de vue physique (D'après <http://www.inrs.fr>)

B. Du point de vue clinique

(D'après <http://www.cultures-et-croyances.com/etude-les-effets-des-rayonnements-ionisants>)

1.2. Effets des rayonnements ionisants

1.2.1. Etapes physique et chimique

1.2.1.1. Etape physique

Environ 10^{-18} à 10^{-12} s après leur émission, les RI produisent des micro-dépôts d'énergie aléatoirement répartis dans la matière. De 10^{-12} à 1s après les RI, les électrons périphériques de la matière biologique entraînent la formation de certaines espèces chimiques à fort pouvoir oxydant (Sakhuja, 2016).

1.2.1.2. Etape chimique

Les effets cellulaires et moléculaires des particules ionisantes sont initiés par la formation de radicaux libres et la création de lésions de différentes molécules dans la cellule (Amorati et al., 2016). L'eau (H_2O) constitue la majorité (~80%) d'un système biologique. La radiolyse de l'eau par les RI entraîne la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de H_2 et des radicaux libres tels que l'hydroxyle ($\bullet OH$) et l'hydrogène simple ($H\bullet$). A leur tour, ils se transforment rapidement en radicaux superoxydes ($O_2\bullet^-$)/perhydroxyles ($HO_2\bullet$). De plus, des radicaux organiques ($R\bullet$) et des radicaux peroxydes ($RO_2\bullet$) sont également formés par l'abstraction d'hydrogène et la réaction rapide avec l'oxygène moléculaire (Figure 2) (Le Caër, 2011).

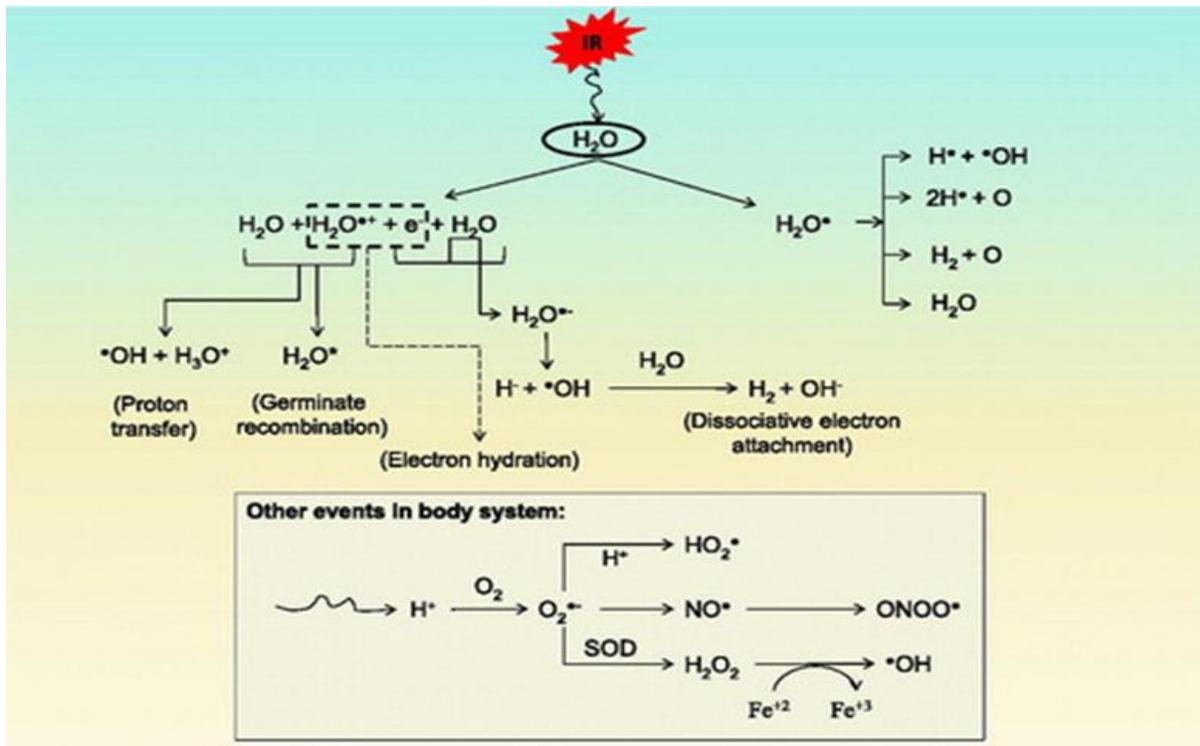


Figure 2 : Radiolyse de l'eau et production d'espèces réactives (Islam, 2017)

1.2.2. Effets cellulaires

1.2.2.1. Effets directs des rayonnements ionisants

Les RI peuvent provoquer des lésions par interaction directe avec une molécule d'ADN. Le passage d'un photon ou d'une particule produit une arborescence de dépôts d'énergie élémentaires aléatoirement espacés et des différentes densités d'énergie. Ces micro-dépôts sont responsables de la formation des modifications des bases constitutives de l'ADN, des cassures simple brin (CSB/SSB : single strand break) ou des cassures double brin (CDB/DSB : double strand break) (Prise and O'Sullivan, 2009; Santivasi and Xia, 2014).

1.2.2.2. Effets indirects des rayonnements ionisants

La radiolyse de l'eau peut produire des radicaux libres dans le milieu, comme les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN). Parmi ces espèces radicalaires, les $OH\cdot$ et $NO\cdot$ peuvent induire des dommages au niveau des bases de l'ADN, des pontages ADN-protéines, des cassures simple- (SSB) ou double-brin (CSB) (Figure 3). De plus, $OH\cdot$ et $ONOO\cdot$ provoquent également une peroxydation lipidique et une oxydation des protéines (Islam, 2017).

Une dose de 1 Gy délivrée à une cellule induit de 1000 à 2000 modifications de base, environ 200 lésions de pontages, 500 à 1000 CSB de l'ADN, environ 40 cassures de l'ADN. Tous ces dommages sont réparés par différents mécanismes qui sont généralement spécialisés pour un (ou plusieurs) type(s) de dommage (Prouillac et al., 2006)

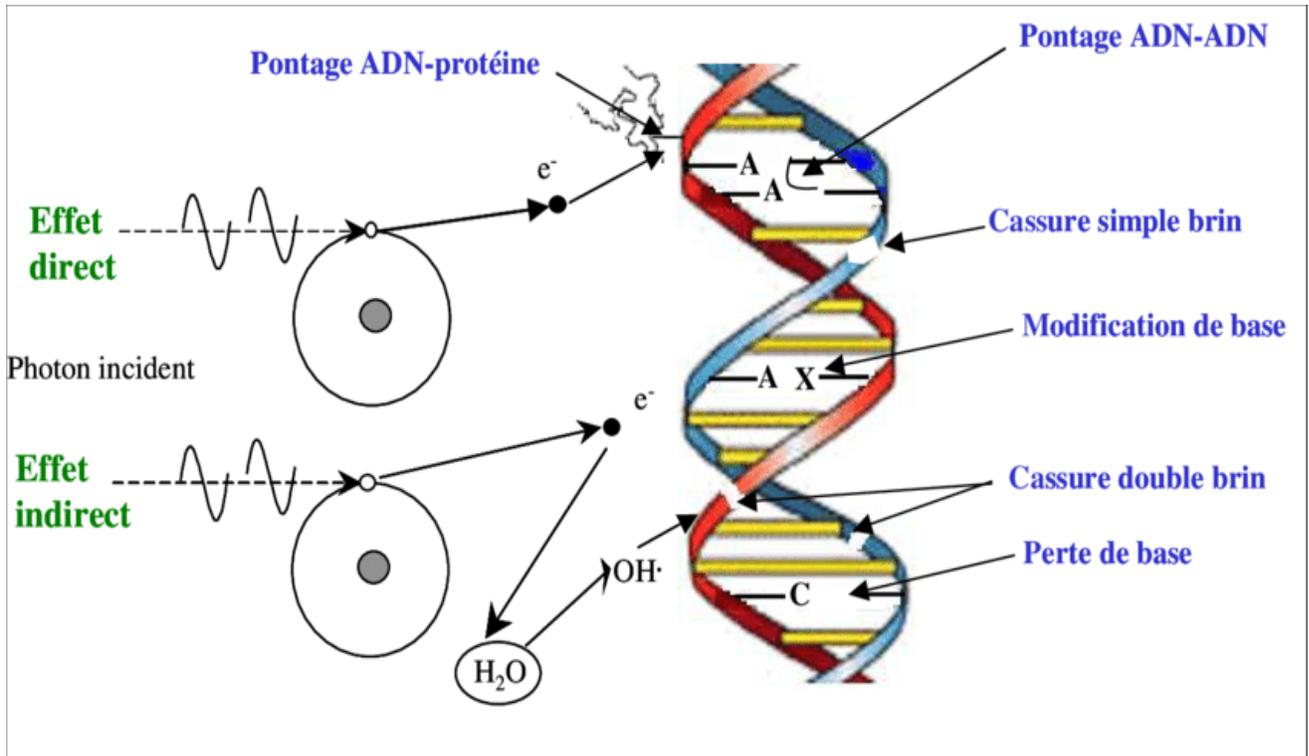
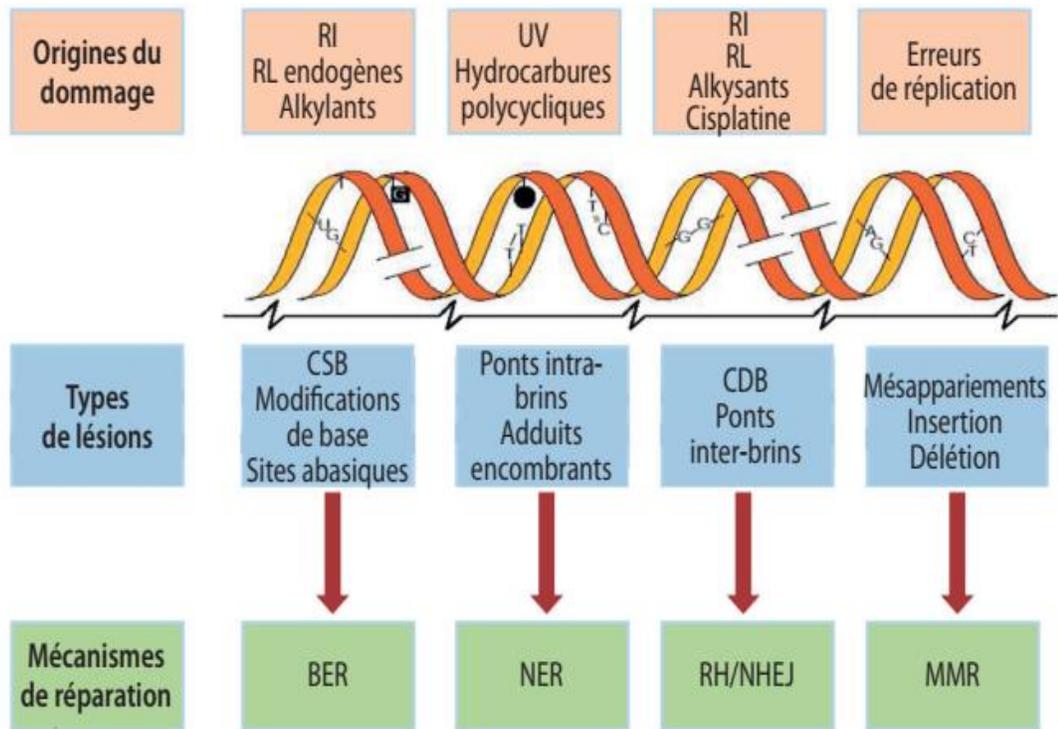


Figure 3: Représentation schématique des lésions de l'ADN induites par les effets directs et indirects des rayonnements ionisants (Prouillac et al., 2006).

1.2.3. Mécanismes de réparation de l'ADN et interactions avec les voies de signalisation

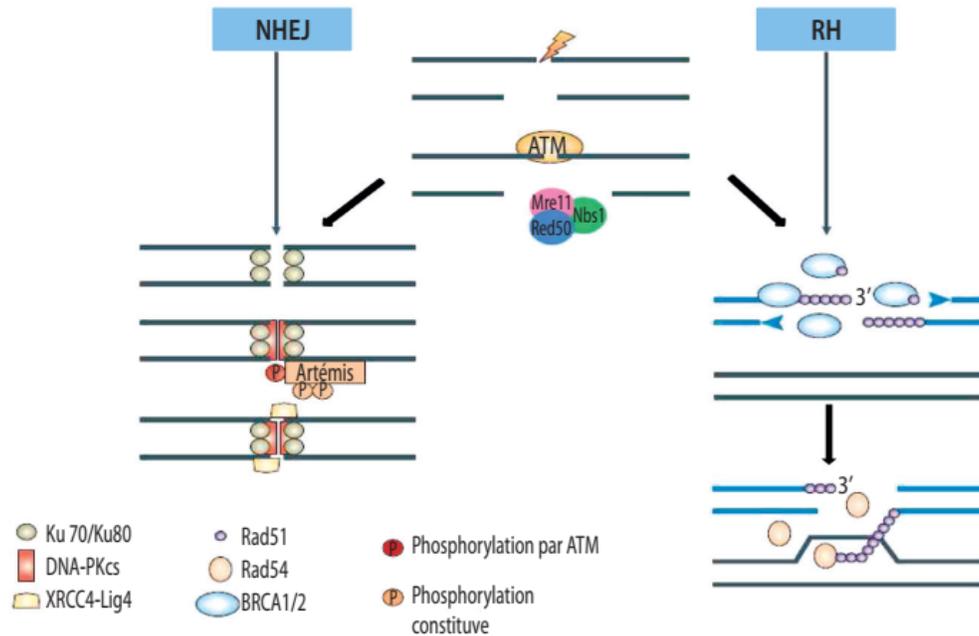
Quatre voies de réparation de l'ADN corrigent les dommages radio-induits (Figure 4) : (i) la réparation par excision de nucléotide (NER : nucleotide excision repair), (ii) la réparation par excision de base (BER : base excision repair), (iii) la réparation des mésappariements (MMR : mismatch repair) et enfin (iv) la réparation des CDB (Khalifa et al., 2012).



RI : radiations ionisantes. RL : radicaux libres. CSB : cassures simple-brin. CDB : cassures double-brin. BER : Base Excision Repair. NER : Nucleotide Excision Repair. MMR : Mismatch Repair. RH : recombinaison homologue. NHEJ : Non-Homologous End Joining.

Figure 4 : Les quatre voies principales de réparation de l'ADN (Khalifa et al., 2012).

Bodgi et Foray ont montré que les RI peuvent conduire à la conversion de dimères de la protéine mutée de l'ataxie télangiectasie (ATM) en monomères d'ATM. Les monomères d'ATM sont transloqués au sein du noyau (Bodgi and Foray, 2016) ce qui permet la phosphorylation de H2A.X (γ -H2A.X), la reconnaissance des CDB, et l'exécution de la réparation des CDB. Il a été montré qu'en moyenne un foci correspond à une cassure double-brin, et la cinétique de disparition de ces foci est corrélée à la vitesse de réparation des CDB (Rothkamm and Löbrich, 2003). Il y a deux voies de réparation des CDB : (i) la recombinaison homologue (RH/HR : homologous recombination), et (ii) la ligature des extrémités non homologues (NHEJ : nonhomologous end joining). La recombinaison homologue qui nécessite l'utilisation d'une molécule d'ADN homologue à la molécule lésée, peut intervenir à toutes les phases du cycle cellulaire. La ligature des extrémités non homologues prévaut vers la fin de la phase S et la phase G2 (Figure 5) (Santivasi and Xia, 2014).



RH: recombinaison homologue. *NHEJ*: Non-Homologous End Joining.

Figure 5: Signalisation des voies de réparations des CDB de l'ADN (Khalifa et al., 2012).

Les CDB peuvent stimuler la protéine suppressive de tumeur p53, qui peut ensuite entraîner l'activité de PUMA (PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis) et réguler les protéines pro-apoptotiques (Bak et Bax), et les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL). Les protéines pro-apoptotiques sont responsables de la mort cellulaire par apoptose (Dogu and Díaz, 2009).

Les ERO peuvent activer les voies de p53/ p21^{WAF1} et de p16^{Ink4a} /pRb et induire l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence. De fait, l'augmentation des ERO intracellulaires, active le locus d'inhibiteurs de la kinase 2A cycline-dépendante (CDKN2A : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A), notamment les gènes p16^{Ink4a} (p16) et p19^{Ink4d} (ARF). p16^{Ink4a} régule négativement la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), qui bloque certains gènes prolifératifs induisant un arrêt permanent du cycle cellulaire. De plus, la réponse aux dommages de l'ADN (DDR : DNA damage response) active non seulement la voie p16/Rb, mais également le suppresseur de tumeur p53, qui active la transcription du gène p21^{WAF1} (p21), ce qui provoque la sénescence et l'arrêt permanent du cycle cellulaire. De plus, les ERO induisent également la stimulation de la p38-Mitogen-Activated Protein Kinase (p38MAPK) et de la protéine kinase C (PKC), activant le facteur de transcription nucléaire kappa-B (NF-κB), qui contribue à l'expression de gènes de nombreuses cytokines et chimiokines (Islam, 2017; Liauw et al., 2013; Maier et al., 2016). La figure 6 ci-dessous illustre ces processus.

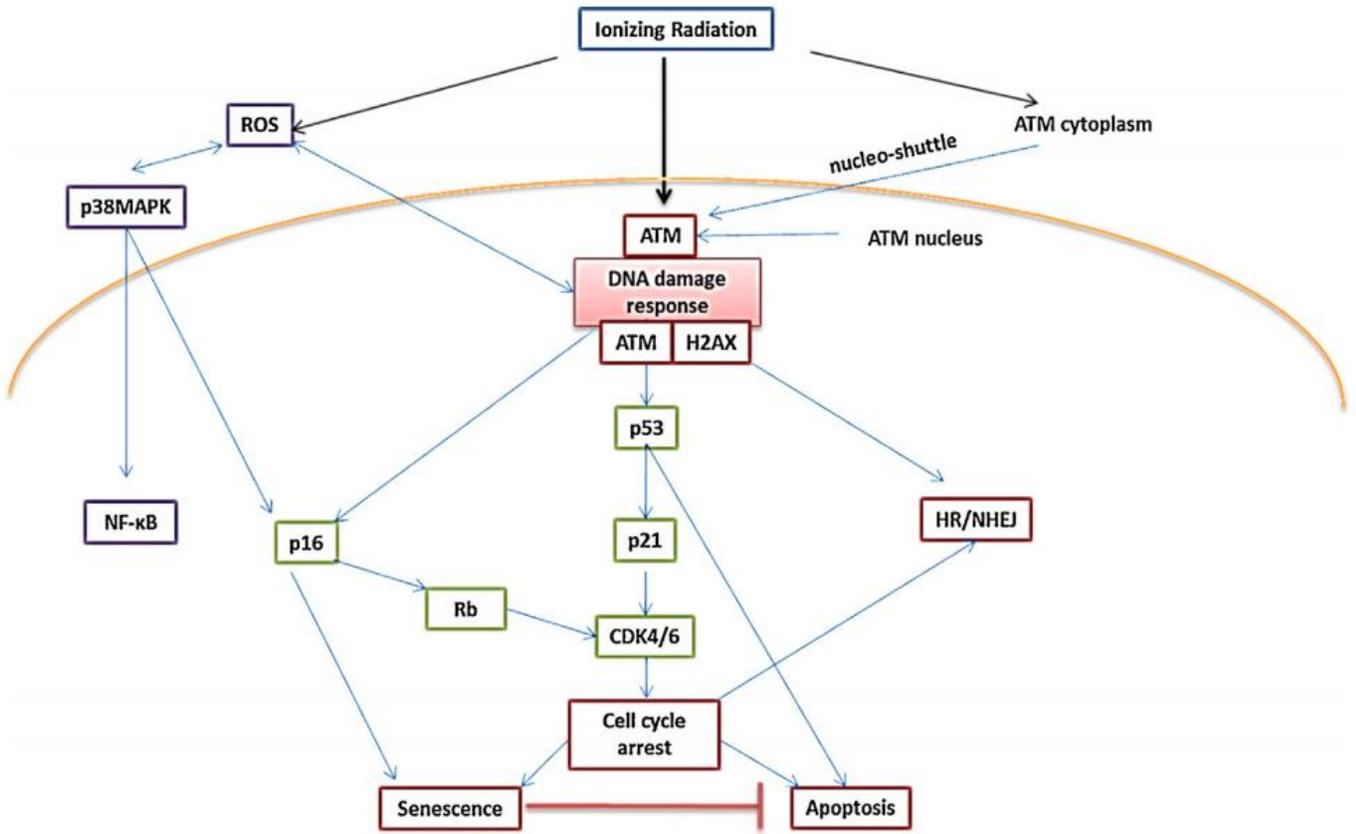


Figure 6: Schéma général des voies de signalisation en radiobiologie (Nguyen et al., 2018).

1.2.4. Mort cellulaire

1.2.4.1. Apoptose radio-induite

Les RI peuvent induire principalement la voie apoptotique intrinsèque (la libération du cytochrome c des mitochondries et la formation d'apoptosome). Cependant, selon la dose et le type cellulaire, l'activation de la voie apoptotique extrinsèque ou la voie apoptotique du stress membranaire peut être une conséquence de l'exposition aux RI (Figure 7).

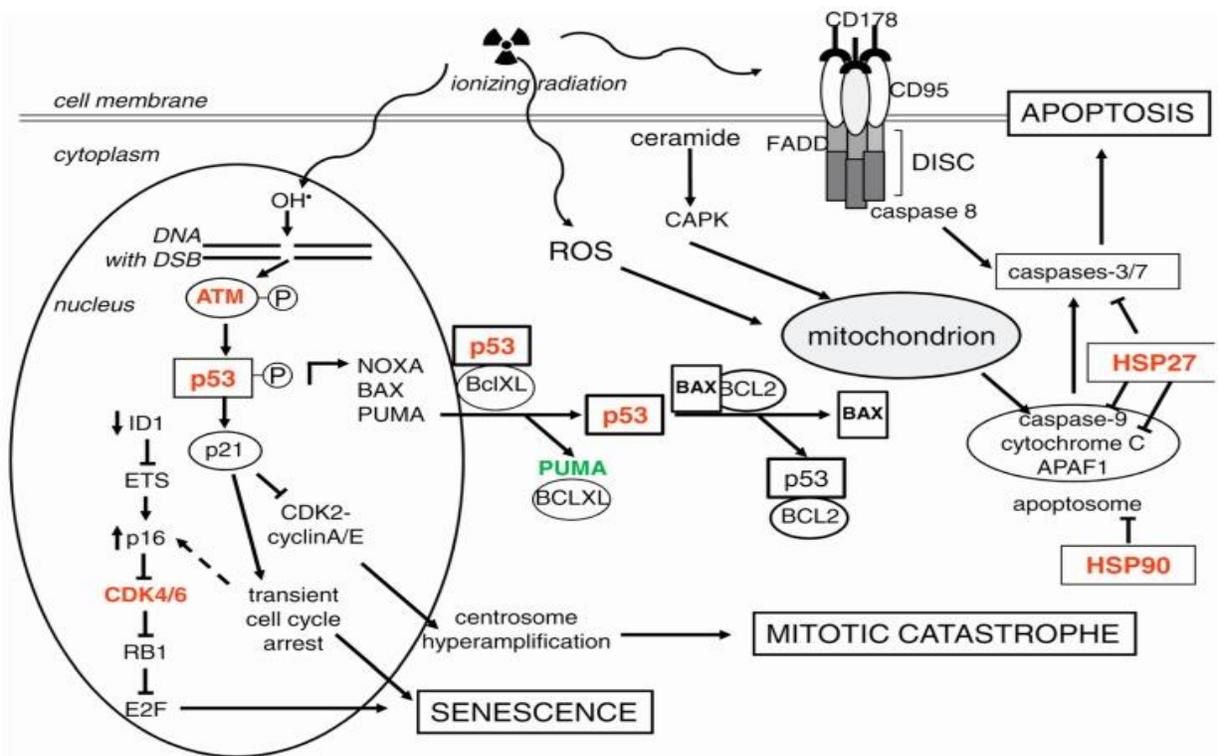


Figure 7 : Les voies de signalisation de mort cellulaire après exposition aux RI (Maier et al., 2016).

1.2.4.1.1. La voie apoptotique intrinsèque

Le contrôle et la régulation des événements mitochondriaux apoptotiques sont assurés par des membres de la famille des protéines Bcl 2 (B-cell lymphoma 2), qui gouvernent la perméabilité de la membrane mitochondriale. Les protéines Bcl 2 peuvent être pro-apoptotiques ou anti-apoptotiques. L'accumulation nucléaire de p53 par la voie ATM/p53 suite aux dommages de l'ADN active l'expression des gènes pro-apoptotiques, tels que PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis), Bax (BCL2-associated X protein). Après sa translocation dans le cytoplasme, PUMA perturbe un complexe formé par p53 et la protéine anti-apoptotique Bcl2 L1 (Bcl 2-like 1 ou Bcl-XL). La p53 libérée dissout le complexe formé de Bcl 2 (anti-apoptotique) et de Bax (pro-apoptotique), et BAX libéré déclenche la mort cellulaire suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, puis libération du cytochrome c. De plus, les RI peuvent augmenter la production d' $O_2\cdot$ par les mitochondries, ce qui également déclenche la libération de cytochrome c. La libération de cytochrome c dans le cytosol conduit à la formation du complexe apoptosome contenant le cytochrome c/APAF1 (apoptotic protease activating factor 1)/caspase-9 (cysteinyl aspartate-specific proteinase). La caspase-9 active les caspases-3 et -7, aboutissant à l'apoptose intrinsèque par dégradation de substrats cellulaires du noyau et du cytoplasme (Cain et al., 1999; Dogu and Díaz, 2009; Kuribayashi et al., 2011).

1.2.4.1.2. La voie apoptotique extrinsèque

L'apoptose radio-induite peut également être exécutée par la voie de l'apoptose extrinsèque canonique dépendante des récepteurs de mort (DR : death receptors), qui appartiennent à la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR : tumor necrosis factor receptor). L'activation de la voie ATM/p53 suite aux dommages à l'ADN induits par les RI, peut activer transcriptionnellement l'expression du récepteur CD95 (Fas). L'expression de ligand de Fas (FasL) peut aussi être induite par des RI. La liaison de FasL à Fas entraîne la trimérisation de Fas et le regroupement des domaines de mort (DD : death domain) intracellulaires qui recrutent l'adaptateur FADD (Fas-associated death domain). Ensuite, la procaspase-8 interagit avec le DD de FADD, formant ainsi le complexe de signalisation induisant la mort (DISC : death-inducing signaling complex). L'activation de caspase-8 entraîne l'activation de procaspase-3 et de procaspase-7, induisant l'apoptose (Chen et al., 1996; Scaffidi et al., 1998).

1.2.4.1.3. La voie apoptotique du stress membranaire

Contrairement aux processus apoptotiques dépendant des dommages à l'ADN, les processus apoptotiques indépendant des dommages à l'ADN ne nécessitent pas l'activation de p53. Les ERO produites induisent la peroxydation lipidique dans la membrane plasmique, ce qui entraîne l'activation de la sphingomyélinase, suivie d'une hydrolyse rapide de la sphingomyéline de la membrane plasmique, libérant un second messager, le céramide. La cible la plus importante du céramide est la voie RAC1/MEKK, qui conduit directement à l'activation de MAPK8 et des effecteurs caspases-1, -3 et -6, ainsi qu'à la stimulation du récepteur de mort Fas et son ligand FasL. La MAPK8 a été impliqué dans l'apoptose induite par le TNF (tumor necrosis factor) (Liao et al., 1999b; Maier et al., 2016; Verheij et al., 1998).

1.2.4.2. Mort cellulaire par nécrose

La mort cellulaire par nécrose est caractérisée par une augmentation du volume cellulaire, une dilatation des organites, une rupture de la membrane cellulaire et une perte conséquente du matériel intracellulaire. La nécrose est considérée comme une forme de mort cellulaire accidentelle et non contrôlée, mais les auteurs considèrent de plus en plus qu'elle serait finement régulée par un ensemble de voies de signalisation et de processus cataboliques (Festjens et al., 2006; Golstein and Kroemer, 2007). En effet, des récepteurs aux domaines de mort (TNFR1, Fas/CD95 et TRAILR) ainsi que des récepteurs Toll-like (TLR3 et TLR4) ont été impliqués dans le phénomène nécrotique. La mort cellulaire médiée par les récepteurs TNFR1, Fas/CD95, TRAILR et TLR 3 dépendrait de la kinase RIP1. La nécrose programmée (nécroptose) présente un certain chevauchement avec l'apoptose. C'est un mécanisme de la mort cellulaire nécrotique induit par des stimuli apoptotiques, c'est-à-dire un engagement ligand-DR, dans des conditions où la machinerie apoptotique est déficiente ou bloquée (Degterev and Yuan, 2008; Jonathan et al., 1999).

1.2.4.3. Catastrophe mitotique radio-induite

La catastrophe mitotique a été caractérisée comme la principale forme de mort cellulaire induite par des RI, et résulte d'une induction prématurée de la mitose avant la complétion des phases S et G2. Elle peut être accompagnée par des altérations morphologiques, telles que la formation de cellules géantes avec une morphologie nucléaire aberrante, de multiples noyaux ou de plusieurs micro-noyaux. Les micro-noyaux résultent souvent d'une distribution non équitable des chromosomes ou de fragments de chromosomes entre les noyaux des cellules-filles. Les multiples noyaux résultent d'une séparation déficiente au moment de la cytokinèse, à l'origine de cellules possédant plusieurs noyaux. L'inhibition ou l'inactivation de protéines contrôlant le point de contrôle G2 du cycle cellulaire, telles que ATM, ATR, CHK1, CHK2, et p21, favorise la catastrophe mitotique (Hirose et al., 2005). La catastrophe mitotique peut entraîner la mort cellulaire soit pendant la phase M, soit pendant l'interphase suivante. Au cours de la métaphase, des voies apoptotiques sont activées dans certaines cellules, entraînant une apoptose de type retardé jusqu'à quelques jours après les RI (Galluzzi et al., 2007; Weaver and Cleveland, 2005).

1.2.5. Sénescence radio-induite

La sénescence est un état d'arrêt irréversible de la prolifération cellulaire combiné avec le maintien du métabolisme. La sénescence peut être, soit répllicative et être provoquée par un raccourcissement des télomères, soit accélérée en réponse à un stress de la cellule : dommages à l'ADN, stress par des agents thérapeutiques, activation d'oncogène, stress oxydant. L'activation de la voie p53/p21 peut induire un arrêt permanent du cycle en G1 et provoquer une sénescence. La sénescence radio-induite est souvent appelée sénescence prématurée induite par le stress (SIPS : stress-induced premature senescence). La plupart des cellules normales de type p53 sauvage répondent aux RI en subissant une SIPS. Dans les cellules normales, les voies p53/p21 et p16/Rb1 agissent comme des points de contrôle de la sénescence déterminant l'arrêt de la croissance (Maier et al., 2016; Nguyen et al., 2018).

1.2.6. Autophagie radio-induite

L'autophagie radio-induite peut impacter les cellules normales et cancéreuses (Kim et al., 2015). L'autophagie est une étape catabolique intracellulaire indispensable à la dégradation et au recyclage de protéines, de ribosomes, mais également d'organites tels que les mitochondries, l'appareil de Golgi, dans des vésicules à double membrane appelées autophagosomes. Dans certaines cellules, une dégradation lysosomale peut être suivie d'une apoptose, mais les cellules survivantes utilisent les métabolites comme source d'énergie. L'autophagie joue un double rôle au cours de la cancérogenèse : le développement des cellules tumorales est retardé car les mitochondries endommagées sont éliminées, cependant, il a été proposé que l'autophagie soit responsable de la radiorésistance en éliminant les ERO des cellules tumorales. (Dittmann et al., 2005; Pattingre and Levine, 2006).

1.3. Sensibilité des cellules immunitaires aux rayonnements ionisants

Le compartiment des cellules hématopoïétiques est particulièrement sensible aux RI. Par exemple, les patients exposés à la RT corporelle totale de 1–2 Gy sont caractérisés par une diminution du compartiment hématopoïétique (Luo-Owen et al., 2012; Zhang et al., 2017). Parmi les cellules hématopoïétiques, les lymphocytes sont particulièrement sensibles à la mort cellulaire radio-induite (Deloch et al., 2016; Schaeue, 2017). Cependant, la radiosensibilité des sous-populations de lymphocytes peut présenter une grande variabilité. Il a été montré que les lymphocytes B, les lymphocytes T naïfs, les lymphocytes T effecteurs-mémoire et les cellules NK sont sensibles à l'apoptose radio-induite, alors que les lymphocytes T régulateurs sont plus résistantes à l'apoptose radio-induite (Cao et al., 2011; Liu et al., 2015, 2018). De plus, une étude de 1995 a révélé une radiosensibilité plus élevée des lymphocytes effecteurs de type Th2 par rapport aux lymphocytes effecteurs de type Th1 (DeKruyff et al., 1995). En raison de leur radiosensibilité élevée et de leur accessibilité facile, les lymphocytes sanguins sont fréquemment utilisés en biodosimétrie (Ozsahin et al., 1997).

D'autres effets directs décrits dans les lymphocytes irradiés se concentrent sur la réponse de transcription de ces cellules aux RI (Gridley et al., 2009). Les études ont révélé qu'une majorité des gènes fortement activés sont des cibles de p53, comme le gène DDB2 (DNA damage bindings protein 2), le gène Bax, et le gène TNFRSF10b (TNF Receptor Superfamily Member 10b), impliqués respectivement dans la réparation de l'ADN et la régulation de l'apoptose (Mori et al., 2005).

2. Toxicité radio-induite et processus biologiques

2.1. Généralités sur la toxicité radio-induite

La radiothérapie (RT) occupe une place essentielle dans le traitement des cancers. En moyenne 60% des patients atteints d'un cancer auront besoin d'une RT à un moment de leur traitement. En plus de son potentiel curatif, la RT joue également un rôle-clé dans les soins palliatifs, notamment pour la douleur, le saignement et la compression nerveuse. La RT peut être faite de façon exclusive ou associée à un autre traitement, soit chirurgical, soit médical (chimiothérapie, hormonothérapie, biothérapie ciblée) (Liauw et al., 2013).

Les protocoles de RT sont définis principalement en fonction du type de tumeur. Les paramètres de la RT comme la dose totale, la dose par fraction et le débit de dose, sont définis systématiquement pour chaque traitement. Le fractionnement est choisi selon de multiples critères d'efficacité en tenant compte du risque de toxicité liée à l'exposition des organes à risque situés à proximité de la cible tumorale (Liauw et al., 2013; Santivasi and Xia, 2014).

Environ 20 % des patients atteints de cancers peuvent présenter des dommages tissulaires tardifs après une RT. Les complications radio-induites entraînent une perte de la fonction des tissus et des organes. C'est une cause importante de morbidité et de mortalité. Le tableau 1 ci-dessous décrit les principales toxicités selon les organes.

Organes très radiosensibles	
Ovaire	Stérilité temporaire/définitive
Testicule	Stérilité temporaire/définitive
Cristallin	Cataracte
Rein	Néphrite radique
Foie	Hépatite radique
Moelle	Aplasie médullaire
Organes radiosensibles	
Intestin grêle	Grêle radique, perforation
Colon	Sténose, perforation
Rectum	Rectite radique, perforation
Poumon	Insuffisance respiratoire
Cœur	Péricardite
Peau	Radiodermite, fibrose, télangiectasie
Organes peu radiosensibles	
Os	Ostéoradionécrose
Muscle	Rétraction musculaire
Tissu conjonctif	Fibrose

Tableau 1 : Principaux organes à risque en radiothérapie et complications cliniques associées (D'après le guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO).

2.2. D'un point de vue biologique

2.2.1. Généralités sur la fibrose

La fibrose est caractérisée par une accumulation excessive de composants de la matrice extracellulaire (MEC), notamment des collagènes, de la fibronectine et de l'acide hyaluronique au site de la lésion tissulaire, entraînant une diminution de la fonction de l'organe, pouvant aller jusqu'à sa défaillance, et des problèmes esthétiques qui ont un impact significatif sur la qualité de vie des patients (Borthwick et al., 2013).

2.2.2. Fibrose radio-induite

Le traitement par les RI déclenche une réponse inflammatoire et stimulent la réparation tissulaire. En effet des lésions immédiates peuvent apparaître et entraîner une perte du parenchyme, de la fonction de barrière protectrice et une inflammation aiguë. Bien que cette inflammation aiguë soit considérée comme essentielle à la réparation de la lésion, elle peut entraîner des dommages supplémentaires, un stress oxydatif et éventuellement un remodelage tissulaire et une inflammation chronique (Citrin et al., 2017; Huet et al., 2019 & annexe 2). Les effets secondaires radio-induits tardifs résultent d'une inflammation persistante soutenant la production de facteurs de croissance, d'enzymes protéolytiques, de facteurs angiogéniques, de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques (Figure 8). Tous ces facteurs contribuent au remodelage des tissus et au dépôt de matrice extracellulaire, et favorisent ainsi la fibrose.

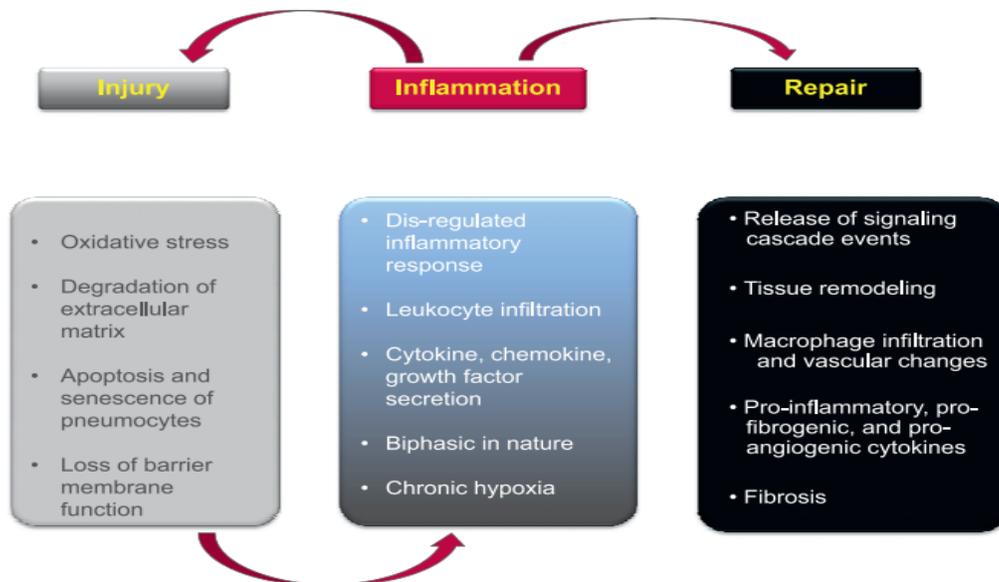


Figure 8 : Mécanismes de fibrose : les lésions, l'inflammation et la réparation jouent chacun un rôle dans la fibrose radio-induite (Citrin et al., 2017).

2.2.2.1. Cellules impliquées dans le développement de la fibrose radio-induite

Différents types cellulaires contribuent au développement de la fibrose : les myofibroblastes ainsi que les cellules épithéliales, endothéliales et immunitaires. L'activation de ces cellules entraîne le remodelage tissulaire. Les principales cellules impliquées dans le développement de la fibrose sont les myofibroblastes, provenant principalement des fibroblastes (Chen et al., 2016; Wynn and Ramalingam, 2012). Les myofibroblastes peuvent également provenir d'autres types de cellules par le processus de différenciation ou de transition épithélio/endothélio-mésenchymateuse (EMT : Epithelial to Mesenchymal Transition , EndMT : Endothelial to Mesenchymal Transition) (Nagaraja and Nagarajan, 2018).

Dans des conditions physiologiques, les myofibroblastes jouent un rôle critique dans la fermeture des berges d'une plaie lors d'une cicatrisation primaire après une blessure. Après la cicatrisation de la plaie et la restauration de la MEC, les myofibroblastes subissent une apoptose ou une dédifférenciation et retournent à leur état quiescent. Cependant, des plaies qui ne guérissent pas correctement contiennent des myofibroblastes persistants laissant une cicatrice chéloïde ou hypertrophique. L'activation des myofibroblastes persiste au moyen de boucle de signalisation autocrine/paracrine des facteurs de croissance ou des cytokines inflammatoires (Huang et al., 2017; Judge et al., 2015).

2.2.2.2. Facteurs impliqués dans le développement de fibrose radio-induite

Les RI peuvent induire la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance tels que le facteur de croissance TGF- β (transforming growth factor-beta), principal facteur profibrotique jouant un rôle essentiel dans l'initiation de la fibrose (Lierova et al., 2018). De plus, les ERO induites par les RI, qui activent le TGF- β . Les ERO sont aussi l'un des signaux qui aident à maintenir le phénotype des myofibroblastes. L'impact des ERO sur la voie de signalisation TGF- β est aussi étudié dans le contexte de la fibrose radio-induite.

2.2.2.2.1. TGF- β

Les RI peuvent activer TGF- β , qui joue un rôle critique dans le processus de fibrose (Lierova et al., 2018). Une fois lié à son récepteur, le TGF- β entraîne l'activation des voies de signalisation SMAD, qui stimulent la prolifération et la différenciation des fibroblastes et l'accumulation aberrante de protéines de la matrice extracellulaire associée à une diminution de la dégradation de ces mêmes protéines (Figure 9). Ces modifications peuvent conduire à une hypoxie des tissus, qui contribue également à la progression de la fibrose (de Andrade et al., 2017).

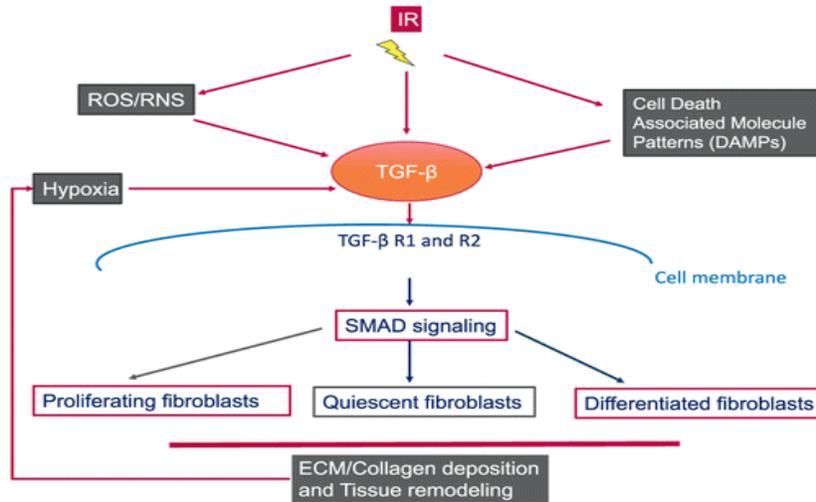


Figure 9 : Rôle central du TGF-β dans la fibrose radio-induite (Citrin et al., 2017).

2.2.2.2.2. Modifications de la signalisation du TGF-β par les espèces réactive de l'oxygène (ERO) dans la fibrose radio-induite

Les RI induisent la génération des ERO, qui induisent des modifications épigénétiques des cellules de fibroblastes. Les ERO peuvent également être générés directement à cause des dommages causés dans les mitochondries. Cela conduit à l'activation de la voie de signalisation TGF-β, qui favorise à son tour l'augmentation des niveaux des ERO en augmentant l'expression de NOX4 (Figure 10). Ceci crée ainsi un cercle vicieux de stress oxydatif élevé entraînant des modifications de l'épigénome des fibroblastes et résultant dans le développement de la fibrose (Citrin et al., 2017; Li et al., 2019).

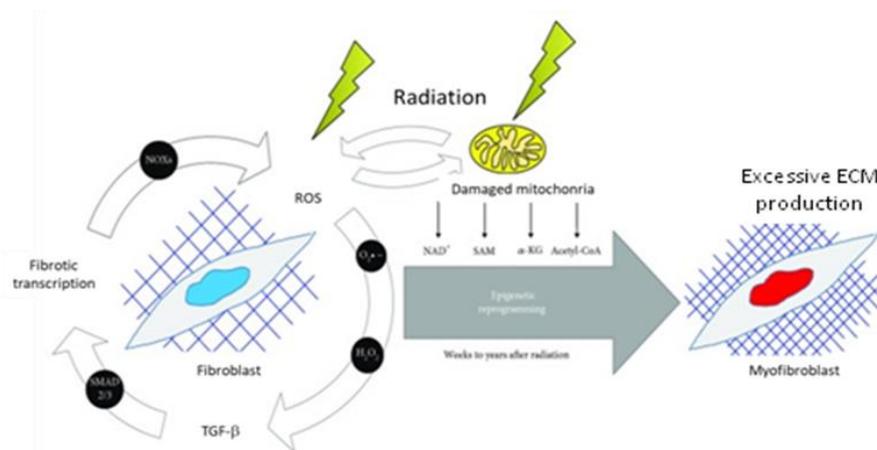


Figure 10 : Les RI induisent la génération des ERO et la fibrose (Citrin et al., 2017). (NOX : NADPH oxydases; NAD + : nicotinamide adénine dinucléotide; SAM : S- adénosylméthionine; α-KG : α-cétoglutarate; ECM : matrice extracellulaire)

2.2.2.3. La fibrose est favorisée par la sénescence accélérée radio-induite

Des travaux récents ont montré que la sénescence cellulaire joue un rôle important dans le développement des dommages de tissus sains, telles que les maladies cardiovasculaires (Wang et al., 2016), la fibrose (Beach et al., 2017; He et al., 2019; McCart et al., 2017). Les RI peuvent induire la sénescence cellulaire dans les épithéliums, l'endothélium (Lafargue et al., 2017; Ungvari et al., 2013; Wang et al., 2016), les fibroblastes (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014; Liakou et al., 2016; Papadopoulou and Kletsas, 2011; Schafer et al., 2017; Tsai et al., 2009), les astrocytes (Turnquist et al., 2019), les cellules de gliome (Zhang et al., 2019), les cellules immunitaires (Liu et al., 2018; Ye et al., 2012), et les cellules stromales/cellules souches mésenchymateuses (Alessio et al., 2014; McCart et al., 2017; Xu et al., 2015; Zhu et al., 2015). Le SASP interagit avec les cellules du microenvironnement par une boucle d'endocrine ou paracrine, lesquelles excrètent des facteurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques (Borodkina et al., 2018; Zhang et al., 2018). D'après une étude récente, les auteurs suggèrent que les irradiation corporelle totale peut induire une sénescence dans l'intestin grêle et promouvoir les dommages de tissus sains des souris irradiées (Zhao et al., 2019). Dans notre récente revue, nous avons fait le point sur ce sujet afin de mieux comprendre le rôle de la sénescence dans le processus de fibrose radio-induite (Nguyen et al., 2018).

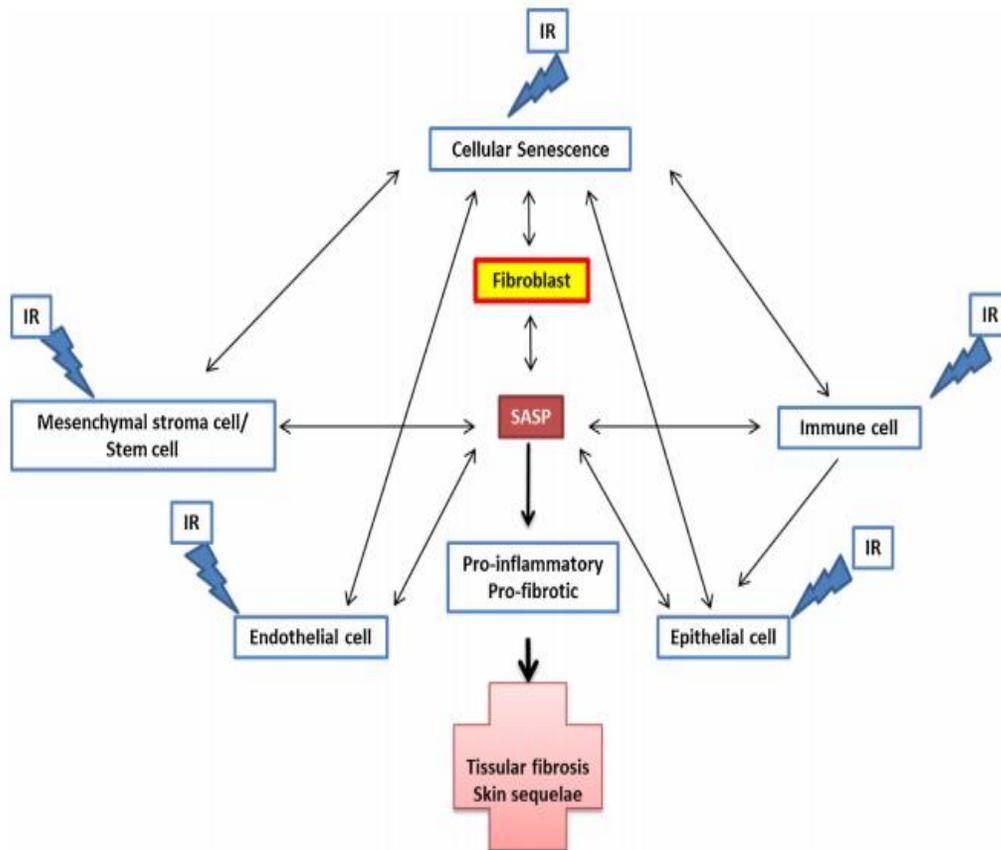


Figure 11 : Fibrose et Sénescence accélérée radio-induite (Nguyen et al., 2018)

2.2.3. Exemples de toxicités radio-induites

2.2.3.1. Fibrose cutanée radio-induite : de la biologie à la clinique

2.2.3.1.1. Biologie

Les lésions radio-induites cutanées déclenchent l'inflammation et stimulent finalement la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Ces myofibroblastes sécrètent un excès de collagène et d'autres composants de la MEC en association avec une réduction de la production des enzymes de remodelage ce qui se traduit par une accumulation des protéines matricielles (Straub et al., 2015). De plus, le TGF- β contribue à une multitude de fonctions, telles que le contrôle de la dégradation du tissu conjonctif, l'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales et l'induction de la synthèse des collagènes, et des TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) afin de favoriser le processus de la fibrose. Le détail de la fibrose cutanée radio-induite est présentée dans notre article de revue ci-après.

2.2.3.1.2. Manifestations cliniques et pathologiques des lésions cutanées radio-induites

Les lésions cutanées causées par les RI se manifestent par un érythème précoce et une desquamation sèche ou humide (Figure 12). De plus, certaines lésions humides progressent par la suite en lésions cutanées subaiguës et chronique, comme la fibrose. La fibrose radio-induite réduit la qualité de vie des patients après le traitement, et il n'existe pas de traitement spécifique pour atténuer ce problème (Ginot et al., 2010).



Figure 12 : Fibrose cutanée radio-induite (Ginot et al., 2010).

- A. Radiodermite chronique de grade 3 avec fibrose et rétraction cutanée supérieure
- B. Radiodermite chronique de grade 4 avec ulcération/nécrose et hyperpigmentation

2.2.3.2. Fibrose pulmonaire radio-induite : de la biologie à la clinique

2.2.3.2.1. Biologie

Des études ont démontré que les RI pulmonaires activaient faiblement le TGF- β le premier jour et l'activaient fortement 14 jours après les RI. Cela suggère que des cellules bronchiques et alvéolaires peuvent participer au processus complexe de fibrose pulmonaire induite par les RI en jouant le rôle de sources cellulaires de TGF- β actif. De plus, une exposition prolongée au TGF- β initie et maintient l'EMT dans divers systèmes biologiques et active des voies de signalisation SMAD, qui peuvent stimuler la prolifération des fibroblastes et l'accumulation aberrante de protéines, d'inhibiteurs des MMPs qui contribuent également à la progression de la fibrose (Wirdorffer et Jendrossek, 2016; Ding et al., 2013).

2.2.3.2.2. Manifestations cliniques et pathologiques des lésions pulmonaires radio-induites

Les lésions pulmonaires induites par les rayonnements sont généralement divisées en deux formes : pneumonie et fibrose chronique. La pneumonie se caractérise par une inflammation aiguë apparaissant dans les 3 premiers mois d'exposition aux RI et comporte un risque de complications pulmonaires importantes conduisant à une détresse respiratoire et à une défaillance d'organe qui se manifestent par des modifications inflammatoires et fibrotiques (Figure 13). La fibrose radio-induite du poumon est une réponse retardée à la radiothérapie qui peut se développer des mois, voire des années après l'exposition aux RI (Ghaye et al., 2016). Elle aboutit à une fibrose entraînant un dysfonctionnement respiratoire et une réduction de la qualité de vie.

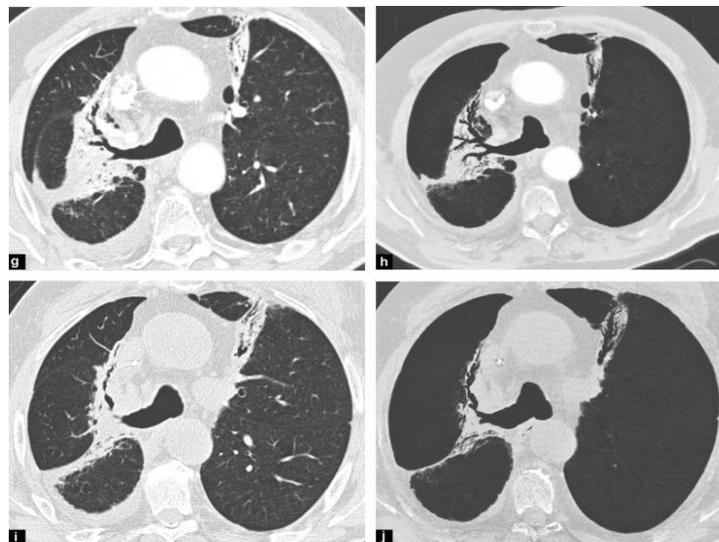


Figure 13 : La fibrose pulmonaire radio-induite (Ghaye et al., 2016).

2.2.3.3. Toxicité gastro-intestinale radio-induite : de la biologie à la clinique

2.2.3.3.1. Biologie

Il est devenu évident que les complications associées à la rectite radio-induite impliquent une coordination entre les processus de fibrose et d'angiogenèse. Les altérations cellulaires du système vasculaire, notamment la néovascularisation et les télangiectasies, entraînent des symptômes cliniques de saignement persistant, alors que la fibrose provoque une ischémie et éventuellement une nécrose du tissu intestinal (Mancini and Sonis, 2014). Cependant, les mécanismes exacts des modifications tardives de la vascularisation et de la fibrose doivent encore être élucidés. A ce jour, il est prouvé que plusieurs facteurs de croissance, notamment le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF : Platelet-Derived Growth Factor), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF : Vascular endothelial growth factor), et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF : fibroblast growth factor) jouent un rôle clé dans la pathologie (Brenn and Fletcher, 2006). D'autres études suggèrent une implication des mastocytes conduisant à l'expression synergique de gènes endothéliaux et inflammatoires en réponse aux RI (Blirando et al., 2011).

2.2.3.3.2. Manifestations cliniques et pathologiques des lésions gastro-intestinales radio-induites

Les symptômes et les signes de lésions gastro-intestinales radio-induites peuvent survenir pendant ou après la RT. Les symptômes les plus importants de toxicité gastro-intestinale aiguë sont les nausées/vomissements, les diarrhées, ainsi que les douleurs abdominales et rectales. Les lésions gastro-intestinales chroniques se développent généralement 3 à 4 mois après la fin de la RT, par exemple une rectite, une sténose, une télangiectasie, une congestion muqueuse, une ulcération, une nécrose. Les ulcérations peuvent se manifester par des saignements ou des fistulisations en profondeur (de Parades et al., 2007).



Figure 14 : La rectite radio-induite en endoscopie (de Parades et al., 2007).

A. Rectite radique télangiectasie

B. Rectite radique congestive

2.2.4. La réponse immunitaire dans le développement de la fibrose.

Les RI induisent des lésions des cellules résidentes des tissus, telles que les cellules endothéliales et épithéliales, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ainsi que des cellules immunitaires. Les dommages cellulaires résultants peuvent initier des réponses au stress, l'hypoxie tissulaire ou la mort cellulaire des cellules voisines avec libération ultérieure de cytokines/chimiokines et de composants moléculaires associés aux dommages (DAMP : damage-associated molecular patterns) modifiant ainsi le microenvironnement tissulaire. Cette réaction initiale aux dommages induits par les RI conduit au recrutement et à l'activation de diverses cellules immunitaires dont les lymphocytes, et favorisent une libération de cytokines par ces cellules immunitaires. Enfin, les transitions EMT, EndMT, la différenciation des cellules souches mésenchymateuses ainsi que la modification de l'environnement contribuent à l'activation de myofibroblastes entraînant le dépôt de collagène et menant, finalement, à une fibrose radio-induite (Wirsdörfer and Jendrossek, 2016).

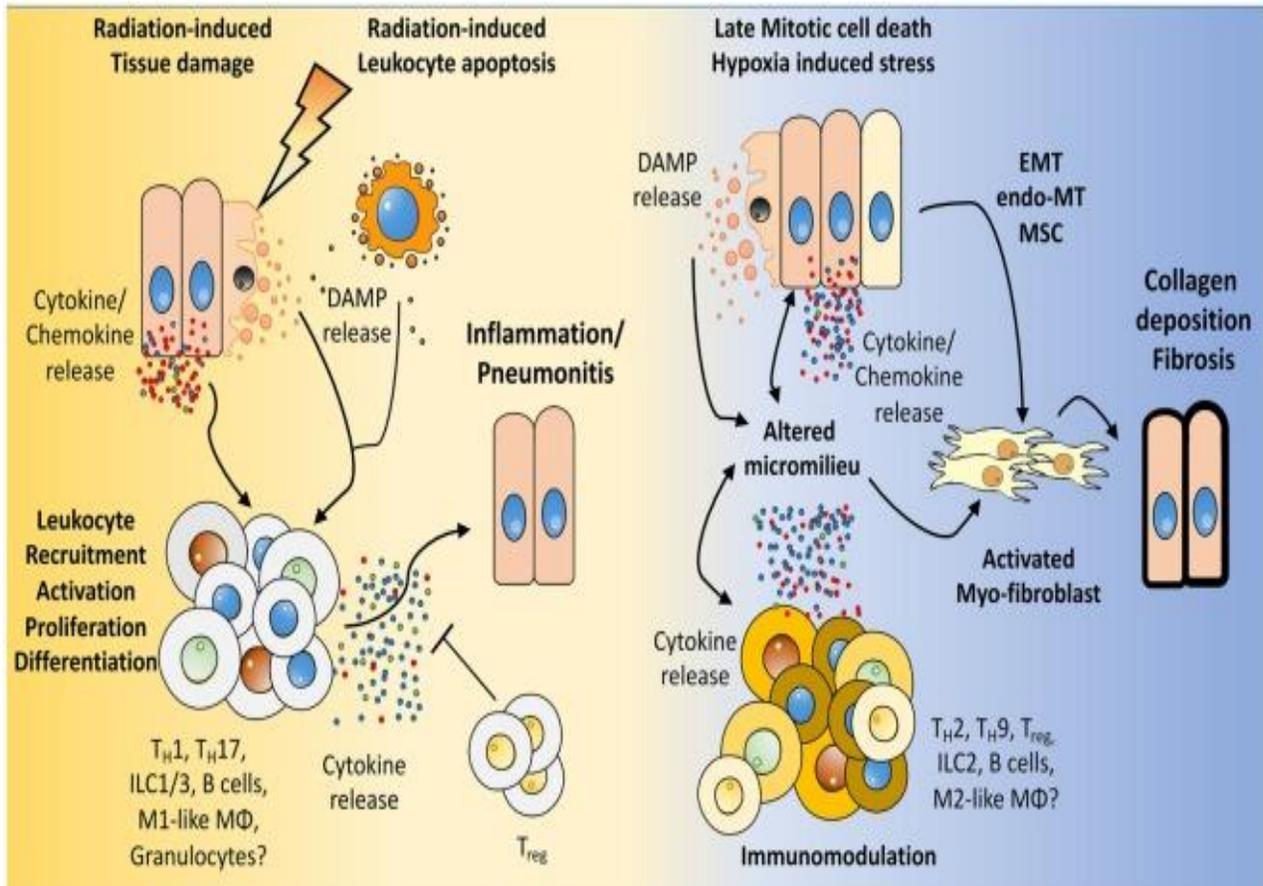


Figure 15 : Effets des RI sur la réponse immunitaire (Wirsdörfer and Jendrossek, 2016).

2.2.4.1. Les lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺)

Activation des lymphocytes T CD4⁺ effecteurs / mémoire

Les lymphocytes T CD4⁺ représentent une population hétérogène de lymphocytes jouant un rôle essentiel dans l'immunité adaptative. Ces lymphocytes comprennent les lymphocytes T auxiliaires (T helper : Th) effecteurs, qui interviennent dans la protection contre les agents pathogènes et les lymphocytes T régulateurs (Treg) aux fonctions immunosuppressives.

Les lymphocytes T matures, préalablement différenciés dans le thymus, expriment un récepteur spécifique d'antigène TCR (T cell receptor) et peuvent exprimer soit la glycoprotéine CD8 à leur surface et sont appelées lymphocytes TCD8⁺ (cytotoxiques), ou bien la glycoprotéine CD4 à leur surface et sont appelées lymphocytes T CD4⁺. Lors du premier contact avec un antigène spécifique présenté dans les organes lymphoïdes secondaires via des cellules présentatrices d'antigène (APC : Antigen-Presenting Cell), les clones de lymphocytes TCD4⁺ naïfs spécifiques se différencient en lymphocytes T effecteurs, avec une variété de phénotypes fonctionnels, Th ou Treg, en fonction de leur microenvironnement cytokinique, puis les Th migrent vers le site de l'infection et y éliminent l'agent pathogène, et sont régulés par les Treg. Le terme Th provient de l'observation selon laquelle ces lymphocytes étaient essentiels pour aider les lymphocytes B à produire des anticorps lors de la réponse immunité humorale (Raphael et al., 2015).

Les lymphocytes effecteurs sont des lymphocytes à vie courte. Mais il existe un contingent de cellules activés par l'antigène qui a un potentiel de survie à long terme, constitué de lymphocytes appelées lymphocytes T «mémoires» Les lymphocytes T mémoire peuvent être situés dans les organes lymphoïdes secondaires (lymphocytes « centraux-mémoire », T_{CM}) ou dans les tissus récemment infectés (lymphocytes « effecteurs-mémoire », T_{EM}). Lors d'une réexposition à l'antigène dont ils sont spécifiques, les lymphocytes T mémoire subissent une expansion et provoquent une réponse immunitaire, dite «secondaire» plus efficace et plus rapide par rapport à la réponse immunitaire primaire éliminant l'infection (Golubovskaya and Wu, 2016). Les lymphocytes mémoire ont plusieurs caractéristiques : (i) la présence de marqueurs d'une expansion et d'une activation antérieure, (ii) une persistance en l'absence d'antigène, (iii) une augmentation rapide de l'activité lors d'une nouvelle exposition à l'antigène. L'existence de lymphocytes effecteurs et mémoire a également été démontrée pour les lymphocytes Treg (Rosenblum et al., 2016).

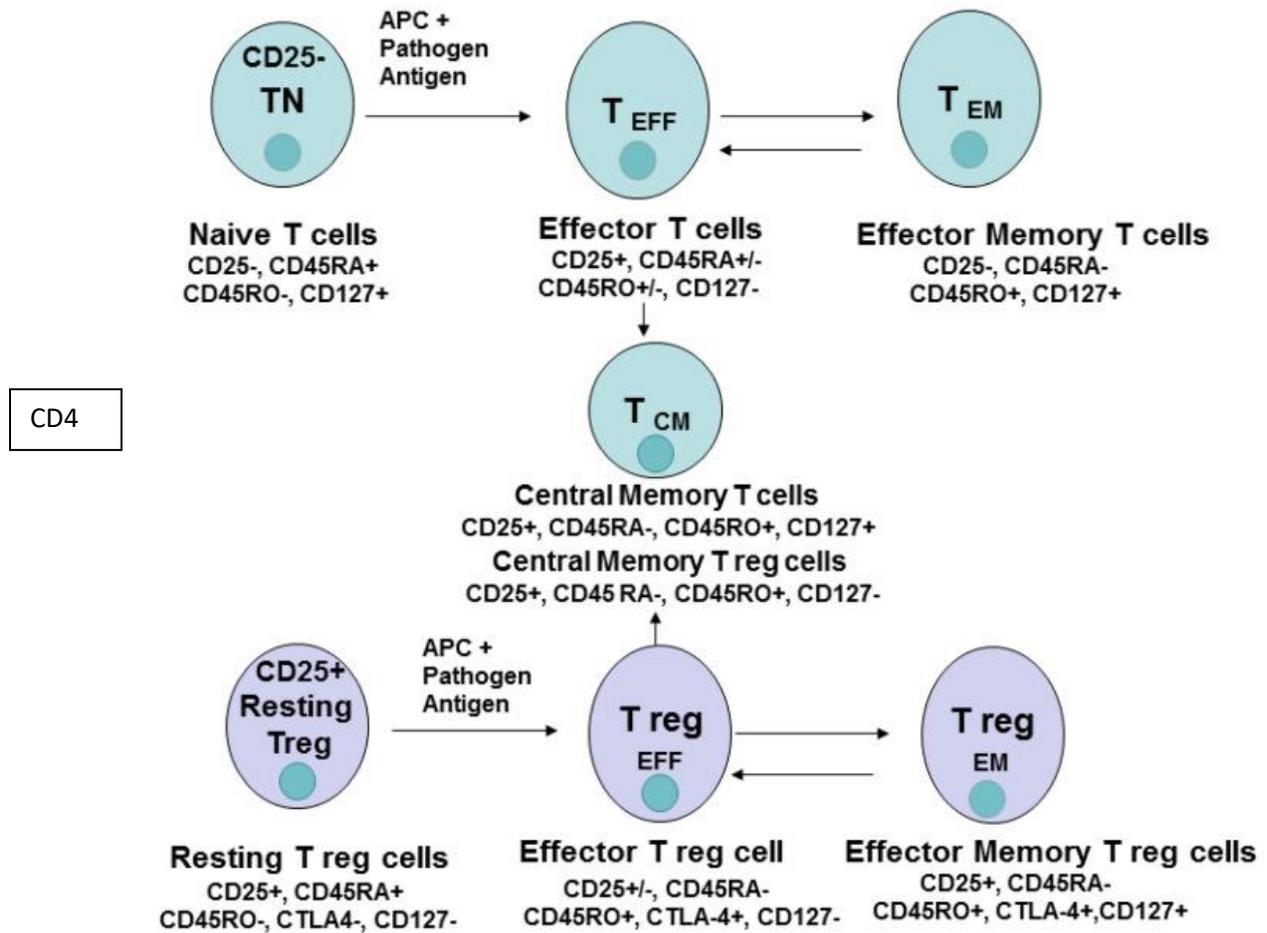


Figure 16 : Différenciation des lymphocytes CD4⁺ naïfs en lymphocytes effecteurs ou mémoire / mémoire centrale. (T_N : lymphocytes T naïfs, T_{CM} : lymphocytes T « centrales mémoires », T_{EFF} : lymphocytes T effecteurs, T_{EM} : lymphocytes « effecteurs mémoires », Treg : lymphocytes T régulateurs) (Golubovskaya and Wu, 2016).

2.2.4.2. Les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ humains et murins ont été classés en six sous-populations principales, définis comme étant Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, T_{FH}, et Treg suppressives qui régulent l'activité des lymphocytes Th (Annunziato and Romagnani, 2009; Knochelmann et al., 2018; Tada et al., 1978). Nous ne présenterons ici que les sous-populations qui ont été associées à la fibrose.

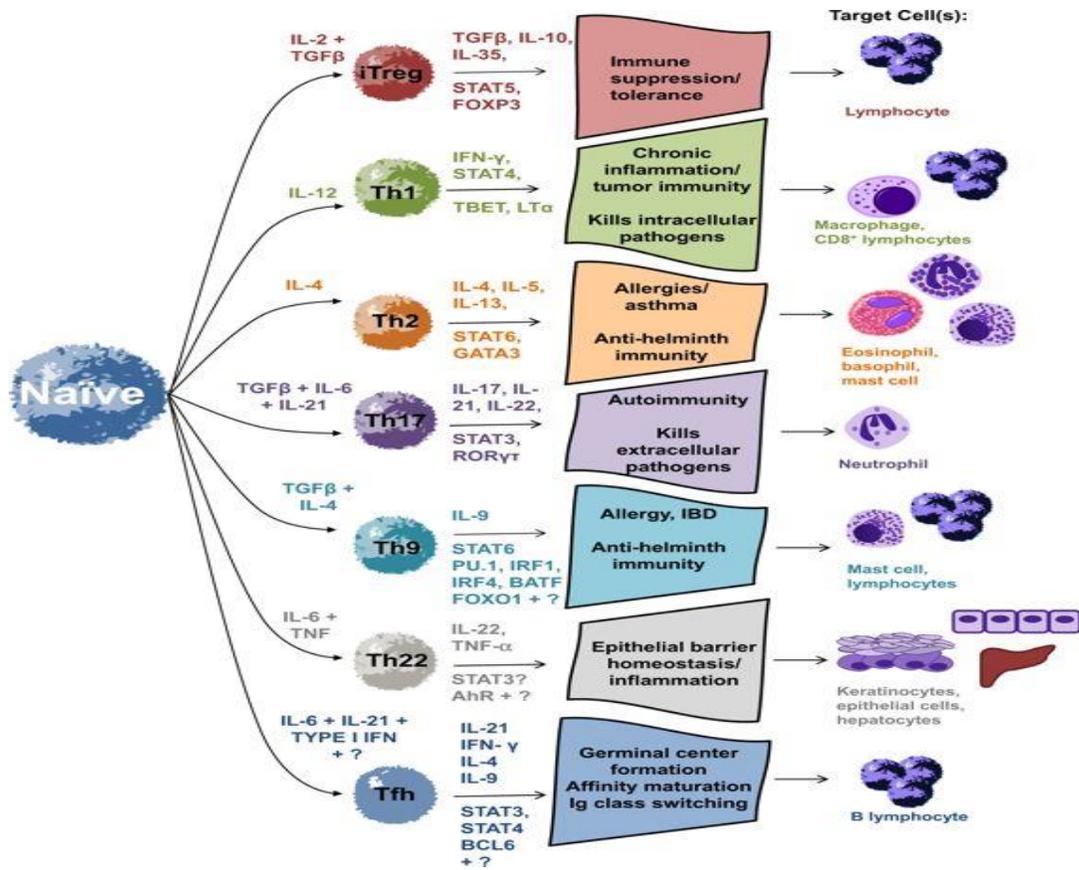


Figure 17 : Différenciation des LT CD4⁺ en fonction du microenvironnement cytokinique (Knochelmann et al., 2018).

2.2.4.2.1. Les lymphocytes Th1

Les lymphocytes Th1 se développent quand la stimulation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs se fait en présence d'IL-12 (Mosmann et al., 2005). Les Th1 sont caractérisés par leur sécrétion d'IFN-γ et l'expression du facteur de transcription T-bet (T-box expressed in T cells, TBX21) (Sakaguchi et al., 2007). La différenciation Th1 est dépendante de la voie de signalisation JAK/STAT, par l'activation de STAT1 par l'IFN-γ et le STAT4 par l'IL-12, qui favorise l'expression du facteur de transcription T-bet et permet l'expression de l'IFN-γ (Raphael and Forsthuber, 2012; Skurkovich et al., 2005). Les lymphocytes Th1 expriment préférentiellement à leur surface les récepteurs de chimiokines : CXCR3 et CCR5, dont les chimiokines correspondantes sont IP-10, Mig, I-TAC pour CXCR3 et MIP-1α, MIP-1β et RANTES pour CCR5 (Bonocchi et al., 1998).

Les lymphocytes Th1 jouent un rôle dans la réponse immunitaire contre les pathogènes intracellulaires via leur interaction avec les macrophages principalement. Les lymphocytes Th1 produisent des cytokines qui activent les macrophages et orientent les réactions inflammatoires vers des mécanismes d'hypersensibilité de type retardée dépendant des lymphocytes T CD8⁺ (Hsieh et al., 1993). Ils stimulent également la sécrétion d'immunoglobulines de type A et G par les lymphocytes B (Raphael and Forsthuber, 2012).

2.2.4.2.2. Les lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 se développent quand la stimulation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs se fait en présence d'IL-4. Les Th2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13, et expriment le facteur de transcription GATA3 (Vahedi et al., 2013a, 2013b; Zheng and Flavell, 1997; Zhu et al., 2010). Les lymphocytes Th2 expriment à leur surface le récepteur de chimiokine CCR4 dont la chimiokine correspondante est MDC (macrophage-derived chemokine) (Bonecchi et al., 1998).

Les lymphocytes Th2 jouent un rôle dans la défense contre les pathogènes extracellulaires, et interviennent directement dans les réactions de défense anti-parasitaire mais ils jouent aussi un rôle dans les réactions d'allergie. Les Th2 favorise le système immunitaire à médiation humorale via la stimulation de la prolifération des lymphocytes B (Raphael et al., 2015).

2.2.4.2.3. Les lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 se développent quand la stimulation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs se fait en réponse à l'action combinée du TGF- β et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23. Les Th17 produisent et sécrètent des niveaux élevés des cytokines de la famille de l'IL-17, telles que l'IL-17A, l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, l'IL-17E, and l'IL-17F (Gu et al., 2013; Korn et al., 2009), et d'autres cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-21, l'IL-22, le CCL20 (Korn et al., 2009; Raphael et al., 2015; Shabgah et al., 2014), et l'IL-23 (Cua et al., 2003; Langrish et al., 2005). De plus, les Th17 sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription de type ROR γ t et STAT3. Les Th 17 expriment à leur surface les différents récepteurs de chimiokines : CCR6, CCR4, CXCR3 (Annunziato and Romagnani, 2009; Annunziato et al., 2012; Korn et al., 2009; Raphael et al., 2015).

Les lymphocytes Th17 jouent un rôle-clé dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux extracellulaires, la granulopoïèse et la chimiotaxie des granulocytes par l'intermédiaire des cytokines qu'ils sécrètent. L'IL-17 a une fonction régulatrice de la défense de l'hôte et de l'inflammation mais son action peut également entraîner des dommages aux tissus et conduire à l'induction des maladies auto-immunes (Knochelmann et al., 2018) telles que la sclérose en plaques (Lock et al., 2002; Viglietta et al., 2004), le psoriasis (Kagami et al., 2010; Martin et al., 2013), la polyarthrite rhumatoïde (Kaneko et al., 2018), la maladie intestinale inflammatoire (Skroza et al., 2013) et le lupus érythémateux systémique (Martin et al., 2014; Zhong et al., 2018).

Les lymphocytes Th17 sont également associés au cancer mais leur rôle fonctionnel dans les tumeurs reste controversé (Knochelmann et al., 2018; Murugaiyan and Saha, 2009). Les Th17 favorisent ou inhibent le développement de cancer (figure 18) selon le type de tumeur. D'une part, les lymphocytes Th17 peuvent favoriser la progression tumorale par la production d'IL-17 contribuant ainsi au recrutement intratumoral des cellules myéloïdes suppressives (MDSC : myeloid-derived suppressor cells) et aussi à l'angiogenèse tumorale, en agissant directement sur les cellules endothéliales ou indirectement par stimulation de la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales (Numasaki et al., 2003; Pan et al., 2015). D'autre part, il a été démontré que les lymphocytes Th17 inhibent la prolifération tumorale en induisant le recrutement des cellules NK, lymphocytes Th1, lymphocytes Tc1 dans les tumeurs et en activant les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques de la tumeur (Guéry and Hugues, 2015).

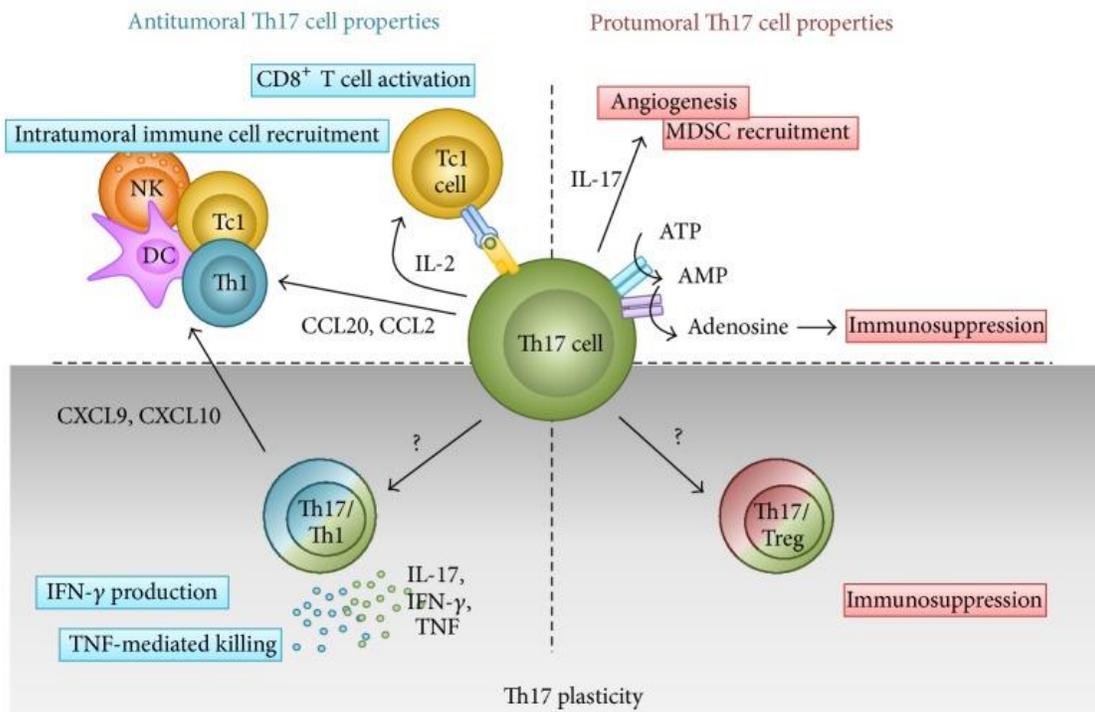


Figure 18 : Rôles des lymphocytes Th17 dans l'immunité tumorale (Guéry and Hugues, 2015).

Contrairement aux lymphocytes Th1 et Th2 qui sont considérés comme des lignées stables, les lymphocytes Th17 présentent un degré élevé de plasticité. Les lymphocytes Th17 ont la capacité de se convertir en différents sous-populations, Th1/Th2/Treg, en fonction de leur microenvironnement cytokinique. Les lymphocytes Th17 acquièrent des fonctions « pathogènes » en se convertissant en lymphocytes Th1 pendant le cancer et les infections ou en lymphocytes Th2 en cas d'inflammation pulmonaire. Quand les lymphocytes ex-Th17 acquièrent un profil Th1, ils peuvent toujours être distingués des lymphocytes Th1 classiques via des

marqueurs de surface notamment CD161, CCR6 (Cosmi et al., 2011). Alternativement, les lymphocytes Th17 acquièrent des fonctions immunosuppressives en se convertissant en lymphocytes Treg dans le contexte de maladies auto-immunes (Guéry and Hugues, 2015). De plus, les lymphocytes de phénotype Th17 peuvent être convertis en lymphocytes Treg lorsqu'ils sont activés par des antigènes tumoraux en présence de facteurs tels que l'IL-2 ou l'acide rétinoïque (RA) (Mucida et al., 2007). La figure 19 résume la plasticité fonctionnelle des lymphocytes Th17.

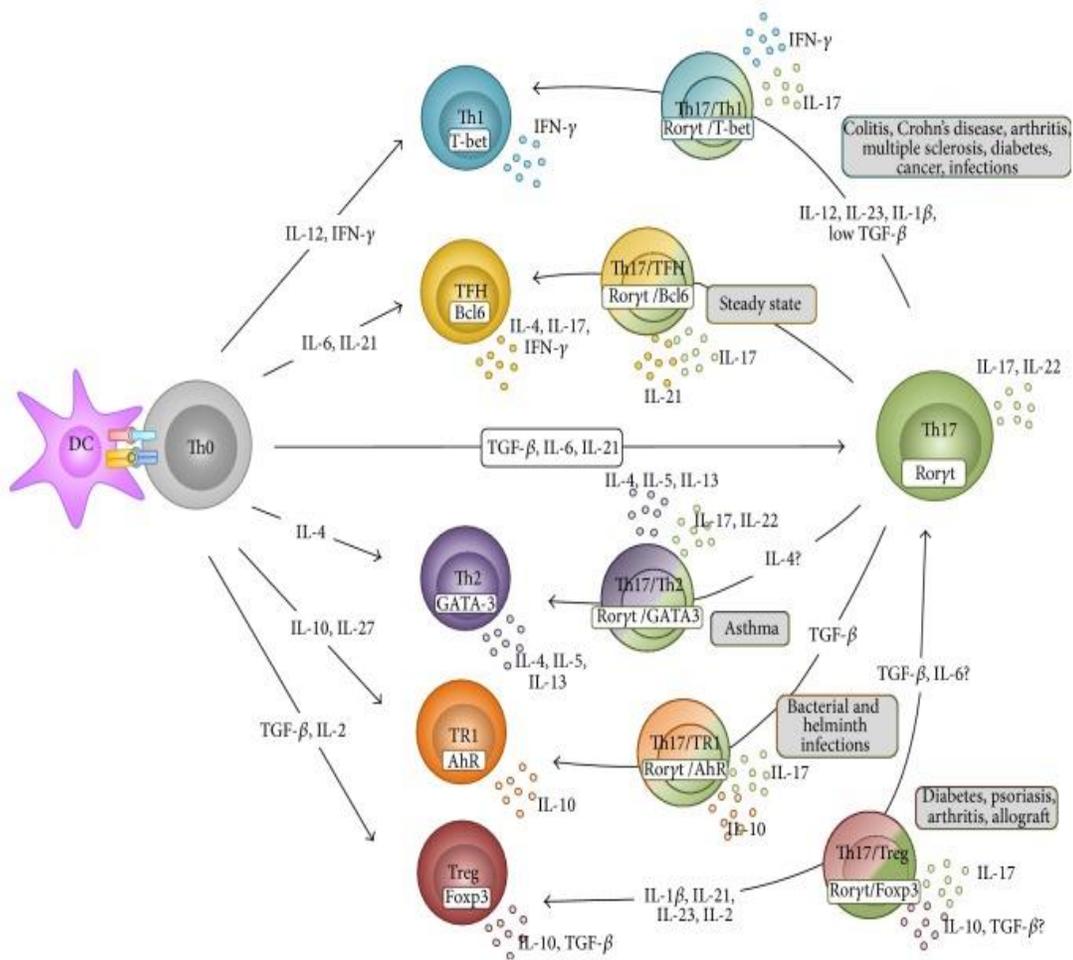


Figure 19 : Plasticité des lymphocytes Th17 (Guéry and Hugues, 2015).

2.2.4.2.4. Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Au milieu des années 90, une nouvelle sous-population de lymphocytes Th ayant une fonction régulatrice vis-à-vis des lymphocytes Th a été identifiée et appelée Treg. Sous l'influence de l'IL-2 et du TGF- β , les lymphocytes Treg se différencient et expriment les facteurs de transcription STAT5 et Foxp3. Les lymphocytes Treg produisent uniquement du TGF- β et de l'IL-10 (Hori et al., 2003, 2017; Sakaguchi et al., 2007). Initialement, la caractérisation des lymphocytes Treg était principalement basée sur leur expression élevée du récepteur de l'IL-2 (CD25) (Sakaguchi et al., 2007). Divers marqueurs de surface supplémentaires ont été proposés afin de mieux définir les lymphocytes Treg, notamment la molécule CD152 (ou CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), la molécule d'adhésion CD62L, le récepteur GITR (GITR : glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-related receptor), la molécule CD279 (ou PD-1 : Programmed cell death 1) (Liu et al., 2018; Sakaguchi et al., 2007).

Comme les lymphocytes Th17, les lymphocytes Treg ont été décrits comme des cellules ayant une capacité de plasticité. Les lymphocytes Treg stimulés par des cytokines telles que l'IL-6, l'IL-21 et le TGF- β peuvent être convertis en lymphocytes Th17, produisant ainsi de l'IL-17, IL-21 et IL-22 (Kitani and Xu, 2008). L'exigence partagée de la présence de TGF- β et la régulation réciproque de leurs principaux facteurs de transcription, ROR γ t et Foxp3, suggèrent une dichotomie dans la génération de lymphocytes Th17 et Treg en fonction du microenvironnement cytokinique (Knochelmann et al., 2018).

La fonction suppressive des lymphocytes Treg a conduit à étudier leur rôle potentiel dans le cancer. La valeur pronostique associée à l'infiltrat de lymphocytes Treg au site tumoral est sujet à controverse. Des auteurs ont rapporté qu'un pronostic défavorable est associé à une forte densité intratumorale en lymphocytes Treg dans les cancers du sein (Merlo et al., 2009), du foie (Fu et al., 2007), du pancréas (Hiraoka et al., 2006), de l'ovaire (Curiel et al., 2004). D'autres auteurs ont observé que l'infiltration en lymphocytes Treg (CD4⁺, FoxP3⁺) était associée à un pronostic favorable dans les lymphomes folliculaires et les lymphomes de Hodgkin (Carreras et al., 2009; Tzankov et al., 2008), les cancers de la tête et du cou (Badoual et al., 2006), ainsi que le cancer du côlon (Frey et al., 2010; Le Gouvello et al., 2008; Salama et al., 2009; Tosolini et al., 2011).

2.2.4.3. Les lymphocytes T CD4⁺ et la fibrose

Les lymphocytes T CD4⁺ sont impliqués dans la fibrose par leur production de cytokines. Il existe également beaucoup de régulation croisée entre les sous-populations de cellules Th. Par exemple, l'IL-13 inhibe la différenciation Th17, alors que l'IFN- γ peut supprimer la fibrose induite par l'IL-13 en induisant l'activation classique des macrophages et en inhibant la synthèse du collagène induit par l'IL-13 et le TGF- β 1 dans les myofibroblastes (Wynn and Ramalingam, 2012).

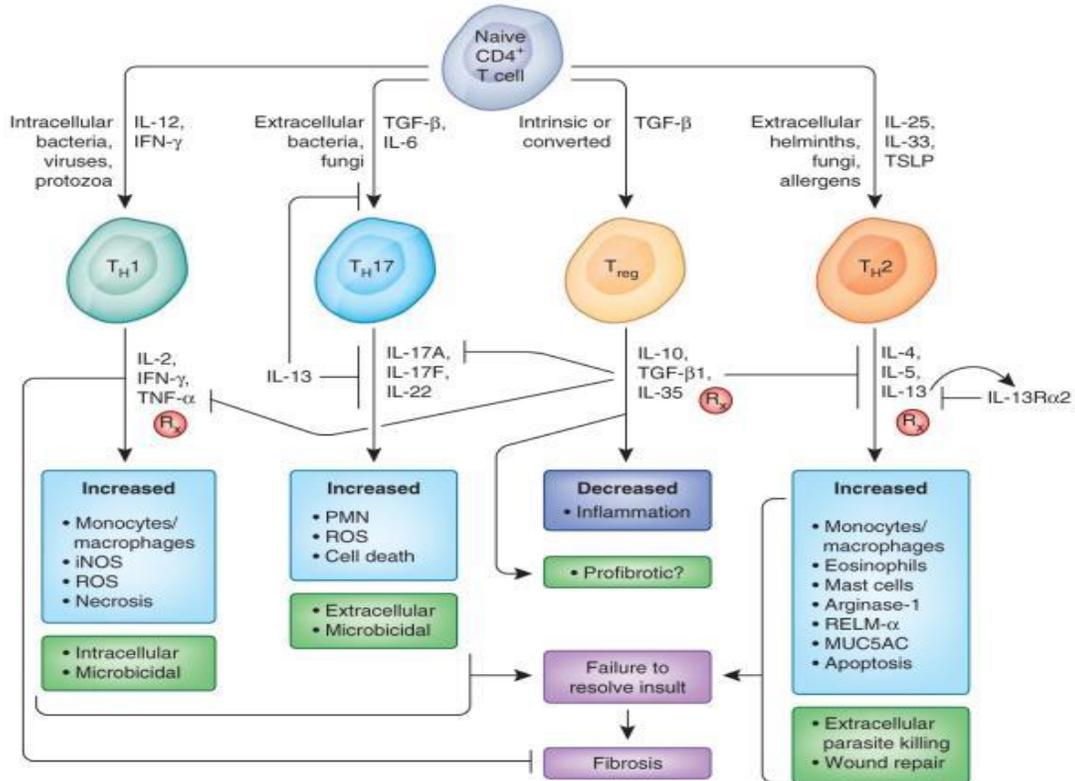


Figure 20 : La réponse immunitaire adaptative dans la fibrose (Wynn and Ramalingam, 2012).

2.2.4.3.1. Lymphocytes Th1 et fibrose

La contribution des lymphocytes Th1 dans la fibrose reste controversée. D'une part, les lymphocytes Th1 et leur cytokine IFN- γ participent à l'établissement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine en favorisant l'inflammation pulmonaire chronique et la prolifération des fibroblastes (Chen et al., 2001; Huaux et al., 2003). Cependant, d'autres études ont suggéré que les lymphocytes Th1 ont une activité anti-fibrotique (Kiwamoto et al., 2006; Wynn and Ramalingam, 2012). En effet, l'IFN- γ peut inhiber au moins en partie, la fibrose, en antagonisant l'activité pro-fibrotique du TGF- β . L'IFN- γ inhibe la phosphorylation de SMAD3 et donc la voie de signalisation SMAD induite par le TGF- β . L'IFN- γ induit l'expression de SMAD7, qui en se liant à SMAD3, va empêcher l'interaction de SMAD3 avec le récepteur au TGF- β et atténuer ainsi la voie de signalisation induite par le TGF- β . L'IFN- γ inhibe également directement la prolifération des fibroblastes (Ulloa et al., 1999).

2.2.4.3.2. Lymphocytes Th2 et fibrose

Les lymphocytes Th2, eux sont profibrotiques. Ils produisent IL-4 et IL-13, connues pour induire la différenciation des myofibroblastes et la synthèse de la MEC. De plus, l'IL-4 et l'IL-13 conduisent à une activation par la voie alternative des macrophages résidents dans les tissus en

macrophages pro-fibrotiques, favorisant la réparation tissulaire et la fibrose. Il a été rapporté que des macrophages activés par l'IL-13, régulent positivement la fibrose radio-induite (Citrin et al., 2017). En effet, la carence en IL-13 ou l'utilisation d'agents diminuant le taux d'IL-13 ont permis de réduire la fibrose induite par un certain nombre de stimuli exogènes, dont les RI (Wynn et al, 2013).

2.2.4.3.3. Lymphocytes Th17 et fibrose

Les lymphocytes Th17 produisent la cytokine pro-inflammatoire IL-17A, qui est un facteur important associé à la progression de la fibrose car elle induit la différenciation des fibroblastes et active leur prolifération. L'expression de l'IL-17A a été impliquée dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire, du rejet d'allogreffe chronique, de la fibrose dans la transplantation pulmonaire, de la fibrose myocardique et de la fibrose hépatique induite par l'hépatite B ou hépatite C. L'équipe d'A. Paun a montré qu'un taux élevé de lymphocytes Th17 était associé à un risque de fibrose pulmonaire radio-induite tardive dans un modèle expérimental chez la souris (Paun et al., 2015, 2017). Des études mécanistiques portant sur la voie de la fibrose induite par l'IL-17 chez la souris ont permis d'identifier les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-23. De plus, l'axe des cytokines IL-1 β / IL-17A / TGF- β 1 a aussi été montré comme une voie importante dans la fibrose induite par l'inflammation (Wynn et al, 2013; Wirdorffer et Jendrossek, 2016).

2.2.4.3.4. Lymphocytes Treg et fibrose

Le rôle des lymphocytes Treg dans la fibrose est controversé. Les lymphocytes Treg jouent un rôle crucial dans la limitation de l'ampleur des réponses des lymphocytes Th, et assurent une régulation appropriée de la cicatrisation. Quand ils sont activés par l'IL-18 et l'IL-33, les Treg montrent une capacité suppressive grâce à la sécrétion accrue de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, qui vont induire un arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose des lymphocytes T effecteurs (Wirsdörfer and Jendrossek, 2016).

Cependant, les lymphocytes Treg sont dépendants du TGF- β pour leur différenciation. Cette cytokine est libérée tôt après une lésion tissulaire par les pneumocytes, les fibroblastes et les lymphocytes Th2, mais la forme latente peut également être activée directement par les RI.

Au début de la dernière phase de la cicatrisation, le remodelage tissulaire (de 24 à 30 semaines), les macrophages représentent une source de TGF- β . Pendant cette phase, le TGF- β va favoriser les processus de réparation. Bien qu'au cours de cette phase précoce, le TGF- β agit principalement comme médiateur pro-inflammatoire pour attirer les neutrophiles, il peut également fournir des signaux pour la limitation de l'inflammation tissulaire, notamment en induisant les Treg. Mais produit en excès, le TGF- β va favoriser la fibrose (Wirsdörfer and Jendrossek, 2016). Il a aussi été démontré que les Treg contribuent aux affections fibrotiques du poumon, telles que les lésions pulmonaires induites par la blémomycine, les RI, et la fibrose

pulmonaire idiopathique. Les lymphocytes Treg stimulent la prolifération des fibroblastes en sécrétant PDGF-B et TGF- β . (Re et al., 2013). En outre, les Treg peuvent induire une réponse Th17, modifier la sécrétion de l'IFN-gamma, de l'IL-12/IL-4, de l'IL-5 et promouvoir la transition EndMT (Wynn et al, 2013).

2.2.4.3.5. Récepteur de chimiokine CCR6

Dans notre travail, nous avons focalisé notre étude sur les lymphocytes T exprimant le récepteur de chimiokine CCR6, dont le ligand unique est la chimiokine CCL20, qui est sécrétée par les lymphocytes Th17. La CCL20 est présente dans l'intestin et régulée positivement après un stimulus inflammatoire (Lee et al., 2013). Le CCR6 est naturellement exprimé dans plusieurs tissus : fortement dans l'appendice, la rate, les ganglions lymphatiques et le pancréas, et plus faiblement dans le thymus, le côlon, l'intestin grêle, le foie fœtal, les testicules (Ranasinghe and Eri, 2018). Le CCR6 est régulé positivement par de nombreuses sous-populations de leucocytes telles que les cellules dendritiques immatures, les cellules NK lymphocytes B, les lymphocytes T, plus spécifiquement les lymphocytes Th17 pro-inflammatoires et les lymphocytes Treg immunorégulateurs (Liao et al., 1999a; Wiede et al., 2013). De façon intéressante, le recrutement des lymphocytes Th17 et des lymphocytes Treg vers les tissus inflammatoires produisant CCL20, est dépendant l'expression du CCR6. En effet, Yamazaki et coll. ont montré que l'absence du CCR6 dans les lymphocytes Th17 réduit la sévérité de l'EAE et diminue la migration des Th17 et des Treg dans les tissus inflammatoires (Yamazaki et al., 2008). Turner et coll. ont également montré que le déficit de CCR6 réduit l'infiltration des Th17 et des Treg dans les lésions tissulaires rénales de la glomérulonéphrite (Turner et al., 2010).

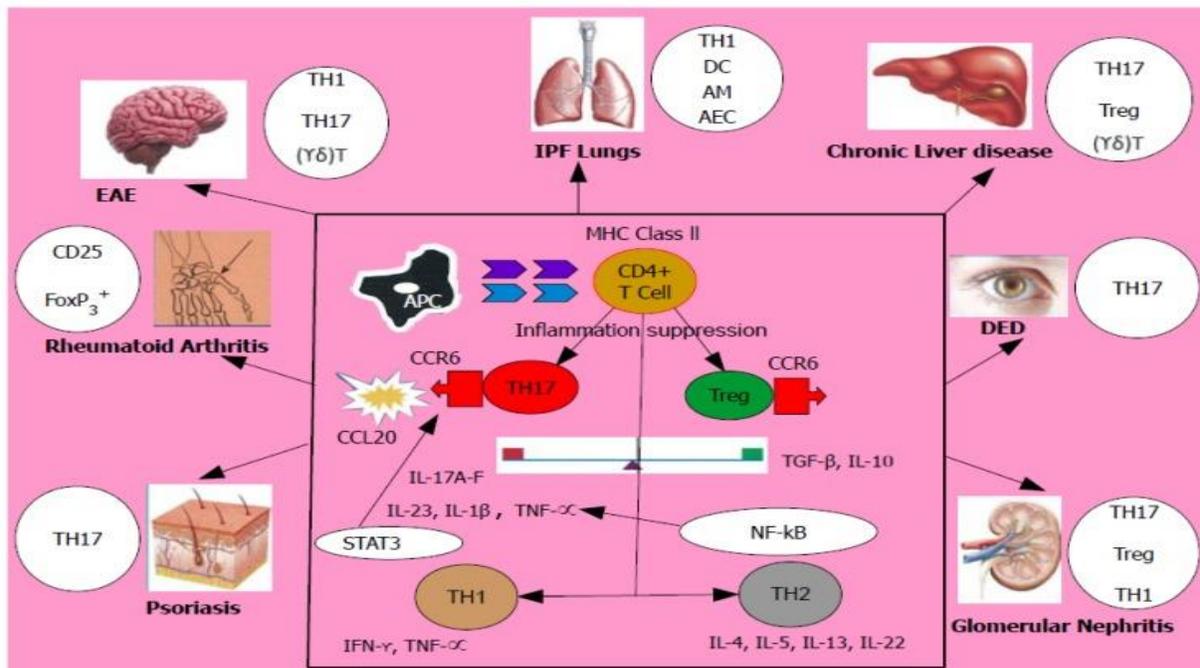


Figure 21 : Fonctions immunitaires pléiotropes de l'axe CCR6-CCL20 (Ranasinghe and Eri, 2018)

3. Sénescence

3.1. Sénescence

La sénescence cellulaire a été identifiée par L. Hayflick comme un état d'arrêt permanent du cycle cellulaire en rapport avec le raccourcissement des télomères (sénescence répliquative) ou en réponse à plusieurs autres formes de stress (sénescence accélérée ou sénescence prématurée), mais au cours duquel les cellules restent métaboliquement actives (Figure 22). La sénescence cellulaire peut être induite par de nombreux stimuli notamment fumée de cigarette, stress oxydatif, chimiothérapie, RI, des lésions génomiques ou épigénomiques, l'activation mutationnelle des oncogènes, un dysfonctionnement mitochondrial, des déséquilibres métaboliques (Rodier and Campisi, 2011). Les cellules sénescentes sont également caractérisées par un phénotype sécrétoire pro-inflammatoire particulier comprenant de nombreuses cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, et protéases. De plus elles régulent positivement l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire ($p16^{Ink4a}$, p21), augmentent l'activité de β -galactosidase, et acquièrent une résistance à l'apoptose (Campisi, 2016, Gonzalez-Meljem et al., 2018).

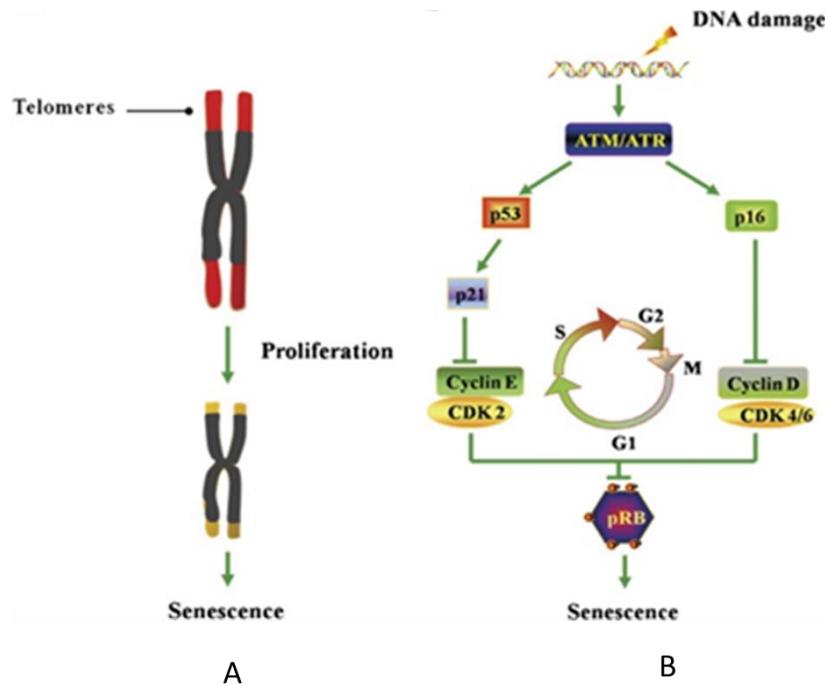


Figure 22 : Vue d'ensemble de la sénescence répliquative et de la sénescence prématurée (Wang et al., 2018).

A. sénescence répliquative induite par le raccourcissement des télomères.

B. sénescence prématurée induite par les stress oxydatifs.

3.1.1. Sénescence réplivative

La sénescence réplivative fait suite à une diminution du potentiel de prolifération observée après plusieurs divisions cellulaires conduisant finalement à un arrêt total. Le raccourcissement des télomères à la suite de multiples divisions cellulaires dans des cellules non-transformées a été montré comme le facteur principal pour ce type de sénescence. La sénescence réplivative est généralement dépendante de la voie TP53/p21^{CIP1}/pRb/E2F (Demaria et al., 2017; Wang et al., 2018).

3.1.2. Sénescence prématurée

La sénescence accélérée, ou sénescence prématurée, peut être induite en réponse à un stress de la cellule : dommages à l'ADN, stress oxydant, stress par des agents thérapeutiques, activation d'oncogènes. La sénescence accélérée peut être transmise par la voie TP53/ p21/pRb/E2F ou la voie p16^{Ink4a}/pRb/E2F. L'activation de p38MAPK est le plus souvent impliquée dans ce type de sénescence (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Il y a différents types de sénescence prématurée :

Sénescence induite par les dommages à l'ADN : des dommages irréparables à l'ADN peuvent induire une sénescence ou une apoptose, en fonction de l'ampleur des dommages. De multiples agents endommageant l'ADN induisent ce type de sénescence, y compris les rayonnements (ionisants et UV) ou l'exposition à de multiples drogues *in vitro* (Hernandez-Segura et al., 2018).

Sénescence induite par le stress oxydant : des produits oxydants du métabolisme cellulaire, ou des agents oxydants connus (H₂O₂) peuvent provoquer une sénescence prématurée (Figure 22). Bien que les agents oxydants exercent leur effet en partie en endommageant l'ADN, d'autres composants et processus cellulaires sont également affectés (Hernandez-Segura et al., 2018).

Sénescence induite par la chimiothérapie : de multiples médicaments anticancéreux, comme la bléomycine ou la doxorubicine, sont capables d'induire une sénescence prématurée. Certains d'entre eux induisent des lésions de l'ADN, tandis que d'autres peuvent agir par le biais de différents autres mécanismes (Calcinotto et al., 2019; Wang et al., 2018).

Sénescence induite par les oncogènes (OIS : Oncogene-induced senescence) : l'activation d'oncogènes, tels que RAS ou BRAF, ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur, tels que PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), peuvent conduire à la sénescence prématurée (Hernandez-Segura et al., 2018).

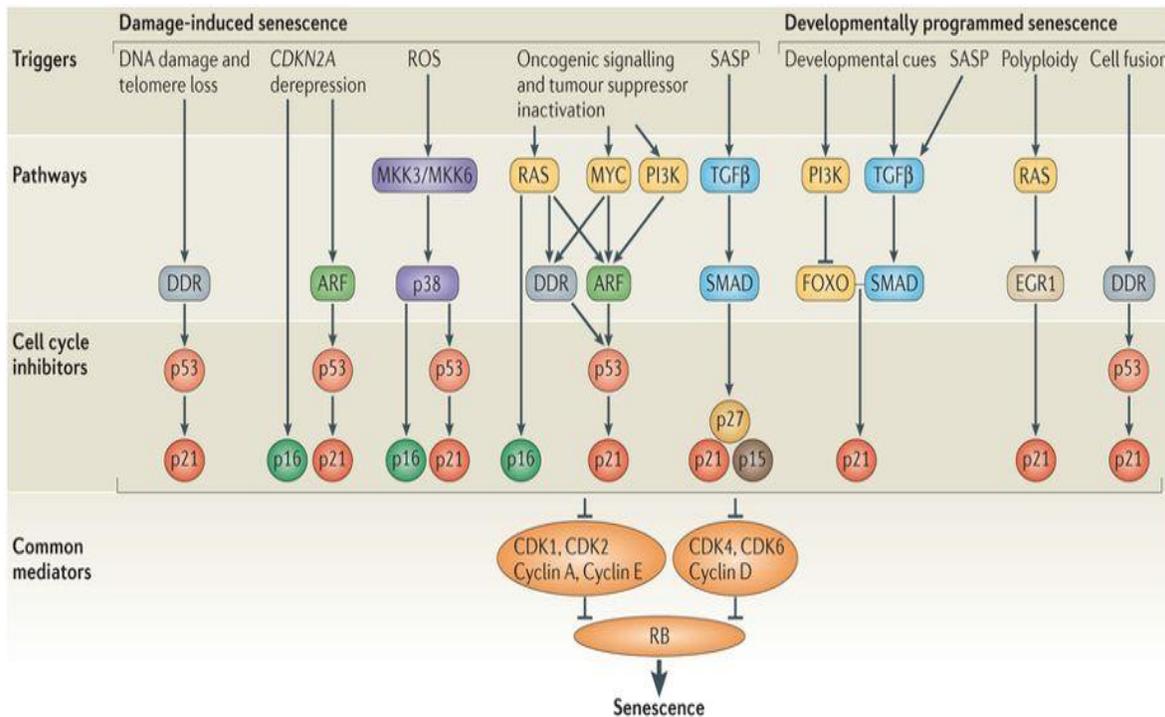


Figure 23 : Facteurs de stress et agents dommageables activent des inhibiteurs du cycle cellulaire et du supprimeur de tumeur Rb (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

3.1.3. Caractéristiques des cellules sénescentes

3.1.3.1. Transformation morphologique

La sénescence cellulaire est généralement accompagnée de changements morphologiques qui peuvent être une augmentation de la taille et un aplatissement des cellules qui présentent une vacuolisation et un contour irrégulier traduisant les nombreuses réorganisations du cytosquelette. Ces cellules peuvent devenir multinucléées. Ainsi, l'activation de la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) est nécessaire à l'agrandissement du corps cellulaire des cellules endothéliales sénescées. Le réarrangement du cytosquelette, principalement des filaments de vimentine contribue à la forme modifiée de la cellule associée à la sénescence (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). De plus, la sénescence induite par l'oncogène RAS muté (RAS^{v12}) présente une vacuolisation importante des cellules due au stress du réticulum endoplasmique (Denoyelle et al., 2006).

3.1.3.2. Résistance à l'apoptose

Les cellules sénescents activent plusieurs facteurs de survie et deviennent résistantes à l'apoptose. Lors du traitement avec des inducteurs d'apoptose, les cellules sénescents sont capables de réguler positivement la protéine anti-apoptotique Bcl-2 en réponse à l'activation du facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein). Les membres de la famille BCL-2, en particulier les protéines anti-apoptotiques (Bcl-XL et Bcl-W), sont surexprimés dans les cellules sénescents (Yosef et al., 2016). Par ailleurs, l'expression de p21 protège les cellules sénescents de la mort par l'atténuation de la signalisation de JNK et des caspases en cas de dommages persistants à l'ADN. Enfin, la HSP90 s'est révélée être une protéine-clé pour la survie des cellules sénescents via la stabilisation de p-AKT (Hernandez-Segura et al., 2018).

3.1.3.3. Inhibiteurs des kinases dépendant des cyclines (CDK) et arrêt du cycle cellulaire

Les CDK 1/2 et CDK 4/6 phosphorylent et régulent de multiples protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Les principaux effecteurs de l'arrêt du cycle cellulaire en sénescence sont les inhibiteurs p21 et p16, qui sont codées par les gènes CDKN1A et CDKN2A (Stein et al., 1999). p16 interagit directement et inhibe CDK4/6. L'expression de p16 est largement utilisée pour signaler la présence de cellules sénescents dans les études *in vitro* et *in vivo* (Campisi, 2016).

3.1.3.4. Augmentation de l'activité β -galactosidase

L'augmentation de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal) est également un biomarqueur de la sénescence couramment utilisé. La β -galactosidase peut cliver le substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactopyranoside (X-gal), ce qui se produit un marquage bleu périnucléaire dans les cellules positives (Dimri et al., 1995). L'activité augmentée dans les cellules sénescents est celle de la β -galactosidase lysosomale, qui est codée par le gène GLB1. Sa détection nécessite la congélation rapide des tissus afin de préserver l'activité enzymatique (Debacq-Chainiaux et al., 2009). De plus, les cellules quiescentes présentent une activité de la β -galactosidase dans les lysosomes qui fonctionne de manière optimale à pH 4 (Lee et al. 2006). En conséquence, l'activité SA- β -Gal dans les cellules sénescents est mesurée à pH 6 (Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000; Yang and Hu, 2005).

3.1.3.5. Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)

3.1.3.5.1. Composition du SASP

L'existence de changements dans le surnageant des cellules sénescents a été signalée dans des fibroblastes au cours de la sénescence réplivative. Ils correspondent au phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) ou senescence-messaging secretome (SMS) (Coppé et al., 2006; Mialet-Perez et al., 2015; Rodier and Campisi, 2011). Ces changements concernent les cytokines (IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13), les chimiokines (CCL2, CXCL1/CXCL2), et les protéines de la famille des métalloprotéinases (MMP-1 and MMP-3), les facteurs de croissance (PDGF-A, VEGF, GM-CSF, M-CSF). Cependant la composition du SASP diffère selon les types cellulaires. Certaines publications montrent que des dommages persistants à l'ADN sont nécessaires pour l'induction du SASP (Calcinotto et al., 2019; Coppé et al., 2006; Hernandez-Segura et al., 2018; Rodier and Campisi, 2011; Rodier et al., 2009).

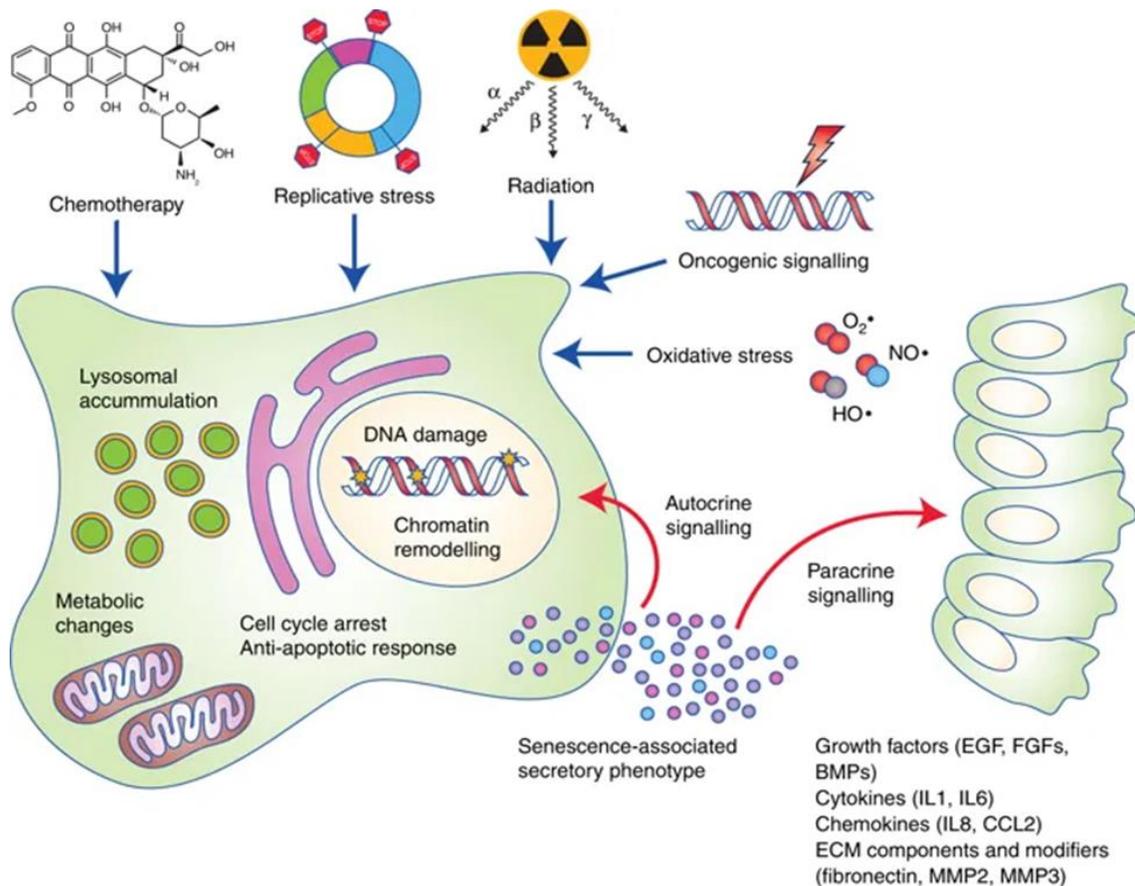


Figure 24 : Marqueurs et phénotypes associés à la sénescence (Gonzalez-Meljem et al., 2018)

3.1.3.5.2. Les voies de signalisation régulant l'expression du SASP

L'expression des gènes codant pour les protéines du SASP est contrôlée par différentes voies de signalisation. Cette expression peut être régulée positivement au niveau de l'activation de la transcription, et/ou de la stabilisation des transcrits et/ou du remodelage de la chromatine (figure 25). La signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) pourrait induire le SASP par des voies indépendantes de p53. D'autres voies de signalisation régulant le SASP sont la voie de PI3K/Akt/mTOR (Herranz et al., 2015; Iglesias-Bartolome et al., 2012; Laberge et al., 2015; Yentrapalli et al., 2013), la voie de p38MAPK (Freund et al., 2011) en réponse à des stress oxydants. Les RI pourraient induire la sécrétion d'IL-1 α , d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8 par les cellules adipeuses sénescents via la voie de signalisation JAK/STAT (Xu et al., 2015). D'autres auteurs ont également montré que la sécrétion d'IL-8 et de VEGF propageait la sénescence dépendante des ERO dans les épithéliums rétiniens sénescents (Marazita et al., 2016), et dépendait de la voie ATM/ATR/DNA-PKcs dans les cellules cancéreuses sénescents du côlon (Strzeszewska et al., 2018).

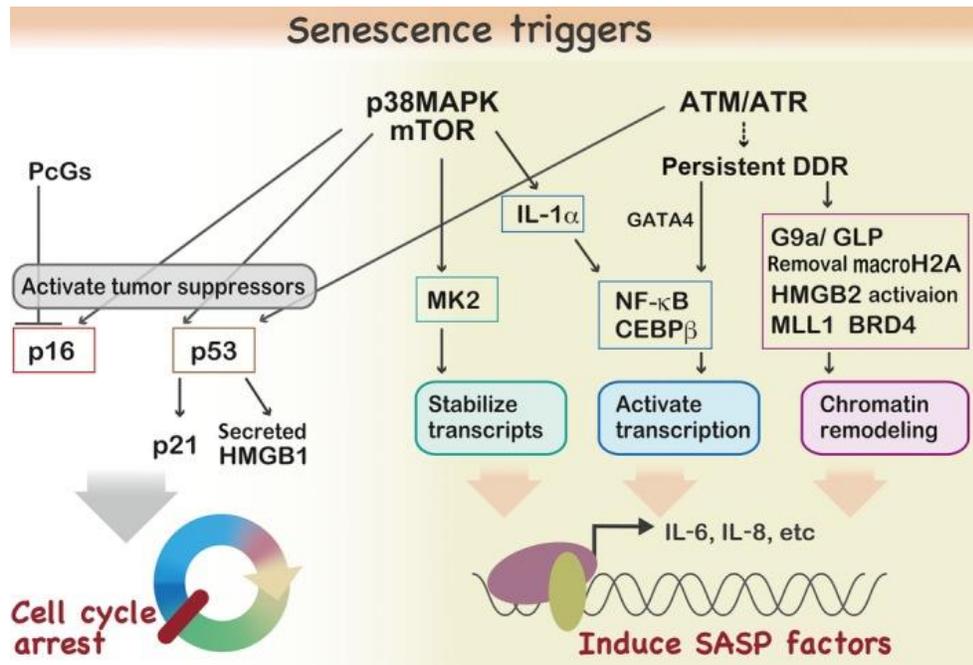


Figure 25 : Différentes voies d'induction du SASP dans la sénescence cellulaire (Watanabe et al., 2017).

3.1.3.6. Persistance des dommages à l'ADN

Les CDB de l'ADN sont de puissants activateurs de la DDR (réponse aux dommages de l'ADN) et peuvent conduire à une sénescence cellulaire. Les CDB de l'ADN favorisent le recrutement et la liaison de la kinase ATM aux sites endommagés de l'ADN. Ce recrutement permet la phosphorylation de l'histone H2A.X (γ H2A.X), ce qui facilite l'assemblage de complexes spécifiques de réparation de l'ADN (Figure 26). Les cellules sénescentes présentent ainsi une accumulation de foyer de γ H2A.X marquant des dommages à l'ADN (Hernandez-Segura et al., 2018). La persistance des dommages de l'ADN induit également la phosphorylation au niveau de la sérine 15 de p53 et favorise la transcription de nombreux gènes concernant du SASP (Coppé et al., 2006; Rodier et al., 2009). Les inductions de foyers nucléaires du γ H2A.X ou de p53 phosphorylée sont couramment utilisées comme des marqueurs de sénescence. Cependant, tous les programmes de sénescence ne sont pas une conséquence de la DDR (Pospelova et al., 2009).

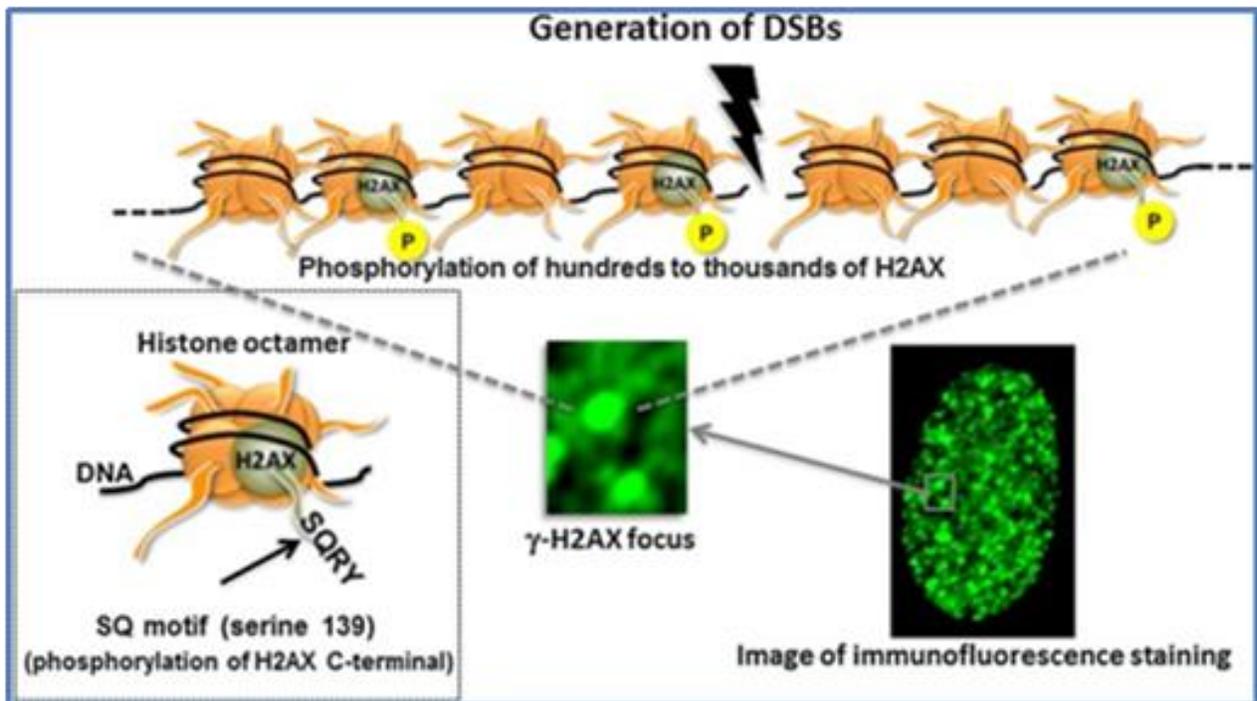


Figure 26 : Phosphorylation de l'histone H2A.X après la réponse aux dommages de l'ADN (Ibuki and Toyooka, 2015).

3.1.3.7. Accumulation de l'histone de H2A.J

Les travaux récents de l'équipe de C. Mann (Contrepois et al., 2017) ont mis en évidence un variant rare d'histone H2A.J s'accumulant spécifiquement dans les fibroblastes sénescents présentant des dommages persistants à l'ADN. De plus, il a été montré que l'histone H2A.J est associée à la régulation de la transcription des gènes codant pour le SASP, indépendamment des voies de régulation du cycle cellulaire (Contrepois et al., 2017). L'histone H2A.J pourrait donc être un potentiel marqueur de stress lié au vieillissement (Contrepois et al., 2017). Par ailleurs, l'histone H2A.J est également un marqueur de la sénescence radio-induite dans les chondrocytes articulaires humains (Hamdi et al., 2016).

3.2. Sénescence immunitaire

3.2.1. Caractérisation

L'immunosénescence affecte à la fois l'immunité innée et adaptative, qui résulte de défauts d'immunité des lymphocytes T et se caractérise également par un état inflammatoire chronique de bas grade (Macaulay et al., 2013). L'immunosénescence décrit fait suite à des altérations produites par le vieillissement chronologique induisant une sénescence répllicative, mais également à la sénescence prématurée due à une activation chronique du système immunitaire associée à des infections virales (VIH : virus de l'immunodéficience humaine, CMV : cytomégalovirus), à des maladies inflammatoires, au cancer ou à des greffes d'organes (Akbar et al., 2016; Kasakovski et al., 2018). Des lymphocytes T sénescents peuvent être trouvés même chez les jeunes en raison d'une activité proliférative excessive, mais ils augmentent considérablement au cours du vieillissement. Les lymphocytes T sénescents peuvent exprimer dans certaines circonstances les marqueurs de surface CD27^{neg}, CD28^{neg}, CD45RA, KLRG1, CD57 (Akbar et al., 2016).

L'immunosénescence répllicative se caractérise par le raccourcissement des télomères, qui est dû à la fois à la réplication continue des lymphocytes T et à une réduction de l'expression du composant ARN de la télomérase humaine, hTERC, qui est un facteur régulateur de l'activité de la télomérase (hTERC : human telomerase RNA component) (Lanna et al., 2013; Xu and Larbi, 2017).

L'immunosénescence prématurée a été caractérisée lors de dommages de l'ADN dus à un dysfonctionnement mitochondrial conduisant à une augmentation de la production des ERO (Akbar et al., 2016). D'autres ont montré la sénescence radio-induite des T CD4⁺ naïfs, et la sénescence des CD8⁺/CD4⁺ naïfs induite par les lymphocytes Treg (Liu et al., 2018; Ye et al., 2012).

3.2.2. La sénescence lymphocytaire n'équivaut pas à l'épuisement lymphocytaire

La sénescence et l'épuisement lymphocytaire T présentent des similitudes dans certains aspects phénotypiques et fonctionnels. Par conséquent, il est important de noter les différences entre la sénescence et l'épuisement des lymphocytes T, car cela permettra une interprétation précise des résultats.

Premièrement, les marqueurs exprimés par les cellules T sénescents sont les CD57 et KLRG-1, qui indiquent une sénescence répliquative, alors que les marqueurs associés à l'épuisement des cellules T sont les molécules PD-1 (programmed cell death 1), LAG-3 (lymphocyte activation gene 3), TIM-3 (T cell immunoglobulin mucin 3), et CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4).

Deuxièmement, les lymphocytes T sénescents ont des phénotypes bien différenciés (T_{EM}/T_E), sont résistants à l'apoptose (Spaulding et al., 1999), et adoptent un profil pro-inflammatoire qui les rend capables de sécréter des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires similaires au SASP établi pour les fibroblastes, caractéristiques que n'ont pas les lymphocytes T « épuisés ».

Troisièmement, la sénescence répliquative semble irréversible alors que l'épuisement est réversible. Des études ont montré que le blocage de la ligature de PD-1 est capable de récupérer la fonction de sécrétion de cytokines dans les lymphocytes T (Liu et al., 2018; Xu and Larbi, 2017).

3.2.3. Implication des voies de signalisation dans la sénescence des lymphocytes T

Bien que l'impact de la sénescence des lymphocytes T soit bien décrit au niveau cellulaire, les mécanismes moléculaires sont plutôt moins bien compris.

Ye et coll. ont montré par des études transcriptomiques que la sénescence des lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ induite par les Treg était associée à des altérations significatives des gènes impliqués dans les voies de signalisation des MAPKs ERK1/2, p38, et JNK (Ye et al., 2012). Pawelec et coll. ont montré également que l'activation de la voie p38MAPK est directement impliquée dans les lymphocytes T $CD4^+$ sénescents (Pawelec, 2017).

Une étude récente a montré que la sénescence des lymphocytes T $CD4^+$ induite par les Treg était associée à une compétition dans la consommation de glucose par ces cellules et à l'activation d'ATM. Les mêmes auteurs ont également montré que la voie de signalisation MAPK ERK1/2 et p38MAPK coopère avec les facteurs de transcription STAT1 / STAT3 pour contrôler la sénescence des lymphocytes T induite par les cellules Treg humaines (Liu et al., 2018).

Par ailleurs, la voie mTOR joue un rôle important dans la régulation de métabolisme des lymphocytes T. Lors de la stimulation par des facteurs de croissance, la voie PI3K/ Akt/mTOR est activée, ce qui favorise l'absorption des nutriments, améliore de nombreuses activités métaboliques (Jones and Thompson, 2007), et favorise la survie à long terme des lymphocytes T (Jones and Pearce, 2017). Mannick et coll. ont montré que l'inhibition de mTOR par RAD001 améliorait l'immunosénescence des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ chez les donneurs sains âgés (Mannick et al., 2014).

4. La radiosensibilité individuelle

4.1. La réponse individuelle des tissus sains aux rayonnements ionisants

Les premiers événements tissulaires indésirables survenant après une exposition aux RI ont été observés peu après la découverte des rayons X par Röntgen en décembre 1895. Giesel a soutenu l'idée que les RI pourraient avoir des effets tissulaires nocifs. À ce jour, les réponses individuelles aux RI ont révélé au moins deux aspects principaux (Foray et al., 2016) :

- La radiosensibilité est définie comme la prédisposition aux événements tissulaires indésirables après une RT.
- «La radio-susceptibilité» est définie comme la prédisposition au cancer radio-induit y compris pour les faibles doses des RI.

4.2. Maladies génétiques associées à la radiosensibilité

4.2.1. Syndromes de radiosensibilité par défaut de réparation des CDB de l'ADN

Il existe différents syndromes génétiques associés à une radiosensibilité anormale. Ce sont les cas des mutations d'ATM et de LIG1 et LIG4, du syndrome de rupture de Nimègue (mutations NBS1), des troubles de type AT (mutations MRE11), de l'anémie de Fanconi (mutations des gènes FANC), du syndrome de Bloom (mutations de BLM), du xeroderma pigmentosum (mutations de 8 gènes XP), du syndrome de Cockayne (mutation de 2 gènes CS). Ces syndromes partagent un éventail de caractéristiques cliniques et biologiques communes, telles que l'instabilité génomique, les rendements anormaux d'aberrations chromosomiques, une immunodéficience et généralement une prédisposition au cancer (Foray et al., 2016).

4.2.2. Syndromes de radiosensibilité sans défaut direct de réparation des CDB de l'ADN

Certains syndromes de radiosensibilité ne sont pas directement associés à un défaut de réparation des CDB. C'est notamment le cas de la progéria (syndrome de Hutchinson-Gilford), la neurofibromatose, la chorée de Huntington, la maladie de Bruton ou le syndrome de Gorlin. Les syndromes sont causés par des mutations de gènes dont les protéines se localisent dans le cytoplasme ou la membrane nucléaire, mais pas nécessairement dans le noyau (Foray et al., 2016).

4.3. Test de la radiosensibilité individuelle

La remarquable efficacité de la radiothérapie a mené à de nombreuses indications pour différents types de cancers. Cependant, compte-tenu du risque de toxicité radio-induite, le bénéfice de la radiothérapie est restreint à une partie des patients. Ceci souligne la nécessité de disposer de

biomarqueurs prédictifs de toxicité radio-induite. Plusieurs tests prédictifs de la radiosensibilité individuelle ont été étudiés à différents niveaux biologiques, incluant les cellules, les chromosomes, les dommages de l'ADN, et la radiogénomique. La figure ci-dessous résume les principales techniques évaluées pour leur potentiel prédictif de radiosensibilité individuelle (Figure 27).

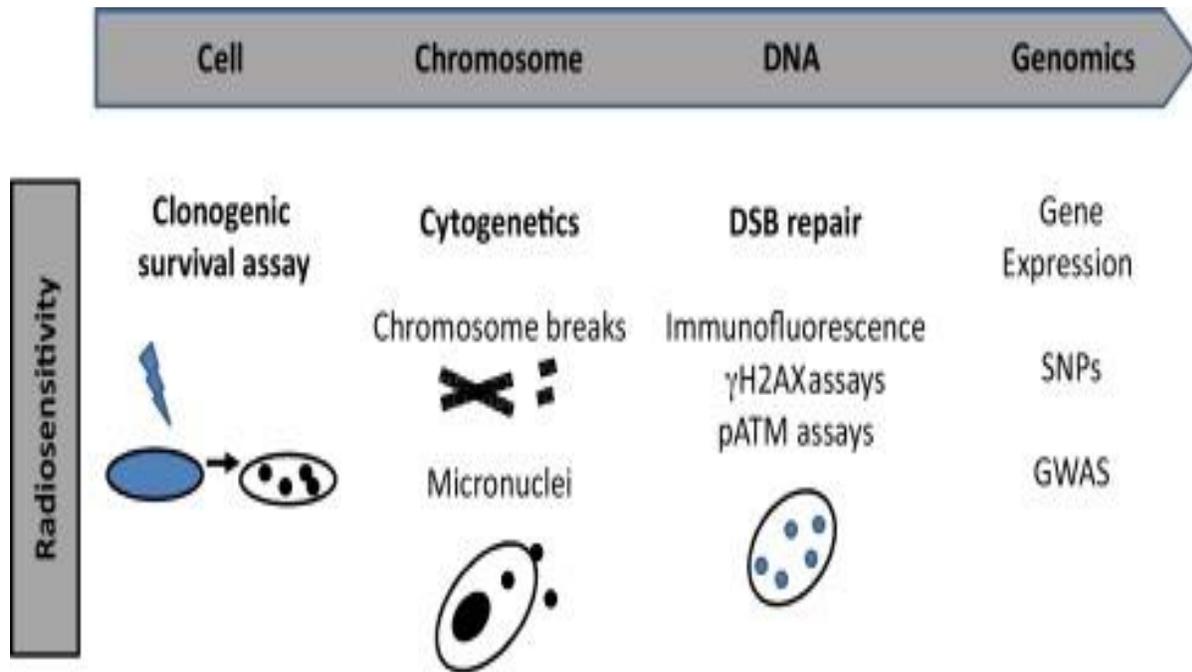


Figure 27 : Principales techniques d'évaluation de la radiosensibilité (Foray et al., 2016).

4.3.1. Tests de la mort cellulaire

4.3.1.1. Test de survie clonogénique des fibroblastes

La survie cellulaire clonogénique est l'un des premiers tests prédictifs de radiosensibilité qui a été largement étudié. Son principe est que la fraction de survivants à une dose de 2 Gy (SF2) indique la radiosensibilité intrinsèque des cellules. Ces études ont montré qu'il y a une corrélation entre la radiosensibilité des fibroblastes des patients et les réactions de différents tissus sains à la radiothérapie (Joubert et al., 2008). Cette association a été étudiée dans les cancers du sein et de la tête et du cou. Cependant, à ce jour, aucune étude prospective n'a pu démontrer une association significative entre la radiosensibilité des fibroblastes et la toxicité radio-induite chez les patients (Azria et al., 2017). Par ailleurs, la durée du test de deux semaines est considérée comme un obstacle à sa mise en œuvre clinique.

4.3.1.2. Test d'apoptose radio-induite des lymphocytes T

Le test d'apoptose radio-induite des lymphocytes T (RILA : radiation-induced lymphocyte apoptosis) a été développé au début des années 90 sur la base de données précliniques et rétrospectives prometteuses (Crompton, 1997; Crompton et al., 1997; Ozsahin et al., 1997). Le principe du RILA est le suivant : les échantillons sanguins sont irradiés avec une seule fraction de 8 Gy. Ensuite, l'apoptose des lymphocytes T est mesurée 48 heures après irradiation par cytométrie en flux. Les résultats initiaux du RILA montrent que le taux d'apoptose des lymphocytes T CD8⁺ est significativement associé à l'incidence d'effets tardifs de grade > 2 dans différents cancers, dans une étude prospective monocentrique (Ozsahin et al., 2005), puis cette association a été récemment confirmée dans une étude prospective multicentrique chez des malades ayant eu une RT pour cancer du sein (Azria et al., 2015). De plus, des travaux récents ont validé la corrélation du RILA CD4⁺ à une fibrose et à une télangiectasie radio-induites après 10 ans de traitement, dans une population de 272 patientes atteintes d'un cancer du sein (Veldwijk et al., 2019). Dans ces études le faible taux d'apoptose radio-induite au niveau des lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺ était corrélé avec les complications radio-induites de grade élevé (> 2) (Azria et al., 2010, 2015; Ozsahin et al., 2005; Veldwijk et al., 2019). En outre, ce test était reproductible entre les laboratoires (Mirjolet et al., 2016; Azria et al., 2017, 2018; Talbot et al., 2019). L'intérêt du RILA CD8⁺ a été confirmé dans différents types de cancer, tels que le cancer du col de l'utérus (Bordón et al., 2010) et les cancers de la tête et du cou (Bordón et al., 2010). Récemment, dans des cohortes de patients atteints de cancer de la prostate (Azria et al., 2019) et du poumon (Talbot et al., 2019), les auteurs ont mis en évidence une association entre un faible RILA CD8⁺ et la toxicité radio-induite. Enfin, le RILA a été aussi évalué positivement dans une cohorte de 120 patients ayant développé un sarcome radio-induit (Mirjolet et al., 2019). Par ailleurs, l'équipe de P-H Roméo au CEA a montré qu'un fort taux d'apoptose radio-induite des lymphocytes TCD4⁺ « effecteurs-mémoires » (T4EM) est associé à un risque élevé de radiodermite précoce aigüe ou subaigüe après radiothérapie (Baijer et al., 2016). Cependant, les travaux de Vogin et al. ont indiqué une absence de corrélation entre le RILA CD8⁺ et les séquelles radio-induites sur 245 patients porteurs du cancer de la prostate (Vogin et al., 2018a).

4.3.2. Tests de formation des micro-noyaux et des comètes

Les tests cytogénétiques ont d'abord été basés sur les techniques de fluorescence qui permettent de quantifier les ruptures et les aberrations chromosomiques. Le nombre élevé de ruptures chromosomiques non réparées a été corrélé avec la sévérité de la toxicité radio-induite (Wang et al., 2013). Les tests des comètes et de formation des micro-noyaux sont réalisés sur des lymphocytes (Figure 28). Comme les tests de survie clonogénique, les tests cytogénétiques ont besoin de temps pour être réalisés. C'est la raison pour laquelle, certaines approches alternatives plus moléculaires ont été préférées.

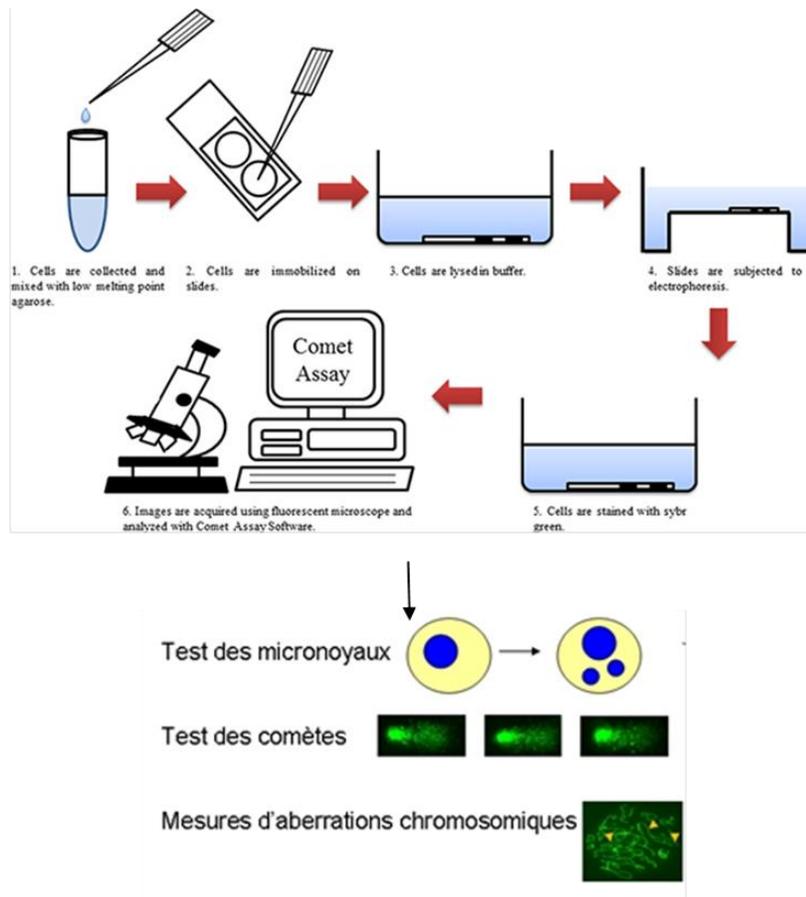


Figure 28 : Schéma du test des comètes et des tests cytogénétiques (D'après Nowsheen et al., 2012 ; dsv-old.cea.fr)

4.3.3. Tests utilisant des marqueurs de dommages de l'ADN

4.3.3.1. Test d'évaluation des foyers de γ H2A.X

Une dose de 1 Gy de rayons X ou γ produit simultanément environ 10000 dégâts de base (BD), 1000 CSB de l'ADN, et 40 CDB de l'ADN par cellule. Malgré un faible taux d'induction, les CDB, si elles ne sont pas réparées, semble être liées à la radiosensibilité. De nombreuses études expérimentales montrent que le nombre des CDB induites par rayonnement pouvaient être déterminé à partir du nombre de foyers nucléaires formés par le variant d'histone H2A.X phosphorylé sur la sérine 139 (γ H2A.X), facilement quantifiables par immunofluorescence. En 2008, l'équipe de Joubert a examiné la relation entre la radiosensibilité cellulaire et les données de réparation CDB dans une collection de 40 fibroblastes humains non transformés représentant au moins 8 syndromes génétiques différents. Les résultats ont montré que la la fraction de

cellules survivantes à 2 Gy (SF2) était inversement proportionnelle à la quantité de CDB non réparées, quels que soient les mutations géniques et les tests appliqués. Une classification des maladies en fonction de leur radiosensibilité cellulaire, de leur réponse RI moléculaire et des tests fonctionnels qui ont permis leur évaluation a donc été proposée (Joubert et al., 2008). En outre, différentes études *ex vivo* montrent que l'expression prolongée du biomarqueur de réparation de l'ADN γ -H2AX est corrélée à une toxicité radio-induite aiguë et chronique (Bourton et al., 2011; Olive and Banáth, 2004; van Oorschot et al., 2014, 2016, 2017; Pouliliou and Koukourakis, 2014).

4.3.3.2. Test de translocation cyto-nucléaire d'ATM

Foray et al. ont montré une corrélation entre le retard de la translocation nucléaire («nucléo-shuttling») de la protéine ATM dans les fibroblastes et la réaction excessive du patient à l'exposition aux rayonnements ionisants observée en clinique. Foray et al. ont proposé le modèle mathématique de la translocation cyto-nucléaire d'ATM (Bodgi and Foray, 2016). Ces résultats ont conduit à classer la radiosensibilité humaine en trois groupes : radiorésistance (groupe I); radiosensibilité modérée causée par le retard de nucléo-shuttling de l'ATM (groupe II) et hyper-radiosensibilité causée par une réparation déficiente des CDB (groupe III) (Belkacemi et al., 2016, COPERNIC project investigators et al., 2016; Pereira et al., 2018; Vogin et al., 2018b; Słonina et al., 2018).

4.3.4. Tests radiogénomiques

Initialement, la recherche réalisée en radiogénomique a consisté dans des approches de type « gènes-candidats ». Ces gènes codent pour des protéines associées à des voies de signalisation qui sont impliquées dans les réponses aux rayonnements ionisants, telles que les processus de réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. Des progrès plus récents dans les études radiogénomiques ont été réalisés grâce à l'utilisation des nouvelles méthodes à haut débit de criblage de polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide (SNP : single nucleotide polymorphism) et à la performance des études d'association au niveau du génome entier (GWAS : genome-wide association studies) dans lequel un grand nombre de SNP ont été évalués dans le génome (Azria et al., 2008, 2017).

Les progrès les plus importants ont été réalisés dans l'identification de SNP spécifiques associés à une toxicité tardive après la RT dans le cancer de la prostate. Les premiers GWAS réalisés visaient à identifier le SNP rs2268363 dans le gène qui code pour FSHR (follicle-stimulating hormone receptor) associé à une dysfonction érectile chez les patients porteurs d'un cancer de la prostate et traités par RT (Kerns et al., 2010).

Andreassen et col. ont montré une association significative entre le SNP rs1801516 d'ATM et la toxicité après radiothérapie chez 5456 patients atteints de cancer du sein ou de la prostate (Andreassen et al., 2016).

Des travaux récents ont montré un lien entre trois SNPs (rs3815496, rs1131532, rs1131535) du gène TRAIL (tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand) et le niveau d'expression de TRAIL à la surface de la sous-population de lymphocytes T CD4⁺ «effecteurs-mémoires» (T4EM) et la toxicité radio-induite chez les femmes atteintes de cancer du sein traitées par RT (Baijer et al., 2016).

L'équipe de Grossberg a par ailleurs montré une association entre le SNP C509T de TGF- β et la fibrose radio-induite chez les patientes atteintes de cancer du sein (Grossberg et al., 2018). Plusieurs études de SNP sur différents gènes-candidats ont permis d'identifier et de valider des SNP associés à une toxicité tardive de la RT dans le cancer du poumon. Des études menées auprès de patients traités par RT pour un cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) ont montré que le SNP HSPB1 rs2868371 était associé à une pneumopathie radique de grade 3 ou plus (Pang et al., 2013). En outre, d'autres études ont montré que le SNP rs1800469 de TGF- β 1 était associé à un risque plus élevé d'œsophagite par rayonnement dans les patients atteints de CPNPC (Barnett et al., 2012).

Actuellement, les études françaises REQUITE et PROUST sont en cours afin de centraliser les données et les prélèvements sanguins dans le but de la validation de ces marqueurs prédictifs de la toxicité radio-induite individuelle (Belkacemi et al., 2018; Seibold et al., 2019).

Au total, la majorité des données figurant dans le paragraphe « Sénescence » font l'objet de l'article de revue ci-après, publié dans "Critical Reviews in Oncology Hematology" en 2018.

5. Article 1

Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy.

A review

Hoang Quy Nguyen ^{a,b}, Nhu Hanh To ^{b,c}, Patricia Zadigue ^b, Stéphane Kerbrat ^d, Alexandre De La Taille ^{b,e}, Sabine Le Gouvello ^{d,f}, Yazid Belkacemi ^{b,c,1,2}

Crit Rev Oncol Hematol. 2018 Sep;129:13-26. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.06.012. Epub 2018 Jun 22.

Résumé

Dans le contexte de la fibrose radio-induite, la connaissance des mécanismes sous-jacents en vue de leur prévention potentielle est devenue un point crucial pour personnaliser l'irradiation selon la radiosensibilité intrinsèque individuelle des patients. Notre revue résume l'état actuel des connaissances sur le rôle de la sénescence cellulaire induite par les rayonnements ionisants dans la fibrogenèse. Après avoir rappelé les principales caractéristiques des réponses cellulaires à l'irradiation, et plus particulièrement celles de la sénescence, nous avons collecté les études fondamentales, translationnelles, et de recherche clinique concernant la sénescence radio-induite. Cette revue a concerné les types cellulaires impliqués dans le processus physiopathologique de fibrose, comme les fibroblastes, les myofibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les cellules souches mésenchymateuses et les cellules immunitaires. Nous avons aussi résumé les tests évaluant la sénescence cellulaire ainsi que les différentes voies de signalisation connues de la sénescence radio-induite. Enfin, nous avons aussi rapporté les données disponibles sur les agents thérapeutiques ciblant la sénescence qui pourraient contribuer à la modulation de la fibrose radio-induite.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Critical Reviews in Oncology / Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/critrevonc

Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review



Hoang Quy Nguyen^{a,b}, Nhu Hanh To^{b,c}, Patricia Zadigue^b, Stéphane Kerbrat^d, Alexandre De La Taille^{b,e}, Sabine Le Gouvello^{d,f}, Yazid Belkacemi^{b,c,*,1,2}

^a University of Paris Saclay, University of Paris Est Créteil (UPEC), France, University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh City, Viet Nam

^b INSERM U955 Team 07, Créteil, France

^c APHP, Department of Radiation Oncology and Henri Mondor Breast Cancer and, Henri Mondor University Hospital, University of Paris Est Créteil (UPEC), France

^d INSERM U955 Team 04, University of Paris Est Créteil (UPEC), France

^e APHP, Department of Urology, Henri Mondor University Hospital, University of Paris Est Créteil (UPEC), Créteil, France

^f APHP, Department of Biology & Pathology, Henri Mondor University Hospital, University of Paris Est Créteil (UPEC), Créteil, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Senescence

Senescence-associated secretion phenotype

Radiosensitivity

Fibrotic tissue

ABSTRACT

Ionizing radiation-exposure induces a variety of cellular reactions, such as *senescence* and *apoptosis*. Senescence is a permanent arrest state of the cell division, which can be beneficial or detrimental for normal tissue via an inflammatory response and senescence-associated secretion phenotype. Damage to healthy cells and their microenvironment is considered as an important source of early and late complications with an increased risk of morbidity in patients after radiotherapy (RT). In addition, the benefit/risk ratio may depend on the radiation technique/dose used for cancer eradication and the irradiated volume of healthy tissues. For radiation-induced fibrosis risk, the knowledge of mechanisms and potential prevention has become a crucial point to determining radiation parameters and patients' intrinsic radiosensitivity. This review summarizes our understanding of ionizing radiation-induced senescent cell in fibrogenesis. This mechanism may provide new insights for therapeutic modalities for better risk/benefit ratios after RT in the new era of personalized treatments.

1. Introduction

Ionizing radiation (IR) exposure can induce a variety of cellular reactions, such as *apoptosis* and *senescence*. Cellular senescence plays an important role in embryonic development and in shaping organogenesis, wound healing and tumor suppression (He and Sharpless, 2017). A senescent cell is a potent anti-cancer mechanism that can occur in virtually any cell, including fibroblasts, epithelial cells, melanocytes, endothelial cells, and astrocytes (He and Sharpless, 2017; Chinta et al., 2015). It remains viable and metabolically active even though it does not undergo cell division and permanently arrests cell proliferation (He and Sharpless, 2017; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

At the tissue level, cellular senescence increases with age in many renewable tissues which are discovered at sites of age-related diseases, including degenerative disorders, malignant and benign diseases. In addition, researches on senescence biomarkers have to take into account specific contexts and different cell types. In the lung tissue, senescent fibroblasts could trigger fibrogenesis (Schafer et al., 2017),

while senescent activated hepatic stellate cells could diminish liver cirrhosis (Krizhanovsky et al., 2008). The impact of cellular senescence in tissue may be beneficial or harmful, which depend on the triggered factors, tissue, and cell type (Schafer et al., 2018). At the cellular level, the long-drawn presence of senescent cells in normal tissues may stimulate potency damage, predominantly due to the persistence of related inflammatory responses (Lasry and Ben-Neriah, 2015). Conversely, cellular senescence can have a beneficial response and prevent the growth of premalignant cells and activate cancer immune surveillance.

IR-induced cellular senescence as a promoter of fibrotic sequelae has been shown in several models recently. In lung, data from Beach et al. have suggested radiation-induced pulmonary fibrosis as a step in progressive fibrosis (Beach et al., 2017). Recently, Schafer et al. showed that IR-induced senescent fibroblasts contribute to lung fibrosis via their profibrotic secretomes (Schafer et al., 2017). Korpela and Liu reported that radiation-induced senescence is involved in endothelial cells (Korpela and Liu, 2014). Hong et al. reported articular

* Corresponding author at: Service d'Oncologie-Radiothérapie, CHU Henri Mondor, 51 Av. Mal De Lattre de Tassigny, Créteil, 94010, France.

E-mail address: yazid.belkacemi@aphp.fr (Y. Belkacemi).

¹ Transatlantic Radiation Oncology Network (TRONE).

² Association of Radiotherapy and Oncology of the Mediterranean area (AROME, www.aromecancer.org).

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.06.012>

Received 18 February 2018; Received in revised form 8 June 2018; Accepted 15 June 2018

1040-8428/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

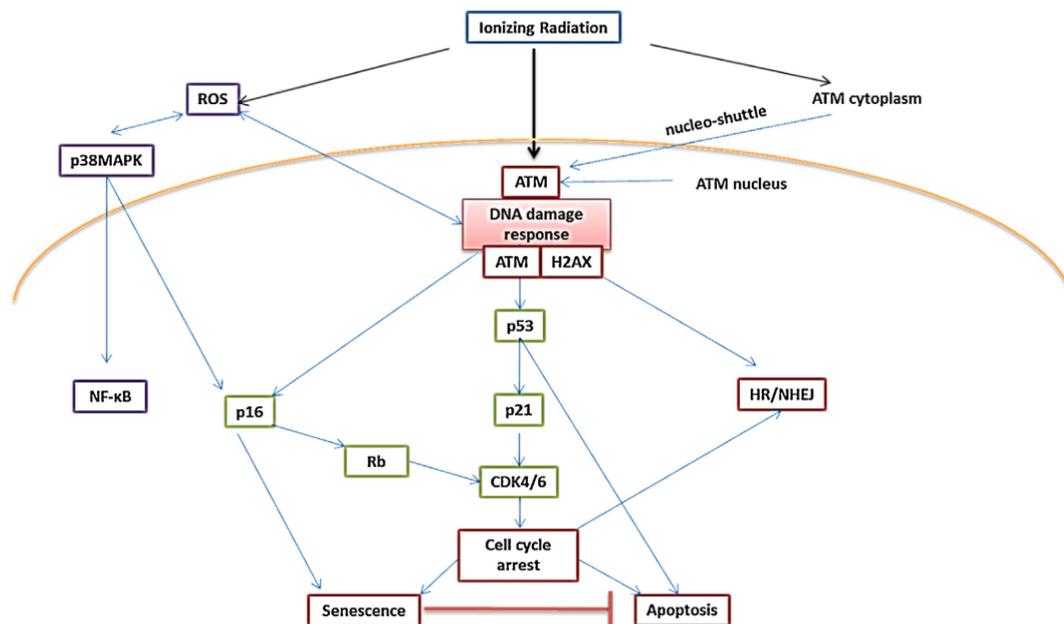


Fig. 1. DNA damage response induced senescence by ionizing radiation.

IR induced nucleo-shuttling of ATM. The ATM kinase activated, permit accurate phosphorylation of H2 AX and other DNA repair protein by two main repairs NHEJ, HR. The DNA damage response (DDR) after IR leads to stimulate p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) through ROS, ROS also produced after radiolysis of water, in turns activate transcription factor nuclear factor kappa-B, in turn production of p16INK4A, p16 INK4A activates the pRb tumor suppressor, which block certain proliferative genes, ultimately induces durable cell-cycle arrest. DDR activates not only p16/Rb but also p53 tumor suppressor, then turns on the p21 WAF1 gene transcription, ultimately causes senescence permanent growth arrest. Both the p53/p21 and p16INK4a/pRb pathways are clearly of major importance in cellular senescence by inhibiting the cyclin-dependent kinase (CDK) to exit from cell division cycle, thus involve in cellular arrest and oncogene-induced senescence, which is characterized by overexpression of p16, p53 or p21 proteins and resistant to apoptosis. (ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated protein; CDK: cyclin-dependent kinase; DNA: Deoxyribonucleic acid; H2 AX: histone H2 A family; IR: Ionizing radiation; NF-κB: nuclear factor kappa-B; NHEJ: non-homologous end joining; p38MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; pRb: retinoblastoma protein ROS: Reactive Oxygen Species).

chondrocytes damage after radiation via the senescence pathway (Hong et al., 2010). In the heart, Liu et al. recently reported that radiation can induce myocardial fibrosis after RT for thoracic tumors (Liu et al., 2017). However, the authors have not shown that IR-induced senescence promotes a fibrotic myocardium.

In this review, we aimed to focus on IR-induced senescence accelerated tissue fibrosis. We hypothesize that this mechanism may provide new insights into novel therapeutic modalities in RT to prevent or cure radiation-induced fibrosis in patients who have a long-term outcome after irradiation.

2. Methods

2.1. Data sources

We searched for relevant studies by using the electronic resources of the “Pubmed” database from 1977 to 2018. The search language was limited to publications written in English and French.

2.2. Search strategy

A literature search strategy involving the keywords “radiation-induced toxicity”, “radiotoxicity” “radiation-induced senescence”, “radiation-induced fibrosis”, “radiotherapy-induced toxicity”, “radio-sensitivity AND radioresistance”, “radiation AND senescence”, “senescence AND fibrosis”, “radiation AND fibrosis”, “senescence AND senotherapeutics”, “senescence AND senolytics”, “senescence AND senomorphics”, and “senescence AND SASP inhibitors” was used. We screened keywords, titles and abstracts of all retrieved articles and selected significant articles for full text. Electronic links to related articles

and references of selected articles were hand-searched. Eligible articles included meta-analyses, prospective studies, multicenter studies, clinical trials, reviews and systematic reviews.

3. Results

3.1. Radiation-induced senescent cells mechanisms

Exposure to IR can lead to many cellular responses, including a modification of gene expression as well as deoxyribonucleic acid (DNA) damage which occurs either as a direct effect of radiation on DNA molecules or by an indirect action by the free radicals and reactive oxygen species (ROS). DNA double-strand breaks (DSBs) are one of the most genotoxic lesions in the genome, with 5% unable to be repaired. Unrepaired DSBs after irradiation can lead to cell death, such as apoptosis, senescence, mutation or genomic instability. IR induces cell apoptosis and senescence via multiple pathways (Islam, 2017; Liauw et al., 2013a; Santivasi and Xia, 2014).

Several authors have shown that radiation can lead to the oxidation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein dimers converted into ATM monomers. The resulting ATM monomers are nucleo-shuttled, to allow DSB recognition via the phosphorylation of H2 AX (γ -H2 AX) and execute DSBs repair by two main repair pathways non-homologous end joining (NHEJ), prevalent throughout all phases of the cell cycle and homologous recombination (HR), prevalent during late S-phase and G2-phase (Islam, 2017; Santivasi and Xia, 2014; Belkacemi et al., 2016; Bodgi et al., 2013; Bodgi and Foray, 2016; COPERNIC project investigators et al., 2016). The DNA damage response (DDR) after IR leads to stimulating p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and protein kinase C (PKC), activating transcription factor nuclear

factor kappa-B (NF- κ B) which produces cytokines and chemokines as well as contributing to increased intracellular ROS, in turn activating the Cyclin-dependent kinase inhibitor 2 A (CDKN2A) locus, producing p16 INK4A (p16) and p19 INK4D (ARF). p16 INK4A activates the retinoblastoma protein (pRb) tumor suppressor, which blocks certain proliferative genes by heterochromatinization, ultimately inducing durable cell-cycle arrest. DDR activates not only p16/Rb but also the p53 tumor suppressor, then turns on the p21 WAF1 (p21) gene transcription, ultimately causing senescence and permanent growth arrest (Fig. 1). Both the p53/p21 and p16/pRb pathways are clearly of major importance in cellular senescence, by inhibiting the cyclin-dependent kinase (CDK) from exiting from the cell division cycle, involved in cellular arrest and oncogene-induced senescence which is characterized by overexpression of p16, p53 or p21 proteins (Bernardes de Jesus and Blasco, 2012) (Fig. 1).

Additionally, Kim et al. examined the characterization of DNA damage that can induce endothelial cell senescence after IR by performing a DNA microarray analysis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) irradiated in comparison with the multi-passage HUVECs-induced senescence. These authors demonstrated that IR-induced gene alterations are associated with senescence (Kim et al., 2014a). Recently, Baselet et al. determined that IR induced senescence in human telomerase-immortalized coronary artery endothelial (TICAE) cells with a single X-ray dose (0.05, 0.1, 0.5 and 2 Gy) and measured at days 1, 7 and 14 after exposure to irradiation. The authors elucidated IR-induced premature senescence by functional gene alterations that resulted in cell cycle changes and inflammation in endothelial cells (Baselet et al., 2017).

3.2. Senescent cells and microenvironment after X-ray exposure

In order to update the hallmarks of cancer, Fouad and Aanei showed that senescent cells can be induced by different oxidative stresses which activate tumor-suppressors and unbalance mitogenic signaling (Fouad and Aanei, 2017). Additionally, the characterization of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) or senescence-messaging secretome by cellular senescence is capable of remodeling the tissue microenvironment, which can be detrimental to tissues by promoting inflammation, stimulating angiogenesis, and contributing to metastasis (Campisi, 2013; Coppé et al., 2011, 2008; Demaria et al., 2017; Kulman and Peeper, 2009; Rodier et al., 2009) (Fig. 2).

3.2.1. Senescence-associated secretory phenotype

The senescence-associated secretory phenotype (SASP) is one of the hallmarks of cellular senescence, which can facilitate wound healing, tissue repair and development, and serve several biological functions, either beneficial or deleterious. SASP constituents include a various number of cytokines, chemokines, growth factors and proteases (Campisi, 2013; Demaria et al., 2017; Baker et al., 2017). Additionally, SASP can extend the stress response and impact in the tissue microenvironment by cell-cell communication or cell-matrix interaction. The SASP provides a strong link between senescence and inflammation (Lasry and Ben-Neriah, 2015). On the other hand, inflammatory genes can be observed in various types of senescence cells that are activated by different triggers (RT, chemotherapy, UV, smoking), secrete proteins and affect their neighboring environment. The stimulation of SASP is activated by the transcription factors nuclear NF- κ B by way of producing a diversity of soluble inflammatory chemokines, pro-inflammatory cytokines (interleukin (IL), IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and IL-8), growth factors (hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor beta (TGF- β)), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and matrix components, protease released (matrix metalloproteinases (MMP)-1,-3,-13) and small molecular weight metabolites, which create a pro-inflammatory environment and multiply reactions with the immune cell, and ultimately cause tissue injury (Lasry and Ben-Neriah, 2015). Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines can be induced by

paracrines, autocrines, or endocrines, which reinforce the senescent milieu as well as cause inflammatory microenvironment (Ortiz-Montero et al., 2017).

3.2.2. Radiation-induced senescence in fibroblasts

Fibroblasts play a crucial role in the fibrosis process and tissue scarring, as they are responsible for the deposition and remodeling of extracellular matrix (ECM) components. Fibrogenesis occurs through the transition from fibroblasts to myofibroblasts via environmental inflammation mediated inflammatory cytokines (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). Papadopoulou and Kletsas investigated human lung fibroblasts premature senescence after exposure to IR. In their study, the researchers showed that generated ROS and activated TGF- β , as well as activated p38 MAPK by IR, can accelerate premature senescence (Papadopoulou and Kletsas, 2011). Schafer et al. also demonstrated IR-induced senescence in primary human fibroblasts, which triggered proinflammatory and profibrotic SASP factors, promoted lung fibrosis (Schafer et al., 2017). In primary human mammary fibroblasts (HMFs), Tsai et al. showed that IR-induced senescent stromal fibroblasts rendered nearby radioresistant cell lines in breast cancer (BC) (Tsai et al., 2009). Similarly, Liakou and colleagues demonstrated that IR induced premature senescence in human breast stromal fibroblasts *in vivo* and *in vitro*, which can lead to overexpression of proteoglycan syndecan 1 (SDC1) at the cell surface through an autocrine TGF- β loop formation (Liakou et al., 2016).

3.2.3. Radiation-induced epithelial cell senescence and pathways

IR-induced epithelial cells senescence has been investigated in many studies of different organs. In this paragraph, we will discuss radiation-induced senescence according to the irradiated tissue types of epithelium, such as pulmonary, breast, skin and crystalline lens.

3.2.3.1. Pulmonary. Radiation-induced pulmonary fibrosis is one of the main complications. Oxidative stress can induce it in the oxygenated medium, thus can be at the origin of these lethal consequences in different types of cellular mortality and organ dysfunction. Chung et al. found that radiation-induced senescence promoted pulmonary fibrosis in alveolar epithelium (Chung et al., 2016a). Another research group investigated bronchio-alveolar epithelial cells from the lungs of mice, which had induced senescence after total body irradiation (Klein et al., 2015). Several studies elucidated that epithelial senescence in culture has been shown in the up-regulation of a range of pro-inflammatory gene transcripts that include IL-6 and chemokines (CXCL1, CCL2), implicated in the emergence of radiation-induced pulmonary fibrosis (Beach et al., 2017; Coppé et al., 2011; Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009; Johnston et al., 2010).

3.2.3.2. Breast and skin. After RT for BC, breast and skin fibrosis can significantly alter aesthetic score and quality of life. The mechanism of radiation-induced fibrosis has been extensively studied in the literature. It depends on the technical modalities of the irradiation and the intrinsic radiosensitivity of the patients (Azria et al., 2012). Senescence may be at the origin of radiation-induced fibrosis.

In the human mammary epithelium, Mukhopadhyay et al. demonstrated that IR induced accelerated cellular senescence *in vitro* (Mukhopadhyay et al., 2010). Similarly, Gao et al. showed that IR-induced the senescent cell line MCF-10A (non-tumorigenic mammary epithelial) at day 10 following an acute dose of 10 Gy (Gao et al., 2016).

Apart from the mammary tissue, cutaneous tissue elements may also be affected by senescence. McCart and colleagues recently demonstrated that accelerated senescence occurs in the human keratinocyte following radiation exposure at 18 Gy in a murine model. Interestingly, the investigators found that the fibrosis occurred 80 days following irradiation (McCart et al., 2017).

3.2.3.3. Crystalline lens. The crystalline lens is a radiosensitive

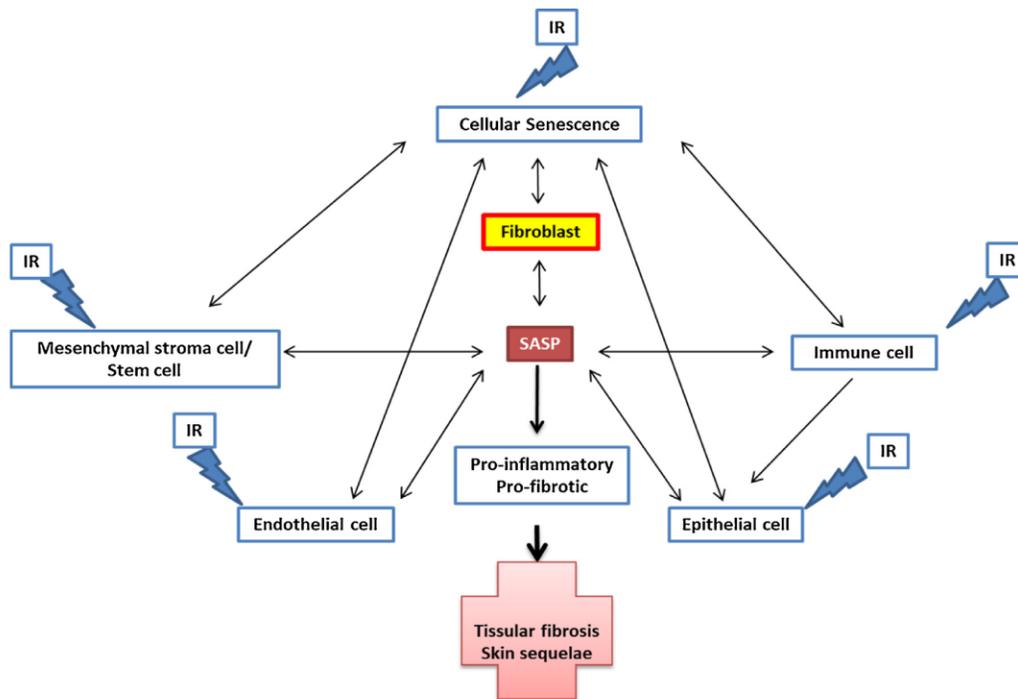


Fig. 2. Interrelationships between senescence-associated secretory phenotype (SASP) and the cellular microenvironment.

Ionizing radiation (IR) can induce senescence cells in epithelium, endothelium, immune cell, and in mesenchymal stromal cells/stem cells. SASPs interact to neighboring cells through endocrine or a paracrine stimulatory loop, which excrete pro-inflammatory cytokines such as IL-1, TNF- α as well as the pro-fibrotic cytokine TGF- β . TGF- β signaling results in activation of SMAD 2/3 pathway, can stimulate fibroblast proliferation and collagen production, involve in ECM remodeling and ultimately contribute to the progression of fibrosis. (ECM: extracellular matrix; IL: Interleukin; IR: Ionizing radiation; SASP: Senescence-associated secretory phenotype; TGF: transforming growth factor beta; TNF: tumor necrosis factor).

avascular organ and opacification can be observed at a low dose. Apoptosis of crystalline epithelial cells is involved in cataractogenesis (Belkacemi et al., 2001; Belkacemi et al., 2000). Recently, Hamada found that IR induced senescence in primary normal human lens epithelial cells, dependent on the ATM and DNA-PK pathways (Hamada, 2017). These results suggest that IR-induced senescence in human lens epithelial cells might result in cataracts.

3.2.4. Radiation-induced endothelial cell senescence and pathways

In endothelial tissues, many cellular types can be affected by senescence via different mechanisms and signaling pathways. For each cell type, it is possible to have the involvement of one or more signaling pathways to promote radio-induced senescence. In this section, we will describe the processes in HUVECs as well as in human pulmonary arterial endothelial cells (HPAECs), human lung microvascular endothelial cells (HMVECs), cerebromicrovascular endothelial cells (CMVECs) and TICAE cells. Accelerated endothelial senescence after IR has been elucidated by various signal transductions from the transmembrane tyrosine kinase receptor (IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR), leading to the activity of cytoplasmic signaling pathways (p38 MAPK pathways, mitochondrial dysfunctions) and ultimately nucleus alterations (NF- κ B pathway).

3.2.4.1. Transmembrane tyrosine kinase receptor and cytoplasmic signaling pathways. Senescence is a process that may involve all transmembrane and cytoplasmic signaling pathways. In membrane, the insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) was studied by Day et al. IR-induced endothelial cell senescence has been investigated through the effect of the IGF-1R/phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K)/Akt/mechanistic target of rapamycin/mammalian target of rapamycin

(mTOR) pathway signaling. Several *in vitro* studies showed that IR-induced senescence has been associated with reduced pro-survival PI3K in HUVECs as well as in HPAECs by triggering IGF-1R-induced PI3K/Akt/mTOR activity upstream of both p53 and p21 (Day et al., 2014; Panganiban and Day, 2013; Wang et al., 2016; Yentrapalli et al., 2013).

In cytoplasm, p38 MAPK is widely implicated in senescence. p38 MAPK is a signaling pathway which responds differently, depending on the dose of exposure to radiation. Exposure of endothelial cells to a high dose (> 10 Gy) of irradiation can induce apoptosis via the relationship of plasma membrane (acid sphingomyelinase (ASMase)/ceramide) and p38 MAPK pathways by the relocation of ASMase at the cell membrane, allowing the formation of the sphingolipid ceramide from sphingomyelin, leading to the formation of enlarged lipid platforms and, finally, yielding the signal to p38 MAPK activation and apoptotic cell death (Niaudet et al., 2017). Interestingly, IR exposure of endothelial cells to low or moderate doses (0.5–10 Gy) can induce cellular senescence via p38 MAPK pathways by up-regulating p16 expression (Wang et al., 2016).

Mitochondrial dysfunction after irradiation exposure was recently studied by Lafargue's group. The authors showed that IR can induce endothelial cell senescence through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation in primary human lung microvascular endothelial cells (Lafargue et al., 2017). Moreover, the NF- κ B pathway has been considered as an important element in the promotion of inflammatory genes under the governance of p38 MAPK. Dong et al. reported that radiation-induced DSBs allowed NF- κ B pathway activation and, ultimately, induced HUVECs to enter a senescence-like phenotype. In this study, the authors revealed that IR-induced senescence can reduce, by inhibiting of NF- κ B activation and ultimately decreasing of IL-6, one of the major pro-inflammatory

cytokines (Dong et al., 2015).

NF- κ B signaling is the crucial signaling pathway which prompts the emergence of SASP. Ungvari et al. found that IR-induced senescence promotes SASP formation activation in CMVECs. The authors showed that DNA alterations occurred with the role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity after IR induced senescence and contributed to the impairment of angiogenic capacity in CMVECs (Ungvari et al., 2013).

3.2.5. Radiation-induced mesenchymal stromal/stem cell senescence

Stem cells are able to differentiate in bone, cartilage, and fat, and contribute to tissue regeneration and body homeostasis. Radiation-induced mesenchymal stem cell senescence can promote cytotoxic effects via accelerated senescence. In this paragraph, we introduce the effect of irradiation in cell-derived mesoderm and ectoderm to senescence.

3.2.5.1. Cell-derived mesoderm

3.2.5.1.1. Preadipocyte. By analyzing the expression of p16 and p21 in the preadipocyte cells, Xu et al. revealed that IR induced preadipocyte senescence. The authors then analyzed in depth the SASP components, which increased messenger ribonucleic acid (mRNA) levels IL-1 α , IL-6, IL-8, and MMP-3 in preadipocyte senescence-mediated radiation compared with control non-senescence (Xu et al., 2015). Zhu et al. have also demonstrated radiation-induced senescence in primary human preadipocytes after a single-dose of 10 Gy (Zhu et al., 2015).

3.2.5.1.2. Bone marrow cells. The medullary cells are highly radiosensitive. Radiation can damage bone marrow stem cells via the senescence process. Alessio's group demonstrated that radiation-induced senescence in human mesenchymal stromal cells (MSC) of bone marrow derived from the mesoderm was sensitive to very low dose irradiation (40 mGy) and triggered senescence due to impaired autophagy and DNA repair capacity. Interestingly, the authors showed that an increase in senescence was progressive from 40 mGy to 2 Gy; notably, exposure to 2 Gy of dose radiation induced senescence rather than apoptosis (Alessio et al., 2014). Similarly, Carbonneau's group found IR-mediated senescence in murine bone marrow-derived stromal cell populations (Carbonneau et al., 2012).

Hong's team described radiation-induced senescence of mesenchymal stromal cells in articular chondrocytes by negative post-translational regulation of SIRT1 (a mammalian Sir 2 ortholog) via ROS-dependent p38 kinase activation pathway; an increase of the expression of SIRT1 significantly decreased the IR-induced cellular senescence (Hong et al., 2010). Additionally, Havelek's laboratory found that radiation-induced senescence and premature differentiation of human dental stem cells shifted to odonto-/osteoblast lineages *in vitro* (Havelek et al., 2013).

3.2.5.2. Cell-derived ectoderm. IR can induce senescence either in mesodermal stem cells or in ectodermal stem cells. We next present radiation-induced senescence in neural stem cells and skin stem cells, which are original ectoderm.

3.2.5.2.1. Neural stem cells. Contrary to medullary cells, neural stem cells are radioresistant. Schneider et al. investigated the DNA damage in mammalian neural stem cells (NSC) by inducing X-ray. This study found that IR induced senescent NSC by leading cell cycle arrest and down-regulation of DDR signaling by acute exposure to 10 Gy X-ray irradiation (Schneider et al., 2013).

3.2.5.2.2. Skin stem cells. Radiation can induce dermatitis and ulceration, which affect the quality of life of cancer patients after RT. The loss of the adult stem cell population can induce tissue damage via the senescence process. Recently, McCart's team demonstrated radiation-induced senescence in adult skin stem cells in mice within 14 days after 18 Gy of irradiation. The authors observed that the p21/waf1 expression was increased through 30 days post-irradiation, which correlated with multifocal ulceration and chronic-active

pyogranulomatous dermatitis (McCart et al., 2017).

3.2.6. Radiation-induced immune cellular senescence

3.2.6.1. Radiosensitivity of immune cells. The immune cells are particularly sensitive to IR. B-cells, as well as natural killer (NK) cells, are radiosensitive, whereas memory T cells, effector T cells (Teffs) and regulatory T cells (Treg) from healthy donors are radioresistant (Wilkins et al., 2002). IR not only affects the Treg/Teffs immune balance but also reshapes the ratios of T helper 1 (Th1)/T helper 2 (Th2) (Schaue, 2017). Bauer and colleagues revealed that monocytes are more radiosensitive than macrophages (Bauer et al., 2011). The immune reactivity after IR is a potential major benefit but can increase the risk of normal tissue sequelae and chronic inflammation of cancer patients in the long term (Schaue, 2017).

3.2.6.2. Immunosenescence and T cell function. The induction of senescence by oxidative stress that results from IR exposure can alter leukocyte and T cell function; therefore, senescent T cells might have implications for enhancing human immunity (Akbar et al., 2016). In addition, senescent T cells have the capacity to secrete large quantities of pro-inflammatory cytokines and cytotoxic mediators, called SASP (Yu et al., 2016).

The CD8 + T cell senescence revealed its mitochondrial dysfunction, which augmented ROS production and had a negative effect on mitochondrial biogenesis (Henson et al., 2014). Ye et al. showed that Treg cells can induce senescence in naïve T cells and Teffs (Ye et al., 2012). Interestingly, Treg cells have been found to contribute fibrotic diseases in the lung by promoting a pro-fibrotic microenvironment after IR (Wirsdörfer and Jendrossek, 2016). In the study of Xiong's group, the authors demonstrated that Treg cells promoted epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in radiation-induced lungs fibrosis through the β -catenin signaling pathway (Xiong et al., 2015).

While Th1 cells have shown that anti-fibrotic activity by their production of IFN- γ can antagonize the pro-fibrotic activity of TGF- β 1, Th2 cells act as a potent driver of progressive fibrosis, enhance inflammation and promote tissue damage. Th2 cells are known by the production of IL-4, IL-5 and IL-13, linked to the development of fibrosis (Duffield et al., 2013; Wynn and Ramalingam, 2012). Likely, Th2 and Th17 cells are also pro-inflammatory and pro-fibrosis cells. Th17 cells can produce the pro-inflammatory cytokine IL-17 A, which plays a central role in driving the fibrosis in the pathogenesis of pulmonary fibrosis, hepatitis-induced hepatic fibrosis, especially radiation-induced lung fibrosis, myocardial fibrosis, colonic mucosal damage and fibrosis, as has been highlighted in many studies (Duffield et al., 2013; Wynn and Ramalingam, 2012; Bessout et al., 2015; Wang et al., 2014a, b).

3.2.6.3. Pre-clinical and clinical results. According to a study by Ye et al. *in vitro*, IR-induced senescence in naïve CD4 + T cells were observed at day 5 after 5 Gy (Ye et al., 2012). One recent work described the immune alteration in peripheral T lymphocytes after exposure to low doses of IR in mice. The authors provided evidence that low-dose radiation accelerated aging of the T-cell receptor repertoire with more T lymphocytes surviving (Candéias et al., 2017). Additionally, in the study of Klein and colleagues, the authors demonstrated that IR induced senescence in the leukocyte infiltration in lung tissue from mice exposed to whole-thorax irradiation at 15 Gy (Klein et al., 2015). Interestingly, radiation-induced senescence of CD4 + and CD8 + T cells has been reported in one patient undergoing extracorporeal photopheresis in graft-versus-host disease (Lee et al., 2004).

3.2.7. Radiation-induced senescent cells promotes fibrosis

Radiation-induced DNA damage leads to a chronic inflammatory state and senescence. A landmark in the study of Beach's team was identifying the merging of a molecular target involved in DNA damage response, inflammatory response and senescent cells in radiation-induced pulmonary fibrosis by using RNA sequencing technology. The

data strengthen the fact that radiation-induced cellular senescence related to changes in ECM and promoted tissue fibrosis (Beach et al., 2017). Additionally, cellular senescence may exist for longer periods in tissues and can be dependent on adjacent cells by producing a myriad of molecules, such as pro-inflammatory mediators. In this paragraph, we will describe how these factors can promote fibrosis in IR-induced senescence.

3.2.7.1. Senescent fibroblasts. As described above, fibroblasts contribute to fibrogenesis by activating fibroblast-to-myofibroblast transition, which promote excessive ECM production (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). IR-induced senescent fibroblasts bring out the SASP with a range of pro-inflammatory cytokines, chemokines, and growth factors which exacerbated fibrotic process in the naïve fibroblasts (Schaffer et al., 2017). A vicious circle in senescent fibroblasts induced senescence in the others vicinal cells or fibroblasts, multiplied signal SASP with pro-inflammatory factors, driven fibrosis.

3.2.7.2. Pro-inflammatory factors. IR can induce senescent cells in epithelium and endothelium, in fibroblast and mesenchymal stromal cells/stem cells, as well as in immune cells. The SASP interacts with neighboring cells through paracrine, autocrine and/or endocrine stimulatory loops, which excrete pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, IL-8, tumor necrosis factor α (TNF- α), intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), E-selectin (also known as CD62 antigen-like family member E (CD62E) or endothelial-leukocyte adhesion molecule 1), and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) expressions via activation of NF- κ B, inducing attraction of the immune cells. Polarization of neutrophil infiltration, macrophage subpopulations and monocytes activate in the damage position and release the TGF- β 1, which stimulates ECM synthesis by local fibroblasts. TGF- β 1, together with ras homolog (Rho)/ rho-associated protein kinase (ROCK) signaling pathway, plays an important role in radiation-induced fibrosis (Liu et al., 2017; Monceau et al., 2010; Taunk et al., 2015).

3.2.7.3. ROS formation. Cellular senescence can generate increased ROS levels by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases, which damage neighboring cells. Therefore, Citrin et al. clarified the mechanism of radiation-induced senescence-promoted lung fibrosis via NADPH oxidases (NOX) generation, in turn leading to senescent pneumocytes-stimulated fibroblast proliferation and collagen deposition, and ultimately to lung injury and fibrosis (Wang et al., 2016; Citrin et al., 2013; Citrin et al., 2017).

3.2.7.4. TGF- β . TGF- β activated at injury sites after IR exposure plays an important role in pathological processes. Senescence-mediated IR is associated with the SASPs, which secrete TGF- β . TGF- β signaling results in activation of the Smad 2/3 signaling pathway, reacts to ROS formations, and expands various pro-fibrotic signals to promote myofibroblast accumulation and production of ECM and, ultimately, fibrosis (Ahamed and Laurence, 2017). Interestingly, the myofibroblasts store in the space of an organic structure plays an important role in fibrotic formation through producing ECM protein pro-fibrosis. Moreover, myofibroblasts are the primary effector cells in tissue reconstruction and fibrosis through the activation of immune cells by secreting a number of cytokines, including TGF- β 1, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 A, IL-13, and platelet-derived growth factor (PDGF) (Duffield et al., 2013; Wynn and Ramalingam, 2012; Citrin et al., 2017; Wynn, 2008). In addition, the renin-angiotensin system plays a pivotal role in hemodynamic regulation in multiple organ systems. TGF- β is activated by up-regulation of angiotensin II, thus contributing to fibrosis.

TGF- β and ROS have a reciprocal relationship in the pathophysiology of radiation-induced fibrosis, a concept known as redox-fibrosis. Immediate induction of ROS by radiation induces damage of DNA,

protein, and lipids, thus releasing TGF- β (Ahamed and Laurence, 2017). Moreover, TGF- β is associated with pro-inflammatory effects involving the development and subset commitment of IL-17 producing Th17 cells, which promote inflammation (Raphael et al., 2015). Thus, the triplets of TGF- β , ROS and pro-inflammatory factors might play an important role in promoting fibrosis via accelerated senescence in fibroblast after IR. Conversely, in animal models exposed to carbon tetrachloride (CCl $_4$), the senescent activated stellate cells decreased hepatic fibrosis via the enhancing immune surveillance by natural killer cells (Krizhanovsky et al., 2008). The role of the senescent cell is a paradox in the fibrotic tissue, advantageous or disadvantageous fibrogenesis is dependent on oxidative stress parameters and cellular types (Schaffer et al., 2018). The pathway of IR-induced senescence boosts fibrosis which might be a relevant hypothesis for selectively killing the senescent cell in choosing treatment. Further studies will be investigated to help a better understanding of the fibrotic mechanisms involved in multi-element and multi-step events in radiation-induced multi-tissue senescence (Fig. 2).

3.3. Prediction of intrinsic radiosensitivity by cellular senescent tests

In fundamental research, cellular senescence might be identified in fibroblasts by cellular phenotype (specific morphology, senescence-associated β -galactosidase activity), cell proliferation arrest (decreased Ki-67), inhibiting the cyclin dependent kinase (p16, p21, p53, p38 MAPK expression), apoptosis exclusion (cleaved caspase-3), DDR and repair (ATM, γ -H2AX) and secretory proteins (IL-6, IL-8, CXCR2) (Schaffer et al., 2017; Akbar et al., 2016; Ewald et al., 2010). By analyzing characteristic features of senescence after IR-induced senescence, we might predict IR-induced fibrotic tissue. Thus, we hypothesize that the more IR-induced senescence, the more radiosensitivity and, ultimately, the more tissue injury with fibrosis. Use of the senescence biomarker assay could reflect indirectly radiosensitivity in translational research and predict the complication of prospective RT patients in clinical practice. Herein, we describe different tests to predict radiosensitivity: senescence-associated β -galactosidase, protein expression assays, SASP assay, senescence-associated secretory phenotype, DDR and apoptosis assays (Table 1).

3.3.1. Senescence-associated β -galactosidase assay (SA- β -gal assay)

3.3.1.1. Method. SA- β -gal activity can be measured at pH 6.0 by immunohistochemistry or by staining with X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside), a chromogenic substrate of β -gal. X-gal is cut by β -gal in the lysosome, resulting in an insoluble blue dye in cytoplasm. SA- β -gal reflected an increase in lysosomal mass in the senescent cells. Actually, SA- β -gal provides strong evidence for identifying cellular senescence with changes in morphology and increased side scatter in flow cytometry (Bernardes de Jesus and Blasco, 2012; Kurz et al., 2000).

3.3.1.2. Experiment. By using SA- β -gal assay, many cellular types of radiation-induced senescence have been identified, such as naïve T cells at day 5 after exposure to 5 Gy, human breast stromal after 5 days followed by irradiation in a dose of 4 Gy, and mammalian neural stem cells observed at 1, 3, 5 and 7 days after 10 Gy (Liakou et al., 2016; Schneider et al., 2013; Ye et al., 2012).

3.3.2. Gene and protein expression assay

As noted earlier, prematurely senescent cells have an over-expression of cell cycle inhibitors p21 and p16, and an absence of the hyper-phosphorylated form of the pRb. The expression of p16 strongly correlates with the overall burden of senescence cells. *in vitro* and *in vivo* experiments have shown the increase of senescence biomarkers of p21 or p16 expression after hours and up to 30 weeks following radiation treatment by using the Western blot analysis, immunofluorescence staining or reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Table 1
Prediction of intrinsic radiosensitivity by cellular senescent/apoptotic tests.

Tests	Methods	Models/Dose	Results in senescence/apoptosis	References
SA- β Gal assay	staining with X-Gal /Immunohistochemistry	human breast stromal (4 Gy) naïve T cell (5 Gy) mammalian neural stem cell (10 Gy)	blue dye in cytoplasm/senescence	(Liakou et al., 2016), (Schneider et al., 2013), (Ye et al., 2012)
Genes/Proteins expression	p21 (p21 WAF1), p16 (p16 INK4a)/Western Blot, RT-PCR	murine stromal bone marrow (6 Gy)	protein overexpression/senescence	(Carbonneau et al., 2012)
SASP assay	Pro-inflammatory cytokine dosage/ ELISA kits or Luminex xMAP	human preadipocyte (10 Gy)	increased level expression of cytokine/senescence	(Xu et al., 2015)
DNA damage response assay (DDR assay)	γ -H2 AX foci/Immunofluorescence	human lymphocyte (2 Gy) human skin biopsy (2 Gy)	radiation toxicity related to a decline of γ -H2 AX foci decay	(Belkacemi et al., 2016), (van Oorschot et al., 2017)
Apoptotic assay	cleaved caspase-2/3/9 Radiation-induced T-lymphocyte apoptosis (RILA)	peripheral blood (1 Gy, 2 Gy, 4 Gy) lymphocyte (2, 8 Gy)	protein overexpression/apoptosis high value RILA/apoptosis	(Santos et al., 2017), (Ozsahin et al., 2005), (Azria et al., 2015)

Abbreviations (Table 1).

ELISA:enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Luminex xMAP: Luminex (multi-analyse profiling); RILA: Radiation-induced T-lymphocyte apoptosis; RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction SA- β Gal: senescence-associated β -Galactosidase; SASP:senescence-associated secretory phenotype; X-Gal : 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside.

analysis. The study of McCart's team showed that p21 expression was increased in areas of adult skin stem cells following radiation-induced accelerated senescence (McCart et al., 2017). In the *in vivo* study of Carbonneau, p16 expression levels were found to be increased in murine stromal bone marrow after 6–8 weeks of 6 Gy total body irradiation (Carbonneau et al., 2012). Measurements of p16 levels can be performed in the tissue or in peripheral blood lymphocytes (Beach et al., 2017; Kim et al., 2014a; Panganiban and Day, 2013; Citrin et al., 2013; Salama et al., 2014). The p16 pre-treatment status in patients might be predictive of the degree of radiotoxicity: the higher the threshold, the higher the toxicity. Therefore, p16 expression might be promising as a biomarker to measure intrinsic radiosensitivity.

3.3.3. Senescence-associated secretory phenotype assay (SASP assay)

3.3.3.1. Method. As mentioned earlier, senescent cells down-regulated the production of proliferative proteins but up-regulated the production of pro-inflammatory and pro-fibrogenesis cytokines, a behavior termed the SASP. The level of these cytokine expressions can be measured by using immunoassays based on either enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits or Luminex xMAP (multi-analyse profiling). High-level expressions of IL-6, IL-8 and TGF- β 1 cytokine-mediated the SASP significantly linked to radiation-induced senescence and radiotoxicity.

3.3.3.2. Experiment. Xu et al. demonstrated that the most highly produced cytokines of radiation-induced senescence in preadipocytes were IL-6 (19-fold) and IL-8 (46-fold) in comparison to un-irradiated cells *in vitro* (Xu et al., 2015). Recent studies have shown that increased levels of IL-8 and TGF- β 1 in the plasma of patients undergoing RT functioned as a biomarker in combination with mean lung dose to predict the risk of radiation-induced lung toxicity in non-small cell lung cancer (Wang et al., 2017). Altogether, quantification of cytokine expression could show promise as a bio-indicator to predict radiation-induced toxicity via the mechanism of the SASP factor induced by senescent cells at the systemic level.

3.3.4. DNA damage response assay (DDR assay)

Several studies have shown the use of γ -H2 AX as a predictive monitor of DDR and senescence on *in vitro*, *in vivo* and translational research (Lafargue et al., 2017), (Oorschot et al., 2013; van Oorschot et al., 2017; Pouliliou and Koukourakis, 2014; van Oorschot et al., 2014; Vandersickel et al., 2010). Biosampling for γ -H2 AX studies can be applied to most types of cells or tissues, such as tumor cells,

lymphocytes, plucked cells, oral cells and skin biopsy, exposed to radiation *ex vivo* and quantification of γ -H2 AX foci *in vitro* by microscopy or by flow cytometry (Belkacemi et al., 2016; COPERNIC project investigators et al., 2016; Oorschot et al., 2013; van Oorschot et al., 2017; Pouliliou and Koukourakis, 2014, 2014; Andrievski and Wilkins, 2009; Borràs et al., 2015; Golfier et al., 2009; Kunogi et al., 2014; Olive and Banáth, 2004). Oorschot's team found that late radiation toxicity was related to a decline of γ -H2 AX foci decay and decreased DDR repair genes in peripheral lymphocytes of prostate cancer patients undergoing RT (van Oorschot et al., 2017). Hence, the γ -H2 AX assay might show promise as a standardized method in clinical practice to monitor DSB damage and tissue complication by IR-induced senescence.

3.3.5. Apoptotic assay

Resistance to radiation-induced apoptosis has been described in cellular senescence. This mechanism has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* by determining the ratio of pro-apoptotic proteins and anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family members, which determine whether and when apoptosis was triggered. Cellular senescence has both a stable expression of anti-apoptotic Bcl-2, Bcl-W and Bcl-XL proteins and lower levels of pro-apoptotic protein expression (p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA), BCL2-antagonist/killer (Bak), Bcl-2 related ovarian killer (Bok), Bcl-2-interacting killer (Bik)) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Kim et al., 2014a; Demaria et al., 2017; Monceau et al., 2010). Seluanov et al. demonstrated that the existence of apoptosis resistance in senescent cells *in vitro* following IR low-dose cisplatin (Seluanov et al., 2001).

3.3.5.1. Methods. Apoptotic analysis can be studied by different methods (flow cytometry or immunofluorescence staining) with different markers, such as cleaved PARP (poly (ADP-ribose) polymerase), cleaved caspase-2/3/9 or terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining.

3.3.5.2. Cleaved caspase-3. Active caspase-3 expression levels were established as a bio-indicator of individual radiosensitivity in peripheral blood samples of 10 healthy individual donors by using flow cytometry, *ex vivo* at 1, 2, 4 Gy and *in vitro* incubation after 24, 48 and 72 h. The data suggested that incubation during 24 h was considered the better condition to distinguish dose of IR; the proposed assay could be used as a test for detecting radiosensitivity of patients before undergoing RT (Santos et al., 2017).

3.3.5.3. Radiation-induced T-lymphocyte apoptosis. Radiation-induced T-lymphocyte apoptosis (RILA) has been investigated since 1997. This assay has provided a rapid means of determining radiosensitivity with a high negative predictive value, able to discriminate differences in radiation-induced cytotoxicity between individuals (Wilkins et al., 2002; Ozsahin et al., 2005; Ozsahin et al., 1997). In a French prospective multicentric study, Azria et al. demonstrated that patients with a low RILA (< 12%) present grade ≥ 2 breast fibrosis, whereas patients with a high RILA (> 16%) are not affected by late toxicity after RT. Radio-induced apoptosis in CD8 + T lymphocyte was significantly associated with late effects in various cancers (prostate, head and neck, cervix) in prospective trials by using flow cytometry with staining of the markers of propidium iodide/annexin V (Ozsahin et al., 2005, 1997; Azria et al., 2017, 2015; Azria et al., 2010; Brengues et al., 2017).

3.4. Therapeutic perspectives

Despite recent advances in RT techniques, approximately 5–15% of patients suffer from radiation-toxicity that can impede effective treatment and also quality of life. Radiation-induced fibrosis is one of the toxicities that influences morbidity and function in patients after RT. In order to extend the therapeutic window between tumor eradication and the induction of adverse events in normal tissue, the development of advance therapeutics aimed at eliminating the detrimental effects of cellular senescence might mitigate radiation-induced toxicity of normal tissue. Table 2 and Fig. 3 summarize some molecular targets investigated with intracellular signaling pathways.

3.4.1. Drug products

3.4.1.1. Anti-oxidants and free radical scavengers. The work of Yuhas and that of Liauw showed that radioprotective compounds can act as free-radical scavenger agents, which can absorb radicals generated by IR (Liauw et al., 2013b; Yuhas et al., 1977). The thiol-containing drug amifostine was approved by the FDA for clinical use as a protector of radiation-induced cell death. Amifostine can reduce the severity of mucositis, xerostomia and dysphagia in head and neck cancer patients treated with RT (Hall et al., 2016). These antioxidants and free radical scavenger products can also reduce ROS production after IR, thus possibly decreasing the senescent process via preventing ROS formation.

3.4.1.2. Anti-inflammatory agents. Much evidence indicates that anti-inflammatory agents, such as dexamethasone, benzydamine, pravastatin, and pentoxifylline, can prevent and treat radiation-induced toxicity. These drugs might effectively reduce IR-induced senescence-mediated toxicity by reducing the pro-inflammatory cytokines. Wang et al. found that dexamethasone might provide a protective role in radiation-induced lung injury in mice via reduction of the IL-17, which is a cytokine that has powerful pro-inflammatory effect (Wang et al., 2014b).

Benzydamine, a topical non-steroidal anti-inflammatory drug, can decrease both the incidence and severity of oral mucositis while undergoing RT (Hall et al., 2016; Sheibani et al., 2015).

An inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase repressed late radiation-induced submucosal fibrosis in the intestine (Hall et al., 2016). Doi et al. found that pravastatin can protect normal intestines and lung tissues after irradiation. The effect of pravastatin was associated with a decrease in the level of radiation-induced DNA damage (Doi et al., 2017). Similar works showed that pravastatin reduced pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines, including IL-6 and IL-8, in lung endothelial cells exposed to radiation (Hall et al., 2016; Gaugler et al., 2005).

Pentoxifylline, a methyl xanthine derived, has been shown to be favorable in decreasing the risk of radiation-induced lung toxicity in patients with breast and lung cancer by the mechanisms of anti-inflammation and anti-oxidant. Additionally, sulfasalazine, a 5-

aminosalicylate compound, with the same mechanisms as pentoxifylline, has been shown to be beneficial in reducing the gastrointestinal manifestations associated with radiation toxicity (Hall et al., 2016).

The mechanism used by angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors to alleviate tissue injury in IR-induced senescence is not completely understood. Nevertheless, ACE inhibitors reduced the rate of radiation pneumonitis in patients undergoing thoracic radiation for lung cancer in the retrospective study of (Kharofa et al. (2012)). Similarly, Harder's publication reported that treatment with the pharmacological inhibition of ACE was associated with less radiation pneumonitis and fibrosis (Harder et al., 2015). Captopril can reduce adverse events and severity of radiation-induced proctitis (Alashkham et al., 2016a; Alashkham et al., 2016b). A new clinical trial (NCT01754909) of enalapril is ongoing, to evaluate those drugs that can alleviate radiation-induced lung injury (Citrin et al., 2017). We hypothesize that ACE inhibitors down-regulated TGF- β and, thus, can reduce senescence-mediated IR by decreasing TGF- β via the SASP.

3.4.2. Targeted therapies of senescence

3.4.2.1. IGF-1R. Pharmacological inhibition of IGF-1R has great therapeutic potential to prevent radiation-induced senescence. *in vitro*, the primary endothelial cell IGF-1R inhibitor AG1024 significantly inhibited cellular senescence from a radiation dose of 10 Gy. It offers promise in pre-clinical research and a clinical trial in the future (Day et al., 2014; Panganiban and Day, 2013).

3.4.2.2. PI3K/ Akt/ mTOR. PI3K/Akt/mTOR pathway is involved in cellular proliferation, Akt activation causes pre-mature senescence via increased production of ROS. Blocking PI3K activation by the PI3K inhibitor LY294002 significantly reduced radiation-induced endothelial cellular senescence in the *in vitro* study of Panganiban's laboratory. Moreover, the mTOR inhibitor with rapamycin has been shown as a molecular target to prevent accelerated senescence in cells exposed to DNA-damaging agents *in vitro* (Panganiban and Day, 2013; Iglesias-Bartolome et al., 2012). Recent *in vivo* studies found that rapamycin might alleviate radiation-induced lung injury and mucositis in a murine model, by preventing the senescent process through decreasing of ROS formation and prohibiting the SASP (Iglesias-Bartolome et al., 2012; Chung et al., 2016b; Suzuki and Yamashita, 2014, 2014).

3.4.2.3. Senolytics and senomorphics. Interestingly, another promising target to reduce toxicity due to radiation-induced senescence is the use of senotherapeutics, namely, senolytics and senomorphics. The others senotherapeutics are targeting SASP factors and immune system-mediated senescent cell clearance, were described in the reviews of Schafer et al. and Childs et al. (Schafer et al., 2018; Childs et al., 2017). By using senolytic drugs, radiation-induced injury in tissue can be mitigated and treated via anti-inflammatories and by selectively killing senescent cells. In addition, senolytic drugs not only target individual harmful inflammatory molecules (cytokine, chemokine) and suppress SASP, but also improve tissue repair and regeneration, improving the microenvironment tissue (Wang et al., 2016). The first investigated senolytics was carried out by the laboratory at Robert and Arlene Kogod center on aging in America. The authors discovered the selective destruction of cellular senescence by the combination of dasatinib and quercetin in *in vivo* after IR (Zhu et al., 2015). Two years later, Scharfer et al. as well as Lehmann et al. demonstrated dasatinib plus quercetin could attenuate fibrotic pulmonary disease by selectively clearance of senescence cell (Schafer et al., 2018; Lehmann et al., 2017; Mailleux and Crestani, 2017). Further clinical studies should be investigated to evaluate the benefit/risk ratio in patients (Mailleux and Crestani, 2017). Apart from senolytics, targeting senescent cells by senomorphics showed clearly an efficient in *in vitro* and *in vivo*. In the study of Yosef et al. found the ABT-737 was efficiently eradicated senescent cells after ultraviolet radiation through inhibiting BCL-W and BCL-xl (Yosef et al., 2016). In an *in vivo* study in Pan's laboratory, ABT-

Table 2
Current status of molecular interventions for irradiation-induced toxicity.

Drug products	Target	Substance	IR-induced toxicity	Mechanism	Impact on senescence	Status of Project Trial	Indication	References
Antioxidants - free radical scavenger		Amifostine	Radiotoxicity in head and neck cancer patient	Reduction of ROS	Unknown	FDA approved 2007	200 mg/m ² (IV) Once daily, starting 15-30 minutes prior to standard fraction radiation therapy	https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/020221s024bl.pdf
Targeted therapies of senescence	Anti-inflammatory	BIO3000 (genistein)	Chemoradiation in non-small cell lung cancer	Reduction of ROS, modulation of the inflammatory cytokine response	Unknown	NCT02567799	Oral	https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02567799
		HMG-CoA Dexamethasone	IR-induced intestinal injury	Reduced the level of Anti-inflammatory by reducing IL-17	Unknown	<i>In vivo</i>		(Doi et al., 2017)
		ACE inhibitors (Enalapril)	IR-induced lung injury	Anti-inflammatory	Unknown	<i>In vivo</i>		(Wang et al., 2014b)
		Benzylamine	IR-induced pneumonitis and fibrosis	Anti-inflammatory	Unknown			https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01754909
		Pentoxifylline AG1024	IR-induced mucositis	Anti-inflammatory	Unknown			(Hall et al., 2016), (Sheibani et al., 2015)
		LY294002 Rapamycin	IR-induced lung toxicity	Anti-inflammatory IGF-1R blockade	Unknown	<i>In vitro</i>		(Hall et al., 2016)
		TGF-β receptor 1 inhibitor	IR-induced endothelial senescence	PI3K blockade mTOR inhibitors	SASP inhibition	<i>In vitro</i>		(Panganiban and Day, 2013)
		CYT387, INCB18424	Radiation-induced lung fibrosis	Reduction of ROS Anti-inflammatory	Reduction of ROS	<i>In vitro</i>		(Panganiban and Day, 2013)
		PS115	Radiation-induced senescence in HUVECs	JAK inhibitors	Reduction of ROS	<i>In vivo</i>		(Chung et al., 2016)
		IL-17 mAb	Radiation-induced lung injury	Inhibition of the DSB/NEMO/NF-κB signal pathway	Anti-inflammatory	<i>In vivo</i>		(Schafer et al., 2018), (Ahamed and Laurence, 2017), (Avraham et al., 2010)
Senolytic		ABT-263 A-1331852	Radiation-induced lung injury	Immunoregulation, restoration of the immunological balance	SASP inhibition	<i>In vivo</i>		(Wang et al., 2016), (Pan et al., 2017)
		Dasatinib + Quercetin	Radiation-induced hepatic fibrosis	Bcl-xL inhibitor	Killing senescent cell	<i>In vivo</i>		(Monesek et al., 2018)
		ABT-737	Radiation-induced senescence	BCL-W and BCL-XL inhibitions	Killing senescent cell	<i>In vivo</i>		(Schafer et al., 2017), (Zhu et al., 2015)
		Stem cell mobiliser	UV radiation-induced skin/intestines/lung/Bones/Salivary glands	Regeneration of radiation-induced tissue damage	Killing senescent cell	<i>In vivo</i>		(Yosef et al., 2016)
					Unknown	<i>In vivo</i>		(Nicolay et al., 2015)

Abbreviations (Table 2).

ACE: Angiotensin-converting enzyme; BCL-XL: B-cell lymphoma-extra large; DDR: DNA damage response; DSBs: DNA double-strand breaks; FDA: The Food and Drug Administration; HGF : hepatocyte growth factor; HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; HUVECs: human umbilical vein endothelial cells; IGF-1R: insulin-like growth factor receptor; IL: Interleukin; IL-17mAb: Interleukin 17 monoclonal antibody; IR: ionizing radiation; JAK: Janus kinase; MSC: mesenchymal stem cells; mTOR: mechanistic target of rapamycin/mammalian target of rapamycin; NEMO: nuclear factor kappa B essential modulator; NF-κB: nuclear factor kappa-B; PI3K: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; RNAi: RNA interference; ROS: Reactive Oxygen Species; SASP: Senescence-associated secretory phenotype; STAT: signal transducer and activator of transcription; TGF-β: transforming growth factor beta; UV: Ultraviolet.

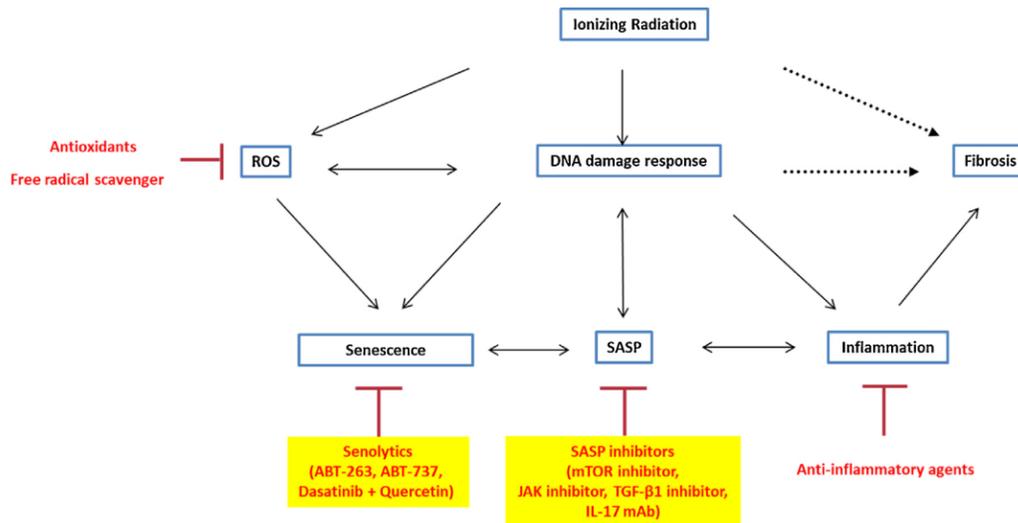


Fig. 3. Interrelationships between DNA damage, inflammatory response and cellular senescence induced by IR and therapeutic perspectives.

Radiation-induced senescent cell by triggering the DNA damage responses, activating the senescence-associated inflammatory signaling and increasing the SASP, which is composed different inflammatory proteins, chemokines and pro-fibrogenesis of cytokines, which are well-known players in fibrotic sequelae. Several strategies described above are promising target for either radiotoxicity approaches. These include antioxidants, free radical scavenger, mTOR inhibitor, senolytic drugs, and anti-inflammatory agents. (DNA: Deoxyribonucleic acid; IGF-1R: insulin-like growth factor receptor; IL-17mAb: Interleukin 17 monoclonal antibody; JAK: Janus kinase; mTOR: mechanistic target of rapamycin/mammalian target of rapamycin; SASP: Senescence-associated secretory phenotype; ROS: Reactive Oxygen Species; TGF- β : transforming growth factor beta).

263, also a specific Bcl-2/xl inhibitor and a newly identified senolytic drug, was used to treat IR-induced tissue injury and fibrosis in the lungs. Researchers have demonstrated that this senolytic can reverse pulmonary fibrosis at week 16 after exposure in C57BL/6 mice to a single dose of 17 Gy (Pan et al., 2017). To date, no clinical studies are available investigating ABT-263 in the context of radiation-induced fibrosis. In the same mechanism of Pan's study, Moncsek et al. recently found a novel senolytics targeting killed senescent cholangiocytes improve hepatic fibrosis in *in vivo* (Moncsek et al., 2018). These findings emerged a new era in optimal treatment IR-induced fibrosis in radiosensitivity patients via the suppressed senescent cells.

3.4.2.4. Targeting SASP factors. Senotherapeutics by targeting SASP factors might decrease radiation-induced fibrosis through inhibiting proinflammatory cytokines and profibrogenic factors. We next describe the SASP inhibitors such as TGF- β , NF- κ B/NEMO and JAK/STAT pathways, and IL-17 A antibody (Fig. 3).

3.4.2.5. TGF- β . TGF- β is strongly linked to radiation-induced fibrosis. The TGF- β signaling pathway can activate and amplify these profibrotic signals via ROS. Therefore, pharmacological inhibition of the TGF- β receptor 1 (LY-364947) has been shown to significantly decrease radiation-induced tissue fibrosis on lymphatic endothelial cells (Ahamed and Laurence, 2017; Avraham et al., 2010; Kim et al., 2014b) Targeted TGF- β might reduce radiotoxicity-related senescence by reducing ROS formation and proinflammatory, thus inhibiting SASP factors. In the recent review of Schafer showed that TGF- β , as well as IL-6, is considered as a promise senotherapeutics but difficult approach due to the plurality of proinflammatory, profibrotic and proremodeling factors with the senescence-messaging secretome by cellular senescence (Schafer et al., 2018).

3.4.2.6. NF- κ B/NEMO and JAK/STAT pathways on the SASP. One *in vitro* study demonstrated that a specific small-molecule inhibitor of NF- κ B essential modulator (NEMO) PS1145 may inhibit radiation-induced senescence via inhibition of NF- κ B activation and reduce the SASP, such

as IL-6 formations (Dong et al., 2015). By the same mechanism in decreasing of the SASP in radiation-induced senescent preadipocytes, Xu et al. found that pharmacological inhibition of the Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway could alleviate frailty after exposure to irradiation via SASP inhibition. Targeting the JAK pathway has the potential to be developed as a new treatment for radiotoxicity via senescent cells (Xu et al., 2015). However, to date, no clinical data are available and further studies will need to be confirmed in animal experiments before being transferable to humans.

3.4.2.7. IL-17A antibody. In a study performed in rats, Bessout et al. found that IL-17 played an important role in colonic smooth muscle cells to induce expression of pro-inflammatory genes, which can be associated with the development of radiation-induced fibrosis (Bessout et al., 2015). As mentioned earlier, the effect of dexamethasone can reduce IL-17 in mice following IR-induced toxicity (Wang et al., 2014b) Not long after these experiments were performed by Wang et al., the IL-17 A antibody was determined to attenuate the radiation-induced fibrotic lung in mice through blocking of IL-17 A, reducing inflammation, and inactivation of the SASP. This finding may offer a new treatment option for radiation-induced toxicity (Wang et al., 2014a). These findings strongly suggest that IL-17 is an important target for reducing late side effects induced after irradiation.

Targeting senescent cells by using the molecules selected into the signaling pathway senescence, such as IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B/NEMO and JAK/STAT pathways in the SASP, IL-17 A antibody, and the others senotherapeutics such as senolytics and senomorphics might show a promise perspective in the prevention and treatment of IR-induced toxicity via the senescence process.

3.4.3. Stem cell therapy

Hematopoietic stem cells, as well as mesenchymal stem cells (MSC), are known to be radioresistant to apoptosis by activating the senescence pathway. In the review of Nicolay's team, the authors revealed that MSC-based treatments might afford an exciting new approach to the

therapy and could prevent radiation-induced toxicity (Nicolay et al., 2015; Nicolay et al., 2015). Similarly, the study by Haubner et al. showed that human adipose-derived stem cells (ASC) reduced the overexpression of IL-6, basic fibroblast growth factor (FGF) and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) in human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) following irradiation with sequential doses of 2–12 Gy (Haubner et al., 2013). In addition, *in vivo* experiments were performed by Bessout's group, and the investigators determined that adipose-derived mesenchymal stromal cells can reduce radiation-induced epithelial injury with decreased collagen production (Bessout et al., 2015). We hypothesize that therapy-based stem cells can replace IR-induced cellular senescence and can reduce the radiotoxicity-mediated senescence process.

Taken together, these results clearly support the clinical practice that stem cells may have an effect when injected into the irradiated tissue injury, providing therapeutic opportunities aimed at reducing severe lesions induced after RT via decreasing IR-induced senescence.

4. Discussion

4.1. Mechanisms

Radiation induced accelerated senescence by triggering the DNA damage response machinery, arresting the cellular cycle and ultimately senescent states or called apoptosis-resistant states. Cellular senescence significantly contributes to the onset and progression of fibrotic tissues by secreting pro-inflammatory cytokines and pro-fibrogenic molecules via the SASP. IR promotes senescence from molecular alterations in DNA to protein expressions in different cellular types, such as epithelium, endothelium, immune and stem/stroma cells, cell-derived ectoderm, and cell-derived mesoderm through multicytokine-mediated cell-cell and cell-microenvironment interactions, thus also injured tissues, dysfunctional organs and ultimately morbidities, such as fibrosis, that decrease quality of life. Fibroblasts play a central role in fibrogenesis via the mechanism of the fibroblast-to-myofibroblast transition in response to oxidative stress (RT, UV, chemotherapy, smoking) (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). IR senesces fibroblasts, stimulate pro-fibrotic process in naïve fibroblasts through their SASP factors (Schafer et al., 2017). Better understanding of radiation-induced senescence, accelerated fibrotic tissue, and skin sequelae will be able to help the radiation oncologist in the choice of the best personalized therapy, thereby optimizing outcomes in patient cancer assigning RT.

4.2. Prognostic tests and clinical impacts

Senescence markers and their characteristics could also be used to assess the diagnosis and anticipate the prognosis of radiosensitivity in normal tissues by different tests, such as SA- β -gal, p16 expression, SASP assay, apoptosis assay, and DDR assay. In clinical studies, *ex-vivo* radiation induced apoptotic lymphocytes from blood samples or radiation-induced ATM nucleoshuttling from fibroblast of skin biopsies have been developed to evaluate intrinsic radiosensitivity. By using the RILA assay based CD8 + T lymphocytes in a prospective multicenter study for late breast fibrosis in BC patients undergoing RT, Azria and colleagues have shown an increase of RILA values at 8 Gy, which was observed for a decreasing percentage of grade ≥ 2 in breast fibrosis. The authors proposed the use of RILA as a rapid screening test for predicting the risk of breast fibrosis pre-treatment RT (Ozsahin et al., 2005, 1997; Azria et al., 2017, 2015; Azria et al., 2010; Brengues et al., 2017).

Another test can reflect the senescence process through a DDR assay via ATM and γ -H2AX residual foci in fibroblasts. This assay was shown in the COPERNIC's retrospective study, determined into three groups of human radiosensitivity based on the speed of ATM nucleoshuttling (COPERNIC project investigators et al., 2016). The cytoplasm to nuclear fast translocation of the ATM after radiation in radioresistance can induce a lower senescent cell risk due to a decrease of ATM in the

cytoplasm which might impede ATM interaction with the lysosome and reduce the mitochondrial dysfunction, thus alleviating senescence (Kang et al., 2017). Further prospective studies are necessary to confirm the predictive value before being used in routine practice.

4.3. Therapeutic potentials

As discussed in this review, there is a growing list of novel therapeutic potentials to mitigate radiation-induced fibrosis via targeting senescent cells with a selective molecule. The trend of therapeutic perspectives in radiation-induced accelerated senescence has been focused on the tyrosine kinase cascade. Pharmacological inhibition of IGF-1 G/PI3K/Akt/mTOR signal transduction pathway might become a promising approach to reduce tissue injury due to radiation-induced senescence. Similarly, NF- κ B/NEMO and JAK/STAT pathways play an important role in SASP production after radiation; therefore, their inhibitors have promise for treating radiotoxicity via senescent cell formations. These pathways are plausible, although not yet proven in clinical practice of radiation-induced toxicity. Further investigations need to be performed in humans to evaluate their safety and efficacy.

In addition, stem cell therapy, senolytics and senomorphics are the new options to treat radiation-induced senescence dysfunction. While MSC-based treatments have shown beneficial effects in different organ-specific toxicities *in vitro* and *in vivo*, senolytics and senomorphics have shown favorable effects to reduce IR-induced senescence and pulmonary fibrosis *in vitro*, and amelioration of *in vivo* fibrotic status. Senotherapeutics for treatment of radiation-induced fibrosis are continuing to be a focus of research with increasing enthusiasm in the future. These will be nominated in other translational research and in clinical trials to evaluate and guarantee patient safety and reproducible treatment efficacy. Further studies in different selective molecules will be investigated to clarify these unknowns as well as characterize in more detail the molecular mechanisms of radiation-induced cellular senescence promoting sequelae.

In the scenario of IR-induced cellular senescence promoting fibrotic sequelae, the biomarkers for prediction of outcome in radiation-induced senescence are not validated in patients. Senescent assay by analyzing skin tissue biopsy via fibroblast or liquid biopsy via lymphocyte tests could be conceptualized as predictive IR-induced fibrosis in patients after RT. Moreover, there is no existential recommendation of the prophylactics and treatment in clinical practice. Looking ahead to a more promising future for cancer patients with radiotoxicity, further preclinical studies and clinical trials will be indispensable to contribute the intrinsic individual marker as well as the therapeutics in radiation-induced senescence-promoted fibrosis in cancer patients.

5. Conclusion

Ionizing radiation-induced cellular senescence is a double-edged sword in the defense against cancer. It is not only a benefit in tumor-suppression, but also acts in a deteriorative process to promote fibrogenesis. It is vitally important to identify predictive biomarkers for intrinsic radiosensitivity of patients in clinical practice. Use of senescence biomarkers might assess the radiosensitivity of prospective RT patients. A better understanding of radiation-induced cellular senescence in fibrotic tissue and skin sequelae will be able to help the radiation oncologist in the choice of the best personalized therapeutic course of action, thereby optimizing outcomes in assigning RT.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest.

Author contributions

Conception and design: Yazid Belkacemi, Hoang Quy Nguyen

Literature review and data collection: Yazid Belkacemi, Hoang Quy Nguyen

Revision and approval of the manuscript: All authors.

Manuscript writing: Yazid Belkacemi, Hoang Quy Nguyen

Funding

H.Q.N was supported by grants from the Ministry of Education and Training (MOET, Vietnam) and the Association for Research and Training in Oncology-Radiotherapy (AREFOR).

Acknowledgements

The authors thank Mrs Myrna Perlmutter for reviewing English.

References

- Ahamed, J., Laurence, J., 2017. Role of platelet-derived transforming growth factor- β and reactive oxygen species in radiation-induced organ fibrosis. *Antioxid. Redox Signal.* 27 (November (13)), 977–988.
- Akbar, A.N., Henson, S.M., Lanna, A., 2016. Senescence of T lymphocytes: implications for enhancing human immunity. *Trends Immunol.* 37 (December (12)), 866–876.
- Alashkham, A., Paterson, C., Windsor, P., Struthers, A., Rauchhaus, P., Nabi, G., 2016a. The incidence and risk of biochemical recurrence following radical radiotherapy for prostate cancer in men on angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) or angiotensin receptor blockers (ARBs). *Clin. Genitourin. Cancer* 14 (October (5)), 398–405.
- Alashkham, A., Paterson, C., Rauchhaus, P., Nabi, G., 2016b. Can angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce the incidence, severity, and duration of radiation proctitis? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 94 (January (1)), 93–101.
- Alessio, N., et al., 2014. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process. *Oncotarget* 6 (December (10)), 8155–8166.
- Andrievski, A., Wilkins, R.C., 2009. The response of gamma-H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. *Int. J. Radiat. Biol.* 85 (January (4)), 369–376.
- Avraham, T., et al., 2010. Radiation therapy causes loss of dermal lymphatic vessels and interferes with lymphatic function by TGF- β 1-mediated tissue fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299 (September (3)), C589–C605.
- Azria, D., et al., 2010. 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.* 11 (March (3)), 258–265.
- Azria, D., Betz, M., Bourcier, C., Jeanneret Sozzi, W., Ozsahin, M., 2012. Identifying patients at risk for late radiation-induced toxicity. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 84 (December Suppl. (1)), e35–e41.
- Azria, D., 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 (December (12)), 1965–1973.
- Azria, D., et al., 2017. Data-based radiation oncology: design of clinical trials in the toxicity biomarkers era. *Front. Oncol.* 7, 83.
- Baker, D.J., et al., 2017. Oncogenic senescence: a multi-functional perspective. *Oncotarget* 8 (February (16)), 27661–27672.
- Baselet, B., et al., 2017. Functional Gene analysis reveals cell cycle changes and inflammation in endothelial cells irradiated with a single X-ray dose. *Front. Pharmacol.* 8 (April).
- Bauer, M., Goldstein, M., Christmann, M., Becker, H., Heylmann, D., Kaina, B., 2011. Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (December (52)), 21105–21110.
- Beach, T.A., Johnston, C.J., Groves, A.M., Williams, J.P., Finkelstein, J.N., 2017. Radiation induced pulmonary fibrosis as a model of progressive fibrosis: contributions of DNA damage, inflammatory response and cellular senescence genes. *Exp. Lung Res.* (May), 1–16 vol. 0, no. 0.
- Belkacemi, Y., et al., 2000. Ionizing radiation-induced death in bovine lens epithelial cells: mechanisms and influence of irradiation dose rate. *Int. J. Cancer* 90 (June (3)), 138–144.
- Belkacemi, Y., Touboul, E., Méric, J.B., Rat, P., Warnet, J.M., 2001. Cataract radio-induite: aspects physiopathologiques, radiobiologiques et cliniques. *Cancer/Radiothérapie* 5 (August (4)), 397–412.
- Belkacemi, Y., et al., 2016. The henri mondor procedure of morbidity and mortality review meetings: prospective registration of clinical, dosimetric, and individual radiosensitivity data of patients with severe radiation toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol.* 96 (November (3)), 629–636.
- Bernardes de Jesus, B., Blasco, M.A., 2012. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circ. Res.* 111 (June (1)), 97–109.
- Bessout, R., et al., 2015. TH17 predominant T-cell responses in radiation-induced bowel disease are modulated by treatment with adipose-derived mesenchymal stromal cells. *J. Pathol.* 237 (December (4)), 435–446.
- Bodgi, L., Foray, N., 2016. The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model*. *Int. J. Radiat. Biol.* 92 (March (3)), 117–131.
- Bodgi, L., et al., 2013. A single formula to describe radiation-induced protein re-localization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J. Theor. Biol.* 333 (September), 135–145.
- Borràs, M., Armengol, G., De Cabo, M., Barquinero, J.-F., Barrios, L., 2015. Comparison of methods to quantify histone H2AX phosphorylation and its usefulness for prediction of radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.* 91 (no. 12), 915–924.
- Bregues, M., Lapiere, A., Bourcier, C., Pèlerin, A., Özshahin, M., Azria, D., 2017. T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17 (February (2)), 119–127.
- Campisi, J., 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* 75 (no. 1), 685–705.
- Campisi, J., d'Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (September (9)), 729–740.
- Candéas, S.M., et al., 2017. Low-dose radiation accelerates aging of the T-cell receptor repertoire in CBA/Ca mice. *Cell. Mol. Life Sci.* 331 (January (1)), 1–13.
- Carbonneau, C.L., et al., 2012. Ionizing radiation-induced expression of INK4a/ARF in murine bone marrow-derived stromal cell populations interferes with bone marrow homeostasis. *Blood* 119 (January (3)), 717–726.
- Childs, B.G., et al., 2017. Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (October (10)), 718–735.
- Chinta, S.J., Woods, G., Rane, A., Demaria, M., Campisi, J., Andersen, J.K., 2015. Cellular senescence and the aging brain. *Exp. Gerontol.* 68 (August), 3–7.
- Chung, S.L., et al., 2016a. IL-13 is a therapeutic target in radiation lung injury. *Sci. Rep.* 6 (December), 39714.
- Chung, E.J., et al., 2016b. Mammalian target of rapamycin inhibition with rapamycin mitigates radiation-induced pulmonary fibrosis in a murine model. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 96 (November (4)), 857–866.
- Citrin, D.E., et al., 2013. Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 105 (October (19)), 1474–1484.
- Citrin, D.E., et al., 2017. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and opportunities to mitigate. Report of an NCI workshop, september 19, 2016. *Radiat. Res.* 188 (May (1)), 1–20.
- COPERNIC project investigators, et al., 2016. 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.* 94 (March (3)), 450–460.
- Coppé, J.-P., et al., 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-non-autonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 6 (December (12)), 2853–2868.
- Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C.K., Freund, A., Desprez, P.-Y., Campisi, J., 2011. Tumor suppressor and aging biomarker p16INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* 286 (October (42)), 36396–36403.
- Day, R.M., Snow, A.L., Panganiban, R.A.M., 2014. Radiation-induced accelerated senescence: a fate worse than death? *Cell Cycle Georget. Tex.* 13 (no. 13), 2011–2012.
- Demaria, M., et al., 2017. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov.* 7 (February 2), 165–176.
- Doi, H., et al., 2017. Pravastatin reduces radiation-induced damage in normal tissues. *Exp. Ther. Med.* 13 (May (5)), 1765–1772.
- Dong, X., et al., 2015. NEMO modulates radiation-induced endothelial senescence of human umbilical veins through NF- κ B signal pathway. *Radiat. Res.* 183 (January (1)), 82–93.
- Duffield, J.S., Lupher, M., Thannickal, V.J., Wynn, T.A., 2013. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 8 (no. 1), 241–276.
- Ewald, J.A., Desotelle, J.A., Wilding, G., Jarrard, D.F., 2010. Therapy-induced senescence in cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 102 (October (20)), 1536–1546.
- Fouad, Y.A., Aanei, C., 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* 7 (no. 5), 1016–1036.
- Gao, X., Sishc, B.J., Nelson, C.B., Hahnfeldt, P., Bailey, S.M., Hlatky, L., 2016. Radiation-induced reprogramming of pre-senescent mammary epithelial cells enriches putative CD44+/CD24-/low stem cell phenotype. *Front. Oncol.* 6 (June).
- Gaugler, M.-H., Vereycken-Holler, V., Squiban, C., Vandamme, M., Vozenin-Brotons, M.-C., Benderitter, M., 2005. Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat. Res.* 163 (May (5)), 479–487.
- Golfier, S., et al., 2009. Dicerin chromosomes and gamma-H2AX foci formation in lymphocytes of human blood samples exposed to a CT scanner: a direct comparison of dose response relationships. *Radiat. Prot. Dosimetry* 134 (February (1)), 55–61.
- Hall, S., et al., 2016. Protection against radiotherapy-induced toxicity. *Antioxidants* 5 (July (3)).
- Hamada, N., 2017. Ionizing radiation response of primary normal human lens epithelial cells. *PLoS One* 12 (July (7)), e0181530.
- Harder, E.M., Park, H.S., Nath, S.K., Mancini, B.R., Decker, R.H., 2015. Angiotensin-converting enzyme inhibitors decrease the risk of radiation pneumonitis after stereotactic body radiation therapy. *Pract. Radiat. Oncol.* 5 (December (6)), e643–e649.
- Haubner, F., Leyh, M., Ohmann, E., Pohl, F., Prantl, L., Gassner, H.G., 2013. Effects of external radiation in a co-culture model of endothelial cells and adipose-derived stem cells. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 8, 66.
- Havelek, R., et al., 2013. Ionizing radiation induces senescence and differentiation of human dental pulp stem cells. *Folia Biol. (Praha)* 59 (no. 5), 188–197.
- He, S., Sharpless, N.E., 2017. Senescence in health and disease. *Cell* 169 (June (6)), 1000–1011.
- Henson, S.M., et al., 2014. p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human CD8⁺ T cells. *J. Clin. Invest.* 124 (September (9)), 4004–4016.
- Hong, E.-H., et al., 2010. Ionizing radiation induces cellular senescence of articular

- chondrocytes via negative regulation of SIRT1 by p38 kinase. *J. Biol. Chem.* 285 (January (2)), 1283–1295.
- Iglesias-Bartolome, R., et al., 2012. mTOR inhibition prevents epithelial stem cell senescence and protects from radiation-induced mucositis. *Cell Stem Cell* 11 (September (3)), 401–414.
- Islam, M.T., 2017. Radiation interactions with biological systems. *Int. J. Radiat. Biol.* 93 (May (5)), 487–493.
- Johnston, C.J., Hernady, E., Reed, C., Thurston, S.W., Finkelstein, J.N., Williams, J.P., 2010. Early alterations in cytokine expression in adult compared to developing lung in mice after radiation exposure. *Radiat. Res.* 173 (April (4)), 522–535.
- Kang, H.T., et al., 2017. Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. *Nat. Chem. Biol.* 13 (June (6)), 616–623.
- Kendall, R.T., Feghali-Bostwick, C.A., 2014. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* 5 (May).
- Kharofa, J., Cohen, E.P., Tomic, R., Xiang, Q., Gore, E., 2012. Decreased risk of radiation pneumonitis with concomitant use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and thoracic radiation therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 84 (September (1)), 238–243.
- Kim, K.S., Kim, J.E., Choi, K.J., Bae, S., Kim, D.H., 2014a. Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 90 (January (1)), 71–80.
- Kim, J.H., Jenrow, K.A., Brown, S.L., 2014b. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. *Radiat. Oncol. J.* 32 (September (3)), 103–115.
- Klein, D., et al., 2015. Therapy with multipotent mesenchymal stromal cells protects lungs from radiation-induced injury and reduces the risk of lung metastasis. *Antioxid. Redox Signal.* 24 (June (2)), 53–69.
- Korpela, E., Liu, S.K., 2014. Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 9 (December), 266.
- Krizhanovskiy, V., et al., 2008. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134 (August (4)), 657–667.
- Kuilman, T., Peeper, D.S., 2009. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* 9 (February (2)), 81–94.
- Kunogi, H., Sakanishi, T., Sueyoshi, N., Sasai, K., 2014. Prediction of radiosensitivity using phosphorylation of histone H2AX and apoptosis in human tumor cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 90 (July (7)), 587–593.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., Erusalimsky, J.D., 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 113 (October Pt 20), 3613–3622.
- Lafargue, A., et al., 2017. Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. *Free Radic. Biol. Med.* 108 (July), 750–759.
- Lasry, A., Ben-Neriah, Y., 2015. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. *Trends Immunol.* 36 (April (4)), 217–228.
- Lee, S., Dörken, B., Schmitt, C.A., 2004. Extracorporeal photopheresis in graft-versus-host disease: ultraviolet radiation mediates T cell senescence *in vivo*. *Transplantation* 78 (August (3)), 484–485.
- Lehmann, M., et al., 2017. Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis *ex vivo*. *Eur. Respir. J.* 50 (August (2)).
- Liakou, E., et al., 2016. Ionizing radiation-mediated premature senescence and paracrine interactions with cancer cells enhance the expression of syndecan 1 in human breast stromal fibroblasts: the role of TGF- β . *Ageing* 8 (August (8)), 1650–1669.
- Liauw, S.L., Connell, P.P., Weichselbaum, R.R., 2013a. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. *Sci. Transl. Med.* 5 (February (173)), 173sr2.
- Liauw, S.L., Connell, P.P., Weichselbaum, R.R., 2013b. New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology. *Sci. Transl. Med.* 5 (February (173)), 173sr2.
- Liu, L.K., et al., 2017. Pathogenesis and prevention of radiation-induced myocardial fibrosis. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 18 (no. 3), 583–587 01.
- Mailleux, A.A., Crestani, B., 2017. Licence to kill senescent cells in idiopathic pulmonary fibrosis? *Eur. Respir. J.* 50 (August (2)).
- McCart, E.A., et al., 2017. Accelerated senescence in skin in a murine model of radiation-induced multi-organ injury. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 58 (September (5)), 636–646.
- Monceau, V., Pasinetti, N., Schupp, C., Pouzoulet, F., Opolon, P., Vozenin, M.-C., 2010. Modulation of the Rho/ROCK pathway in heart and lung after thorax irradiation reveals targets to improve normal tissue toxicity. *Curr. Drug Targets* 11 (November (11)), 1395–1404.
- Moncsek, A., et al., 2018. Targeting senescent cholangiocytes and activated fibroblasts with B-cell lymphoma-extra large inhibitors ameliorates fibrosis in multidrug resistance 2 gene knockout (Mdr2 $^{-/-}$) mice. *Hepatology* 67 (no. 1), 247–259.
- Mukhopadhyay, R., Costes, S.V., Bazarov, A.V., Hines, W.C., Barcellos-Hoff, M.H., Yaswen, P., 2010. Promotion of variant human mammary epithelial cell outgrowth by ionizing radiation: an agent-based model supported by *in vitro* studies. *Breast Cancer Res. BCR* 12 (no. 1), R11.
- Niaudet, C., et al., 2017. Plasma membrane reorganization links acid sphingomyelinase/ceramide to p38 MAPK pathways in endothelial cells apoptosis. *Cell Signal.* 33 (May), 10–21.
- Nicolay, N.H., Lopez Perez, R., Debus, J., Huber, P.E., 2015. Mesenchymal stem cells – a new hope for radiotherapy-induced tissue damage? *Cancer Lett.* 366 (October (2)), 133–140.
- Olive, P.L., Banáth, J.P., 2004. Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58 (February (2)), 331–335.
- Oorschot, V., et al., 2013. Decay of γ -H2AX foci correlates with potentially lethal damage repair in prostate cancer cells. *Oncol. Rep.* 29 (June (6)), 2175–2180.
- Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A., Vernot, J.-P., 2017. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun. Signal.* CCS 15 (May).
- Ozsahin, M., Ozsahin, H., Shi, Y., Larsson, B., Würgrler, F.E., 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 (May (2)), 429–440.
- Ozsahin, M., et al., 2005. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. *Clin. Cancer Res.* 11 (October (20)), 7426–7433.
- Pan, J., et al., 2017. Inhibition of bcl-2/xl with ABT-263 selectively kills senescent type II pneumocytes and reverses persistent pulmonary fibrosis induced by ionizing radiation in mice. *Int. J. Radiat. Oncol.* 99 (October (2)), 353–361.
- Panganiban, R.A.M., Day, R.M., 2013. Inhibition of IGF-1R prevents ionizing radiation-induced primary endothelial cell senescence. *PLoS One* 8 (no. 10), e78589.
- Papadopoulou, A., Kleitsas, D., 2011. Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Oncol.* 39 (October (4)), 989–999.
- Pouliou, S., Koukourakis, M.I., 2014. Gamma histone 2AX (γ -H2AX) as a predictive tool in radiation oncology. *Biomarkers* 19 (May (3)), 167–180.
- Raphaël, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., Forsthuber, T.G., 2015. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74 (July (1)), 5–17.
- Rodier, F., et al., 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* 11 (August (8)), 973–979.
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., Narita, M., 2014. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* 28 (January (2)), 99–114.
- Santivasi, W.L., Xia, F., 2014. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid. Redox Signal.* 21 (July (2)), 251–259.
- Santos, N.F.G.D., et al., 2017. Active caspase-3 expression levels as bioindicator of individual radiosensitivity. *An. Acad. Bras. Ciênc. No. AHEAD* pp. 0–0.
- Schafer, M.J., et al., 2017. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.* 8 (February).
- Schafer, M.J., Haak, A.J., Tschumperlin, D.J., LeBrasseur, N.K., 2018. Targeting senescent cells in fibrosis: pathology, paradox, and practical considerations. *Curr. Rheumatol. Rep.* 20 (January (1)), 3.
- Schaefer, D., 2017. A century of radiation therapy and adaptive immunity. *Front. Immunol.* 8.
- Schneider, L., et al., 2013. DNA damage in mammalian neural stem cells leads to astrocytic differentiation mediated by BMP2 signaling through JAK-STAT. *Stem Cell Rep.* 1 (no. 2), 123–138.
- Seluanov, A., et al., 2001. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol. Cell. Biol.* 21 (March (5)), 1552–1564.
- Sheibani, K.M., Mafi, A.R., Moghaddam, S., Taslimi, F., Amiran, A., Ameri, A., 2015. Efficacy of benzydamine oral rinse in prevention and management of radiation-induced oral mucositis: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* 11 (March (1)), 22–27.
- Suzuki, K., Yamashita, S., 2014. Radiation-induced bystander response: mechanism and clinical implications. *Adv. Wound Care* 3 (January (1)), 16–24.
- Taunk, N.K., Haffty, B.G., Kostis, J.B., Goyal, S., 2015. Radiation-induced heart disease: pathologic abnormalities and putative mechanisms. *Front. Oncol.* 5 (February).
- Tsai, K.K.C., Stuart, J., Chuang, Y.-Y.E., Little, J.B., Yuan, Z.-M., 2009. Low-dose radiation-induced senescent stromal fibroblasts render nearby breast cancer cells radioresistant. *Radiat. Res.* 172 (August (3)), 306–313.
- Ungvari, Z., et al., 2013. Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosensitivity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 68 (December (12)), 1443–1457.
- van Oorschot, B., et al., 2014. Reduced activity of double-strand break repair genes in prostate cancer patients with late normal tissue radiation toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol.* 88 (March (3)), 664–670.
- van Oorschot, B., et al., 2017. Prostate cancer patients with late radiation toxicity exhibit reduced expression of genes involved in DNA double-strand break repair and homologous recombination. *Cancer Res.* 77 (March (6)), 1485–1491.
- Vandersickel, V., et al., 2010. Early increase of radiation-induced γ H2AX foci in a human Ku70/80 knockdown cell line characterized by an enhanced radiosensitivity. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 51 (no. 6), 633–641.
- Wang, B.-Z., et al., 2014a. Interleukin-17A antagonist attenuates radiation-induced lung injuries in mice. *Exp. Lung Res.* 40 (March (2)), 77–85.
- Wang, L.-P., Wang, Y.-W., Wang, B.-Z., Sun, G.-M., Wang, X.-Y., Xu, J., 2014b. Expression of interleukin-17A in lung tissues of irradiated mice and the influence of dexamethasone. *Sci. World J.* 2014, e251067.
- Wang, Y., Boerma, M., Zhou, D., 2016. Ionizing radiation-induced endothelial cell senescence and cardiovascular diseases. *Radiat. Res.* 186 (August (2)), 153–161.
- Wang, S., et al., 2017. Plasma levels of IL-8 and TGF- β 1 predict radiation-induced lung toxicity in Non-small cell lung cancer: a validation study. *Int. J. Radiat. Oncol.* 98 (July (3)), 615–621.
- Wilkins, R.C., Wilkinson, D., Maharaj, H.P., Bellier, P.V., Cybulski, M.B., McLean, J.R.N., 2002. Differential apoptotic response to ionizing radiation in subpopulations of human white blood cells. *Mutat. Res.* 513 (January (1–2)), 27–36.
- Wirsdörfer, F., Jendrossek, V., 2016. The role of lymphocytes in radiotherapy-induced adverse late effects in the lung. *Front. Immunol.* 7.
- Wynn, T., 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 214 (January (2)), 199–210.
- Wynn, T.A., Ramalingam, T.R., 2012. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for

- fibrotic disease. *Nat. Med.* 18 (July (7)), 1028–1040.
- Xiong, S., et al., 2015. Regulatory T cells promote β -catenin–mediated epithelium-to-mesenchyme transition during radiation-induced pulmonary fibrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 93 (October (2)), 425–435.
- Xu, M., et al., 2015. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (November (46)), E6301–E6310.
- Ye, J., et al., 2012. Human regulatory T cells induce T-lymphocyte senescence. *Blood* 120 (September (10)), 2021–2031.
- Yentrapalli, R., et al., 2013. The PI3K/Akt/mTOR pathway is implicated in the premature senescence of primary human endothelial cells exposed to chronic radiation. *PLoS One* 8 (no. 8), e70024.
- Yosef, R., et al., 2016. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* 7 (April), 11190.
- Yu, H.T., Park, S., Shin, E.-C., Lee, W.-W., 2016. T cell senescence and cardiovascular diseases. *Clin. Exp. Med.* 16 (August (3)), 257–263.
- Yuhus, J.M., Yurconic, M., Kligerman, M.M., West, G., Peterson, D.F., 1977. Combined use of radioprotective and radiosensitizing drugs in experimental radiotherapy. *Radiat. Res.* 70 (May (2)), 433–443.
- Zhu, Y., et al., 2015. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14 (August (4)), 644–658.

Hoang Quy Nguyen MD, MSc, is a medical oncologist in Vietnam. He received his MD in Vietnam and has been in practice at Oncology Hospital, Department of Oncology of the University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh City, Vietnam. His clinical practice has focused on breast, prostate and colorectal cancers. He is currently a PhD student at the Doctoral School of Oncology of the University of Paris Saclay, France. His research works are focused on translational research in oncology, mainly on biomarkers identification of radiosensitivity at INSERM U955, team 7, University of Paris Est Créteil (UPEC), France.

Nhu Hanh To, MD, MSc, is a Senior Assistant in Radiation Oncology in the Radiation Oncology Department of Henri Mondor University Hospital of the University of Paris East-Creteil since 2015. She received her MD in Vietnam and Medical Degree Equivalence in Paris in 2014. Her clinical specialist training was held in Vietnam and Paris Hospitals. She also obtained her Master's Degree in Biology and Health domain, division Tissue, Cellule, and Gene Biotherapy at the University of Paris-East Creteil in 2017 and is actually following a PhD program in the domain of Life and Health Science at the University of Paris-East Creteil. She is member of the European Society of Medical Oncology (ESMO). Her clinical research interests include the management of Skin, Hepatic and Breast cancers. Her biological research includes radio-sensitivity biomarkers of tumors and healthy tissues and combinations of new molecules with ionizing radiation.

Patricia Zadigue is a lab technician in biomedical research at Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB). She has been working for thirty years at the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM, U955). She has acquired many skills including cell culture, lineage and primary culture of senescence cells, molecular biology, biochemistry and small animal experimentation in respiratory physiology teams. She is currently working in Team 7, which titled translational research in genitourinary oncogenesis led by Professor De La Taille.

Stéphane Kerbrat PhD, is a lab technician at IMRB U955 Creteil Medical School, University of Paris-East Creteil (UPEC) since 2003. Since the beginning of his career he developed technical skills and knowledge in immunology by taking part in different research projects. When joining IMRB team 4, where he completed his PhD work, he got

interested in the functional modifications of the T CD4 + Th17 sub-population, with a focus on the ERK1/2 MAP kinase pathway and senescence, in various oxidative stress situations linked to “environmental” exposures such as cigarette smoke and ionizing radiations.

Alexandre De La Taille MD, PhD. Professor Alexandre de la Taille is head of Urology Department in CHU Mondor Assistance Publique des Hopitaux de Paris in France and also head of the Inserm U955Eq07 research team on translational research in uro-oncology. He has been involved in uro-oncology for over 15 years and is in charge of the robotic surgery program. His research and clinical activity are focused on Prostate (BPH and cancer). His main research programs include discovery and validation of biomarkers for high-risk prostate cancer patients treated by chemotherapy and hormonal therapies and in inflammation in prostatic benign hyperplasia patients. He teaches and has spoken on urology, robotic surgery and molecular biology of prostate cancer at Paris XII University, IRCAD, American Urological Association (AUA) meetings and European Association of Urology (EAU) meetings. He is one of the member of the Scientific Office of EAU. He wrote over 411 articles, predominantly focused on prostate cancer, and his work has received an array of honors, such as the Crystal Matula Award from the EAU and the first prize of research from the American Urological Association (AUA).

Sabine Le Gouvello MD, PhD, is a Biologist Practitioner at the Henri Mondor University Hospital of Créteil and an Associate Professor in Immunology at the University of Paris-Est Créteil since 1992. She received her medical and clinical training at the University of Pierre et Marie Curie - Paris 6 and at the Pitié-Salpêtrière University Hospital of Paris, and received her PhD at the University of Paris – Diderot - Paris 7. She has been a Post-doctoral Fellow at the INSERM U153 – CNRS URA 614 in Paris between 1990 and 1993. She has worked at the University of Pierre et Marie Curie - Paris 6 and at the Pitié-Salpêtrière University Hospital of Paris, where she was an University Assistant in Immunology & a Biologist Practitioner until 1990. Since 2013, she is the coordinator of the Innovation and Translational research Committee of the Biology department (C.I.B.) of the Henri Mondor University Hospital in Créteil. Her clinical research interest is the identification of biological markers based on T cell biology to detect occupational, environmental, or iatrogenic exposure to air pollutants and drugs, in the field of chronic beryllium disease, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and drug-induced epidermal necrolysis. She is also involved in cutaneous T cell lymphoma characterization. Her biological research interests include transduction signaling mechanisms of CD4 T cell with a focus on Th17 cells.

Yazid Belkacemi MD, PhD, is a professor of Radiation Oncology at Creteil Medical School, University of Paris-East Creteil (UPEC) since 2008. He received his medical and clinical training in Paris Hospitals, and received his PhD at the University of Paris XI. He has worked at the Tenon Hospital (University of Paris VI) and at Oscar Lambret Anti-Cancer Center in Lille (France), where he was an Associate Professor between 2005 and 2008. Since 2011, he has been head of the Radiation Oncology Department at the Henri Mondor University Hospital in Creteil (France). He is also head of the Henri Mondor Breast Center. He is one of the founding members of AROME (www.aromecancer.org) and its first President between 2006 and 2010. He is currently Honorary President of AROME. He is also one of the founding members of the Transatlantic Radiation Oncology Network (TRONE) and ASFOR (French-Chinese association of Radiation Oncology). His clinical research interests include the management of breast, urology, CNS, Skin and hematologic cancers. He is also involved in rare tumors management and the Rare Cancer Network (www.rcn.net). His biological research includes radio-sensitivity markers of tumors and healthy tissues and combinations of targeted therapies and new drugs with ionizing radiation.

Partie 2 : Hypothèses et objectifs.

Rappel de la problématique

En moyenne 5 à 20% des patients présentent des toxicités radio-induites aiguës et/ou tardives des tissus sains exposés. En pratique clinique, il n'existe aucun test pratiqué en routine pour discriminer les patients radiosensibles afin de permettre une éventuelle adaptation du schéma de la RT et améliorer le ratio bénéfice/risque du traitement.

D'un point de vue radiobiologique, les RI peuvent induire l'apoptose et/ou la sénescence et une réaction inflammatoire des cellules irradiées qui peuvent être délétères pour les tissus non tumoraux entourant la tumeur. Des données récentes de la littérature montrent que la sénescence accélérée radio-induite pourrait provoquer la fibrose via un sécrétome contenant des cytokines, des chimiokines, et des facteurs de croissance pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques. Ainsi, l'accumulation pulmonaire de lymphocytes T CD4⁺ inflammatoires Th17, l'une des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ effecteurs, est corrélée positivement avec la fibrose pulmonaire chez les souris après exposition à des RI (Paun A et al, 2015, 2017). L'existence d'une sensibilité particulière à la sénescence radio-induite des lymphocytes Th17 entraînant leur accumulation (en raison de la résistance à l'apoptose radio-induite des cellules sénescentes) pourrait contribuer à une toxicité radio-induite tardive à type de fibrose.

L'hypothèse qui sous-tend mon travail de thèse est que les lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th17 pro-fibrogéniques ont une forte sensibilité à la sénescence radio-induite en comparaison des autres lymphocytes T CD4⁺, CD4⁺CCR6^{neg}Th et/ou Treg ; cette forte sensibilité à la sénescence radio-induite pourrait résulter dans l'augmentation du ratio CD4⁺CCR6⁺Th17 / CD4⁺CCR6^{neg}Th ou CCR6^{+/neg}Treg en périphérie et être associée au grade de fibrose radio-induite dans les tissus sains.

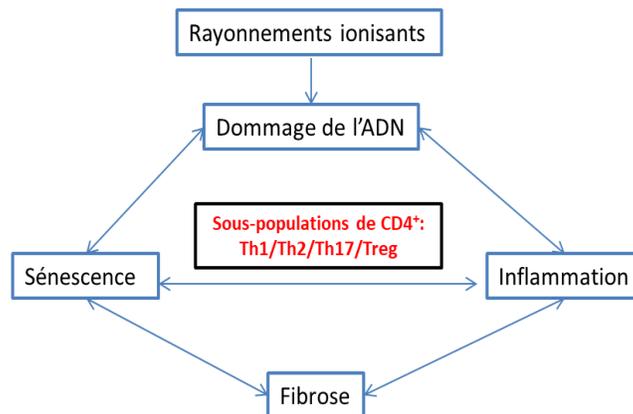


Figure 29 : La sénescence prématurée radio-induite dans les sous-populations de LT CD4⁺ (Th1/Th2/Th17/Treg) pourrait promouvoir la fibrose.

Les objectifs de cette étude sont de :

Objectif n°1 : Comparer la sensibilité à la sénescence induite par des RI des lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th17 à celle des autres lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique de sujets volontaires sains, et d'en analyser le mécanisme. Les méthodes utilisées pour réaliser cet objectif ont été : la cytométrie en flux pour l'évaluation de l'apoptose RI-induite par marquage Annexine V, l'immunofluorescence pour l'analyse de l'activation de la caspase 3, l'expression de p16^{Ink4a}, des foyers de γ H2A.X et de H2A.J, la qRT-PCR pour la quantification de l'expression des ARNm de protéines anti/pro-apoptotiques et de p21^{Cdkn1a}, la cytochimie pour déterminer l'activité de β -galactosidase (β -Gal), et et la technologie Luminex pour déterminer la production de cytokine après l'irradiation.

Objectif n°2 : Etudier si une proportion élevée de la sous-population de lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th17 par rapport aux sous-populations lymphocytaires périphériques CD4⁺CCR6^{neg}Th ou CD4⁺CCR6⁺Treg est associée à la toxicité radio-induite \geq Grade 3 chez les patients recrutés dans le projet PROUST (PROUST Prospective Registration of morbidity and mortality, individual radioSensitivity and radiation Technique), par rapport aux sujets sains et/ou aux sujets ayant reçu une radiothérapie mais n'ayant pas développé de fibrose. Pour la réalisation de cet objectif, nous avons mis au point un panel de 11 anticorps fluorescents spécifiques de différents récepteurs membranaires et permettant d'identifier par cytométrie en flux ces différentes sous-populations lymphocytaires au sein d'un prélèvement sanguin.

Partie 3 : Matériels et Méthodes

1. Réalisation de l'Objectif n°1 : Comparaison de la sensibilité des lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th17 à la sénescence induite par des rayonnements ionisants par rapport à celle des autres lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique

La figure ci-dessous résume le protocole expérimental adopté pour caractériser la sénescence radio-induite dans les sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ et l'analyse des voies de signalisation impliquées. Les détails de ce protocole figurent dans l'article joint au chapitre « Résultats », et soumis à l'« International Journal of Radiotherapy Oncology Biology and Physics ».

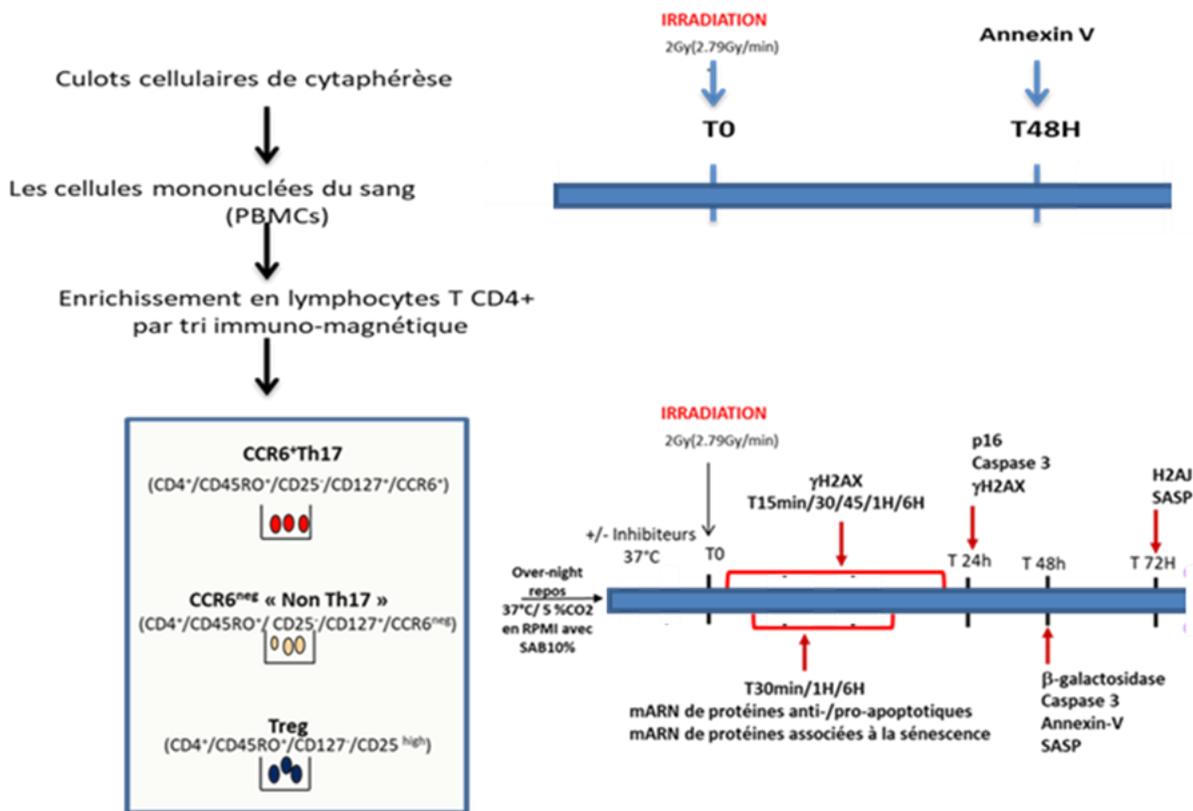


Figure 30 : Protocole expérimental de l'étude de la sensibilité à la sénescence radio-induite des lymphocytes T CD4⁺

2. Réalisation de l'Objectif n°2 : Etude de la proportion de la sous-population de lymphocytes T périphériques CD4⁺CCR6⁺Th17 par rapport à celle des lymphocytes T CD4⁺CCR6^{neg}Th ou CD4⁺CCR6⁺Th17/Th1, Th2, Th1 ou CD4⁺CCR6⁺Treg

2.1. Prélèvements

L'étude sera réalisée sur des prélèvements de sang veineux total périphérique prélevés chez des patients présentant une toxicité radio-induite \geq Grade 3, et inclus dans le projet PROUST (PROUST : Prospective Registration of mOrbidity and mortality, individUal radioSensitivity and radiation Technique), et comparés à des donneurs volontaires sains et/ou des patients ayant reçu une radiothérapie mais n'ayant pas développé de fibrose. Les prélèvements seront collectés dans des tubes contenant un anticoagulant (EDTA). Un consentement individuel écrit et signé a été obtenu de chaque donneur avant la collecte de sang. Les échantillons de sang ont été analysés entre 2 et 4 heures après le prélèvement.

2.2. Anticorps

Mon travail a consisté à mettre au point deux panels (pour les LT CD4⁺ et CD8⁺) de 11 couleurs permettant d'analyser sur un cytomètre de LSR Fortessa X20 (BD Biosciences) l'immunophénotypage des principales sous-populations des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sur la base de l'expression des récepteurs membranaires CD3, CD4, CD8, CD45RO, CD127, CD25, CCR6, CCR4, CXCR3, CD90, CD161. Ces analyses ont été mises au point sur des prélèvements de sang frais total périphérique et des PBMCs isolés par Ficoll. Ces panels multi-couleurs ont été établis avec l'aide du Docteur Julien Mafille, ingénieur de Miltenyi Biotec. L'un de ces panels a été utilisé également pour l'analyse de l'apoptose radio-induite dans les LT CD4⁺ après l'ajout d'un marquage de l'Annexine V et d'un marqueur de viabilité cellulaire, Viobility Fixable Dye.

2.3. Cytométrie en flux

2.3.1. Principe

La cytométrie en flux est la mesure (-métrie) des propriétés d'une population cellulaire (cyto-) qui se déplace dans une gaine de liquide (flux) jusqu'à une source d'excitation lumineuse (souvent un laser). Le premier cytomètre de flux développé était un instrument détectant un seul paramètre, uniquement la taille des cellules. Actuellement, des instruments très sophistiqués ont la possibilité de détecter 14 paramètres simultanément. La cytométrie en flux permet de mesurer les caractéristiques optiques et de fluorescence d'une cellule unique ou d'autres particules, telles que des microorganismes, des noyaux et des préparations de chromosomes, dans un flux de fluide lorsqu'elles passent devant une source de lumière. La taille, la granularité et les caractéristiques fluorescentes des cellules, obtenues à l'aide d'anticorps ou de colorants, sont des exemples de paramètres utilisés pour analyser et différencier les cellules (Adan et al., 2017).

Les principaux composants d'un cytomètre de flux sont le système fluidique, le système optique (l'excitation et la collecte), le système électronique (détecteurs) et le logiciel d'analyse. Le système fluidique est basé sur le principe de focalisation hydrodynamique. Il est responsable de la direction des particules contenues dans le flux liquide vers la source de lumière focalisée. L'optique d'excitation focalise la source de lumière sur les cellules/particules, tandis que l'optique de collecte transmet la diffusion de lumière ou la lumière fluorescente de la particule à un réseau

électronique. Le système électronique détecte le signal et convertit les signaux en données numériques proportionnelles à l'intensité de la lumière émise. Un logiciel dédié permet d'analyser les données (Shapiro, 2004; Wilkerson, 2012)

La cytométrie en flux est utilisée dans diverses applications basées sur la détection d'antigènes membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires. De plus, des cellules entières et des composants cellulaires tels que les organites, les noyaux, l'ADN, l'ARN, les chromosomes, les cytokines, les hormones et le contenu en protéines peuvent également être étudiés par cytométrie en flux (Adan et al., 2017).

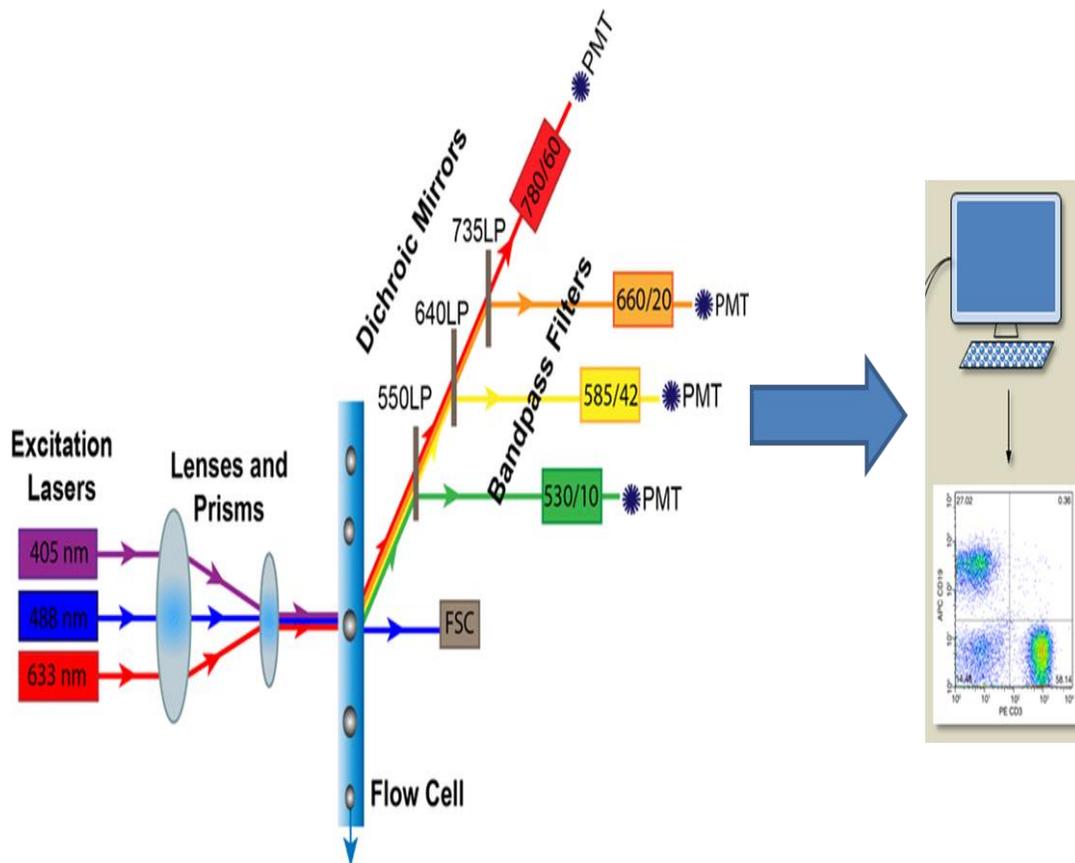


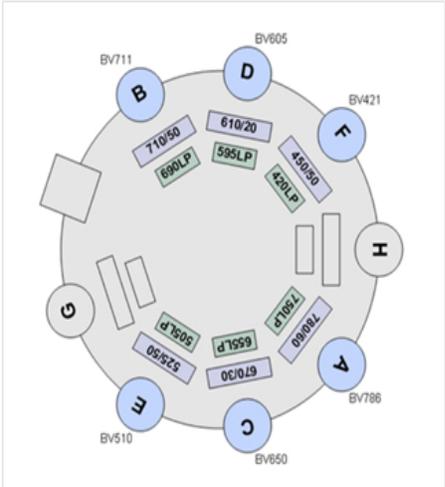
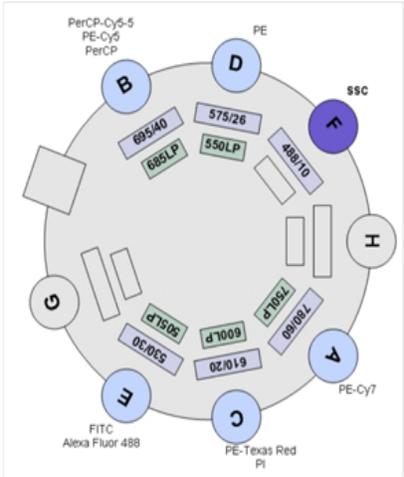
Figure 31 : Principaux composants d'un cytomètre de flux (D'après <https://bitesizebio.com/31638/flow-cytometry-optics-system/>)

2.3.2. Cytomètre de flux

Un cytomètre de flux de type LSR Fortessa (BD Biosciences) avec trois lasers a été utilisé pour notre travail. Les trois lasers sont bleu (488nm), rouge (640nm), et violet (405nm). La figure 31 ci-dessous détaille la configuration optique du cytomètre de flux que nous avons utilisé.

Blue Laser (488nm)
FSC

Violer Laser (405nm)



Red Laser (640nm)

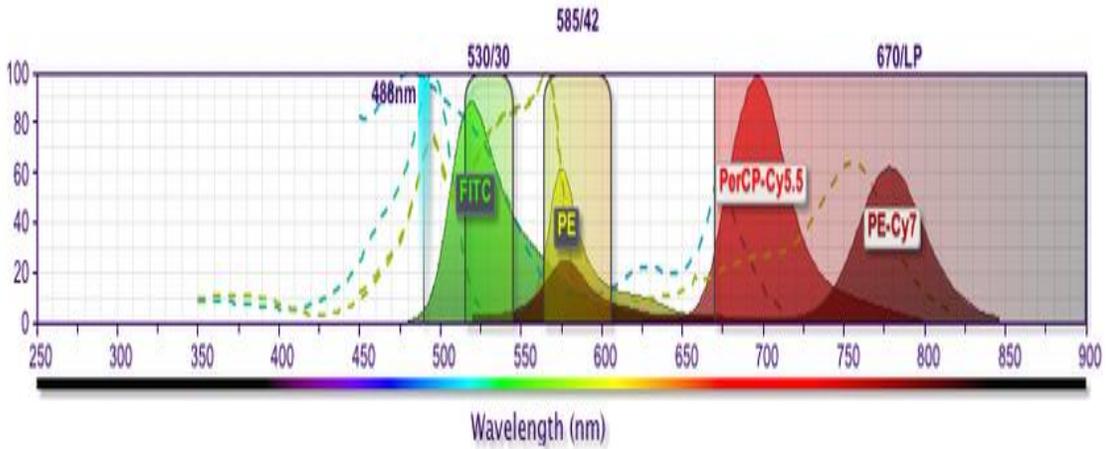
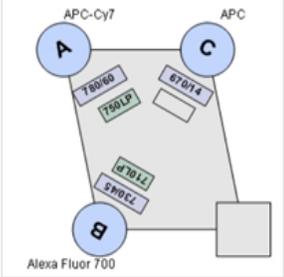


Figure 32 : Configuration optique du cytomètre LSR Fortessa (BD)

2.3.3. Panels d'anticorps

2.3.3.1. Rationnel du choix des différents marqueurs membranaires des lymphocytes T CD4⁺

Au cours de ce travail, nous avons choisi les marqueurs en fonction de leur expression à la surface de la membrane de différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ mémoire ou CD8⁺. D'abord, nous avons utilisé les marqueurs classiques des lymphocyte T : l'anticorps CD3 combiné à l'anticorps CD4 ou CD8, le marqueur des lymphocytes T mémoire : l'anticorps CD45RO, et les anticorps CD25 et CD127 qui permettent de discriminer les lymphocytes T régulateurs (Treg) des lymphocytes T conventionnels, effecteurs-mémoire ou mémoire ; les lymphocytes Treg sont identifiable par l'absence d'expression de CD127 ainsi que par la forte expression de CD25 (Yu et al., 2012). La stratégie d'identification des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ (ou stratégie de « gating ») au sein des leucocytes périphériques dans le sang total est illustrée sur la figure 33 (voir paragraphe 2.3.3.2). La même stratégie sera adoptée ultérieurement pour discriminer les sous-populations de lymphocytes T CD8⁺.

CD45RO est une glycoprotéine transmembranaire de type I qui a une activité cytoplasmique de tyrosine phosphatase impliquée dans la transduction du signal du récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TCR). CD45RO est exprimé fortement sur les lymphocytes T ayant été préalablement activés via le TCR ou « mémoire », et plus faiblement sur la plupart des thymocytes et lymphocytes T activées (Song et al., 2005).

CD25 s'associe au CD122 (chaîne de l'IL-2R β) et au CD132 (chaîne γ commune ou γ_c) pour former le complexe récepteur IL-2R de haute affinité et transducteur du signal d'activation. Le CD25 est exprimé par des sous-populations de thymocytes et de lymphocytes T activés du sang périphérique ; son expression est particulièrement élevée à la surface des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ y compris en l'absence d'activation préalable de ces cellules (Yu et al., 2012).

CD127 est le nom de la sous-unité alpha du récepteur IL-7 (IL-7R α). Des études indiquent que le récepteur de l'IL-7 joue un rôle important dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes T matures. Il a été démontré qu'une faible expression de surface de CD127, combinée à une expression de surface intermédiaire à élevée de CD25, la chaîne alpha du complexe récepteur de l'IL-2, permet de distinguer les lymphocytes T régulateurs des lymphocytes T conventionnels chez l'homme adulte dans le sang, les ganglions lymphatiques et le thymus (Dunham et al., 2008).

Parmi les lymphocytes T « mémoire » CD3⁺ CD4⁺ CD45RO⁺, les sous-populations de lymphocytes T effecteurs/mémoires Th1, Th2, Th1/Th17 et Th17 peuvent être discriminées en fonction de l'expression des récepteurs de chimiokines CCR6, CXCR3, CCR4, qui déterminent leur potentiel de migration dans les tissus.

L'expression de **CCR6** détermine le potentiel de recrutement des cellules, essentiellement les Th17, dans les tissus inflammatoires sécrétant le ligand de CCR6, la chimiokine CCL20 (Ranasinghe and Eri, 2018). **CCR4** est un récepteur de chimiokine exprimé surtout par les Th2 dont nous avons indiqué plus haut dans le texte, qu'ils étaient impliqués à la fois dans la réparation des tissus et dans le développement de la fibrose. CCR4 permet aux lymphocytes T de migrer en réponse à plusieurs chimiokines, y compris le CCL2, une chimiokine qui est libérée de l'épithélium adjacent aux zones fibrotiques (Yoshie and Matsushima, 2015). L'expression du récepteur de chimiokine **CXCR3** est associée aux lymphocytes Th1 qui produisent de l'IFN- γ . La signalisation par CXCR3 induit une migration chimiotactique des lymphocytes T effecteurs associés à l'inflammation. CXCR3 est également exprimé par la sous-population de lymphocytes Th1/Th17, qui sont des lymphocytes Th17 sécrétant de l'IFN- γ (Groom and Luster, 2011).

Pour préciser le phénotype membranaire de la sous-population de lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th17, nous avons ajouté à notre panel les anticorps spécifiques des molécules CD161 et CD90.

CD161 est également appelé molécule NKR-P1A. CD161 est un récepteur d'activation initialement décrit sur des cellules NK, mais contrairement à d'autres récepteurs des cellules NK tels que les KIR (p58, p70, p140) et CD94/NKG2, l'activation médiée par CD161 n'est pas dépendante du complexe majeur d'histocompatibilité HLA. Les lymphocytes T CD4⁺CD161⁺ présentent un phénotype de cellules « effectrices- mémoire » avec un profil de transcription comprenant les gènes de signature des lymphocytes Th17 tels que l'IL-23R, le ROR γ , l'IL-17A, l'IL-22, l'IL18R et le CCR6 (Cosmi et al., 2008). Les lymphocytes T CD4⁺ Th17 CD161⁺ sont enrichis dans différentes maladies chroniques inflammatoires, notamment le psoriasis, la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde (PR) et l'arthrite idiopathique juvénile, suggérant des fonctions pathogènes. Ils sont recrutés dans les tissus inflammatoires où ils entretiennent la réponse inflammatoire locale en induisant la production de médiateurs immunitaires par les cellules épithéliales et les fibroblastes (Shi et al., 2015). De ce fait, nous rechercherons si la proportion des lymphocytes T CD4⁺ Th17 CD161⁺ est augmentée dans le sang périphérique des patients présentant une forte fibrose séquellaire post-radiothérapie

CD90 (Thy-1) est une glycoprotéine membranaire de la superfamille des Ig et ancrée au GPI. La stimulation de CD90 active les lymphocytes T de façon similaire au TCR, sans nécessiter la présence de l'antigène spécifique. La stimulation de CD90 active préférentiellement le programme de différenciation fonctionnelle des lymphocytes T CD4⁺ naïfs vers le phénotype Th17 (Furlong et al., 2018) ce qui explique pourquoi les lymphocytes T CD4⁺CD90⁺ expriment le facteur de transcription RORC2 spécifique des Th17 et produisent de l'IL-17A. Les lymphocytes T CD4⁺CD90⁺ peuvent exprimer CCR6 et CD161. Leur phénotype sécrétoire est très inflammatoire et, à ce titre, pourrait favoriser la fibrose (Guillot-Delost et al., 2012).

Les anticorps monoclonaux utilisés figurent sur le Tableau 2:

Anticorps	Fluorochrome	Source d'excitation (nm)	Canal de lecture de fluorescence	Volume anticorps (µl) / réaction (Après titration des différents anticorps)	Fournisseur
Annexin V	FITC	488 nm (Laser Bleu)	E	5	BD
Anti-CD127	PE	488 nm (Laser Bleu)	D	1	Miltenyi
Anti- CD45RO	PE-Texas Red (ECD)	488 nm (Laser Bleu)	C	5	Beckman Counter
Anti-CD3	PerCP-Cy5.5	488 nm (Laser Bleu)	B	1	Miltenyi
Anti-CCR6	PE-Cy7	488 nm (Laser Bleu)	A	5	BD
Anti-CD25	APC	640nm (Laser Rouge)	C	1	Miltenyi
Anti-CD4 ou Anti-CD8	APC-Cy7	640nm (Laser Rouge)	A	1	Miltenyi
Anti-CCR4	BV421	405nm (Laser Violet)	F	3	BD
Viabilité	BV510	405nm (Laser Violet)	E	0.5	Miltenyi
Anti-CXCR3	BV711	405nm (Laser Rouge)	B	3	BD
Anti-CD90	BV605	405nm (Laser Violet)	D	1	BD
Anti-CD161	BV786	405nm (Laser Violet)	A	1	BD

Tableau 2 : Description des panels d'anticorps utilisés

2.3.3.2. Analyse des données brutes

Le logiciel utilisé pour les analyses de cytométrie en flux est Flowlogic 7 (Miltenyi, Ashland, OR). Les pourcentages et nombres absolus des sous-populations de lymphocytes CD4⁺ sont identifiés au sein de l'ensemble de la population de lymphocytes T CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ (LTCD4⁺ mémoire), via la stratégie de « gating » suivante :

La sélection initiale a été effectuée sur FSC-H (FSC: diffusion aux petits angles) et SSC-H (SSC : diffusion aux grands angles) afin d'identifier la morphologie des lymphocytes et d'éliminer les débris cellulaires. Les paramètres FSC-H et FSC-A ont été utilisés pour discriminer les cellules singulets afin d'exclure les doublets de cellules. Les cellules vivantes sont ensuite incluses dans l'analyse sur la base de leur absence de marquage par le colorant fluorescent Viability™ Fixable Dye (Miltenyi).

Les anticorps CD3 et CD4 ont été utilisés pour identifier les lymphocytes T CD3⁺CD4⁺ (LTCD4⁺). Les cellules lymphocytaires CD4⁺ mémoire ont été identifiées par la positivité du marquage par CD45RO⁺ au sein des cellules positives pour l'expression de CD3⁺ et CD4⁺.

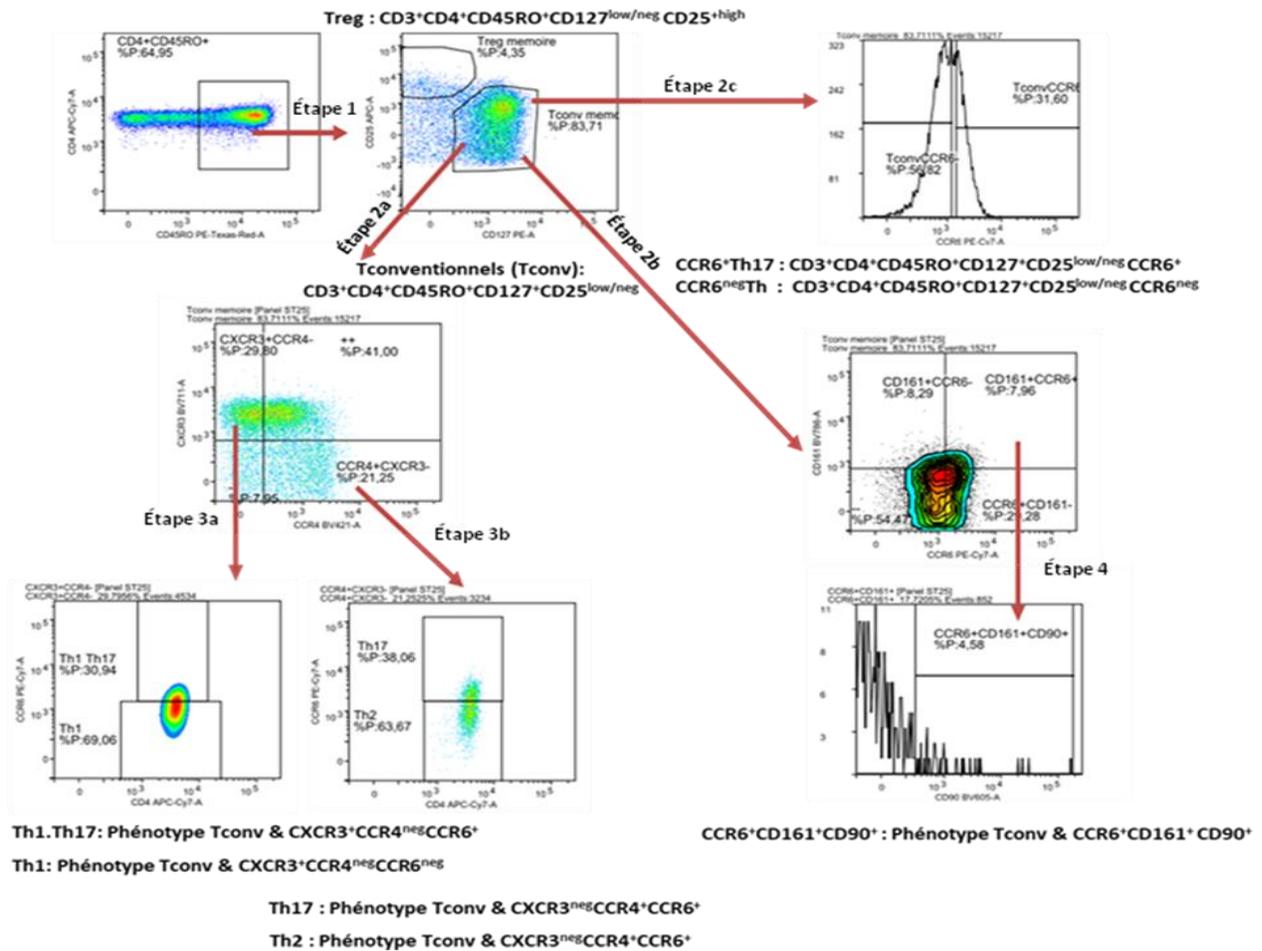


Figure 33 : Stratégie de «gating» des sous-populations lymphocytaires T CD4⁺

Étape 1 : La discrimination ultérieure au sein des cellules CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ sur l'expression de CD25 et de CD127 a permis d'identifier les lymphocytes T régulateurs mémoire (Treg) comme étant CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺CD127^{low}, et lymphocytes T conventionnels mémoire (Tconv) qui ont été identifiés comme étant CD4⁺CD45RO⁺CD25^{low}CD127⁺.

Parmi les Treg, deux sous-populations ont été identifiées par l'expression de CCR6 (CCR6⁺Treg et CCR6^{neg}Treg).

Étape 2 :

Parmi les cellules T conventionnelles CD4⁺CD45RO⁺CD25^{low}CD127⁺ (Tconv), nous avons effectué trois «gating» différents : Étape 2a - c

Étape 2a : On a généré une fenêtre sur les marquages par CCR4 et CXCR3 afin d'identifier les sous-populations CXCR3⁺CCR4^{neg} et CXCR3^{neg}CCR4⁺. Étape 3a-b : Au sein de chaque sous-population, l'expression de CCR6 est discriminée dans les sous-populations de CXCR3⁺CCR4^{neg}CCR6^{neg} (pour les lymphocytes Th1), CXCR3^{neg}CCR4⁺CCR6⁺ (pour les

lymphocytes Th17), $CXCR3^+CCR4^{neg}CCR6^+$ (pour les lymphocytes Th1.Th17), $CXCR3^{neg}CCR4^+CCR6^{neg}$ (pour les lymphocytes Th2).

Etape 2b : On a aussi généré une fenêtre sur les marquages par CCR6 et CD161 puis CD90 afin de cibler les sous-populations $CCR6^+CD161^+$, $CCR6^+CD161^{neg}$, $CCR6^{neg}CD161^+$, $CD161^{neg}CCR6^{neg}$. Puis l'expression de CD90 a permis d'identifier les sous-populations $CCR6^+CD161^+CD90^+$, $CCR6^+CD161^{neg}CD90^+$, $CCR6^{neg}CD161^+CD90^+$, $CD161^{neg}CCR6^{neg}CD90^+$ (Etape 4)

Etape 2c : Pour certaines analyses, on a simplement créé une fenêtre sur l'expression de CCR6 afin d'identifier les sous-populations $CCR6^+Th17$ et $CCR6^{neg}Th$ comprenant tous les autres lymphocytes Th mémoires.

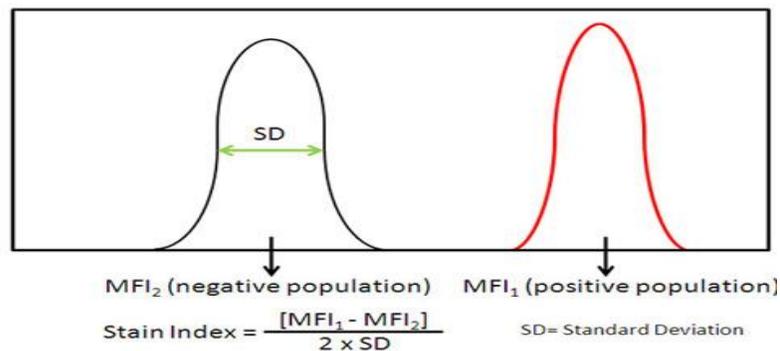
Les différents phénotypes des sous-populations lymphocytaires T $CD4^+$ obtenus par cette stratégie d'analyse sont résumés dans le tableau 3 suivant.

	Sous-populations des lymphocytes T CD4 ⁺	Expression des récepteurs membranaires
1	CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺
2	CD4 ⁺ mémoire	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺
3	Tconventionnels (Tconv)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ CD25 ^{low/neg}
4	Treg	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ^{low/neg} CD25 ^{high}
5	CCR6 ⁺ Treg	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ^{low/neg} CD25 ^{high} CCR6 ⁺
6	CCR6 ^{neg} Treg	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ^{low/neg} CD25 ^{high} CCR6 ^{neg}
7	CCR6 ⁺ Th17	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ CD25 ^{low/neg} CCR6 ⁺
8	CCR6 ^{neg} Th	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ CD127 ⁺ CD25 ^{low/neg} CCR6 ^{neg}
9	Th1.Th17	Phénotype Tconv & CXCR3 ⁺ CCR4 ^{neg} CCR6 ⁺
10	Th1	Phénotype Tconv & CXCR3 ⁺ CCR4 ^{neg} CCR6 ^{neg}
11	Th17	Phénotype Tconv & CXCR3 ^{neg} CCR4 ⁺ CCR6 ⁺
12	Th2	Phénotype Tconv & CXCR3 ^{neg} CCR4 ⁺ CCR6 ^{neg}
13	CCR6 ⁺ CD161 ⁺	Phénotype Tconv & CCR6 ⁺ CD161 ⁺
14	CCR6 ⁺ CD161 ^{neg}	Phénotype Tconv & CCR6 ⁺ CD161 ^{neg}
15	CCR6 ^{neg} CD161 ⁺	Phénotype Tconv & CCR6 ^{neg} CD161 ⁺
16	CCR6 ^{neg} CD161 ^{neg}	Phénotype Tconv & CCR6 ^{neg} CD161 ^{neg}
17	CCR6 ⁺ CD161 ⁺ CD90 ⁺	Phénotype Tconv & CCR6 ⁺ CD161 ⁺ CD90 ⁺
18	CCR6 ⁺ CD161 ^{neg} CD90 ⁺	Phénotype Tconv & CCR6 ⁺ CD161 ^{neg} CD90 ⁺
19	CCR6 ^{neg} CD161 ⁺ CD90 ⁺	Phénotype Tconv & CCR6 ^{neg} CD161 ⁺ CD90 ⁺
20	CCR6 ^{neg} CD161 ^{neg} CD90 ⁺	Phénotype Tconv & CCR6 ^{neg} CD161 ^{neg} CD90 ⁺

Tableau 3 : Différentes sous-populations des lymphocytes T CD4⁺ en fonction de l'expression des récepteurs de chimiokines à la surface de leur membrane

2.3.4. Titration d'anticorps

Après avoir conçu les panels multi-couleurs de cytométrie en flux et sécurisé les cellules et les réactifs nécessaires, nous avons pu procéder à l'optimisation des panels d'anticorps. La première étape de cette optimisation a consisté à titrer les anticorps. La titration d'anticorps est une étape importante de l'optimisation du panel permettant d'obtenir une résolution optimale du signal, l'identification de la population et le niveau d'expression du marqueur. Pour titrer les anticorps, le marquage des cellules avec chaque anticorps a été réalisé à plusieurs concentrations de l'anticorps afin de déterminer quelle concentration donnait le meilleur indice de fluorescence. L'indice de fluorescence est déterminé par la formule dans la figure ci-dessous :



MFI : median fluorescent intensity

Figure 34 : Indice de fluorescence de l'anticorps titré
(D'après <https://www.biolegend.com/newsdetail/1245/>)

L'indice de fluorescence optimal peut être déterminé automatiquement par les fonctions statistiques du logiciel Flowlogic. Les titrages d'anticorps ont été effectués pour les 12 anticorps utilisés dans notre panel d'immunophénotypage ; ils incluent des dilutions de 2 à 5 fois de chaque anticorps en partant de la concentration recommandée par le fabricant. Après avoir obtenu la concentration optimisée en anticorps pour les 11 couleurs déterminées par l'indice de fluorescence le plus élevé, nous avons ensuite réalisé le protocole de marquage de 11 couleurs sur des échantillons.

2.3.5. Protocole de marquage des échantillons

2.3.5.1. Protocole général

Chaque prélèvement de 100µl de sang total frais de donneur volontaire sain ou de patient est transféré dans un tube de polystyrène à fond rond de 5ml, puis d'abord traité pendant 5 min à 4°C avec une solution de Fc Blocking afin de bloquer les récepteurs Fc pour éviter les faux positifs via l'interaction du fragment Fc des anticorps du panel avec les cellules. Ensuite, les échantillons sont incubés avec un cocktail d'anticorps qui comprend le volume nécessaire de chaque anticorps du panel, pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après le marquage par les anticorps, les érythrocytes du prélèvement sont lysés en ajoutant dans le tube

un tampon de lyse (1 ml / tube de VersaLyse Ref A09777, Beckman Coulter) et incubés pendant 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les tubes sont ensuite centrifugés à 1500 rpm pendant 5 minutes, lavés avec 3ml de tampon PBS par une deuxième centrifugation. Puis, les culots cellulaires sont remis en suspension dans 500 µl de tampon PBS et mis dans la glace avant de passer les tubes au cytomètre de flux pour l'analyse. En parallèle des tubes contenant les cellules marquées, nous avons également réalisé les différents contrôles nécessaires à l'analyse, y compris des tubes de contrôle FMO (Fluorescence Minus One), et des tubes avec des billes de compensation monomarquées avec chacun des anticorps du panel.

2.3.5.2. Contrôle fluorescence minus one

Les contrôles FMO sont des tubes dans lesquels les cellules sont marquées avec tous les anticorps du panel sauf un qui est remplacé par son isotype contrôle (anticorps de même isotype mais non spécifique de l'antigène d'intérêt) couplé au même fluorochrome afin de positionner le seuil de fluorescence au pied du pic des cellules négatives marquées avec l'isotype contrôle. Les FMO sont réalisées sur 100µl du sang total avec les doses d'anticorps décrites dans le tableau 4. Les FMO de marquage de CD3, CD4, CD25, CD127, CD45RO, CD8 ne sont pas nécessaire à effectuer car la positivité de ces marquages est facilement distinguable des cellules négatives pour l'expression de ces marqueurs.

Tubes / Anticorps	Cellules non marquées	FMO CCR6	FMO CCR4	FMO CXCR3	FMO CD161	FMO CD90	Tube de panel
Anti-CD127		X	X	X	X	X	X
Anti-CD45RO		X	X	X	X	X	X
Anti-CD3		X	X	X	X	X	X
Anti-CCR6		Isotype PE Cy7	X	X	X	X	X
Anti-CD25		X	X	X	X	X	X
Anti-CD4/ Anti-CD8		X	X	X	X	X	X
Anti-CCR4		X		X	X	X	X
Viabilité		X	X	X	X	X	X
Anti-CD90		X	X	X	X	Isotype BV605	X
Anti-CXCR3		X	X	Isotype BV711	X	X	X
Anti-CD161		X	X	X	Isotype BV786	X	X

Tableau 4 : Description des tubes d'anticorps utilisé comme contrôle FMO

2.3.5.3. Contrôle des compensations

Certains fluorochromes ont des spectres d'émission qui peuvent se chevaucher, ce qui peut être la cause d'un signal faussement positif. Des tubes ont été préparés avec des billes de capture d'anticorps (ou billes de compensation) (Miltenyi, CompBeads, BD Biosciences) pour chaque anticorps utilisé. Les billes de compensation permettent de déterminer le signal positif d'émission pour chaque anticorps fluorescent et de calculer la matrice de compensation qui soustrait les valeurs de fluorescence résultant de la superposition de deux ou plusieurs signaux de fluorescence liée aux chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes. Les contrôles de compensation sont réalisés en ajoutant 1 μ L de l'anticorps d'intérêt à 100 μ L de suspension de billes de compensation.

Partie 4 : Résultats

1. Article 2 : « La radiosensibilité à la sénescence des lymphocytes CD4⁺CCR6⁺Th17 : une nouvelle voie de recherche sur la fibrose radio-induite ».

Introduction

L'efficacité de la radiothérapie dépend en grande partie de la dose délivrée à la tumeur. Cependant, en pratique courante, les doses sont limitées en raison du risque important d'effets secondaires comme la fibrose, au niveau des tissus sains. Dans le but de pouvoir améliorer la personnalisation de la radiothérapie, différentes équipes ont proposé des tests prédictifs de la radiosensibilité individuelle des patients, basés sur les différentes variétés de mort cellulaire radio-induite et/ou sur leurs mécanismes. Le projet COPERNIC a montré la corrélation entre le retard de la translocation nucléaire ou « nucléo-shuttling » de la protéine ATM dans les fibroblastes et la réaction excessive du patient à l'exposition aux rayonnements ionisants (COPERNIC project investigators et al., 2016). De plus, Andreassen et collègues ont montré une association significative entre le SNP rs1801516 d'ATM et la toxicité après radiothérapie chez 5456 patients atteints cancer du sein ou de la prostate (Andreassen et al., 2016). D'autres équipes ont montré que les femmes ayant un taux élevé d'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ et TCD8⁺ ont un très faible taux de fibrose mammaire post-radiothérapie (Azria et al., 2015; Ozsahin et al., 2005). Par ailleurs, Paun et ses collègues ont démontré que des taux élevés de lymphocytes Th1 (inflammatoires) et Th17 (inflammatoires et pro-fibrogéniques) infiltrant les tissus pulmonaires sont corrélés à la sévérité de la fibrose pulmonaire dans un modèle murin d'irradiation thoracique totale (Paun et al, 2015, 2017).

La sénescence est un état d'arrêt irréversible de prolifération cellulaire combiné avec le maintien du métabolisme, en réponse à différents stress environnementaux ou au raccourcissement des télomères faisant suite à de nombreuses divisions cellulaires. Les cellules sénescents ont diverses caractéristiques, parmi lesquelles une sensibilité réduite à l'apoptose, des modifications de l'expression de certaines protéines dont une augmentation de l'expression des facteurs pro-inflammatoires (SASP : senescence-associated secretory phenotype), et dans certains cas une modification de la réponse aux dommages de l'ADN.

Nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th17 pro-fibrogéniques ont une forte sensibilité à la sénescence radio-induite en comparaison aux autres lymphocytes T CD4⁺, CD4⁺CCR6^{neg}Th et Treg ; cette forte sensibilité à la sénescence radio-induite pourrait résulter dans l'augmentation du ratio CD4⁺CCR6⁺Th17 / CD4⁺CCR6^{neg}Th ou Treg CCR6^{+/neg} en périphérie et être associée au grade de fibrose radio-induite dans les tissus sains.

Méthodes

Trois sous-populations de lymphocytes T effecteurs-mémoires : CD4⁺CCR6⁺Th17 (profibrogéniques), CD4⁺CCR6^{neg}Th (inflammatoires) et CD4⁺CD45RO⁺CD25⁺CD127^{neg} (régulateurs/ anti-inflammatoires), et les PBMCs sont irradiées à la dose unique de 2 Gy

L'induction de l'apoptose est évaluée en cytométrie de flux par marquage Annexin V et par marquage en immunofluorescence (IF) de la caspase-3 clivée/activée, en qRT-PCR par la quantification de l'expression des ARNm de protéines anti/pro-apoptotiques. La sénescence a été évaluée par l'activité de β -galactosidase (β -Gal), et l'expression de p16^{Ink4a}, p21, γ H2A.X, H2A.J. La production de cytokines par les lymphocytes T irradiés a été déterminée dans le surnageant par la technologie Luminex. Différents inhibiteurs pharmacologiques des principales voies de signalisation associées à la sénescence ont ensuite été testés pour évaluer leur potentiel inhibiteur de la sénescence radio-induite dans les lymphocytes Th17 CCR6⁺ après les RI.

Résultats

Nos résultats ont montré, pour la première fois, que l'irradiation par une dose unique de 2 Gy induisait la sénescence de la sous-population de lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺ Th17 en l'absence d'activation du TCR ; les lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺ étaient plus sensibles à la sénescence radio-induite que les autres sous-populations lymphocytaires T conventionnelles CD4⁺CCR6^{neg}Th et lymphocytes T régulateurs. De façon cohérente, les lymphocytes T conventionnels CD4⁺CCR6^{neg}Th et les lymphocytes T régulateurs étaient plus sensibles à l'apoptose après l'exposition à des RI. De plus, nous avons montré que les lymphocytes Th17 CCR6⁺ sénescents sécrétaient de l'IL-8 pro-inflammatoire et du VEGF-A pro-angiogénique, ce qui leur conférait un potentiel pathogénique. Nous avons également pu montrer que les lymphocytes T régulateurs CCR6⁺ étaient plus sensibles à l'apoptose radio-induite que les lymphocytes T régulateurs CCR6^{neg}.

Enfin nous avons montré, pour la première fois également, que la sénescence radio-induite de la sous-population de lymphocytes CCR6⁺Th17 dépendait des voies de signalisation des MAPKinases associées à la production d'espèces réactives oxygénées mais était indépendante du mécanisme de réparation des dommages à l'ADN associé à l'activation de la voie de la kinase ATM en dépit de l'expression d'une des cibles d'ATM, le variant d'histone H2A.J..

Conclusion

Au total, nos résultats ont apporté de nouvelles informations sur la sénescence radio-induite des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺, en particulier au niveau des lymphocytes CCR6⁺Th17 pro-fibrogéniques et pro-angiogéniques. Ils suggèrent que le ratio des lymphocytes T CCR6⁺Th17/CCR6⁺Treg circulants pourrait être envisagé comme un marqueur potentiel de la radiosensibilité individuelle intrinsèque. La sensibilité à la sénescence des lymphocytes CD4⁺CCR6⁺Th17 pourrait être une nouvelle voie de recherche sur la fibrose radio-induite. Par sa capacité à prévenir la sécrétion d'IL-8 et de VEGF-A par les lymphocytes CCR6⁺Th17 irradiés, le ciblage des voies de signalisation ROS-MAPKs et/ou mTOR pourrait être envisagé comme une nouvelle stratégie pharmacologique de prévention de la toxicité radio-induite des tissus sains.

Human CCR6⁺Th17 lymphocytes are highly sensitive to radiation-induced senescence and are a potential target for prevention of radiation-induced toxicity

Hoang Quy Nguyen ^{a,b*}, Yazid Belkacemi ^{a,b,c*}, Carl Mann ^d, Françoise Hoffschir ^e, Stéphane Kerbrat ^f, Mathieu Surenaud ^g, Patricia Zadigue ^{a,b}, Alexandre De La Taille ^{a,b,h}, Paul-Henri Romeo ⁱ, Sabine Le Gouvello ^{b,f,j}

^a University of Paris-Sud, University of Paris-Saclay, INSERM U955 Team 07, Créteil, 94000, France

^b University of Paris Est Créteil (UPEC), Créteil, 94000, France

^c APHP, Department of Radiation Oncology and Henri Mondor Breast Cancer, Henri Mondor University Hospital, University of Paris Est Créteil (UPEC), 94000 France

^d Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, University of Paris-Sud, University of Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette cedex, 91198, France

^e CEA/DRF/IBFJ/iRCM/LRTS/Inserm U967, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France

^f INSERM UMR955 Team 04, University of Paris Est Créteil (UPEC), France

^g INSERM UMR955 Team 16, University of Paris Est Créteil (UPEC), France

^h APHP, Department of Urology, Henri Mondor University Hospital, University of Paris Est Créteil (UPEC), 94000 France

ⁱ CEA/DRF/IBFJ/iRCM/LRTS, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France; Inserm U967, Fontenay-aux-Roses cedex, 92265, France; University of Paris-Diderot, Paris 7, France; Université Paris-Sud, Paris 11, France; University of Paris-Saclay ; Equipe labellisée Ligue contre le Cancer, France

^j APHP, Department of Biology & Pathology, Henri Mondor University Hospital, Créteil, 94000, France

*HQ.N. and Y.B. contributed equally to this work as first authors.

Summary

This study demonstrates the high sensitivity of mucosa-homing CCR6⁺Th17 lymphocytes to irradiation (IR)-induced senescence. This senescence is associated with expression of the rare histone variant H2A.J and secretion of IL-8 and VEGF-A. Pharmacological targeting of ROS or MAPKs and/or mTOR signaling pathways prevented this IR-mediated senescence. Altogether, these results suggest potential deleterious effects of irradiated CCR6⁺Th17 lymphocytes during radiotherapy and how these deleterious effects may be prevented.

Purpose

To study the sensitivity of different peripheral CD4⁺ T-lymphocyte subsets to IR and identify potential targets for the prevention and/or treatment of radiation-induced fibrosis.

Methods and Materials

This study was performed on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or sorted peripheral CCR6⁺ mucosa-homing Th17 cells/CCR6^{neg}Th cells and regulatory T cells (Treg) of healthy volunteers. Cells were irradiated with a 2 Gy single dose in the presence or absence of pharmacological inhibitors of different signaling pathways. Senescence of irradiated cells was assessed by resistance to apoptosis and determination of various senescence-associated biomarkers (senescence associated β -galactosidase (SA- β -Gal) activity, p16^{Ink4a}-, p21^{Cdkn1a}-, γ H2A.X-, H2A.J expression). Cytokine production was measured in supernatants of irradiated cells by Luminex technology.

Results

High sensitivity of CCR6⁺Th17 lymphocytes to IR-induced senescence was shown by expression of the histone variant H2A.J, higher SA- β -Gal activity and upregulation of p16^{Ink4a} and p21^{Cdkn1a} expression. Lower Annexin V staining, cleaved caspase-3 and higher expression of anti-apoptotic genes Bcl-2 and Bcl-xL LF showed that CCR6⁺Th17 lymphocytes were more resistant to IR-induced apoptosis than CCR6^{neg} effector Th and Treg lymphocytes. After a 2 Gy IR, both CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg} cells acquired a moderate senescence-associated secretory phenotype (SASP) but only CCR6⁺Th17 cells secreted IL-8 and VEGF-A. Pharmacological targeting of ROS, MAPKs, and mTOR signaling pathways prevented the expression of senescent markers and IL-8 and VEGF-A expression by CCR6⁺Th17 cells after IR.

Conclusion

This study suggests that IR induces senescence of CCR6⁺Th17 lymphocytes associated with secretion of IL-8 and VEGF-A that may be detrimental to the irradiated tissue. ROS-MAPKs signaling pathways are candidate targets to prevent this CCR6⁺Th17-dependent radiation-induced toxic potential. Finally, the ratio of circulating H2A.J⁺ senescent CCR6⁺Th17/CD4⁺ T lymphocytes may be a candidate marker of individual intrinsic radiosensitivity.

INTRODUCTION

Healthy tissue damage is a limiting factor for radiation therapy. The identification of the radiosensitive patients with predictive assays is needed to tailor radiotherapy plans. Individual radiosensitivity was correlated with resistance of peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T cells to IR-induced apoptosis (1–4). Whether the resistance to IR-induced apoptosis of different CD4⁺T-lymphocyte subsets contribute to radiation-induced toxicity process has never been investigated.

CD4⁺ T lymphocytes differentiate into diverse subsets (T helper (Th): Th1, Th2, Th17, *etc...* and regulatory T cell (Treg)) depending on T cell receptor (TCR) activation and the appropriate cytokine microenvironments. These subsets differ by their distinct master transcription factors, the cytokines they produce, and ultimately their functions against invading pathogens or in mediating tolerance (5). The chemokine receptor CCR6 was identified as the main surface marker characterizing the Th17 lineage (6), and regulating the recruitment of both Th17 and Treg cells into inflammatory tissues (7,8). Interestingly, preclinical data demonstrated that the Th17/Th1 lymphocytes ratio was higher in irradiated mouse strains prone to radiation-induced lung fibrosis (9,10). Moreover CCR6 was recently proposed as a predictive biomarker of radiosensitivity (11). Recent data from Veldwijk et al. (12) revealed that CD4⁺ T lymphocytes are associated with radiotherapy-related adverse late effects of the skin. But the contribution of specific immune cell types to the pathogenesis of IR-induced non-targeted tissue disabilities remains incompletely understood.

Many studies both *in vitro* and *in vivo* in humans and model organisms support the idea that radiation-accelerated senescence promotes radiation-induced toxicity (13). Cellular senescence (CS) is an irreversible arrest of proliferation triggered by different damaging stimuli, including dysfunctional telomeres, DNA damage, oncogenic mutations, oxidative stress, and IR. Senescent cells are characterized by a combination of different parameters such as β -galactosidase activity, cyclin-dependent kinase inhibitors expression such as p16^{Ink4a} and p21^{Cdkn1a}, relative resistance to apoptosis, persistent DNA double-strand breaks (DSBs), a senescence-associated secretory phenotype (SASP) (14,15), and accumulation of the histone variant H2A.J (16). Although “resistance to apoptosis”, underlying the above-mentioned radiosensitivity predictive test, could be part of a senescence phenotype, individual sensitivity to IR-induced senescence has never been evaluated as an endpoint to predict radiosensitivity. Therefore, in the present study, we addressed the question of whether CD4⁺CCR6⁺Th17 lymphocytes have a higher sensitivity to IR-dependent apoptosis and/or senescence as compared to CCR6^{neg}Th lymphocytes and CCR6⁺ or ^{neg}Treg lymphocytes.

MATERIALS and METHODS

Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors (Etablissement Français du Sang, Creteil, France) were separated using UNI-SEP Separation Tubes (Novamed, Jerusalem, Israel). CD4⁺ T cells were enriched from PBMCs by negative selection (untouched CD4⁺ T cell isolation kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD4⁺CD45RO⁺CD127^{neg}CD25^{high}Treg lymphocytes, CD4⁺CD45RO⁺CD127⁺CD25^{low}CCR6⁺Th17 lymphocytes and CD4⁺CD45RO⁺CD127⁺CD25^{low}CCR6^{neg}Th lymphocytes were further purified (purity \geq 99%) by using a fluorescence-activated cell sorter (Influx; BD Biosciences), after labeling with CD127 PE (R34.34), CD45RO ECD (UCHL1, Beckman Coulter, Villepinte, France), CD196 (CCR6) BV 421 or PE-Cy7 (11A9), CD25 APC (2A3, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), CD45RO FITC (UCHL1, Miltenyi Biotec), and CD4 APC eFluor 780 (RPA-T4, eBiosciences, San Diego, CA USA) monoclonal antibodies..

Irradiation

Cells were plated at 10⁶ cells/ml in 96-well U bottom plates (Corning, Acton, MA USA) in RPMI 1640 Medium GlutaMAX™ HEPES 25mM (Thermo Fisher, Waltham, MA USA), 1 mM sodium pyruvate, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, supplemented with 10% human AB serum. Cells were irradiated *ex-vivo* at a 2 Gy single dose, using gamma radiation from a ¹³⁷Cs-source (IBL637; Cis-Bio International/Scherring, Saclay, France) with a dose rate of 2.7 Gy/min.

Flow cytometric analysis of Apoptosis

Irradiated lymphocytes were stained with Annexin V-FITC according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences Science) in combination with fluorochrome-conjugated CD3 PerCP-Cy5.5 (REA613, Miltenyi), CD4 APC-Cy7 (REA623, Miltenyi, France), CCR6 PE-Cy7 (11A9, BD Biosciences), CD25 APC (4E3, Miltenyi), CD127 PE (18C9, Miltenyi), CD45RO ECD (Beckman Coulter), antibodies and Viability Fixable Dye (Miltenyi) for dead cell exclusion, using an LSR Fortessa X20 (BD Biosciences, France). Flow cytometry analysis was performed using Flowlogic software version 7.1 (Miltenyi).

Pharmacologic inhibitors treatments

Prior to IR, cells were pretreated (or not) with 10 mM N-Acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma Aldrich) for 1.5 hours, 100nM rapamycin (Sigma Aldrich), 3 µM KU60019 (Sigma Aldrich) for 1 hour, 5µM U0126 (Sigma Aldrich), 5µM JNK-IN-8 (Sigma Aldrich), or 10µM SB203580 (Sigma Aldrich) for 30 minutes (30 min).

RNA isolation and real time quantitative RT-PCR

Total mRNA isolation and qRT-PCR analysis were performed as published (17). Primer sequences are listed in Table.S1. The expression of all the indicated target transcripts was measured by the relative quantification of real-time PCR using a mix of each cDNA sample as a calibrator sample, according to the $\Delta\Delta C_t$ method (18).

Staining for Senescence-associated β -Galactosidase (SA β -Gal), p16^{Ink4a}, cleaved caspase-3, H2AX and H2A.J

Cells were harvested and spread on Superfrost plus slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) at 1×10^5 cells/slide. Staining for SA β -Gal activity (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) was performed as described (19).

p16^{Ink4a} analysis: cells were fixed by 4% formaldehyde-PBS for 15 min and incubated overnight at 4°C with anti-p16^{Ink4a} (1:250, Abcam, Cambridge, UK) followed by incubation with Alexa-594 conjugated goat anti-rabbit antibody (1:200, Life Technologies, Saint-Aubin, France) for 1 hour. H2A.J analysis: cells were fixed by 3.7% formaldehyde-PBS, and incubated at room temperature for 1 hour with anti-H2A.J (1:750, gift of Carl Mann (16)), followed by a 1 hour incubation with Alexa-594 (1:500, Life Technologies). After washing, cells were mounted with Prolong Gold+DAPI (Life Technologies) and analyzed on microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Caspase 3 activation & H2A.J expression analysis: cells were fixed by 4% formaldehyde-PBS, washed with PBS and deposited onto poly-D-lysine coated slides. After permeabilization and saturation, cells were incubated with primary antibodies (anti-phospho-histone H2A.X mAb (1:400, Merck Millipore, France) or anti-cleaved Caspase-3 mAb (1:200, Cell Signaling, Ozyme, France) for 1 hour, and then with Alexa-488 conjugated goat anti-mouse antibody (1:750, Life Technologies, Saint-Aubin, France) and Alexa-594 (1:1000, Life Technologies) for 1 hour, respectively. After washing, cell were incubated with DAPI (1:1000, Life Technologies), mounted with Prolong Gold Antifade, and analyzed on a Zeiss Axio Imager microscope driven by MetaSystems software.

The images were processed with ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A minimum of 100 cells per condition were analyzed.

Cytokine secretion assays

Cell culture supernatants were analyzed by the Luminex assay (PROCARTAPLEX, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), according to the manufacturer's instructions

Statistics

Statistical tests were performed using Prism version 5.04 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) and data are represented as standard error of the mean (SEM). Differences were assessed with the two-tailed Mann-Whitney U-test. § indicates a statistical difference between 2 sub-populations (§

p<0.05, §§ p<0.01), * in comparison to the non-treated condition (* p<0.05, ** p<0.01), & in comparison to the treated condition (& p<0.05, && p<0.01).

RESULTS

Resting CCR6⁺Th17 lymphocytes are resistant to a 2 Gy IR-induced apoptosis.

We first determined the IR-induced apoptosis of different subsets of CD4⁺T lymphocytes after irradiation of PBMCs at 2 Gy by quantification of AnnexinV⁺ cells 48 hours after IR (**Fig. 1A**). The following CD4⁺T lymphocyte subsets were studied: CCR6⁺T effector/memory lymphocytes (henceforth referred to as “CCR6⁺Th17”) or CCR6^{neg} T effector/memory lymphocytes (henceforth referred to as “CCR6^{neg}Th”) among CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺CD25^{neg}CD127⁺ T lymphocytes, and CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ CD25⁺ CD127^{neg} (henceforth referred to as “Treg”) with CCR6 positive staining or not. CCR6⁺Th17 lymphocytes were more resistant to IR-induced apoptosis compared to CCR6^{neg}Th lymphocytes and to Treg lymphocytes (**Fig. 1A & 1B**). In addition, CCR6⁺Treg lymphocytes were more sensitive to IR-induced apoptosis compared to CCR6^{neg}Treg lymphocytes (**Fig. 1C**). In accordance, CCR6⁺Th17 lymphocytes showed a lower activation of caspase-3 than CCR6^{neg}Th and Treg lymphocytes (**Fig. 1D & 1E**), and a higher expression of anti-apoptotic effectors (Bcl-2, Bcl-xL LF) after 2 Gy IR (**Fig. 1F**). No significant differences could be detected for the other pro- and anti-apoptotic genes (data not shown). Altogether, these results show that resting CCR6⁺Th17 lymphocytes are resistant to a 2 Gy IR-induced apoptosis.

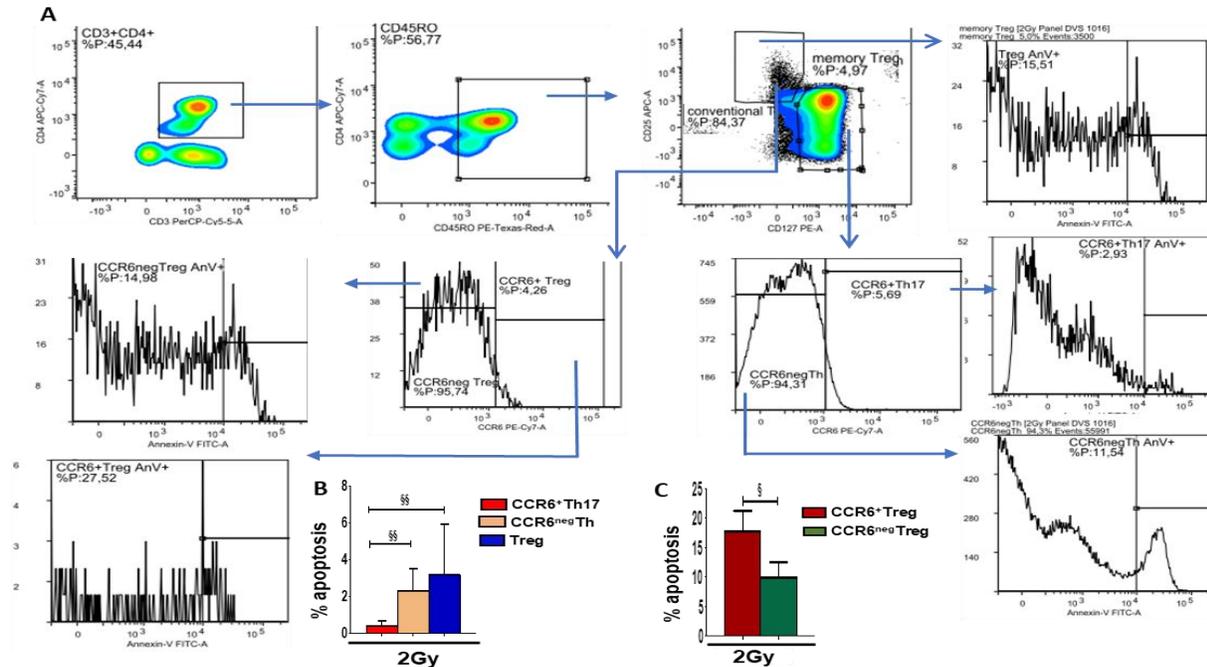


Figure 1: Resistance to IR-induced apoptosis of CCR6⁺Th17 lymphocytes

High IR-induced senescence of CCR6⁺Th17 cells

Cellular senescence is associated with increased resistance to apoptosis. We thus assayed for canonical hallmarks of senescence in irradiated CD4⁺ T lymphocytes: senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity and expression of the cell cycle inhibitors p16^{Ink4a} and p21^{Cdkn1a} (20). IR induced SA- β -gal activity in CCR6⁺Th17, CCR6^{neg}Th and Treg lymphocytes (**Fig. 2A**), but SA β -gal activity dose-response was significantly higher for CCR6⁺Th17 compared to CCR6^{neg}Th and Treg lymphocytes (**Fig. 2B**). Moreover, p16^{Ink4a} expression was higher in CCR6⁺Th17 cells after 2 Gy IR (**Fig. 2C & 2D**) and after H₂O₂ treatment (**Fig. 2E**). Finally, p21^{Cdkn1a} expression significantly increased after 2 Gy IR only in CCR6⁺Th17 (**Fig. 2F**).

We then quantified the secretion of SASP factors (21,22) in supernatants of CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes 48 hours after 2 Gy IR. Mitogenic stimulation with anti-CD3 and anti-CD28, which mimics TCR activation in the presence of a co-stimulatory signal, was used as a positive control. Compared to this TCR activation, irradiation of CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th cells resulted in a moderate secretion of SASP factors with no secretion of IL-13, IL-33 and GM-CSF (**Fig. 2G & 2H**). Secretion of IL-1 α , IL-6, osteopontin, MIP-1 α , and MIP-1 β were similarly increased after IR and secretion of IL-1 β was increased only in CCR6^{neg}Th. Interestingly, irradiated CCR6⁺Th17 lymphocytes secreted larger amounts of VEGF-A and IL-8 compared to irradiated CCR6^{neg}Th lymphocytes (**Fig. 2G**).

Altogether, these results show that human CCR6⁺Th17 lymphocytes are highly sensitive to IR-induced senescence associated with VEGF-A and IL-8 secretion.

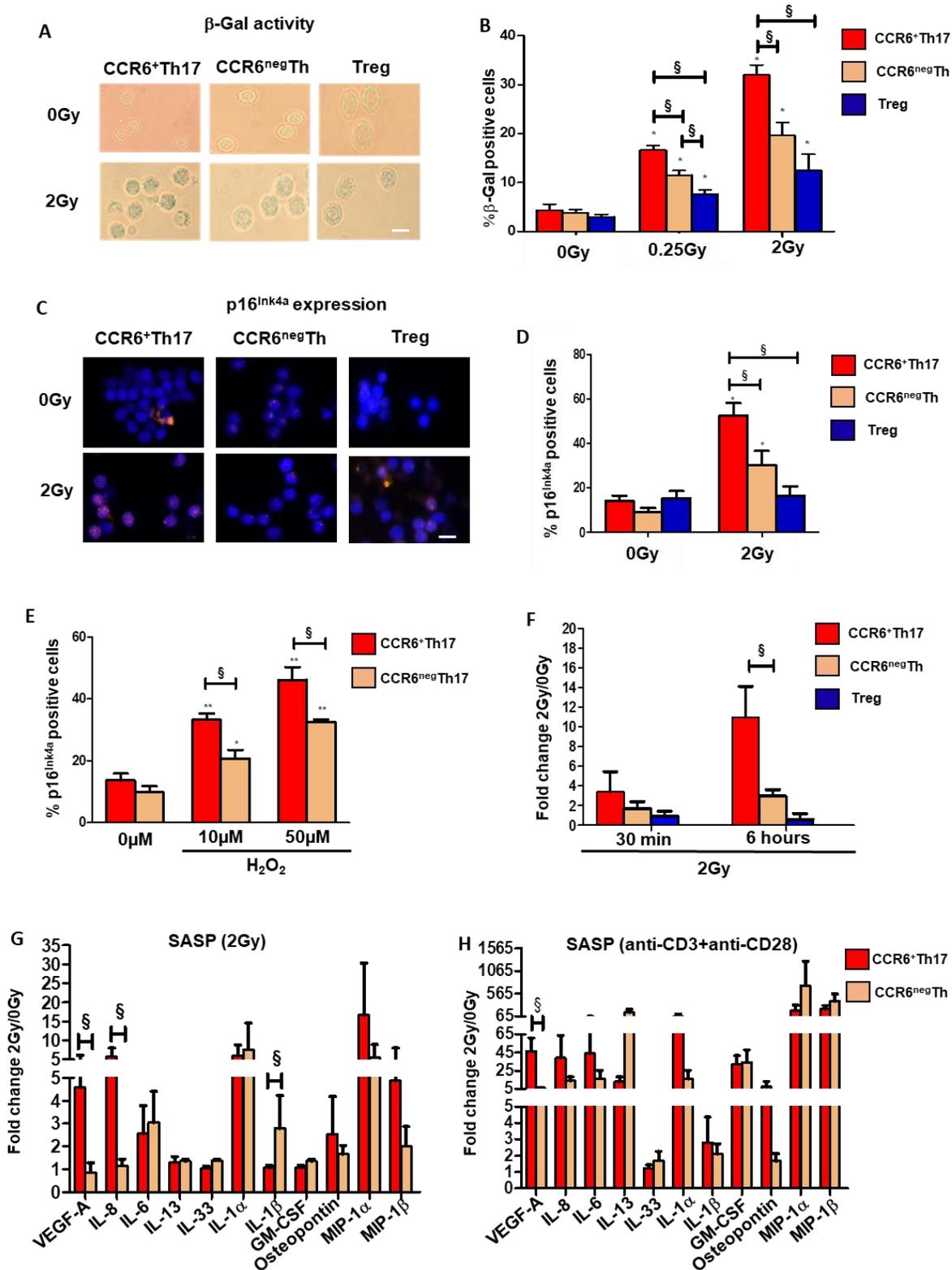


Figure 2: IR-induced senescence in CCR6⁺Th17 lymphocytes

Figure 2: IR-induced senescence in CCR6⁺Th17 lymphocytes

(A) Representative images of SA- β -Gal staining of CCR6⁺Th17/CCR6^{neg}Th17/Treg at 48 hours after 2 Gy IR. Senescent cells are blue after SA- β -Gal cytoplasmic staining.

(B) % SA- β -Gal positive cells. 200-800 cells per experimental condition were counted. n=4, mean +/- SEM.

(C) Representative images of p16^{Ink4a} immunofluorescence in CCR6⁺Th17/ CCR6^{neg}Th/Treg at 24 hours after 2 Gy IR.

(D-E) % p16^{Ink4a} positive cells. 150–500 cells per condition were counted. n=4, mean +/- SEM.

(D) Cells were treated with 2 Gy IR. (E) Cells were treated with H₂O₂ at the indicated concentrations for 72 hours.

(F) qRT-PCR showing expression of p21^{Cdkn1a} in CCR6⁺Th17/CCR6^{neg}Th/Treg. n=5, mean +/- SEM.

(G-H) Comparative cytokine production of CCR6⁺Th17/CCR6^{neg}Th at 72 hours after 2 Gy IR (n=7). (G) plate-bound anti-CD3 ϵ (5 μ g/mL) antibody and soluble anti-CD28 (2 μ g/mL) antibody were used as a positive control (n=4). Selected cytokine levels are shown as the fold change over the non-irradiated conditions.

Irradiation of CCR6⁺Th17 cells is associated with expression of the rare histone variant H2A.J

IR exposure generates DNA double-strand breaks (DSBs) which leads to recruitment of the ATM kinase and phosphorylation of the H2AX histone variant on megabase regions of the chromatin surrounding the DSBs. These so-called γ H2AX foci can be quantified by immunofluorescence microscopy. Residual γ H2AX foci at 24 hours post-IR are hallmarks of persistent DNA damage associated with several types of senescence (22). We thus investigated DSB repair by enumerating γ H2AX foci in sorted, resting CCR6⁺Th17, CCR6^{neg}Th and Treg lymphocytes at different time points after 2 Gy IR. IR-induced γ H2AX foci peaked around 15-30 min post-IR in the three T-lymphocyte subsets which showed similar repair kinetics, but the number of γ H2AX foci at 30 min after 2Gy IR was higher in CCR6⁺Th17 compared to CCR6^{neg}Th and Treg lymphocytes. No significant residual γ H2AX foci were found at 24 hours in the three T-lymphocyte subsets, although there was a tendency towards slightly higher foci per cell in CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes relative to non-irradiated controls (**Fig. 3A & 3B**).

As DNA damage can also impact H2A.J expression (16), we next investigated H2A.J expression in 2 Gy-irradiated CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes. H2A.J expression increased 72 hours after a 2 Gy IR of CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes, but this increased expression was higher in CCR6⁺Th17 lymphocytes (**Fig. 3C & 3D**). The specificity of H2A.J detection was verified by the absence of labeling if the H2A.J peptide, specific of the x BCR epitope of the anti-H2A.J antibody, was added as a competitor (PC) during the incubation with the anti-H2A.J antibody in the IF procedure. H₂O₂-induced oxidative stress similarly increased H2A.J

expression in CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes (**Fig. 3E**) suggesting a specific regulation of expression of H2A.J during irradiation of CCR6⁺Th17 lymphocytes.

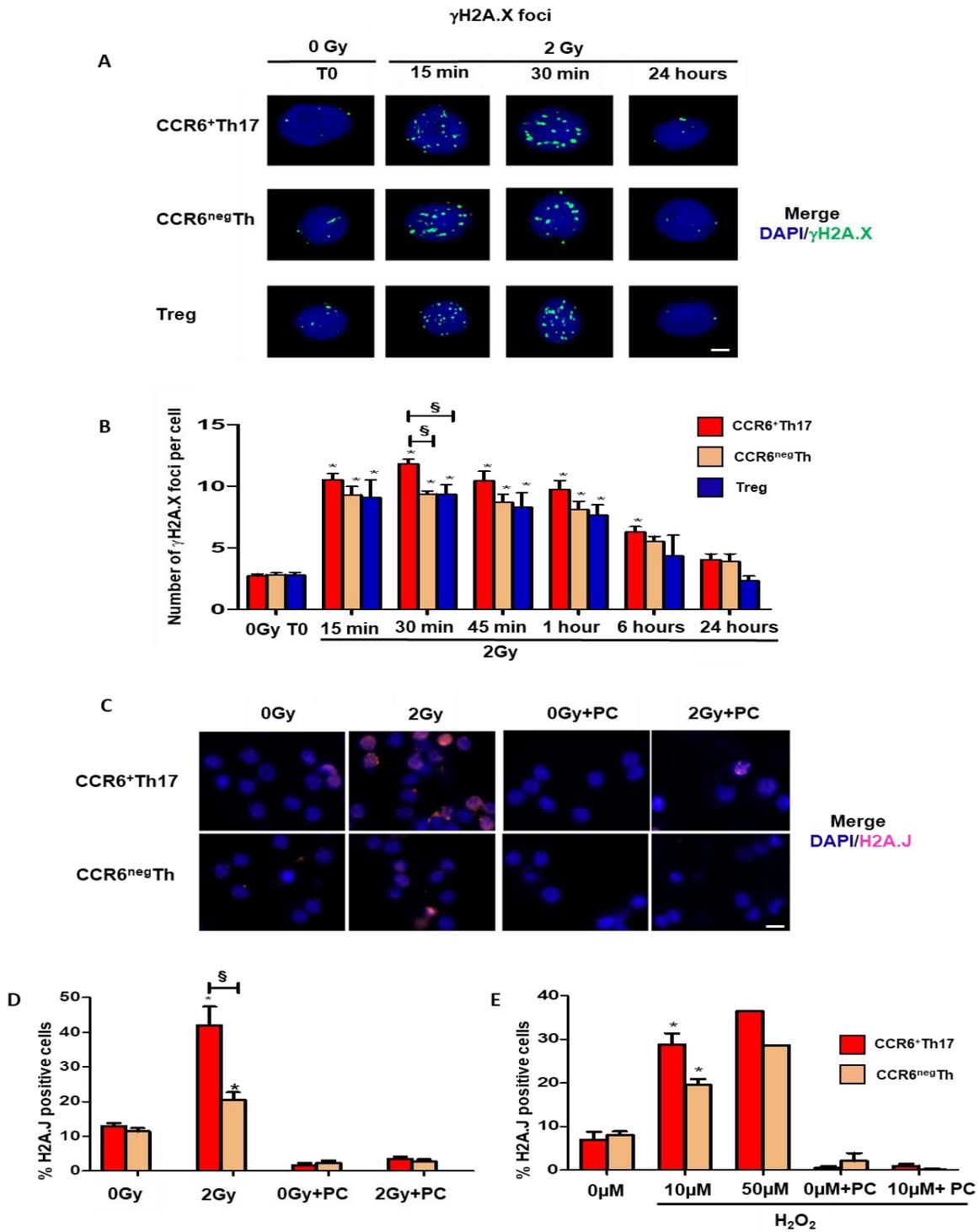


Figure 3: IR-induced senescence of CCR6⁺Th17 lymphocytes is associated with expression of H2A.J despite completion of the DDR

Figure 3: IR-induced senescence of CCR6⁺Th17 lymphocytes is associated with expression of H2A.J despite completion of the DDR

(A) Immunofluorescence of γ H2AX foci in CCR6⁺Th17/CCR6^{neg}Th/Treg lymphocytes at 0, 15, 30 min, and 24 hours after 2 Gy IR.

(B) Quantification of γ H2AX foci at 0, 15, 30, 45 min, 1, 6 and 24 hours after 2 Gy IR. At least 120 cells per experimental condition were counted in each experiment. n=4, mean +/- SEM.

(C) Representative images of H2A.J immunofluorescence in CCR6⁺Th17/CCR6^{neg}Th at 72 hours after 2 Gy IR with or without peptide competition (PC) of H2A.J antibodies.

(D-E) % H2A.J positive cells. 200–500 cells per experimental condition were counted. n=4, mean +/- SEM. (D) Cells were treated with 2 Gy IR (E) Cells were treated with H₂O₂ at the indicated concentrations for 72 hours.

Inhibition of ROS, MAPKs, and mTOR signaling pathways prevents VEGF-A and IL-8 expression independently of H2A.J expression in senescent CCR6⁺Th17.

IR increases the production of ROS, which can activate MAPKs signaling pathways (23), which in turn regulate mTOR kinase (24) and the SASP (25). SASP expression has also been correlated with H2A.J accumulation in senescent fibroblasts (16). By using pharmacologically selective inhibitors, we studied the potential involvement of ATM and the ROS-MAPKs-mTOR (26,27) signaling pathways in IR-induced senescence of CCR6⁺Th17 lymphocytes. CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes were pretreated with the ATM inhibitor (KU60019), a ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC), a p38-MAPK inhibitor (SB203580), a JNK-MAPK inhibitor (JNK-IN-8), a MEK1/2 inhibitor (U0126) or a mTOR inhibitor (rapamycin) before a 2 Gy IR. Pretreatment with NAC, rapamycin, and the three MAPKinase pathway inhibitors prevented the IR-induced upregulation of p16^{Ink4a} expression and SA- β -Gal activity in both CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes, whereas pretreatment with the ATM inhibitor did not (**Fig. 4A & 4B**). Conversely, IR-induced H2A.J expression was not prevented by pretreatment with NAC, rapamycin and p38-MAPK inhibitor, whereas pretreatment with the ATM inhibitor or MEK1/2 and JNK inhibitors did prevent its expression (**Fig. 4C**). Finally, whereas IR-induced secretion of both IL-8 and VEGF-A was abolished by pretreatment with NAC, pretreatment with rapamycin or the three MAP Kinase pathways inhibitors only abolished IR-induced VEGF-A but not IL-8 secretion (**Fig. 4D & 4E**).

Altogether, these results showed that inhibition of the MEK/ERK-JNK signaling pathways was the only condition that blocked all IR-induced senescence hallmarks and VEGF-A secretion of CCR6⁺Th17 lymphocytes.

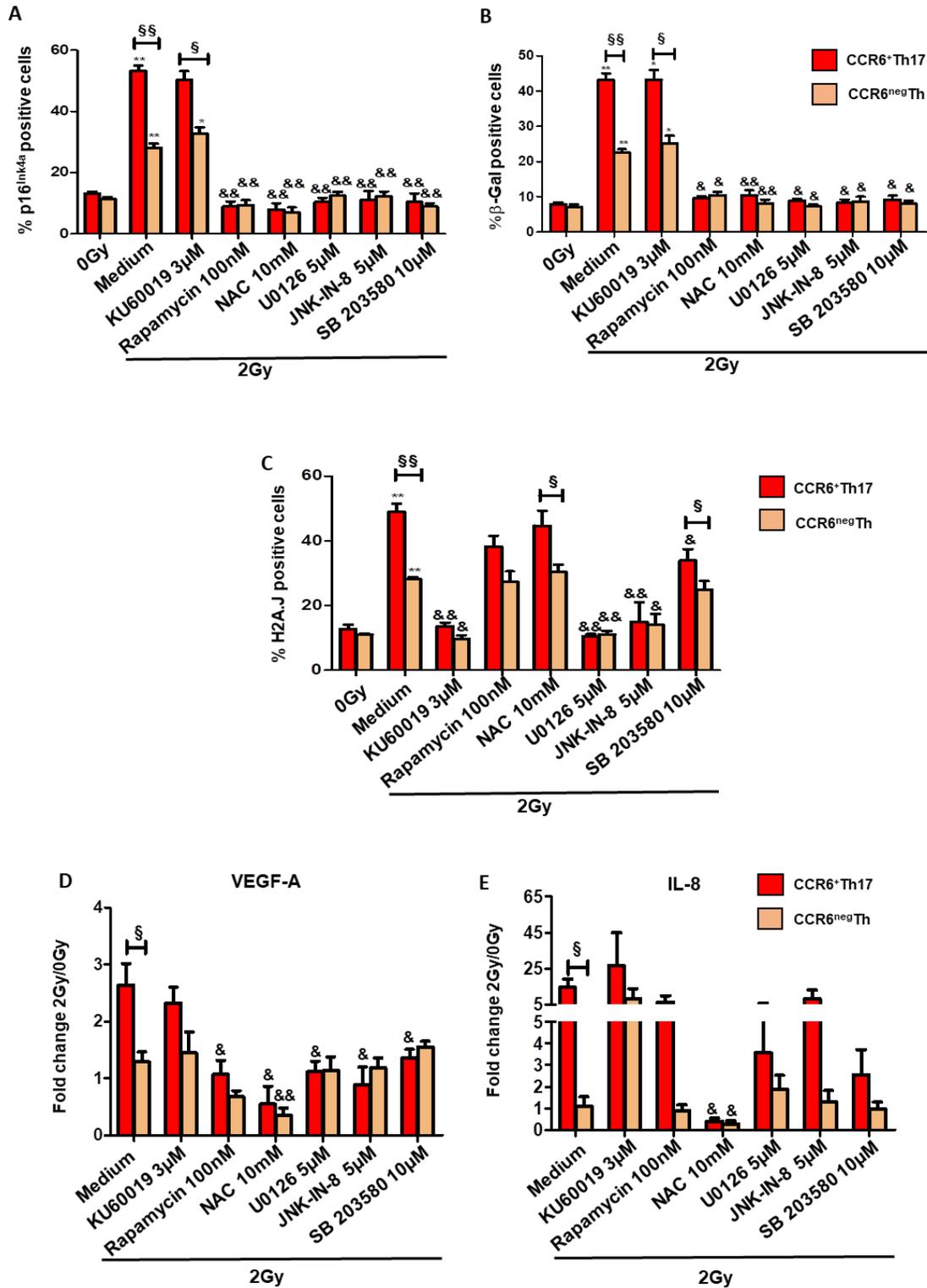


Figure 4: Effect of pharmacological inhibitors pretreatment on irradiated CCR6⁺Th17/CCR6^{neg}Th

Figure 4: Effect of pharmacological inhibitors pretreatment on irradiated CCR6⁺Th17/CCR6^{neg}Th

(A-C) % of p16^{Ink4a}, β-Gal positive cells, and H2A.J were evaluated. 200–600 cells per experiment condition were counted, mean +/- SEM, n=5 for p16^{Ink4a} & H2A.J (A&C), n=3 for β-Gal (B)

(D-E) Comparative cytokine production of CCR6⁺Th17/CCR6^{neg}Th 72 hours after 2 Gy IR. VEGF-A (D) and IL-8 (E) levels are shown as the fold change over the non-irradiated. n=5, mean +/- SEM.

DISCUSSION

IR-induced accelerated senescence in CCR6⁺Th17

Cellular senescence (CS) is an irreversible arrest of proliferation triggered by different damaging stimuli, including IR. Similarly to IR-induced senescence in fibroblasts, epithelial, endothelial and mesenchymal stem cells (28–31), we found that IR of CCR6⁺Th17 cells led to increased expression of SA-β-gal activity, p16^{Ink4a} and p21^{Cdkn1a}. Accordingly, we next demonstrated that CCR6⁺Th17 lymphocytes are more resistant to IR-induced apoptosis compared with CCR6^{neg}Th and Treg among PBMCs, as well as when sorted corresponding cells are compared (**Fig. 1 & 2**). Additionally, the irradiated CCR6⁺Th17 lymphocytes upregulated anti-apoptotic genes (Bcl-2, Bcl-xL LF) that presumably account for this resistance to apoptosis (**Fig. 1D**). These results agree with previous findings that Bcl-2 proteins were increased in senescent fibroblasts (32). In line with this, CD34⁺ hematopoietic stem cells are thought to be more resistant to apoptosis than other hematopoietic cells because of their higher expression of anti-apoptotic proteins (33), and Muranski et al. showed that Th17 lymphocytes were long-lived by retaining stem cell-like characteristics (34). We noted that CCR6^{neg}Treg were more resistant to IR-induced apoptosis compared with CCR6⁺Treg lymphocytes (**Fig. 1C**), although our results showed that Treg are less resistant to IR-induced apoptosis compared to CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes. In contrast, a previous study demonstrated that Treg are more resistant to apoptosis than CD4⁺T lymphocytes in the PBMCs (35), but the authors did not investigate these CCR6⁺Th17, CCR6^{neg}Th, CCR6⁺Treg, CCR6^{neg}Treg T-lymphocyte subsets in their study.

IR-induced senescence of CCR6⁺Th17 cells is associated with expression of H2A.J despite completion of DDR.

We found no significant differences in the decay and residual levels of γH2AX foci post-IR in CCR6⁺Th17 compare to CCR6^{neg}Th and Treg lymphocytes (**Fig. 3A & 3B**). Similarly, 1 Gy IR of quiescent bone marrow cells (30), or 2 Gy IR of quiescent young and old haematopoietic stem

cells did not yield residual γ H2AX foci 24 hours post-IR (30,36). After much higher levels of IR (15 Gy) in the presence of an apoptosis inhibitor, an increase in persistent γ H2AX foci was observed for the IR-induced senescence of quiescent endothelial cells (37).

Senescent cells are metabolically active and exhibit widespread modifications in protein expression and secretion corresponding to the SASP that may damage neighboring healthy tissues (38). In our study, ATM inhibition did not affect p16^{Ink4a} (**Fig. 4A**), SA- β -Gal (**Fig. 4B**), and two SASP factors secretion, VEGF-A and IL-8 (**Fig. 4D & 4E**) after IR of resting (TCR-nonstimulated) CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes. This contrasts with a previous study showing that senescence of TCR-stimulated CD4⁺ Th lymphocytes was induced by Treg lymphocytes in part via DNA damage and ATM activation (39). Therefore, ATM-dependent signaling pathways are not necessary for senescence induction after IR of resting Th lymphocytes. Moreover, ATM inhibition prevented H2A.J expression in irradiated CCR6⁺Th17 cells (**Fig. 4C**). Thus, increased H2A.J levels are not required for the expression of the VEGF-A and IL-8 under these conditions in contrast to a role for accumulated H2A.J in the expression of SASP genes during etoposide-induced senescence of fibroblasts (16). The striking inhibition of H2A.J accumulation by the ATM inhibitor suggests that ATM is activated after IR of CCR6⁺Th17 lymphocytes despite the apparent absence of residual γ H2AX foci 24 hours post-IR (**Fig. 3A & 3B**). ATM can be activated by oxidative stress, but NAC did not inhibit H2A.J expression after IR, and H₂O₂-induced increased H2A.J expression was similar in CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes (**Fig. 3E**). This suggests a specific regulation of H2A.J expression during irradiation of CCR6⁺Th17 lymphocytes, presumably through a transient activation of ATM by DNA DSBs (**Fig. 4C**), independently of ROS.

Inhibition of the MEK-ERK pathway also blocked H2A.J expression. Since the MEK-ERK pathway is known to be activated in an ATM-dependent fashion in response to DNA damage (40–42), we suggest that ATM-MEK-ERK cascade defines a pathway required for H2A.J expression after IR that might be particularly active in CCR6⁺ Th17 compared to other CD4⁺ T lymphocytes. In support of this, previous results showed that the MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway is critical for proper Th17 lymphocyte differentiation and activation (43–45).

Signaling pathways of IR-induced senescence

We found that activation of the p38-MAPK, ERK1/2, JNK and mTOR signaling pathways were required for increased expression of SA- β -Gal, p16^{Ink4a}, and VEGF-A (but not IL-8), independently of ATM activity (**Fig. 4**). Remarkably, inhibition of ROS with N-acetyl-cysteine profoundly inhibited all senescence features including IL-8 expression with the exception of H2A.J accumulation (**Fig. 4**). It thus appears that ROS are crucial for IR-induced senescence of the CCR6⁺Th17 and CCR6^{neg}Th lymphocytes, presumably by activating downstream signaling pathways including MAPKs and mTOR. It is well-documented that IR can trigger ROS formation and ROS-induced senescence via p38-MAPK and ERK1/2 activation leading to p16^{Ink4a} expression (46,47). Inhibition of VEGF-A expression by individual inhibition of ROS,

MAPKs, or mTOR suggests that these represent a single interdependent signaling pathway which might be related to the critical role of MEK-ERK shown in Th17 lymphocytes (43–45). The ROS-MAPKs-mTOR pathway can potentially activate VEGF-A expression via HIF-1 α (48,49). In contrast, IL-8 secretion was blocked only by NAC, so we suggest that ROS activate at least two independent downstream signaling pathways in CCR6⁺Th17 that contribute to IL-8 expression (**Fig. 4E**).

CONCLUSION

To our knowledge, this is the first study to demonstrate high sensitivity of CCR6⁺Th17 cells to IR-induced senescence. We show that IR-induced senescence of CCR6⁺Th17 lymphocytes promotes IL-8 and VEGF-A secretion that may contribute to IR-induced normal tissue damage and even facilitate tumor recurrence and metastasis after radiotherapy. IR-induced senescence in CCR6⁺Th17 lymphocytes was largely independent of ATM activity, but highly dependent on ROS generation and MEKs/ERK/JNK pathways as seen by the strong suppressing action of N-acetyl-cysteine and MEKs inhibitors. Our data are encouraging for further research using CD4⁺ T lymphocytes subtypes as potential intrinsic radiosensitivity hallmarks, and Bcl-2 /Bcl-xl and the MAPKs pathways as target for senolytic drugs to overcome late inflammation after radiotherapy.

Acknowledgements

H.Q.N. was funded by grants from the INCa, AP-HP (C.H.U Henri Mondor), the Ministry of Education and Training (MOET, Vietnam) and the Association for Research and Training in Oncology-Radiotherapy (AREFOR).

C.M. was funded by the ANR-17- 0008-02 and the CEA Radiobiology Program.

The authors wish to thank Adeline Henry, Aurélie Guguin, Odile Ruckebusch from the Flow Cytometry Platform of IMRB, Créteil, Xavier Decrouy from the Microscope Platform of IMRB, Créteil for cell sorting, and their technical help and skill.

REFERENCES

1. 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*. 2005 Oct 15;11(20):7426–33.
2. Azria D, Betz M, Bourgier C, Jeanneret Sozzi W, Ozsahin M. Identifying patients at risk for late radiation-induced toxicity. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Dec;84 Suppl 1:e35-41.
3. 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 Oct 25;2(12):1965–73.
4. COPERNIC project investigators, Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, 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 Mar 1;94(3):450–60.
5. Stockinger B, Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat Rev Immunol*. 2017 Sep;17(9):535–44.
6. Wacleche VS, Landay A, Routy J-P, Ancuta P. The Th17 Lineage: From Barrier Surfaces Homeostasis to Autoimmunity, Cancer, and HIV-1 Pathogenesis. *Viruses*. 2017 19;9(10).
7. Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Dec 15;181(12):8391–401.
8. Ranasinghe R, Eri R. Modulation of the CCR6-CCL20 Axis: A Potential Therapeutic Target in Inflammation and Cancer. *Med Kaunas Lith*. 2018 Nov 16;54(5).
9. Paun A, Kunwar A, Haston CK. Acute adaptive immune response correlates with late radiation-induced pulmonary fibrosis in mice. *Radiat Oncol Lond Engl*. 2015 Feb 20;10:45.
10. Paun A, Bergeron M-E, Haston CK. The Th1/Th17 balance dictates the fibrosis response in murine radiation-induced lung disease. *Sci Rep*. 2017 Sep 14;7(1):11586.
11. Chang H, Wei J, Tao Y, Ding P, Xia Y, Gao Y, et al. CCR6 Is a Predicting Biomarker of Radiosensitivity and Potential Target of Radiosensitization in Rectal Cancer. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc*. 2018 Oct;50(4):1203–13.
12. 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 Off J Am Assoc Cancer Res*. 2019 Jan 15;25(2):562–72.

13. Nguyen HQ, To NH, Zadigue P, Kerbrat S, De La Taille A, Le Gouvello S, et al. Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Sep;129:13–26.
14. Campisi J. Cellular Senescence and Lung Function during Aging. Yin and Yang. *Ann Am Thorac Soc*. 2016 Dec;13(Suppl 5):S402–6.
15. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018 Jun 1;28(6):436–53.
16. Contrepois K, Coudereau C, Benayoun BA, Schuler N, Roux P-F, Bischof O, et al. Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat Commun* [Internet]. 2017 May 10 [cited 2018 Jul 6];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5436145/>
17. Guillot-Delost M, Le Gouvello S, Mesel-Lemoine M, Cheraï M, Baillou C, Simon A, et al. Human CD90 identifies Th17/Tc17 T cell subsets that are depleted in HIV-infected patients. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Feb 1;188(3):981–91.
18. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):995–1001.
19. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 1995 Sep 26;92(20):9363–7.
20. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010 Nov 15;24(22):2463–79.
21. Coppé J-P, Kauser K, Campisi J, Beauséjour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*. 2006 Oct 6;281(40):29568–74.
22. Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009 Aug;11(8):973–9.
23. Werner E, Wang H, Doetsch PW. Opposite Roles for p38MAPK-Driven Responses and Reactive Oxygen Species in the Persistence and Resolution of Radiation-Induced Genomic Instability. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2019 May 22];9(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4182705/>
24. Herranz N, Gallage S, Mellone M, Wuestefeld T, Klotz S, Hanley CJ, et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat Cell Biol*. 2015 Sep;17(9):1205–17.

25. Freund A, Patil CK, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J*. 2011 Apr 20;30(8):1536–48.
26. Zhu K-Q, Zhang S-J. Involvement of ATM/ATR-p38 MAPK cascade in MNNG induced G1-S arrest. *World J Gastroenterol*. 2003 Sep 15;9(9):2073–7.
27. Alexander A, Cai S-L, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, et al. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Mar 2;107(9):4153–8.
28. Alessio N, Del Gaudio S, Capasso S, Di Bernardo G, Cappabianca S, Cipollaro M, et al. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process. *Oncotarget*. 2014 Dec 16;6(10):8155–66.
29. Minieri V, Saviozzi S, Gambarotta G, Lo Iacono M, Accomasso L, Cibrario Rocchietti E, et al. Persistent DNA damage-induced premature senescence alters the functional features of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*. 2015 Apr;19(4):734–43.
30. Pustovalova M, Astrelina TA, Grekhova A, Vorobyeva N, Tsvetkova A, Blokhina T, et al. Residual γ H2AX foci induced by low dose x-ray radiation in bone marrow mesenchymal stem cells do not cause accelerated senescence in the progeny of irradiated cells. *Aging*. 2017 Nov 21;9(11):2397–410.
31. Miyake T, Shimada M, Matsumoto Y, Okino A. DNA damage response after ionizing radiation exposure in skin keratinocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Int J Radiat Oncol • Biol • Phys [Internet]*. 2019 May 11 [cited 2019 May 22];0(0). Available from: [https://www.redjournal.org/article/S0360-3016\(19\)30706-0/abstract](https://www.redjournal.org/article/S0360-3016(19)30706-0/abstract)
32. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun*. 2016 Apr 6;7:11190.
33. Durdik M, Kosik P, Kruzliakova J, Jakl L, Markova E, Belyaev I. Hematopoietic stem/progenitor cells are less prone to undergo apoptosis than lymphocytes despite similar DNA damage response. *Oncotarget*. 2017 Mar 22;8(30):48846–53.
34. Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, et al. Th17 Cells Are Long Lived and Retain a Stem Cell-like Molecular Signature. *Immunity*. 2011 Dec 23;35(6):972–85.
35. Winzler C, Fantinato M, Giordan M, Calore E, Basso G, Messina C. CD4+ T regulatory cells are more resistant to DNA damage compared to CD4+ T effector cells as revealed by flow cytometric analysis. *Cytometry A*. 2011;79A(11):903–11.
36. Flach J, Bakker ST, Mohrin M, Conroy PC, Pietras EM, Reynaud D, et al. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014 Aug 14;512(7513):198–202.

37. Lafargue A, Degorre C, Corre I, Alves-Guerra M-C, Gaugler M-H, Vallette F, et al. Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. *Free Radic Biol Med*. 2017 Jul;108:750–9.
38. Barratt SL, Flower VA, Pauling JD, Millar AB. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and Fibrotic Lung Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Apr 24 [cited 2019 Jul 16];19(5). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5983653/>
39. Liu X, Mo W, Ye J, Li L, Zhang Y, Hsueh EC, et al. Regulatory T cells trigger effector T cell DNA damage and senescence caused by metabolic competition. *Nat Commun*. 2018 Jan 16;9(1):249.
40. Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, et al. ERK Activation Mediates Cell Cycle Arrest and Apoptosis after DNA Damage Independently of p53. *J Biol Chem*. 2002 Apr 12;277(15):12710–7.
41. Golding SE, Rosenberg E, Neill S, Dent P, Povirk LF, Valerie K. Extracellular Signal-Related Kinase Positively Regulates Ataxia Telangiectasia Mutated, Homologous Recombination Repair, and the DNA Damage Response. *Cancer Res*. 2007 Feb 1;67(3):1046–53.
42. Heo J-I, Oh S-J, Kho Y-J, Kim J-H, Kang H-J, Park S-H, et al. ATM mediates interdependent activation of p53 and ERK through formation of a ternary complex with p-p53 and p-ERK in response to DNA damage. *Mol Biol Rep*. 2012 Aug;39(8):8007–14.
43. Tan AH-M, Lam K-P. Pharmacologic Inhibition of MEK–ERK Signaling Enhances Th17 Differentiation. *J Immunol*. 2010 Feb 15;184(4):1849–57.
44. Liu H, Yao S, Dann SM, Qin H, Elson CO, Cong Y. ERK differentially regulates Th17- and Treg-cell development and contributes to the pathogenesis of colitis. *Eur J Immunol*. 2013;43(7):1716–26.
45. Kerbrat S, Vingert B, Junier M-P, Castellano F, Renault-Mihara F, Dos Reis Tavares S, et al. Absence of the Adaptor Protein PEA-15 Is Associated with Altered Pattern of Th Cytokines Production by Activated CD4+ T Lymphocytes In Vitro, and Defective Red Blood Cell Alloimmune Response In Vivo. *PloS One*. 2015;10(8):e0136885.
46. Muller M. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Jan;11(1):59–98.
47. Shao L, Wang Y, Chang J, Luo Y, Meng A, Zhou D. Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury. *Transl Cancer Res*. 2013 Oct;2(5):397.
48. Jing Y, Liu L-Z, Jiang Y, Zhu Y, Guo NL, Barnett J, et al. Cadmium Increases HIF-1 and VEGF Expression through ROS, ERK, and AKT Signaling Pathways and Induces Malignant Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells. *Toxicol Sci*. 2012 Jan;125(1):10–9.

49. Kim D, Dai J, Park Y-H, Fai LY, Wang L, Pratheeshkumar P, et al. Activation of Epidermal Growth Factor Receptor/p38/Hypoxia-inducible Factor-1 α Is Pivotal for Angiogenesis and Tumorigenesis of Malignantly Transformed Cells Induced by Hexavalent Chromium. *J Biol Chem.* 2016 29;291(31):16271–81.

2. Etude par cytométrie en flux de l'association de la proportion des lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺ Th17 parmi les lymphocytes T CD4⁺ périphériques, à la toxicité radio-induite \geq Grade 3 chez les patients après radiothérapie.

Etude comparative de la répartition des sous-populations de lymphocytes Th1/Th2/Th17/Th1-17/Treg au sein des lymphocytes T CD4⁺ CD45RO « mémoire »

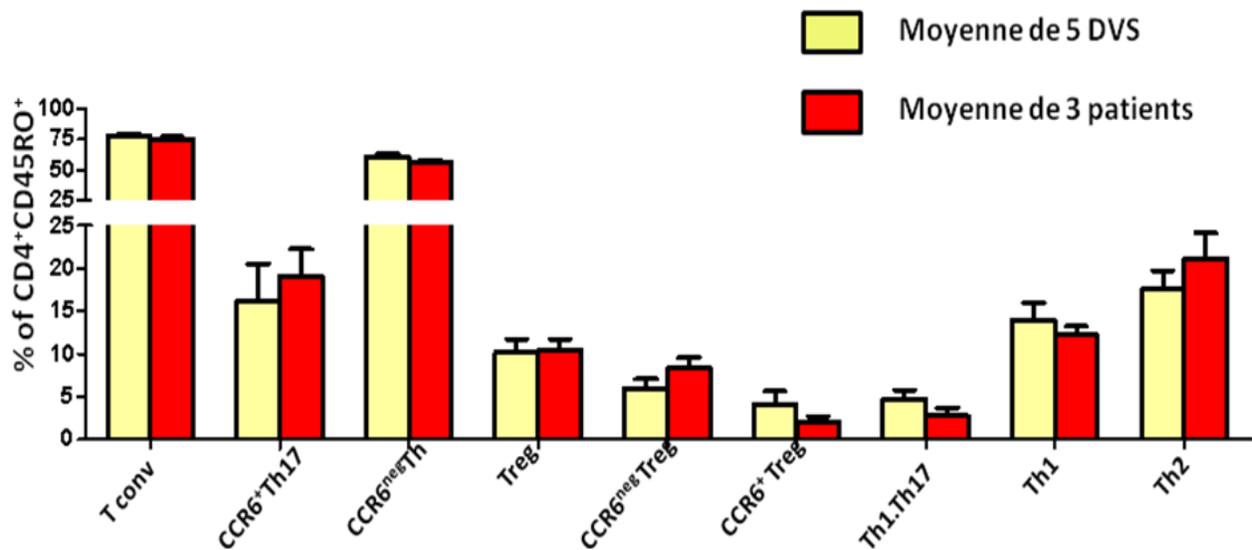


Figure 35 : Etude par cytométrie en flux des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ périphériques chez 3 patients avec fibrose de grade \geq 3 post-RT .

Nos résultats préliminaires montrent une tendance à l'augmentation du pourcentage de lymphocytes T CCR6⁺Th17 au sein des lymphocytes Tconv « mémoire » dans le groupe des trois patients ayant développé une fibrose de grade \geq 3 post-RT par rapport au groupe de cinq donneurs sains, alors que la proportion de la sous-population de lymphocytes T CCR6^{neg} est similaire entre les deux groupes; cependant au sein de la sous-population de lymphocytes T CCR6^{neg} la proportion de la sous-population de lymphocytes Th2 montrent une tendance à l'augmentation dans le groupe des trois patients ayant développé une fibrose de grade \geq 3 post-RT par rapport au groupe de cinq donneurs sains, alors que la proportion des sous-populations Th1 et Th17-Th1 est plutôt diminuée. De plus, au sein des lymphocytes Treg, la répartition des Treg CCR6⁺ et CCR6^{neg} semble être inversée dans le groupe des 3 patients comparé au groupe de donneurs sains, le pourcentage de lymphocytes Treg CCR6⁺ (très immunosuppresseurs) montrant une tendance à être diminué dans le groupe des trois patients par rapport aux donneurs sains.

Nos résultats préliminaires montrent également, qu’au sein des lymphocytes Th17 CCR6⁺, la proportion de lymphocytes Th17 CCR6⁺CD161⁺, plus inflammatoires, semble plus importante que celle des lymphocytes Th17 CCR6⁺CD161^{neg} dans le groupe des trois patients ayant développé une fibrose de grade ≥ 3 post-RT par rapport au groupe de donneurs sains (Figure 36). En revanche, l’expression de CD90 ne semble pas discriminante.

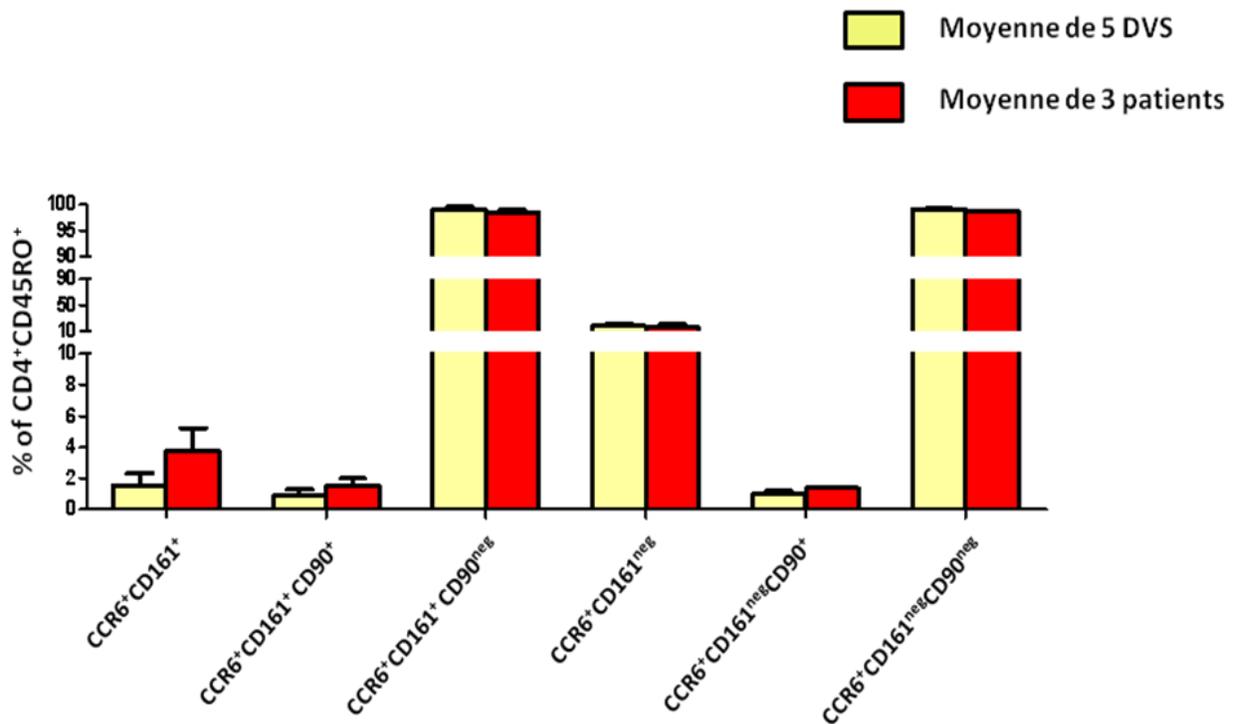


Figure 36 : Etude par cytométrie en flux des sous-populations de lymphocytes T CCR6⁺Th17 périphériques en fonction de l’expression de CD161 et CD90

Enfin, nos résultats préliminaires montrent une tendance à l'augmentation du ratio de $CCR6^{+}Th17/CCR6^{+}Treg$ dans le groupe de trois patients ayant développé une fibrose de grade ≥ 3 post-RT par rapport au groupe de cinq donneurs sains, ce qui suggère que la proportion des lymphocytes Treg très immunosuppresseurs, les lymphocytes Treg $CCR6^{+}$, est diminuée chez les patients qui développent une fibrose sévère post-RT (Figure 37).

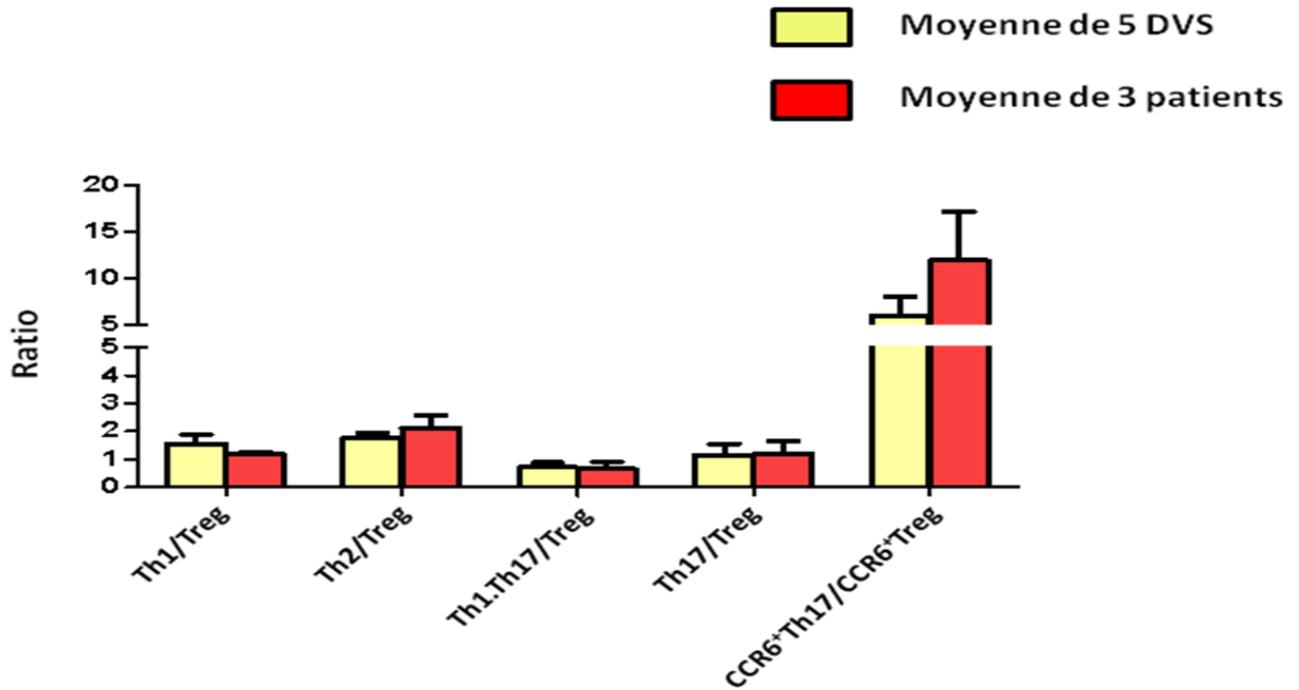


Figure 37 : Ratios Th17 / Treg en fonction de l'expression du récepteur CCR6

Partie 5 : Discussion

Les données de la littérature que nous avons rapportées dans la revue figurant à la partie 1 montrent que la sénescence accélérée radio-induite pourrait provoquer la fibrose via l'induction d'un sécrétome pro-inflammatoire et pro-fibrogénique provenant des cellules irradiées (Nguyen et al., 2018). Par ailleurs, une accumulation pulmonaire de lymphocytes T CD4⁺ inflammatoires, les Th17, corrèle positivement avec la fibrose pulmonaire chez les souris après irradiation totale (Paun et al., 2015, 2017). L'existence d'une sensibilité à la sénescence radio-induite particulièrement élevée pour les lymphocytes Th17 pourrait contribuer à expliquer l'association de leur augmentation à la toxicité radio-induite tardive à type de fibrose.

Dans la première partie de mon travail, j'ai pu montrer que la sous-population de lymphocytes Th17 exprimant le récepteur de chimiokine CCR6⁺ était effectivement plus sensible à la sénescence radio-induite, et donc plus résistante à l'apoptose radio-induite, que la sous-population des lymphocytes Th CCR6^{neg}. J'ai également identifié des voies de signalisation activées par les RI, en particulier la voie des MAPKs, dans les lymphocytes Th17 CCR6⁺, qui représentent des cibles potentielles pour des stratégies de prévention de la sénescence radio-induite de ces cellules. De plus, des résultats préliminaires portant sur 3 patients présentant une fibrose de grade ≥ 3 post-RT comparés à des donneurs sains, montrent le potentiel prédictif d'un ratio élevé des lymphocytes Th17 CCR6⁺ / Treg CCR6⁺ périphériques de radiosensibilité individuelle.

1. Sensibilité des lymphocytes T CD4⁺CCR6⁺Th17 à la sénescence radio-induite

Nous avons montré pour la première fois, que les lymphocytes CCR6⁺Th17 sont plus sensibles à la sénescence radio-induite par rapport aux lymphocytes CCR6^{neg}Th et aux lymphocytes Treg, sur la base de la surexpression du variant d'histone H2A.J, l'augmentation de l'activité de SA- β -Gal, la surexpression de p16^{Ink4a} et de p21, et la production d'IL-8 et de VEGF-A. Ces résultats sont en accord avec ceux récapitulés dans notre revue de la littérature présentée à la partie 1 et décrivant que les RI peuvent induire la sénescence dans différents types cellulaires, tels que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules immunitaires, les cellules souches du stroma hématologique, les cellules qui dérivent de l'ectoderme et du mésoderme. Dans notre étude, nous avons utilisé la dose des RI à 2 Gy pour l'analyse des différents marqueurs de sénescence. En effet, le test de survie cellulaire pour prédire la radiosensibilité a été évalué par la fraction de survivant à une dose de 2 Gy (SF2) (Geara et al., 1992; Pouliliou et al., 2015), et il est décrit que l'effet de dose-réponse peut impacter l'expressions des gènes (Ghandhi et al., 2015). Compte-tenu du caractère résistant à l'apoptose des cellules sénescents, nos résultats sont cohérents avec les résultats de différentes équipes corrélant un faible taux d'apoptose des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ avec un fort risque de toxicité radio-induite tardive (Ozsahin et al., 2005) dans différents cancers, ces études ayant permis de développer l'un des tests prédictifs de

radiosensibilité les plus fiables sur la base de l'apoptose radio-induite lymphocytaire ou test RILA (Radio-induced lymphocyte apoptosis) (Azria et al., 2015).

Dans notre revue nous avons également résumé les liens établis entre la sénescence des fibroblastes et les processus fibrotiques. Les fibroblastes jouent un rôle central dans la fibrogenèse via le mécanisme de la transition fibroblaste-myofibroblaste en réponse au stress oxydatif (qui peut être généré par les RI, les UV, la chimiothérapie, le tabagisme) (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014). Par ailleurs, Fang et coll. ont montré que les fibroblastes attirent les lymphocytes Th17 et maintiennent leur phénotype, ce qui peut contribuer à l'exacerbation de l'état inflammatoire (Fang et al., 2018). De plus, il a été montré que l'IL-8 pérennisait la sénescence des fibroblastes (Acosta et al., 2008) ; les lymphocytes Th17 CCR6⁺ sénescents, via la sécrétion d'IL-8, pourraient contribuer au maintien du phénotype sénescents pro-fibrogénique des fibroblastes, après leur migration vers les tissus inflammatoires sécrétant du CCL20 (Acosta et al., 2008). Par ailleurs, le caractère pro-fibrogénique du VEGF-A a déjà été rapporté dans différents modèles de fibrose pulmonaire et maladies rhumatologiques auto-immunes (Barratt et al., 2018).

Nous avons pu établir que le ciblage pharmacologique de la cascade des voies de signalisation des ERO/MAPKines et/ou de mTOR prévenait la sénescence radio-induite et la sécrétion du VEGF-A, de l'IL-8 par les lymphocytes CCR6⁺Th17, donc était une stratégie anti-fibrosante potentielle. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature qui rapportent que la voie ERK1/2 est impliquée dans le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Suzuki et al., 2003), et que les inhibiteurs des MAPKs, notamment d'ERK1/2, sont testés dans différentes pathologies fibrosantes, comme la BPCO (Mercer and D'Armiento, 2006), la fibrose pulmonaire (Madala et al., 2012), la fibrose cardiaque (Luo et al., 2017), la fibrose hépatique (Lao et al., 2018), et fibrose rénale (Andrikopoulos et al., 2019).

2. Le ratio des lymphocytes CD4⁺CCR6⁺Th17 / CD4⁺CCR6⁺Treg pourrait être utilisé comme marqueur de la radiosensibilité intrinsèque individuelle.

Le déséquilibre entre les réponses pro-inflammatoire et anti-inflammatoire induites par les différentes sous-populations de lymphocytes Th17 et Th2 d'une part et les lymphocytes Treg d'autre part pourrait jouer un rôle central dans la progression de la toxicité radio-induite. Les Th17 sont capables d'induire à une réponse pro-inflammatoire médiée par l'IL-17 et l'expression de divers médiateurs de l'inflammation, alors que les Th2 produisent l'IL-13, qui conduit à une activation par la voie alternative des macrophages résidents dans les tissus en macrophages pro-fibrotiques, favorisant la fibrose (Wynn and Ramalingam, 2012). En revanche, les lymphocytes Treg sont responsables de la réponse anti-inflammatoire.

L'analyse de nos résultats préliminaires semble montrer qu'une distribution particulière des lymphocytes T CD4⁺ mémoire est associée à l'existence chez les patients d'une toxicité radio-

induite. Les proportions de lymphocytes CCR6⁺Th17 et Th2 plus élevées chez les trois patients ayant développés une fibrose de grade ≥ 3 post-RT renforce l'hypothèse d'un rôle potentiel des lymphocytes CCR6⁺Th17 sénescents dans la fibrose après une irradiation, via le caractère pro-fibrogénique de l'IL-8 et du VEGF-A sécrétés. Nos résultats sont en accord avec les résultats rapportant l'augmentation de lymphocytes Th17 trouvée dans le lavage broncho-alvéolaire chez les souris ayant développé une fibrose pulmonaire radio-induite (Paun et al., 2015, 2017). De même, différentes études ont rapporté que le taux élevé des lymphocytes Th17 circulants est associé à un mauvais pronostic de la fibrose kystique pulmonaire (Mulcahy et al., 2015). De même, les résultats de Lei et coll. indiquent que les lymphocytes Th17 participent à la pathogenèse de la fibrose cutanée et pulmonaire en augmentant la prolifération des fibroblastes et la production des cytokines pro-inflammatoires (Lei et al., 2016). L'augmentation des lymphocytes Th17 circulants a été aussi corrélée à la fibrose pulmonaire chez les souris atteintes des lésions rénales aiguës (Mehrotra et al., 2018) En outre, la surexpression de l'IL-17 et l'accumulation de lymphocytes Th17 ont été détectées dans le foie chez les patients atteints de fibrose hépatique. L'augmentation des Th2 circulants a été corrélée à la fibrose pulmonaire idiopathique (Adegunsoye et al., 2016; Mora et al., 2005; Wu et al., 2018). De plus, nous avons observé que la proportion des Th1 serait à tendance diminuée chez les trois patients ayant développé une fibrose de grade ≥ 3 post-RT par rapport aux cinq donneurs sains. Ce résultat est compatible avec ceux rapportés par Paun et coll. qui ont montré que la déficience des lymphocytes Th1 est corrélée avec la fibrose pulmonaire radio-induite dans un modèle murin (Paun et al., 2017). De plus, l'infiltration des lymphocytes Th1 entraînant l'inhibition de la fibrose induite par la bléomycine dans la modèle *in vivo* (Yoshizaki et al., 2010). L'ensemble de ces données suggèrent que les lymphocytes CD4⁺CCR6⁺Th17 constituent un biomarqueur prédictif prometteur de la fibrose radio-induite et une cible potentielle pour le développement thérapeutique anti-fibrotiques.

Enfin, suite à l'observation d'une tendance à l'augmentation des lymphocytes CCR6⁺Th17 chez les trois patients analysés, nous avons évalué les ratios des différentes sous-populations lymphocytaires CD4⁺ pro-inflammatoires et des sous-populations lymphocytaires CD4⁺ anti-inflammatoires pour affiner cette différence entre les patients et les individus sains. Il est intéressant de noter que le ratio des lymphocytes CCR6⁺Th17 / CCR6⁺Treg a tendance à être plus élevé chez les patients par rapport aux donneurs sains. Ce résultat est cohérent avec les résultats présentés dans notre article soumis, qui montrent que les lymphocytes CCR6⁺Treg sont plus sensibles à l'apoptose radio-induite par rapport aux CCR6^{neg}Treg. Cela pourrait indiquer que les capacités de régulation de l'inflammation chez les patients pourraient être déficientes du fait des CCR6⁺Treg diminuées à cause de leur plus grande sensibilité à l'apoptose radio-induite. En effet, les résultats de Lee et coll. indiquent que le CCR6 pourrait servir comme un marqueur pour identifier les cellules Treg mémoires effectrices qui présentent une activité suppressive supérieure à celle des cellules CCR6^{neg}Treg (Lee et al., 2017).

Partie 6 : Conclusions et perspectives

Notre étude a montré que les RI induisent la sénescence des lymphocytes CCR6⁺Th17 qui présentent un phénotype pro-inflammatoire via la sécrétion d'IL-8 et de VEGF-A. Ces lymphocytes CCR6⁺Th17 sénescents pourraient être délétères lors de leur migration dans les tissus inflammatoires proches de la zone irradiée.

Du point de vue de la recherche translationnelle, notre étude a un certain nombre de limites. Les nombres de patients ayant présenté une fibrose de grade ≥ 3 après une radiothérapie adjuvante (n = 3) et de donneurs volontaires sains (n = 5) étudiés sont très faibles. Une étude avec davantage de patients ainsi qu'un groupe-contrôle de patients sans fibrose radio-induite est indispensable pour confirmer l'intérêt du ratio LT CD4⁺CCR6⁺Th17 / CCR6⁺Treg chez les patients. En cas de confirmation de nos résultats préliminaires, des études longitudinales prospectives devront être envisagées.

Chez les patients présentant une fibrose radio-induite sévère, il pourrait être intéressant de regarder par immunohistochimie si le co-marquage CCR6⁺/IL-8 et/ou VEGF-A et/ou H2A.J est plus important dans les lésions de fibrose que dans des tissus avoisinants non fibreux.

Le rôle potentiel des lymphocytes CCR6⁺Th17 irradiés dans la fibrose pourrait être évalué par un modèle de co-culture de lymphocytes CCR6⁺Th17 irradiés et de fibroblastes, ou de culture des fibroblastes avec du surnageant de lymphocytes CCR6⁺Th17 irradiés, en présence ou non d'anticorps bloquants les récepteurs pour l'IL-8, et/ou le VEGF-A, afin d'évaluer *in vitro* l'effet du sécrétome radio-induit sur l'activité fibrogénique des fibroblastes.

Nos résultats ont montré que seul l'inhibiteur de la voie MEK1/2-ERK1/2 inhibe à la fois l'expression de H2A.J et la sécrétion d'IL-8 et VEGF-A après les RI. La modulation des voies ERK-MAPK pourrait être une cible potentielle pour la prévention de la fibrose radio-induite, comme ça a déjà été montré dans différents modèles de fibrose. Nous vérifierons le rôle de la voie de signalisation ERK1/2 dans l'expression de p16^{Ink4a} et la sécrétion de VEGF-A dans les lymphocytes CCR6⁺Th17 en utilisant des petits ARN interférents contre ERK1/2. Comme le VEGF est spécifiquement induit par l'exposition aux RI dans les lymphocytes CCR6⁺Th17, nous testerons l'implication de la voie NRF2/VEGF-A et de la voie HIF-1 α /VEGF-A en analysant par qRT-PCR l'expression des cibles de NRF2 et HIF-1 α dans la sénescence radio-induite des lymphocytes CCR6⁺Th17 en analysant par qRT-PCR l'expression des cibles de NRF2 et HIF-1 α .

En attendant un avenir plus prometteur pour des patients atteints de cancers et présentant des toxicités radio-induites, des études précliniques et des essais cliniques seront indispensables pour contribuer à la découverte d'un marqueur d'une radiosensibilité individuelle ainsi que les agents thérapeutiques pour les patients.

REFERENCES

- Acosta, J.C., O’Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Costa, M.D., Brown, C., Popov, N., et al. (2008). Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* *133*, 1006–1018.
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., and Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* *37*, 163–176.
- Adegunsoye, A., Hrusch, C.L., Bonham, C.A., Jaffery, M.R., Blaine, K.M., Sullivan, M., Churpek, M.M., Strek, M.E., Noth, I., and Sperling, A.I. (2016). Skewed Lung CCR4 to CCR6 CD4+ T Cell Ratio in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Is Associated with Pulmonary Function. *Front. Immunol.* *7*, 516.
- Akbar, A.N., Henson, S.M., and Lanna, A. (2016). Senescence of T Lymphocytes: Implications for Enhancing Human Immunity. *Trends Immunol.* *37*, 866–876.
- Alessio, N., Del Gaudio, S., Capasso, S., Di Bernardo, G., Cappabianca, S., Cipollaro, M., Peluso, G., and Galderisi, U. (2014). Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process. *Oncotarget* *6*, 8155–8166.
- Amorati, R., Baschieri, A., Morroni, G., Gambino, R., and Valgimigli, L. (2016). Peroxyl Radical Reactions in Water Solution: A Gym for Proton-Coupled Electron-Transfer Theories. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* *22*, 7924–7934.
- de Andrade, C.B.V., Ramos, I.P.R., de Moraes, A.C.N., do Nascimento, A.L.R., Salata, C., Goldenberg, R.C. dos S., de Carvalho, J.J., and de Almeida, C.E.V. (2017). Radiotherapy-Induced Skin Reactions Induce Fibrosis Mediated by TGF- β 1 Cytokine. *Dose-Response* *15*.
- Andreassen, C.N., Rosenstein, B.S., Kerns, S.L., Ostrer, H., De Ruyscher, D., Cesaretti, J.A., Barnett, G.C., Dunning, A.M., Dorling, L., West, C.M.L., et al. (2016). 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.* *121*, 431–439.
- Andrikopoulos, P., Kieswich, J., Pacheco, S., Nadarajah, L., Harwood, S.M., O’Riordan, C.E., Thiemermann, C., and Yaqoob, M.M. (2019). The MEK Inhibitor Trametinib Ameliorates Kidney Fibrosis by Suppressing ERK1/2 and mTORC1 Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* *30*, 33–49.
- Annunziato, F., and Romagnani, S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res. Ther.* *11*, 257.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2012). Defining the human T helper 17 cell phenotype. *Trends Immunol.* *33*, 505–512.

- Azria, D., Belkacemi, Y., Lagrange, J.-L., Chapet, O., Mornex, F., Maingon, P., Hennequin, C., Rosenstein, B., and Ozsahin, M. (2008). Séquelles radio-induites et tests prédictifs. *Cancer/Radiothérapie* 12, 619–624.
- Azria, D., Belkacemi, Y., Romieu, G., Gourgou, S., Gutowski, M., Zaman, K., Moscardo, C.L., Lemanski, C., Coelho, M., Rosenstein, B., et al. (2010). 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.* 11, 258–265.
- 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.
- Azria, D., Lapiere, A., Gourgou, S., De Ruyscher, D., Colinge, J., Lambin, P., Brengues, M., Ward, T., Bentzen, S.M., Thierens, H., et al. (2017). Data-Based Radiation Oncology: Design of Clinical Trials in the Toxicity Biomarkers Era. *Front. Oncol.* 7, 83.
- Azria, D., Brengues, M., Gourgou, S., and Bourcier, C. (2018). Personalizing Breast Cancer Irradiation Using Biology: From Bench to the Accelerator. *Front. Oncol.* 8.
- Azria, D., Crehange, G., Castan, F., Schwartz, E., Belkacemi, Y., Lagrange, J., NGuyen, T., Chapet, O., Mornex, F., Noel, G., et al. (2019). OC-0498 Results of the prospective trial evaluating radiation-induced lymphocyte apoptosis and prostate RT. *Radiother. Oncol.* 133, S256.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay, N.E.H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W.H., et al. (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 465–472.
- Baijier, J., Déchamps, N., Perdry, H., Morales, P., Kerns, S., Vasilescu, A., Baulande, S., Azria, D., Roméo, P.H., and Schmitz, A. (2016). TNFSF10/TRAIL regulates human T4 effector memory lymphocyte radiosensitivity and predicts radiation-induced acute and subacute dermatitis. *Oncotarget* 7, 21416–21427.
- Bargues, L., Donat, N., Jault, P., and Leclerc, T. (2010). Soins Aux Brûles Apres Un Accident Nucleaire. *Ann. Burns Fire Disasters* 23, 160–164.
- Barnett, G.C., Elliott, R.M., Alsner, J., Andreassen, C.N., Abdelhay, O., Burnet, N.G., Chang-Claude, J., Coles, C.E., Gutiérrez-Enríquez, S., Fuentes-Raspall, M.J., et al. (2012). Individual patient data meta-analysis shows no association between the SNP rs1800469 in TGFB and late radiotherapy toxicity. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 105, 289–295.
- Barratt, S.L., Flower, V.A., Pauling, J.D., and Millar, A.B. (2018). VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and Fibrotic Lung Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19.

- Beach, T.A., Johnston, C.J., Groves, A.M., Williams, J.P., and Finkelstein, J.N. (2017). Radiation induced pulmonary fibrosis as a model of progressive fibrosis: Contributions of DNA damage, inflammatory response and cellular senescence genes. *Exp. Lung Res.* *43*, 134–149.
- Belkacemi, Y., Colson-Durand, L., Fayolle-Campana, M., Pons, P., Rialland, A., Bastuji-Garin, S., Hoang, Q.N., Lerouge, D., Jaffré, F., Bollet, M., et al. (2018). A Wake-Up Call for Routine Morbidity and Mortality Review Meeting Procedures as Part of a Quality Governance Programs in Radiation Therapy Departments: Results of the PROUST Survey. *Pract. Radiat. Oncol.*
- Blirando, K., Milliat, F., Martelly, I., Sabourin, J.-C., Benderitter, M., and François, A. (2011). Mast Cells Are an Essential Component of Human Radiation Proctitis and Contribute to Experimental Colorectal Damage in Mice. *Am. J. Pathol.* *178*, 640–651.
- Bodgi, L., and Foray, N. (2016). The nucleo-shuttling of the ATM protein as a basis for a novel theory of radiation response: resolution of the linear-quadratic model*. *Int. J. Radiat. Biol.* *92*, 117–131.
- Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D’Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., et al. (1998). Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* *187*, 129–134.
- Bordón, E., Henríquez-Hernández, L.A., Lara, P.C., Ruíz, A., Pinar, B., Rodríguez-Gallego, C., and Lloret, M. (2010). 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.* *5*, 4.
- Borodkina, A.V., Deryabin, P.I., Giukova, A.A., and Nikolsky, N.N. (2018). “Social Life” of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It? *Acta Naturae* *10*, 4–14.
- Bourton, E.C., Plowman, P.N., Smith, D., Arlett, C.F., and Parris, C.N. (2011). Prolonged expression of the γ -H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *129*, 2928–2934.
- Brenn, T., and Fletcher, C.D.M. (2006). Postradiation vascular proliferations: an increasing problem. *Histopathology* *48*, 106–114.
- Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C., and Cohen, G.M. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.* *274*, 22686–22692.
- Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., and Alimonti, A. (2019). Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol. Rev.* *99*, 1047–1078.
- Campisi, J. (2016). Cellular Senescence and Lung Function during Aging. Yin and Yang. *Ann. Am. Thorac. Soc.* *13*, S402–S406.

- Cao, M., Cabrera, R., Xu, Y., Liu, C., and Nelson, D. (2011). Different radiosensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells and effector T cells to low dose gamma irradiation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* *87*, 71–80.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Roncador, G., Villamor, N., Colomo, L., Martinez, A., Hamoudi, R., Howat, W.J., Montserrat, E., and Campo, E. (2009). High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 1470–1476.
- Chen, C., Yang, S., Zhang, M., Zhang, Z., Hong, J., Han, D., Ma, J., Zhang, S.B., Okunieff, P., and Zhang, L. (2016). Triptolide mitigates radiation-induced pulmonary fibrosis via inhibition of axis of alveolar macrophages-NOXes-ROS-myofibroblasts. *Cancer Biol. Ther.* *17*, 381–389.
- Chen, E.S., Greenlee, B.M., Wills-Karp, M., and Moller, D.R. (2001). Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon-gamma-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *24*, 545–555.
- Chen, Y.R., Meyer, C.F., and Tan, T.H. (1996). Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *271*, 631–634.
- Citrin, D.E., Prasanna, P.G.S., Walker, A.J., Freeman, M.L., Eke, I., Barcellos-Hoff, M.H., Arankalayil, M.J., Cohen, E.P., Wilkins, R.C., Ahmed, M.M., et al. (2017). Radiation-Induced Fibrosis: Mechanisms and Opportunities to Mitigate. Report of an NCI Workshop, September 19, 2016. *Radiat. Res.* *188*, 1–20.
- Contrepolis, K., Coudereau, C., Benayoun, B.A., Schuler, N., Roux, P.-F., Bischof, O., Courbeyrette, R., Carvalho, C., Thuret, J.-Y., Ma, Z., et al. (2017). Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat. Commun.* *8*.
- COPERNIC project investigators, Granzotto, A., Benadjaoud, M.A., Vogin, G., Devic, C., Ferlazzo, M.L., Bodgi, L., Pereira, S., Sonzogni, L., Forcheron, F., et al. (2016). 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.* *94*, 450–460.
- Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C.M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* *281*, 29568–29574.
- Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angeli, R., et al. (2008). Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J. Exp. Med.* *205*, 1903–1916.
- Cosmi, L., Cimaz, R., Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Borriello, F., Frosali, F., Querci, V., Simonini, G., Barra, G., et al. (2011). Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype

of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* *63*, 2504–2515.

Crompton, N.E.A. (1997). Telomeres, senescence and cellular radiation response. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *53*, 568–575.

Crompton, N.E.A., Ozsahin, M., Schweizer, P., Larsson, B., and Luetolf, U.M. (1997). Theory and practice of predictive assays in radiation therapy. *Strahlenther. Onkol.* *173*, 58–67.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., et al. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* *421*, 744–748.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* *10*, 942–949.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* *4*, 1798–1806.

Degterev, A., and Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 378–390.

DeKruyff, R.H., Fang, Y., and Umetsu, D.T. (1995). IL-4-based helper activity of CD4+ T cells is radiation sensitive. *Cell. Immunol.* *160*, 248–256.

Deloch, L., Derer, A., Hartmann, J., Frey, B., Fietkau, R., and Gaipl, U.S. (2016). Modern Radiotherapy Concepts and the Impact of Radiation on Immune Activation. *Front. Oncol.* *6*, 141.

Demaria, M., O’Leary, M.N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A.M., et al. (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov.* *7*, 165–176.

Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T.M., Fullen, D.R., Pointer, J.N., Gruber, S.B., Su, L.D., Nikiforov, M.A., et al. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1053–1063.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 9363–9367.

Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D.J., Kehlback, R., and Rodemann, H.P. (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *280*, 31182–31189.

- Dogu, Y., and Díaz, J. (2009). Mathematical model of a network of interaction between p53 and Bcl-2 during genotoxic-induced apoptosis. *Biophys. Chem.* *143*, 44–54.
- Dunham, R.M., Cervasi, B., Brenchley, J.M., Albrecht, H., Weintrob, A., Sumpter, B., Engram, J., Gordon, S., Klatt, N.R., Frank, I., et al. (2008). CD127 and CD25 Expression Defines CD4+ T Cell Subsets That Are Differentially Depleted during HIV Infection. *J. Immunol.* *180*, 5582–5592.
- Fang, S., Huang, Y., Liu, X., Zhong, S., Wang, N., Zhao, B., Li, Y., Sun, J., Wang, Y., Zhang, S., et al. (2018). Interaction Between CCR6+ Th17 Cells and CD34+ Fibrocytes Promotes Inflammation: Implications in Graves' Orbitopathy in Chinese Population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *59*, 2604–2614.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* *1757*, 1371–1387.
- Foray, N., Bourguignon, M., and Hamada, N. (2016). Individual response to ionizing radiation. *Mutat. Res.* *770*, 369–386.
- Freund, A., Patil, C.K., and Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* *30*, 1536–1548.
- Frey, D.M., Drosier, R.A., Viehl, C.T., Zlobec, I., Lugli, A., Zingg, U., Oertli, D., Kettelhack, C., Terracciano, L., and Tornillo, L. (2010). High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* *126*, 2635–2643.
- Fu, J., Xu, D., Liu, Z., Shi, M., Zhao, P., Fu, B., Zhang, Z., Yang, H., Zhang, H., Zhou, C., et al. (2007). Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology* *132*, 2328–2339.
- Furlong, S., Coombs, M.R.P., Ghassemi-Rad, J., and Hoskin, D.W. (2018). Thy-1 (CD90) Signaling Preferentially Promotes ROR γ t Expression and a Th17 Response. *Front. Cell Dev. Biol.* *6*.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* *14*, 1237–1243.
- Geara, F.B., Peters, L.J., Ang, K.K., Wike, J.L., Sivon, S.S., Guttenberger, R., Callender, D.L., Malaise, E.P., and Brock, W.A. (1992). Intrinsic radiosensitivity of normal human fibroblasts and lymphocytes after high- and low-dose-rate irradiation. *Cancer Res.* *52*, 6348–6352.
- Ghandhi, S.A., Smilenov, L.B., Elliston, C.D., Chowdhury, M., and Amundson, S.A. (2015). Radiation dose-rate effects on gene expression for human biodosimetry. *BMC Med. Genomics* *8*.

- Ghaye, B., Wanet, M., and Hajjam, M.E. (2016). Imagerie après radiothérapie de tumeurs thoraciques. /data/revues/22115706/v97i4/S221157061630039X/.
- Ginot, A., Doyen, J., Hannoun-Lévi, J.-M., and Courdi, A. (2010). [Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: skin]. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* *14*, 379–385.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 37–43.
- Golubovskaya, V., and Wu, L. (2016). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* *8*.
- Gridley, D.S., Pecaut, M.J., Rizvi, A., Coutrakon, G.B., Luo-Owen, X., Makinde, A.Y., and Slater, J.M. (2009). Low-dose, low-dose-rate proton radiation modulates CD4(+) T cell gene expression. *Int. J. Radiat. Biol.* *85*, 250–261.
- Groom, J.R., and Luster, A.D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Exp. Cell Res.* *317*, 620–631.
- Grossberg, A.J., Lei, X., Xu, T., Shaitelman, S.F., Hoffman, K.E., Bloom, E.S., Stauder, M.C., Tereffe, W., Schlembach, P.J., Woodward, W.A., et al. (2018). Association of Transforming Growth Factor β Polymorphism C-509T With Radiation-Induced Fibrosis Among Patients With Early-Stage Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.*
- Gu, C., Wu, L., and Li, X. (2013). IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* *64*.
- Guéry, L., and Hugues, S. (2015). Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Res. Int.* *2015*.
- Guillot-Delost, M., Le Gouvello, S., Mesel-Lemoine, M., Cheraï, M., Baillou, C., Simon, A., Levy, Y., Weiss, L., Louafi, S., Chaput, N., et al. (2012). Human CD90 identifies Th17/Tc17 T cell subsets that are depleted in HIV-infected patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 981–991.
- Hamdi, D.H., Chevalier, F., Groetz, J.-E., Durantel, F., Thuret, J.-Y., Mann, C., and Saintigny, Y. (2016). Comparable Senescence Induction in Three-dimensional Human Cartilage Model by Exposure to Therapeutic Doses of X-rays or C-ions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *95*, 139–146.
- He, Y., Thummuri, D., Zheng, G., Okunieff, P., Citrin, D.E., Vujaskovic, Z., and Zhou, D. (2019). Cellular senescence and radiation-induced pulmonary fibrosis. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *209*, 14–21.
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., and Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* *28*, 436–453.
- Herranz, N., Gallage, S., Mellone, M., Wuestefeld, T., Klotz, S., Hanley, C.J., Raguz, S., Acosta, J.C., Innes, A.J., Banito, A., et al. (2015). mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1205–1217.

- Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., and Hirohashi, S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 5423–5434.
- Hirose, Y., Katayama, M., Mirzoeva, O.K., Berger, M.S., and Pieper, R.O. (2005). Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. *Cancer Res.* *65*, 4861–4869.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* *299*, 1057–1061.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2017). Pillars Article: Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science* *2003*. *299*: 1057-1061. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *198*, 981–985.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O’Garra, A., and Murphy, K.M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* *260*, 547–549.
- Huang, Y., Zhang, W., Yu, F., and Gao, F. (2017). The Cellular and Molecular Mechanism of Radiation-Induced Lung Injury. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* *23*, 3446–3450.
- Huax, F., Liu, T., McGarry, B., Ullenbruch, M., Xing, Z., and Phan, S.H. (2003). Eosinophils and T lymphocytes possess distinct roles in bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 5470–5481.
- Huet, E. , Jaroz, C. , Nguyen, H. Q., Belkacemi, Y. , de la Taille, A. , Stavrinides, V. and Whitaker, H. (2019), Stroma in normal and cancer wound healing. *FEBS J*, *286*: 2909-2920. doi:10.1111/febs.14842
- Ibuki, Y., and Toyooka, T. (2015). Evaluation of chemical phototoxicity, focusing on phosphorylated histone H2AX. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *56*, 220–228.
- Iglesias-Bartolome, R., Patel, V., Cotrim, A., Leelahavanichkul, K., Molinolo, A.A., Mitchell, J.B., and Gutkind, J.S. (2012). mTOR inhibition prevents epithelial stem cell senescence and protects from radiation-induced mucositis. *Cell Stem Cell* *11*, 401–414.
- Islam, M.T. (2017). Radiation interactions with biological systems. *Int. J. Radiat. Biol.* *93*, 487–493.
- Jonathan, E.C., Bernhard, E.J., and McKenna, W.G. (1999). How does radiation kill cells? *Curr. Opin. Chem. Biol.* *3*, 77–83.
- Jones, R.G., and Pearce, E.J. (2017). MenTORing Immunity: mTOR Signaling in the Development and Function of Tissue-Resident Immune Cells. *Immunity* *46*, 730–742.
- Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2007). Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity* *27*, 173–178.

- Joubert, A., Zimmerman, K.M., Bencokova, Z., Gastaldo, J., Chavaudra, N., Favaudon, V., Arlett, C.F., and Foray, D.N. (2008). DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: At least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int. J. Radiat. Biol.* *84*, 107–125.
- Judge, J.L., Owens, K.M., Pollock, S.J., Woeller, C.F., Thatcher, T.H., Williams, J.P., Phipps, R.P., Sime, P.J., and Kottmann, R.M. (2015). Ionizing radiation induces myofibroblast differentiation via lactate dehydrogenase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *309*, L879–887.
- Kagami, S., Rizzo, H.L., Lee, J.J., Koguchi, Y., and Blauvelt, A. (2010). Circulating Th17, Th22, and Th1 Cells Are Increased in Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 1373–1383.
- Kaneko, S., Kondo, Y., Yokosawa, M., Furuyama, K., Segawa, S., Tsuboi, H., Kanamori, A., Matsumoto, I., Yamazaki, M., and Sumida, T. (2018). The ROR γ t-CCR6-CCL20 axis augments Th17 cells invasion into the synovia of rheumatoid arthritis patients. *Mod. Rheumatol.* *28*, 814–825.
- Kasakovski, D., Xu, L., and Li, Y. (2018). T cell senescence and CAR-T cell exhaustion in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* *11*.
- Kendall, R.T., and Feghali-Bostwick, C.A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front. Pharmacol.* *5*.
- Kerns, S.L., Ostrer, H., Stock, R., Li, W., Moore, J., Pearlman, A., Campbell, C., Shao, Y., Stone, N., Kusnetz, L., et al. (2010). 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.* *78*, 1292–1300.
- Khalifa, J., Boyrie, S., and Moyal, É. (2012). Réparation des lésions de l'ADN radio-induites et radiosensibilité. *7*.
- Kim, B.M., Hong, Y., Lee, S., Liu, P., Lim, J.H., Lee, Y.H., Lee, T.H., Chang, K.T., and Hong, Y. (2015). Therapeutic Implications for Overcoming Radiation Resistance in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 26880–26913.
- Kitani, A., and Xu, L. (2008). Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunol.* *1 Suppl 1*, S43-46.
- Kiwamoto, T., Ishii, Y., Morishima, Y., Yoh, K., Maeda, A., Ishizaki, K., Iizuka, T., Hegab, A.E., Matsuno, Y., Homma, S., et al. (2006). Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *174*, 142–151.
- Knochelmann, H.M., Dwyer, C.J., Bailey, S.R., Amaya, S.M., Elston, D.M., Mazza-McCrann, J.M., and Paulos, C.M. (2018). When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.* *15*, 458.

- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517.
- Kuribayashi, K., Finnberg, N., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., and El-Deiry, W.S. (2011). The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 2380–2389.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 20), 3613–3622.
- Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A.V., Patil, C.K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S.C., Davalos, A.R., Wilson-Edell, K.A., Liu, S., et al. (2015). mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat. Cell Biol.* 17, 1049–1061.
- Lafargue, A., Degorre, C., Corre, I., Alves-Guerra, M.-C., Gaugler, M.-H., Vallette, F., Pecqueur, C., and Paris, F. (2017). Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. *Free Radic. Biol. Med.* 108, 750–759.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201, 233–240.
- Lanna, A., Coutavas, E., Levati, L., Seidel, J., Rustin, M.H.A., Henson, S.M., Akbar, A.N., and Franzese, O. (2013). IFN- α Inhibits Telomerase in Human CD8⁺ T Cells by Both hTERT Downregulation and Induction of p38 MAPkinase Signalling. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 191.
- Lao, Y., Li, Y., Zhang, P., Shao, Q., Lin, W., Qiu, B., Lv, Y., Tang, L., Su, S., Zhang, H., et al. (2018). Targeting Endothelial Erk1/2-Akt Axis as a Regeneration Strategy to Bypass Fibrosis during Chronic Liver Injury in Mice. *Mol. Ther.* 26, 2779–2797.
- Le Caër, S. (2011). Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. *Water* 3, 235–253.
- Le Gouvello, S., Bastuji-Garin, S., Aloulou, N., Mansour, H., Chaumette, M.-T., Berrehar, F., Seikour, A., Charachon, A., Karoui, M., Leroy, K., et al. (2008). High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut* 57, 772–779.
- Lee, A.Y.S., Eri, R., Lyons, A.B., Grimm, M.C., and Korner, H. (2013). CC Chemokine Ligand 20 and Its Cognate Receptor CCR6 in Mucosal T Cell Immunology and Inflammatory Bowel Disease: Odd Couple or Axis of Evil? *Front. Immunol.* 4, 194.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195.

- Lee, J.-J., Kao, K.-C., Chiu, Y.-L., Jung, C.-J., Liu, C.-J., Cheng, S.-J., Chang, Y.-L., Ko, J.-Y., and Chia, J.-S. (2017). Enrichment of Human CCR6+ Regulatory T Cells with Superior Suppressive Activity in Oral Cancer. *J. Immunol.* *ji1601815*.
- Lei, L., Zhao, C., Qin, F., He, Z.-Y., Wang, X., and Zhong, X.-N. (2016). Th17 cells and IL-17 promote the skin and lung inflammation and fibrosis process in a bleomycin-induced murine model of systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *34 Suppl 100*, 14–22.
- Li, X., Duan, L., Yuan, S., Zhuang, X., Qiao, T., and He, J. (2019). Ferroptosis inhibitor alleviates Radiation-induced lung fibrosis (RILF) via down-regulation of TGF- β 1. *J. Inflamm.* *16*, 11.
- Liakou, E., Mavrogonatou, E., Pratsinis, H., Rizou, S., Evangelou, K., Panagiotou, P.N., Karamanos, N.K., Gorgoulis, V.G., and Kletsas, D. (2016). Ionizing radiation-mediated premature senescence and paracrine interactions with cancer cells enhance the expression of syndecan 1 in human breast stromal fibroblasts: the role of TGF- β . *Aging* *8*, 1650–1669.
- Liao, F., Rabin, R.L., Smith, C.S., Sharma, G., Nutman, T.B., and Farber, J.M. (1999a). CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950 162*, 186–194.
- Liao, W.C., Haimovitz-Friedman, A., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Zhang, N., Gatei, M., Lavin, M., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (1999b). Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J. Biol. Chem.* *274*, 17908–17917.
- Liau, S.L., Connell, P.P., and Weichselbaum, R.R. (2013). New paradigms and future challenges in Radiation Oncology: An Update of Biological Targets and Technology. *Sci. Transl. Med.* *5*, 173sr2.
- Lierova, A., Jelicova, M., Nemcova, M., Proksova, M., Pejchal, J., Zarybnicka, L., and Sinkorova, Z. (2018). Cytokines and radiation-induced pulmonary injuries. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *59*, 709–753.
- Liu, S., Sun, X., Luo, J., Zhu, H., Yang, X., Guo, Q., Song, Y., and Sun, X. (2015). Effects of radiation on T regulatory cells in normal states and cancer: mechanisms and clinical implications. *Am. J. Cancer Res.* *5*, 3276–3285.
- Liu, X., Mo, W., Ye, J., Li, L., Zhang, Y., Hsueh, E.C., Hoft, D.F., and Peng, G. (2018). Regulatory T cells trigger effector T cell DNA damage and senescence caused by metabolic competition. *Nat. Commun.* *9*, 249.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., et al. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* *8*, 500–508.

- Luo, S., Hieu, T.B., Ma, F., Yu, Y., Cao, Z., Wang, M., Wu, W., Mao, Y., Rose, P., Law, B.Y.-K., et al. (2017). ZYZ-168 alleviates cardiac fibrosis after myocardial infarction through inhibition of ERK1/2-dependent ROCK1 activation. *Sci. Rep.* 7, 43242.
- Luo-Owen, X., Pecaut, M.J., Rizvi, A., and Gridley, D.S. (2012). Low-dose total-body γ irradiation modulates immune response to acute proton radiation. *Radiat. Res.* 177, 251–264.
- Macaulay, R., Akbar, A.N., and Henson, S.M. (2013). The role of the T cell in age-related inflammation. *Age Dordr. Neth.* 35, 563–572.
- Madala, S.K., Schmidt, S., Davidson, C., Ikegami, M., Wert, S., and Hardie, W.D. (2012). MEK-ERK Pathway Modulation Ameliorates Pulmonary Fibrosis Associated with Epidermal Growth Factor Receptor Activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46, 380–388.
- Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., and Herskind, C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Mancini, M.L.P., and Sonis, S.T.D. (2014). Mechanisms of cellular fibrosis associated with cancer regimen-related toxicities. *Front. Pharmacol.* 5.
- Mannick, J.B., Del Giudice, G., Lattanzi, M., Valiante, N.M., Praestgaard, J., Huang, B., Lonetto, M.A., Maecker, H.T., Kovarik, J., Carson, S., et al. (2014). mTOR inhibition improves immune function in the elderly. *Sci. Transl. Med.* 6, 268ra179.
- Marazita, M.C., Dugour, A., Marquioni-Ramella, M.D., Figueroa, J.M., and Suburo, A.M. (2016). Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for Age-related Macular Degeneration. *Redox Biol.* 7, 78–87.
- Martin, D.A., Towne, J.E., Kricorian, G., Klekotka, P., Gudjonsson, J.E., Krueger, J.G., and Russell, C.B. (2013). The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings. *J. Invest. Dermatol.* 133, 17–26.
- Martin, J.C., Baeten, D.L., and Josien, R. (2014). Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 154, 1–12.
- McCart, E.A., Thangapazham, R.L., Lombardini, E.D., Mog, S.R., Panganiban, R.A.M., Dickson, K.M., Mansur, R.A., Nagy, V., Kim, S.-Y., Selwyn, R., et al. (2017). Accelerated senescence in skin in a murine model of radiation-induced multi-organ injury. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 58, 636–646.
- Mehrotra, P., Collett, J.A., Gunst, S.J., and Basile, D.P. (2018). Th17 cells contribute to pulmonary fibrosis and inflammation during chronic kidney disease progression after acute ischemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 314, R265–R273.
- Mercer, B.A., and D’Armiento, J.M. (2006). Emerging role of MAP kinase pathways as therapeutic targets in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 1, 137–150.

- Merlo, A., Casalini, P., Carcangiu, M.L., Malventano, C., Triulzi, T., Mènard, S., Tagliabue, E., and Balsari, A. (2009). FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 1746–1752.
- Mialet-Perez, J., Douin-Echinard, V., Cussac, D., Bril, A., and Parini, A. (2015). Vieillesse - Une question de cœur ? *médecine/sciences* *31*, 1006–1013.
- Mirjolet, C., Merlin, J.L., Dalban, C., Maingon, P., and Azria, D. (2016). Correlation between radio-induced lymphocyte apoptosis measurements obtained from two French centres. *Cancer/Radiothérapie* *20*, 391–394.
- Mirjolet, C., Merlin, J.L., Truc, G., Noël, G., Thariat, J., Domont, J., Sargos, P., Renard-Oldrini, S., Ray-Coquard, I., Liem, X., et al. (2019). RILA blood biomarker as a predictor of radiation-induced sarcoma in a matched cohort study. *EBioMedicine* *41*, 420–426.
- Mora, A.L., Woods, C.R., Garcia, A., Xu, J., Rojas, M., Speck, S.H., Roman, J., Brigham, K.L., and Stecenko, A.A. (2005). Lung infection with gamma-herpesvirus induces progressive pulmonary fibrosis in Th2-biased mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *289*, L711-721.
- Mori, M., Benotmane, M.A., Tirone, I., Hooghe-Peters, E.L., and Desaintes, C. (2005). Transcriptional response to ionizing radiation in lymphocyte subsets. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *62*, 1489–1501.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (2005). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 5–14.
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* *317*, 256–260.
- Mulcahy, E.M., Hudson, J.B., Beggs, S.A., Reid, D.W., Roddam, L.F., and Cooley, M.A. (2015). High Peripheral Blood Th17 Percent Associated with Poor Lung Function in Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* *10*.
- Muñoz-Espín, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 482–496.
- Murugaiyan, G., and Saha, B. (2009). Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 4169–4175.
- Nagaraja, S.S., and Nagarajan, D. (2018). Radiation-Induced Pulmonary Epithelial-Mesenchymal Transition: A Review on Targeting Molecular Pathways and Mediators. *Curr. Drug Targets* *19*, 1191–1204.
- Nguyen, H.Q., To, N.H., Zadigue, P., Kerbrat, S., De La Taille, A., Le Gouvello, S., and Belkacemi, Y. (2018). Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *129*, 13–26.

- Numasaki, M., Fukushi, J.-I., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101, 2620–2627.
- Olive, P.L., and Banáth, J.P. (2004). Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58, 331–335.
- van Oorschot, B., Hovingh, S.E., Moerland, P.D., Medema, J.P., Stalpers, L.J.A., Vrieling, H., and Franken, N.A.P. (2014). Reduced activity of double-strand break repair genes in prostate cancer patients with late normal tissue radiation toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 88, 664–670.
- van Oorschot, B., Hovingh, S., Dekker, A., Stalpers, L.J., and Franken, N.A.P. (2016). Predicting Radiosensitivity with Gamma-H2AX Foci Assay after Single High-Dose-Rate and Pulsed Dose-Rate Ionizing Irradiation. *Radiat. Res.* 185, 190–198.
- van Oorschot, B., Uitterhoeve, L., Oomen, I., Ten Cate, R., Medema, J.P., Vrieling, H., Stalpers, L.J.A., Moerland, P.D., and Franken, N.A.P. (2017). Prostate Cancer Patients with Late Radiation Toxicity Exhibit Reduced Expression of Genes Involved in DNA Double-Strand Break Repair and Homologous Recombination. *Cancer Res.* 77, 1485–1491.
- Ozsahin, M., Ozsahin, H., Shi, Y., Larsson, B., Würgler, F.E., and Crompton, N.E.A. (1997). Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int. J. Radiat. Oncol.* 38, 429–440.
- Ozsahin, M., Crompton, N.E.A., Gourgou, S., Kramar, A., Li, L., Shi, Y., Sozzi, W.J., Zouhair, A., Mirimanoff, R.O., and Azria, D. (2005). 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.* 11, 7426–7433.
- Pan, B., Shen, J., Cao, J., Zhou, Y., Shang, L., Jin, S., Cao, S., Che, D., Liu, F., and Yu, Y. (2015). Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Sci. Rep.* 5, 16053.
- Pang, Q., Wei, Q., Xu, T., Yuan, X., Lopez Guerra, J.L., Levy, L.B., Liu, Z., Gomez, D.R., Zhuang, Y., Wang, L.-E., et al. (2013). 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.* 85, 1332–1339.
- Papadopoulou, A., and Kletsas, D. (2011). Human lung fibroblasts prematurely senescent after exposure to ionizing radiation enhance the growth of malignant lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 39, 989–999.
- de Parades, V., Bauer, P., Marteau, P., Chauveinc, L., Bouillet, T., and Atienza, P. (2007). Traitement non chirurgical des rectites radiques chroniques hémorragiques. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 31, 919–928.

- Pattingre, S., and Levine, B. (2006). Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res.* *66*, 2885–2888.
- Paun, A., Kunwar, A., and Haston, C.K. (2015). Acute adaptive immune response correlates with late radiation-induced pulmonary fibrosis in mice. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* *10*, 45.
- Paun, A., Bergeron, M.-E., and Haston, C.K. (2017). The Th1/Th17 balance dictates the fibrosis response in murine radiation-induced lung disease. *Sci. Rep.* *7*, 11586.
- Pawelec, G.P. (2017). THE CONTRIBUTION OF THE ADAPTIVE IMMUNE SYSTEM TO AGEING. *Innov. Aging* *1*, 1254–1254.
- Pereira, S., Bodgi, L., Duclos, M., Canet, A., Ferlazzo, M.L., Devic, C., Granzotto, A., Deneuve, S., Vogin, G., and Foray, N. (2018). Fast and Binary Assay for Predicting Radiosensitivity Based on the Theory of ATM Nucleo-Shuttling: Development, Validation, and Performance. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *100*, 353–360.
- Pospelova, T.V., Demidenko, Z.N., Bukreeva, E.I., Pospelov, V.A., Gudkov, A.V., and Blagosklonny, M.V. (2009). Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle* *8*, 4112–4118.
- Pouliliou, S., and Koukourakis, M.I. (2014). Gamma histone 2AX (γ -H2AX) as a predictive tool in radiation oncology. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* *19*, 167–180.
- Pouliliou, S.E., Lialiaris, T.S., Dimitriou, T., Giatromanolaki, A., Papazoglou, D., Pappa, A., Pistevou, K., Kalamida, D., and Koukourakis, M.I. (2015). Survival Fraction at 2 Gy and γ H2AX Expression Kinetics in Peripheral Blood Lymphocytes From Cancer Patients: Relationship With Acute Radiation-Induced Toxicities. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *92*, 667–674.
- Prise, K.M., and O’Sullivan, J.M. (2009). Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 351–360.
- Prouillac, C., Célariès, B., Vicendo, P., and Rima, G. (2006). Evaluation, in vitro, of the radioprotection of DNA from gamma-rays by naphazoline. *C. R. Biol.* *329*, 196–199.
- Ranasinghe, R., and Eri, R. (2018a). Pleiotropic Immune Functions of Chemokine Receptor 6 in Health and Disease. *Med. Basel Switz.* *5*.
- Ranasinghe, R., and Eri, R. (2018b). Modulation of the CCR6-CCL20 Axis: A Potential Therapeutic Target in Inflammation and Cancer. *Med. Kaunas Lith.* *54*.
- Raphael, I., and Forsthuber, T.G. (2012). Stability of T-cell lineages in autoimmune diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *8*, 299–301.
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., and Forsthuber, T.G. (2015). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* *74*, 5–17.

- Re, S.L., Lison, D., and Huaux, F. (2013). CD4⁺ T lymphocytes in lung fibrosis: diverse subsets, diverse functions. *J. Leukoc. Biol.* *93*, 499–510.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* *192*, 547–556.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* *11*, 973–979.
- Rosenblum, M.D., Way, S.S., and Abbas, A.K. (2016). Regulatory T cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 90–101.
- Rothkamm, K., and Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5057–5062.
- Sakaguchi, S., Wing, K., and Miyara, M. (2007). Regulatory T cells – a brief history and perspective. *Eur. J. Immunol.* *37*, S116–S123.
- Sakhuja, G. (2016). The Provenance of Nuclear Radioactivity & Radiations and its Deep Developmental Impact on the Mankind. *5*, 7.
- Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., and Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3⁺ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 186–192.
- Santivasi, W.L., and Xia, F. (2014). Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid. Redox Signal.* *21*, 251–259.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* *17*, 1675–1687.
- Schafer, M.J., White, T.A., Iijima, K., Haak, A.J., Ligresti, G., Atkinson, E.J., Oberg, A.L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., et al. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.* *8*.
- Schaue, D. (2017). A Century of Radiation Therapy and Adaptive Immunity. *Front. Immunol.* *8*, 431.
- Seibold, P., Webb, A., Aguado-Barrera, M.E., Azria, D., Bourgier, C., Brengues, M., Briers, E., Bultijnck, R., Calvo-Crespo, P., Carballo, A., et al. (2019). REQUITE: A prospective multicentre cohort study of patients undergoing radiotherapy for breast, lung or prostate cancer. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* *138*, 59–67.
- Shabgah, A.G., Fattahi, E., and Shahneh, F.Z. (2014). Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatol. Alergol.* *31*, 256–261.
- Shapiro, H.M. (2004). The evolution of cytometers. *Cytometry A* *58A*, 13–20.

Shi, T., Zhang, T., Zhang, L., Yang, Y., Zhang, H., and Zhang, F. (2015). The Distribution and the Fibrotic Role of Elevated Inflammatory Th17 Cells in Patients With Primary Biliary Cirrhosis. *Medicine (Baltimore)* *94*, e1888.

Skroza, N., Proietti, I., Pampena, R., La Viola, G., Bernardini, N., Nicolucci, F., Tolino, E., Zuber, S., Soccodato, V., and Potenza, C. (2013). Correlations between psoriasis and inflammatory bowel diseases. *BioMed Res. Int.* *2013*, 983902.

Skurkovich, S., Skurkovich, B., and Kelly, J. (2005). Anticytokine therapy, particularly anti-IFN-gamma, in Th1-mediated autoimmune diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *1*, 11–25.

Song, K., Rabin, R.L., Hill, B.J., Rosa, S.C.D., Perfetto, S.P., Zhang, H.H., Foley, J.F., Reiner, J.S., Liu, J., Mattapallil, J.J., et al. (2005). Characterization of subsets of CD4+ memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 7916–7921.

Spaulding, C., Guo, W., and Effros, R.B. (1999). Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation☆. *Exp. Gerontol.* *34*, 633–644.

Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (1999). Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2109–2117.

Straub, J.M., New, J., Hamilton, C.D., Lominska, C., Shnyder, Y., and Thomas, S.M. (2015). Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *141*, 1985–1994.

Strzeszewska, A., Alster, O., Mosieniak, G., Ciolko, A., and Sikora, E. (2018). Insight into the role of PIKK family members and NF-κB in DNA damage-induced senescence and senescence-associated secretory phenotype of colon cancer cells. *Cell Death Dis.* *9*, 44.

Suzuki, H., Aoshiba, K., Yokohori, N., and Nagai, A. (2003). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition augments a murine model of pulmonary fibrosis. *Cancer Res.* *63*, 5054–5059.

Tada, T., Takemori, T., Okumura, K., Nonaka, M., and Tokuhisa, T. (1978). Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J. Exp. Med.* *147*, 446–458.

Talbot, C.J., Veldwijk, M.R., Azria, D., Batini, C., Bierbaum, M., Brengues, M., Chang-Claude, J., Johnson, K., Keller, A., Smith, S., et al. (2019). Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* *18*, 1–8.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Clinical impact of different classes of

infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 71, 1263–1271.

Tsai, K.K.C., Stuart, J., Chuang, Y.-Y.E., Little, J.B., and Yuan, Z.-M. (2009). Low-dose radiation-induced senescent stromal fibroblasts render nearby breast cancer cells radioresistant. *Radiat. Res.* 172, 306–313.

Turner, J.-E., Paust, H.-J., Steinmetz, O.M., Peters, A., Riedel, J.-H., Erhardt, A., Wegscheid, C., Velden, J., Fehr, S., Mittrücker, H.-W., et al. (2010). CCR6 Recruits Regulatory T Cells and Th17 Cells to the Kidney in Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 974–985.

Turnquist, C., Beck, J.A., Horikawa, I., Obiorah, I.E., von Muhlinen, N., Vojtesek, B., Lane, D.P., Grunseich, C., Chahine, J.J., Ames, H.M., et al. (2019). Radiation-induced astrocyte senescence is rescued by $\Delta 133p53$. *Neuro-Oncol.*

Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S.A., and Dirnhofer, S. (2008). Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 93, 193–200.

Ulloa, L., Doody, J., and Massagué, J. (1999). Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397, 710–713.

Ungvari, Z., Podlutzky, A., Sosnowska, D., Tucsek, Z., Toth, P., Deak, F., Gautam, T., Csiszar, A., and Sonntag, W.E. (2013). Ionizing Radiation Promotes the Acquisition of a Senescence-Associated Secretory Phenotype and Impairs Angiogenic Capacity in Cerebromicrovascular Endothelial Cells: Role of Increased DNA Damage and Decreased DNA Repair Capacity in Microvascular Radiosensitivity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 68, 1443–1457.

Vahedi, G., Poholek, A., Hand, T.W., Laurence, A., Kann, Y., O'Shea, J.J., and Hirahara, K. (2013a). Helper T Cell Identity and Evolution of Differential Transcriptomes and Epigenomes. *Immunol. Rev.* 252, 24–40.

Vahedi, G., Kanno, Y., Sartorelli, V., and O'Shea, J.J. (2013b). Transcription factors and CD4 T cells seeking identity: masters, minions, setters and spikers. *Immunology* 139, 294–298.

Veldwijk, M.R., Seibold, P., Botma, A., Helmbold, I., Sperk, E., Giordano, F.A., Gürth, N., Kirchner, A., Behrens, S., Wenz, F., et al. (2019). 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. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 562–572.

Verheij, M., Ruiter, G.A., Zerp, S.F., van Blitterswijk, W.J., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., and Bartelink, H. (1998). The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 47, 225–232.

- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* *199*, 971–979.
- Vogin, G., Merlin, J.-L., Rousseau, A., Peiffert, D., Harlé, A., Husson, M., Hajj, L.E., Levitchi, M., Simon, T., and Simon, J.-M. (2018a). Absence of correlation between radiation-induced CD8 T-lymphocyte apoptosis and sequelae in patients with prostate cancer accidentally overexposed to radiation. *Oncotarget* *9*, 32680–32689.
- Vogin, G., Bastogne, T., Bodgi, L., Gillet-Daubin, J., Canet, A., Pereira, S., and Foray, N. (2018b). The Phosphorylated ATM Immunofluorescence Assay: A High-performance Radiosensitivity Assay to Predict Postradiation Therapy Overreactions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *101*, 690–693.
- Wang, Y., Xu, C., Du, L.Q., Cao, J., Liu, J.X., Su, X., Zhao, H., Fan, F.-Y., Wang, B., Katsube, T., et al. (2013). Evaluation of the Comet Assay for Assessing the Dose-Response Relationship of DNA Damage Induced by Ionizing Radiation. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 22449–22461.
- Wang, Y., Boerma, M., and Zhou, D. (2016). Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases. *Radiat. Res.* *186*, 153–161.
- Wang, Z., Liu, H., and Xu, C. (2018). Cellular Senescence in the Treatment of Ovarian Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* *28*, 895–902.
- Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N., and Hara, E. (2017). Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci.* *108*, 563–569.
- Weaver, B.A.A., and Cleveland, D.W. (2005). Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell* *8*, 7–12.
- Wiede, F., Fromm, P.D., Comerford, I., Kara, E., Bannan, J., Schuh, W., Ranasinghe, C., Tarlinton, D., Winkler, T., McColl, S.R., et al. (2013). CCR6 is transiently upregulated on B cells after activation and modulates the germinal center reaction in the mouse. *Immunol. Cell Biol.* *91*, 335–339.
- Wilkerson, M.J. (2012). Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* *42*, 53–71.
- Wirsdörfer, F., and Jendrossek, V. (2016). The Role of Lymphocytes in Radiotherapy-Induced Adverse Late Effects in the Lung. *Front. Immunol.* *7*.
- Wu, C., Luo, Z., Pang, B., Wang, W., Deng, M., Jin, R., Muhataer, X., Li, Y., Li, Q., and Yang, X. (2018). Associations of Pulmonary Fibrosis with Peripheral Blood Th1/Th2 Cell Imbalance and EBF3 Gene Methylation in Uygur Pigeon Breeder's Lung Patients. *Cell. Physiol. Biochem.* *47*, 1141–1151.

- Wynn, T.A., and Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* *18*, 1028–1040.
- Xu, W., and Larbi, A. (2017). Markers of T Cell Senescence in Humans. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Xu, M., Tchkonina, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E.R., Pirtskhalava, T., White, T.A., Johnson, K.O., Stout, M.B., Mezera, V., et al. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E6301-6310.
- Yamazaki, T., Yang, X.O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H.S., Ma, L., Panopoulos, A.D., et al. (2008). CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 8391–8401.
- Yang, N.-C., and Hu, M.-L. (2005). The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp. Gerontol.* *40*, 813–819.
- Ye, J., Huang, X., Hsueh, E.C., Zhang, Q., Ma, C., Zhang, Y., Varvares, M.A., Hoft, D.F., and Peng, G. (2012). Human regulatory T cells induce T-lymphocyte senescence. *Blood* *120*, 2021–2031.
- Yentrapalli, R., Azimzadeh, O., Sriharshan, A., Malinowsky, K., Merl, J., Wojcik, A., Harms-Ringdahl, M., Atkinson, M.J., Becker, K.-F., Haghdoost, S., et al. (2013). The PI3K/Akt/mTOR Pathway Is Implicated in the Premature Senescence of Primary Human Endothelial Cells Exposed to Chronic Radiation. *PLOS ONE* *8*, e70024.
- Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., et al. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat. Commun.* *7*, 11190.
- Yoshie, O., and Matsushima, K. (2015). CCR4 and its ligands: from bench to bedside. *Int. Immunol.* *27*, 11–20.
- Yoshizaki, A., Yanaba, K., Iwata, Y., Komura, K., Ogawa, A., Akiyama, Y., Muroi, E., Hara, T., Ogawa, F., Takenaka, M., et al. (2010). Cell adhesion molecules regulate fibrotic process via Th1/Th2/Th17 cell balance in a bleomycin-induced scleroderma model. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 2502–2515.
- Yu, N., Li, X., Song, W., Li, D., Yu, D., Zeng, X., Li, M., Leng, X., and Li, X. (2012). CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation* *35*, 1773–1780.
- Zhang, B., Fu, D., Xu, Q., Cong, X., Wu, C., Zhong, X., Ma, Y., Lv, Z., Chen, F., Han, L., et al. (2018). The senescence-associated secretory phenotype is potentiated by feedforward regulatory mechanisms involving Zscan4 and TAK1. *Nat. Commun.* *9*, 1723.

- Zhang, J., Li, H., Lu, L., Yan, L., Yang, X., Shi, Z., and Li, D. (2017). The Yiqi and Yangyin Formula ameliorates injury to the hematopoietic system induced by total body irradiation. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 58, 1–7.
- Zhang, L., Cheng, F., Wei, Y., Zhang, L., Guo, D., Wang, B., and Li, W. (2019). Inhibition of TAZ contributes radiation-induced senescence and growth arrest in glioma cells. *Oncogene* 38, 2788–2799.
- Zhao, Y., Zhang, J., Han, X., and Fan, S. (2019). Total body irradiation induced mouse small intestine senescence as a late effect. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*.
- Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587–596.
- Zhong, W., Jiang, Z., Wu, J., Jiang, Y., and Zhao, L. (2018). CCR6+ Th cell distribution differentiates systemic lupus erythematosus patients based on anti-dsDNA antibody status. *PeerJ* 6.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–489.
- Zhu, Y., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., et al. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14, 644–658.

Annexes

Annexe 1 : CURRICULUM VITAE

1 - ETAT CIVIL :

NGUYEN Hoang-Quy (M)
Nationalité : vietnamienne Date de naissance: 20 septembre 1986
Lieu de naissance : Da Lat - province de Lam Dong – Viet Nam
Courriel électronique : nguyenhoangquy2009@gmail.com
Profession : Oncologue médical, Université de médecine et pharmacie à Ho Chi Minh ville, Viet Nam.
Doctorant à l'école doctorale de cancérologie 582 – Université de Paris Saclay.

2- FORMATION :

Octobre 2015 à maintenant :

- Doctorant à l'école Doctorale de Cancérologie 582 – Université de Paris Saclay
Inserm U955, Equipe 7 : Recherche translationnelle en oncogène génito-urinaire
(Directeur: Pr Alexandre De La Taille (PU-PH))

Octobre 2013 à Septembre 2015 :

- Oncologue médical à l'Hôpital de Oncologie à Ho Chi Minh ville, Université de médecine et pharmacie à Ho Chi Minh ville.

Novembre 2012 à Septembre 2013 :

- Master 2 de recherche en Oncologie – Université d'Aix Marseille
INSERM-UMR911, Equipe 4 : Angiogénèse, invasivité et micro-environnement tumoral.

Novembre 2011 à Octobre 2012 :

- DFMS (diplôme de formation médicale spécialisée) en France pour la spécialité d'Oncologie Médicale -
Faculté de médecine de Nancy – Université de Lorraine (2012-2013)

Novembre 2010 à Octobre 2011:

- Oncologue à l'hôpital d'Oncologie à Ho Chi Minh ville, Université de médecine et pharmacie à Ho Chi Minh ville.

Septembre 2004 à Septembre 2010 :

- Étudiant en médecine à l'Université de médecine and pharmacie - Ho Chi Minh ville.

3- DIPLÔME

1. Master 2 de recherche spécialité Oncologie à l'université Aix – Marseille, France (2013).
2. Diplôme de Formation Médicale Spécialisée en oncologie médicale, Fac. de Med Nancy, France (2012).
3. Docteur en Médecine à la faculté de Médecine de Ho Chi Minh ville, Vietnam (2010).

4- PUBLICATIONS

1. Bouvier C, Macagno N, Nguyen H.Q, Loundou A, Jiguet-Jiglaire C, Gentet JC, Jouve JL, Rochwerger A, Mattei JC, Bouvard D, Salas S. (2016), "Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and β 1-integrin in conventional osteosarcoma", *Oncotarget*, Vol. 7, No. 40, pp. 64702-10.
2. Nguyen, H.Q., To, N.H., Zadigue, P., Kerbrat, S., De La Taille, A., Le Gouvello, S., and Belkacemi, Y. (2018). Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 129, 13–26.
3. Huet, E. , Jaroz, C. , Nguyen, H.Q., Belkacemi, Y. , Taille, A. , Stavrinides, V. and Whitaker, H. (2019), Stroma in normal and cancer wound healing. *FEBS J*, 286: 2909-2920. doi:10.1111/febs.14842

REVIEW ARTICLE

Stroma in normal and cancer wound healing

Eric Huet^{1,2,3}, Camille Jaroz¹, Hoang Quy Nguyen², Yazid Belkacemi^{2,4}, Alexandre de la Taille^{2,5}, Vasilis Stavrinos³ and Hayley Whitaker³

1 Université Paris-Est, UPEC, Créteil, France

2 INSERM, U955, Equipe 7, Créteil, France

3 Molecular Diagnostics and Therapeutics Group, Charles Bell House, Division of Surgery and Interventional Science, University College London, UK

4 AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Service d'oncologie-radiothérapie et Centre Sein Henri Mondor Créteil, France

5 AP-HP, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Service d'urologie, Créteil, France

Keywords

cancer-associated fibroblasts; EMMPRIN; FAP α ; fibroblasts; fibrosis; myofibroblasts; radiotherapy; TGF β ; tumour microenvironment; wound healing

Correspondence

E. Huet, IMRB - INSERM U955 - EQ07, Translational Research on Urogenital Cancer, Faculté de Médecine, Université Paris-Est Créteil, 8 rue du Général Sarrail, F-94010 Créteil Cedex, France
 E-mail: huet@u-pec.fr
 Website: <http://www.imrb.inserm.fr/equipe/s/a-de-la-taille/>

(Received 10 December 2018, revised 18 February 2019, accepted 5 April 2019)

doi:10.1111/febs.14842

It is currently believed that stroma, the connective framework of biological tissues, plays a central role in normal wound healing and in cancer. In both these contexts, stromal cellular components such as activated fibroblasts interact with complex protein networks that include growth factors, structural protein or proteinases in order to initiate and sustain an extensive remodelling process. However, although this process is usually spatially and temporally self-limited, it is unregulated in the case of cancer and leads to uncontrolled cell proliferation and invasion within tissues, metastasis and therapeutic resistance. In this review, we outline the role of stroma in normal healing, cancer and post radiotherapy, with a particular focus on the crosstalk between normal or cancer cells and fibroblasts. Understanding these mechanisms is particularly important as several stromal components have been proposed as potential therapeutic targets.

Introduction

Following tissue injury, the host response consists of a reparative process involving the action of cells from the connective tissue as well as their extracellular matrix (ECM) products. In a general way, the damaged tissue will be restored in a normal and functional state [1]. However, there are conditions under which repair is excessive, resulting in chronic non-healing wounds and fibrosis that can virtually affect every tissue and organ system. Fibrosis, occurring, for

example, after radiation therapy in cancer treatment, can be considered as the 'dark side' of normal tissue repair [2]. This physiopathological process starts just after the injury and involves several components such as migratory and local cells, ECM proteins and soluble factors. To rapidly and efficiently repair the wound, a large and complex number of cellular responses is set in motion with acute and tight regulations [1]. This process is spatially and temporally self-

Abbreviations

bFGF, basic fibroblast growth factor; CAF, cancer-associated fibroblast; ECM, extracellular matrix; EMMPRIN, extracellular matrix metalloproteinase inducer; FAP α , fibroblast activation protein alpha; FSP-1, fibroblast specific protein 1; MMP, matrix metalloproteinase; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF β , transforming growth factor beta; TIMP, tissue inhibitor of matrix proteinase; α SMA, alpha smooth muscle actin.

limited and the mechanisms underlying it include inflammatory and growth factors, cell–matrix and cell–cell interactions, hence controlling cell proliferation, migration and differentiation, and, ultimately, stages of re-epithelialization, fibroplasia, angiogenesis, wound contraction and ECM remodelling.

Similarities between the healing process and tumour development have previously been noted with Alexander Haddow suggesting that ‘tumour production is a possible over-healing’ [3] and a decade later, it was postulated by Dvorak that ‘tumours are wounds that do not heal’ [4]. Dvorak further suggested that tumour stroma composition strongly resembles stroma found in the granulation tissue of healing wounds. However, this process is not self-limited in cancer and is characterized by uncontrolled cell proliferation, invasion and metastasis [5]. Therefore, better understanding of the mechanisms involved in normal wound healing could impact our understanding of the biology of tumours especially of aggressive ones.

In this review, we will explore the stroma in normal wound healing and cancer, where crosstalk between cells (normal or cancer) and fibroblasts exists with a focus on the main factors involved. Healing in radiotherapy will be also addressed.

Normal wound healing

Adjacent to the damaged area following an injury, local cells initiate a cascade of events that are prerequisite for restoring tissue function [6]. Cellular and molecular biology studies have shown that several pathways are called into play to terminate bleeding at the wound site as an initial response [7]. Reflex vasoconstriction temporarily minimizes blood loss until homeostasis is achieved by the formation of a plug composed of insoluble fibrin-based materials after platelet aggregation and initiation of the plasma coagulation cascade. The presence of activated platelets within this fibrin-based plug provides an abundant source of factors involved in the wound repair process including vasoconstrictive substances, such as thromboxane A₂, or growth factors, such as transforming growth factor beta (TGF β). Most importantly, a temporary matrix, due to the formation of the fibrin-based plug, is available for all cellular responses [1,6].

Once blood lost is controlled, inflammatory cells initiate their migration into the wound as a result of the increased permeability of blood vessels adjacent to the injury site. The expansion of fibroblasts into the wound represents the beginning of the proliferative phase. This phase is characterized by the replacement of the previous established wound matrix with a type

III collagen-rich granulation tissue. Fibroblasts migration and proliferation into the wound are, mainly, regulated by tissue growth factors such as platelet-derived growth factor (PDGF), TGF β and/or basic fibroblast growth factor (bFGF). Two days after the injury, fibroblasts initiate their migration into the wound and after 4 days they represent the most predominant cells in the granulation tissue. Indeed, in both injured and normal connective tissues, fibroblasts are one of the most abundant cell populations. They can be characterized by the expression of fibroblast specific protein 1 or FSP-1 (S100A4), a filament-associated, calcium-binding protein found in the cytoplasm of fibroblasts (Fig. 1), but not of epithelial cells, thus allowing fibroblast identification [8]. Fibroblast primary functions are to form ECM, maintain the tissue microenvironment and sustain cell growth. Specifically, in the last stages of wound healing, they are involved in wound contraction, ECM remodelling by proteases such as matrix metalloproteinases (MMPs) and in the substitution of type III collagen for type I collagen (Fig. 1) [1,6].

Wound healing in radiotherapy

Ionizing radiation exposure can induce a variety of cellular death processes, such as apoptosis. Even though this therapy is used to kill cancer cells, it also damages nearby healthy cells, leading to acute and chronic side effects such as excessive scarring [9]. The main difference between radiation injury during fractionated radiotherapy and a ‘normal’ wound is the repetition of the injury induced by each fraction of irradiation that finally induces different stages of acute and late effects according to tissue type and its intrinsic radio sensitivity. As such, at the end of the treatment, irradiated tissue is profoundly different from non-irradiated tissue. In fact, following radiotherapy, radiation-induced inflammatory reaction may impact radiation response by increasing endothelial dysfunction and levels of cytokines or growth factors such as TGF β [10]. The overexpression of TGF β in irradiated tissues has been suggested to induce fibroblast proliferation and differentiation [11]. In irradiated patients, ionizing radiation exposure of health tissues is associated with an increase of type I and III collagen synthesis and density, an alteration of ECM remodelling by MMPs and sequential activation of growth factors, including TGF β itself (Fig. 2). Such deregulation following radiotherapy can also be accountable for complications appearing several decades later. It is worth to note that the involved molecular pathways are common with mechanisms underlying other fibrotic responses [12].

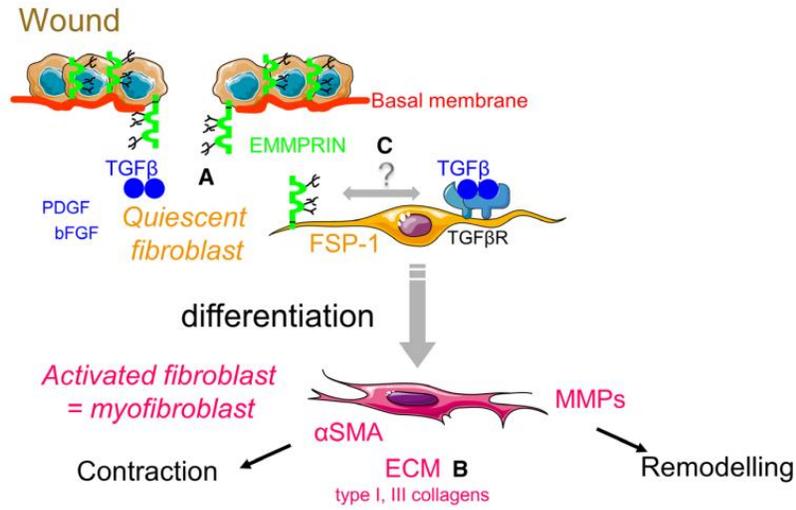


Fig. 1. Normal wound healing. (A) Injuries which cause basal membrane disruption would lead to stromal–epithelial interactions and release of growth factor such as PDGF, bFGF or TGFβ, inducing fibroblast migration, proliferation and differentiation from quiescent (FSP-1 positive) to activated (αSMA positive) fibroblast. (B) Such activated fibroblasts are named myofibroblasts due to their expression of αSMA and their wound contraction abilities. TGFβ is well known as a potent inducer of fibroblast differentiation as it allows αSMA and ECM molecules expression. In addition to its MMP inducing activity, EMMPRIN can also trigger fibroblast differentiation and αSMA expression. (C) Since EMMPRIN and TGFβ receptors are both expressed at the fibroblasts plasma membrane, it is tempting to speculate on their possible interactions.

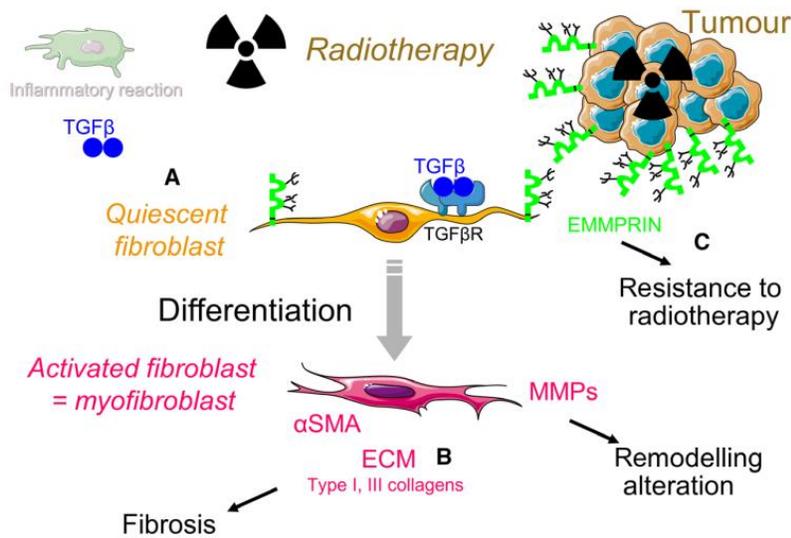


Fig. 2. Wound healing in radiotherapy. (A) After fractionated radiotherapy, the inflammatory reaction induces TGFβ overexpression and, consequently, fibroblast proliferation and differentiation from quiescent cells to myofibroblasts. (B) The continuous TGFβ release is suggested to be responsible of the increase in type I and III collagen synthesis and density, as well as in the alteration of ECM remodelling by MMPs, common mechanisms found with other fibrosis responses. (C) Resistance to radiotherapy has been associated with unfavourable clinical outcomes and EMMPRIN overexpression by cancer cells.

The fibrotic response

The inappropriate repair of connective tissue is defined pathologically as fibrosis. This process is increasingly

recognized as an important feature of many chronic diseases [2]. Fibrosis can affect virtually every organ system, most notably the lung, liver, kidney, heart, blood vessels, vascular, skin or eye. Many of the key

morphological features of fibrosis affecting these organs are similar to those of normal scarring. Traditionally, fibrosis has been viewed as an irreversible, end-stage sequel to multiple diverse disease processes. Typical examples include skin and soft tissue scarring and contraction after burn, hypertrophic scars, keloids after physical injury [13], pulmonary fibrosis, skin fibrosis myelofibrosis after radiation, cardiac fibrosis post-myocardial infarction, brain scarring post-stroke [14], systemic sclerosis, chronic graft versus host disease [15], retroperitoneal fibrosis, asthma, sarcoidosis, atherosclerosis, inflammation, schistosomiasis or hepatitis C-associated cirrhosis and HIV-associated lymphoid fibrosis [16]. The pathogenesis of fibrosis remains poorly understood but it generally involves a 'fibrogenic cascade' involving multiple molecular pathways and cellular targets [17]. The role of inflammation in this process has been historically highlighted, providing the rationale for considering anti-inflammatory or immunosuppressive therapies in fibrotic disease. However, it has become increasingly evident that these types of interventions are generally ineffective [18]. The lack of effective treatments, and the high mortality and increasing morbidity attributed to chronic fibrotic diseases, has stimulated research on the cellular, molecular and genetic basis of fibrosis [18]. One of the ways fibrotic progression can be simply assessed is through the measurement of type I/type III collagen ratio and change in such ratios has been reported in fibrosis that follows radiation therapy for cancer [19].

Cancer wound healing

Similarities are known to exist between wound healing and carcinogenesis [3,4]. Indeed, during the initial phase of tumour development, the basal membrane surrounding tumour cells is rapidly degraded by proteinases such as MMPs that are secreted either by cancer or stromal cells. The loss of this physical barrier allows the contacts of tumour cells with stroma, leading to interactions reminiscent of stromal-epithelial interactions found in wound healing [20]. Such stromal-epithelial interactions are crucial for maintaining functional differentiation and growth/quiescence of organ homeostasis, whereas their deregulation plays a critical role in the initiation and promotion of carcinogenesis [21]. Aberrant interactions between cancer cells and its microenvironment significantly change the composition of the stroma and contribute to the progression of several human cancers including that of the prostate, breast and ovary [22–25]. The tumour microenvironment includes a mixture of resident

fibroblasts, myofibroblasts, endothelial cells as well as innate and adoptive immune cells embedded within the ECM [26]. Apart from direct cell contacts, stromal-epithelial interactions are influenced by soluble factors such as cytokines (IL-6), growth factors (TGF β), hormones, ECM molecules or extracellular vesicles (EVs) [27–31]. EVs refers to microvesicles, exosomes or even oncosomes and are involved in communications between cancer cells themselves but also between cancer cells and cells from the microenvironment. Recently EVs were shown to actively organizing the ECM and to interact with the ECM molecules. They are now considered as components of the ECM [32]. EVs represent promising diagnostic and therapeutic tools in cancer since they have also been involved in radio- or chemotherapies and resistance to treatment [33].

All those different nodes of communication between tumour cells and the microenvironment are expressed both by tumour and stromal cells and lead to a global increase in ECM remodelling by MMPs, angiogenesis, protease activity and immune cell infiltration. Over the last decades, tumour stroma has gained a lot of interest because of its potential as a therapeutic target and its role in the resistance of tumours to therapy (Fig. 3). The latter is conferred by altered oxygen availability, environmental acidity and ECM protein content around tumour cells, thus creating a barrier that prevents delivery of therapeutic molecules but allows metastasis [22,23]. Targeting various components of the tumour stroma represents an alternative approach which is radically different traditional therapies that target cancer cells. Consequently, the modulation of the crosstalk between cancer and stromal cells are being tested in clinical trials for several drugs such as Src kinase or TGF β inhibitors, or angiogenesis inhibitors against the vascular endothelial growth factor receptor [29].

Reactive stroma in normal and cancer wound healing

Stroma is traditionally perceived as a connective tissue consisting of type I collagen and fibroblasts. However, it is closely associated with other ECM components such as fibronectin, laminin, MMPs and glycosaminoglycans [34]. This tissue is found in a very large number of organs where it plays a major role during embryonic development and tissue homeostasis. The stromal-epithelial interactions occurring during embryonic development favour the structural and spatial organization of tissues in respect to their surrounding structures and participate in the temporal regulation of genes expressed at different phases of the process [35].

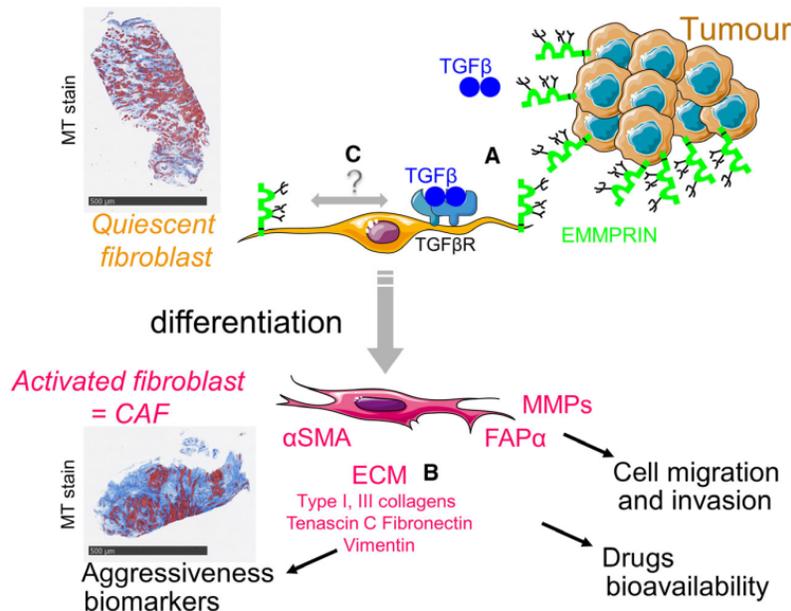


Fig. 3. Cancer wound healing. (A) After basal membrane disruption, contacts between tumour cells and fibroblasts occur both through EMMPRIN and TGF β , thus leading to fibroblast differentiation from quiescent to activated cells, referred to as CAF. Such modifications in stroma nature can be evidenced by MT as displayed by the two histological staining performed on malign and benign prostate biopsies obtained from the same patient. Stromal alterations can be revealed by change in the aniline blue staining which can be of prognostic value in patients with highly aggressive cancer. (B) Stromal–epithelial interactions involve a wide range of tumour-promoting effects such as FAP α and MMP stimulations by CAF allowing cancer cell migration and invasion. As evidenced by MT staining, ECM protein expressions increase within the tumour stroma, thus participating to tumour growth and metastasis as well as to drug resistance. (C) As for normal wound healing (Fig. 1), it is tempting to speculate on possible interactions between EMMPRIN and TGF β receptors in fibroblasts. Hampering such interactions could represent a promising mode of control in fibroblast activation, a key process in fibrosis and tumour stroma formation. Scale bar = 500 μ m.

Stroma is also an important player in tissue homeostasis since it contributes to the regulation of epithelial and stromal cells growth and differentiation as well as to ECM turnover [35].

To understand the importance of the stroma in tumour development, it is essential to understand the differences between ‘normal’ stroma and reactive stroma found at the periphery of the tumour tissue (Figs 1 and 3). For example, stroma found within a breast carcinoma is profoundly different from the stroma of the normal mammary gland [36]. Healthy stroma contains a limited number of fibroblasts, most often in a quiescent state and characterized by the expression of FSP-1 [8]. This is associated with a physiological ECM consisting of fibrous proteins such as type I collagen and organized into a controlled and loose fibrillar network that incorporates low amounts of MMPs [6,34]. In contrast, tumour stroma is associated with ECM rich in type I and type III collagens, MMPs and fibrous proteins such as fibronectin (Fig. 3). Those types of collagen dominate the tumour microenvironment and are procarcinogenic by

regulating tumour density and stiffness [37–39]. Increased density of type I collagen in tumour stroma is associated with decreased dispersion of anticancer drugs within the tumour that reduced their bioavailability and attenuates their absorption by tumour cells, thus diminishing their therapeutic effect [40]. In addition, collagen fibres within the tumour stroma are organized differently compared to healthy tissue. For example, in pancreatic cancer, collagen fibres are arranged in a long linear network that forms ‘paths’ for the rapid migration of tumour cells to the nearest blood vessels [40,41]. Tenascin C, an ECM glycoprotein that is constitutively expressed by fibroblasts within the tumour stroma, has been shown to correlate with tumour invasiveness. Tenascin C and type I collagen were found to form similar tubular ‘network’ structures for tumour cell invasion [42]. Fibronectin is another ECM glycoprotein that is synthesized predominantly by fibroblasts and is abundant in most connective tissues [43,44]. Fibronectin is involved in regulation of cell adhesion, migration and differentiation by interacting with specific cell receptors such as

integrins and proteoglycans. Like type I collagen, fibronectin density is increased within the tumour stroma and correlates with an increase in tumour growth and malignant cell dispersion as well as with decreased responses to anti-inflammatory substances [45,46]. Different fibronectin isoforms can be synthesized through the alternative splicing of three regions (ED-A, ED-B and IIICS) of the primary transcript. The expression level of the ED-B isoform is relatively low in normal adult tissues, but high expression levels can be found in fetal and tumour tissues particularly during angiogenesis [47]. Fibronectin isoforms can also be used as prognostic indicators: the presence of the ED-A isoform in urine is associated with poor prognosis in patients with bladder cancer [48].

There is no one single, predefined tumour stroma since its compositions and quantity of its components differ depending on the type of tumour studied. Some breast, pancreas and stomach carcinomas primarily consist of stroma that is rich in elastic and collagen fibres forming up to 90% of the tumour mass, while others, e.g. bone marrow tumours, have very little stroma that is heavily infiltrated by lymphocytes [49]. Even though numerous studies suggest that alterations in tumour stroma are associated with poor cancer progression, no specific stromal markers have been found to strongly predict clinical outcome. However, tumour tissue can be grossly evaluated with stains such as Masson's trichrome (MT) stain [50]. Such coarse quantification of stromal alterations could be an informative marker of cancer progression (Fig. 3) and could have prognostic value in patients with highly aggressive cancer [25,51].

Stromal-epithelial interactions are involved in a wide range of tumour-promoting effects, most notably the stimulation of several proteinases by stromal fibroblasts. Stroma remodelling can be mediated by several MMPs such as interstitial collagenase (MMP-1), collagenase 3 (MMP-13), stromelysin 1 (MMP-3), gelatinases A and B (MMP-2, -9) or MT1-MMP (MMP-14). Such proteolytic enzymes of ECM proteins can regulate cell behaviour in normal and tumour stroma by remodelling ECM proteins and by regulating the activation and activity of several growth factors or cytokines such as TGF β , IL-1 and IL-6, as well as their bioavailability [52,53]. During the wound healing process, MMPs facilitate cell migration or wound remodelling. However, these proteolytic enzymes must be tightly controlled by their natural inhibitors, the tissue inhibitor of matrix proteinases (TIMPs), the lack of which results in MMP overactivity, as is the case in chronic wounds [54]. Increased MMP activity is also a common feature observed in

carcinogenesis, leading to primary tumour invasion and metastasis [55,56]. Even though differences in ECM proteins and remodelling enzymes can be distinguished in the tumour stroma, the most important feature is a large number of activated fibroblasts that predominate over quiescent fibroblasts as compared to normal stroma [42].

Fibroblast activation and TGF β

Wound repair can be characterized by the activation and differentiation of quiescent fibroblasts into myofibroblasts, a key event in wound healing allowing ECM remodelling and wound contraction [57]. Both *in vitro* and *in vivo*, fibroblast differentiation into myofibroblast can be monitored by the expression of alpha smooth muscle actin (α SMA), the actin isoform typical of vascular smooth muscle cells [58]. The presence of α SMA stress fibres characterizes myofibroblasts and is related to their contractile propriety since a direct correlation could have been demonstrated between α SMA expression and ECM contraction. By stimulating α SMA expression in fibroblasts, TGF β is considered to be the major factor contributing to their differentiation into myofibroblasts [59]. Through receptor binding, TGF β triggers a cascade of signalling events that lead to the phosphorylation of Smad proteins and their translocation to the nucleus where they regulate the expression of targeted genes [60]. TGF β -dependent fibroblast activation results in morphological changes and deregulations of their functions through changes in the expression of several proteins. One such major change is the induction of α SMA expression by fibroblasts, which consequently acquire contractile properties similar to smooth muscle cells. TGF β -activated fibroblasts in turn synthesize a set of factors such as Tenascin C and hepatocyte growth factor, which will promote tumour cell migration and invasion [61,62].

In addition to upregulating α SMA expression, TGF β is also well known as a potent stimulator of connective tissue formation. TGF β controls both the expression of ECM proteins, including fibronectin or type I and III collagens, and the expression of proteinase inhibitors, including TIMPs or plasminogen activator inhibitor-1 [63]. Conversely, connective tissue turnover and remodelling are controlled by the activity of proteolytic enzymes such as MMPs. Therefore, the outcome of the healing process, whether normal, hypertrophic or ulcerated, will be dictated by the balance between ECM formation and deposition by growth factors like TGF β and its degradation by MMPs. Moreover, in addition to its effect on ECM

proteins and protease inhibitors synthesis, TGF β can also regulate the expression of several MMPs. TGF β has been shown to inhibit the synthesis of interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) and to increase MMP-2 (gelatinase A) or MMP-9 (gelatinase B) expression in different cell types [63]. Some MMPs such as MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP are also involved in the processing of TGF β from its latent form to the active one, hence demonstrating a complex interplay between ECM formation and degradation. Consequently, since myofibroblasts are considered as key cells for the connective tissue remodelling associated with wound healing, it would be expected that they encompassed an elaborate equipment to control ECM formation and turnover in a refined way (Fig. 1).

Stroma cells with differentiated myofibroblast phenotypes are also found in primary and metastatic carcinoma tumours, where it is believed that they play a central role in cancer cell growth, proliferation and metastatic conversion [51,57]. These fibroblastic cells adjacent to neoplastic cell nests express significant amounts of α SMA, are the most abundant type found in tumour stroma (almost 50% of the cell population in tumour tissues) and are normally referred to as cancer-associated fibroblasts (CAFs) [64]. Exposure to growth factors or chemokines/cytokines transforms resident fibroblasts into CAFs through the acquisition of mesenchymal properties, which is commonly termed mesenchymal-to-mesenchymal transition. Those cells may be involved in the resistance of malignant cells to therapeutic agents [65].

Cancer-associated fibroblasts are characterized by the expression of several proteins such as α SMA and other common fibroblast markers like vimentin, Tenascin C and fibroblast activation protein alpha (FAP α or seprase), a homodimeric integral membrane gelatinase involved in ECM remodelling, tumour growth and metastasis [66,67]. FAP α possesses two peptidase activities: a dipeptidyl-peptidase activity, specific for N-terminal Xaa-(Pro/Ala) sequences, and an endopeptidase activity. Currently, not much is known about the regulation of its expression in cancer. TGF β , 12-*o*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate or retinoic acid were shown to increase its expression [68]. Although the physiologic substrates of FAP α have yet to be fully determined, it has been proposed that FAP α plays a role in matrix invasion through the degradation of gelatine and denatured type I collagen including MMP-1-cleaved type I collagen. Recently, it has been shown that cancer cell migrates on elongated protrusions of fibroblasts within the ECM [69]. Since FAP α is a transmembrane proteinase, it is tempting to

speculate that it can allow such cancer cell migration on fibroblast scaffold.

In patient biopsies, CAFs can be distinguished from other cell types by their co-expression of vimentin and α SMA without expression of calponin as well as by the expression of PDGF receptor [51]. CAF presence is considered to be a response of the host cells to inductive stimuli exerted by tumour cells, which in return actively participate in disease progression by secreting proteolytic enzymes like MMPs, thus promoting tumour invasion and metastasis (Fig. 3). It is currently postulated that an important proportion of these enzymes is produced by stromal myofibroblasts as part of the host response to tumour presence. ECM metalloproteinase inducer (EMMPRIN), a membrane glycoprotein significantly enriched on the surface of tumour cells, has been shown to stimulate the synthesis of MMPs in fibroblasts [70].

Dual role of EMMPRIN in stroma activation

The major function of MMPs has always been considered to be ECM degradation as part of normal tissue remodelling [52,71]. In physiological conditions, MMPs are only expressed when needed and, under pathological circumstances, their aberrant expression is often noticed [72]. Consequently, tight regulation is required to maintain the proper turnover of ECM and involved numerous physiological regulators including soluble factors such as cytokines, growth factors and hormones. However, the identification of transmembrane glycoprotein inducing MMP expression, EMMPRIN, revealed a new mechanism of MMP regulation through direct cell-cell interactions [70]. Since EMMPRIN is particularly enriched in tumour cells at the plasma membrane, its functional role was at first limited to cancer progression due to its MMP induction ability (Fig. 3). However, recent studies have evidenced a broader involvement of EMMPRIN in many physiopathological situations where deregulated tissue degradation occurs through deregulated MMP activities [21,73]. EMMPRIN overexpression is also associated with tumour radio-resistance (Fig. 2) and can be considered as an adverse predictor of clinical outcome [74,75].

Extracellular matrix metalloproteinase inducer, also named basigin or CD147, belongs to the immunoglobulin super family and is expressed at the plasma membrane of numerous cell type including epithelial cells and fibroblasts [72,73]. It is a single-pass type I membrane protein composed of two C2-like immunoglobulin domains, a transmembrane domain and a short

cytoplasmic tail. Three conserved *N*-glycosylation sites, with variable glycosylation states, are present in the N-terminal extracellular region. Whether EMMPRIN is glycosylated determines its MMP stimulating activity with the non-glycosylated form of EMMPRIN unable to induce MMPs and even antagonizing the activity of the native glycosylated form. In the transmembrane domain, a sequence of 29 amino acids is highly conserved among several species including human, chicken and mouse, thus indicating the importance of this region for EMMPRIN functions. One glutamic acid, a charged amino acid, and leucine zipper-like sequences have also been evidenced within the hydrophobic stretch of the transmembrane domain, suggesting that interactions with other transmembrane proteins could occur through this specific intramembrane site [76].

Until the discovery of EMMPRIN, soluble paracrine mediators such as cytokines and growth factors were considered as the major regulators of MMP expression. EMMPRIN has been shown to stimulate the production of almost all MMPs but has no effect on their physiological inhibitors, the TIMPs [73]. Furthermore, EMMPRIN modifies the proteolytic balance not only by increasing MMPs production but also by modulating their activation, since MMPs-14 and -15, two membrane type MMPs, expression can be up-regulated by EMMPRIN, thus leading to the activation of other MMPs such as MMP-2 [77,78]. In fibroblasts, EMMPRIN induction of MMPs involves the regulation at the mRNA level through the mitogen activated protein kinase p38 signalling pathway since SB203580, a p38 inhibitor, can block MMP-1 stimulation [79]. However, other studies have evidenced the implications of phospholipase A2 and 5-lipoxygenase in the induction of MMP-2. The different signalling pathways used by EMMPRIN to regulate MMP expressions remains to be determined [80].

Extracellular matrix metalloproteinase inducer has also been suggested to play an important function in cell differentiation due to the developmental defects observed in the knockout mice. Several studies in different biological systems could also support such an involvement in cell differentiation [76,81,82]. In many epithelia, including the epidermis, the actively differentiating basal cells exhibit a particularly strong and constitutive expression of EMMPRIN, whereas in the superficial terminally differentiated cells, a weak expression could be seen [83]. Increased EMMPRIN expression, with a parallel MMP stimulation, is also noticed when human monocytes differentiate into macrophages.

Recent studies have also shown the involvement of EMMPRIN in α SMA expression and myofibroblast

differentiation [84,85] and an age-associated increased expression in cardiac tissue [86]. Altogether, these data expand on the known functions of EMMPRIN and suggest that stromal EMMPRIN is an important regulator of fibroblast activation that may represent an interesting therapeutic target (see following section). In fact, EMMPRIN was shown to actively participate in myofibroblasts differentiation (Fig. 1). Increasing EMMPRIN expression by adding exogenous recombinant EMMPRIN or by cDNA transfection results in the stimulation of α SMA expression [84]. Using the same conditions, EMMPRIN also increased the contractile properties of fibroblasts as shown by the augmented contraction of collagen lattices and by the appearance of α SMA stress fibres using immunohistochemical analysis. Additionally, EMMPRIN and α SMA have been demonstrated to colocalize within to the same cells in the stroma of pathological tissues, confirming the implication of EMMPRIN in myofibroblasts differentiation *in vivo* [84].

Altogether these data suggest a dual function of EMMPRIN during normal wound healing (Fig. 1) or tumour stroma formation (Fig. 3) since EMMPRIN can regulate the degradative potential of activated fibroblasts and can also influence the contractile phenotype of these activated cells in an MMP-independent manner. Other studies in EMMPRIN knockout mice have shown that EMMPRIN inhibition correlated with a strong reduction of MMP expression during tissue repair following injury [21,87,88]. This effect can be partially explained by the absence of EMMPRIN which is known to be involved in MMP induction. However, cytokines and growth factors released from the damaged epithelium such as TGF β should still induce MMP expression. Based on all these observations, it is tempting to suggest that EMMPRIN could play a role in the action and activities of such cytokines and growth factors and that tumour cells could use EMMPRIN-related pathways in order to signal neighbouring fibroblasts towards differentiation to myofibroblasts and MMP secretion.

Therapeutic targets and concluding remarks

Stroma in normal wound healing and cancer share many characteristics and similar pathways appear to be implicated. Stroma in both contexts contains activated fibroblasts within a complex ECM (Figs 1 and 3). In normal tissue, these components maintain the tissue microenvironment and sustain cell growth in various ways with spatial and temporal self-limitations.

In tumour stroma, fibroblast activities promote tumour progression and impede response to therapy. Abnormal wound healing can also occur in cancer patient after radiation therapy. A better understanding of the different mediators involved in stroma activation such TGF β or EMMPRIN during this physiopathological process could lead to the development of new therapies for controlling stroma activation in physiopathological wound healing and cancer.

Transforming growth factor beta is considered as the main inducer of fibroblast activation that occurs in wound healing, tumour initiation and progression. After binding to its receptors, TGF β induces signalling pathways leading to the upregulation of targeted genes such as α SMA [59,89]. The expression of α SMA has also been shown to be controlled by EMMPRIN. Moreover, fibroblasts lacking EMMPRIN (siRNA) are less responsive to TGF β and do not differentiate into fully activated cells since their α SMA level is reduced [84]. As EMMPRIN and TGF β receptors are transmembrane proteins expressed at the extracellular surface of fibroblasts, one would expect that these proteins could interact and, therefore, regulate intracellular signalling pathways leading to fibroblast activation. This activation is a key process in fibrosis and tumour stroma formation and could potentially be inhibited by modulating EMMPRIN and TGF β receptor interactions.

Additional research aiming at identifying specific markers for activated fibroblasts could also facilitate the development of targeted therapies that control fibroblast activation and limit their activity in fibrosis or in cancer proliferation and metastasis. Such new biomarkers, with the help of imaging technology [90], could also help to better differentiate indolent cancer from metastatic, aggressive and lethal tumours.

Acknowledgements

We acknowledge the support of University College London for supporting the work of HW and VS.

Conflicts of interest

The authors confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Author contributions

EH, CJ, HQN, YB, ADLT, VS and HW wrote the review and EH prepared the figures.

References

- Clark R (1988) *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Springer, New York, NY.
- Varga J, Brenner DA & Phan SH, editors (2005) *Fibrosis Research: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Haddow A (1972) Molecular repair, wound healing, and carcinogenesis: tumor production a possible overheating? *Adv Cancer Res* **16**, 181–234.
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* **315**, 1650–1659.
- Lu P, Weaver VM & Werb Z (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* **196**, 395–406.
- Tracy LE, Minasian RA & Catterson EJ (2016) Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **5**, 119–136.
- Ferguson MWJ & O’Kane S (2004) Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 839–850.
- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE & Neilson EG (1995) Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* **130**, 393–405.
- Nguyen HQ, To NH, Zadigue P, Kerbrat S, De La Taille A, Le Gouvello S & Belkacemi Y (2018) Ionizing radiation-induced cellular senescence promotes tissue fibrosis after radiotherapy. A review. *Crit Rev Oncol Hematol* **129**, 13–26.
- Di Maggio FM, Minafra L, Forte GI, Cammarata FP, Lio D, Messa C, Gilardi MC & Bravatà V (2015) Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment. *J Inflamm (Lond)* **12**, 14.
- Rodemann HP & Bamberg M (1995) Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* **35**, 83–90.
- Yarnold J & Brotons M-CV (2010) Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol* **97**, 149–161.
- Weiskirchen R, Weiskirchen S & Tacke F (2018) Organ and tissue fibrosis: molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med* **65**, 2–15.
- Talman V & Ruskoaho H (2016) Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res* **365**, 563–581.
- Brown M & O’Reilly S (2019) The immunopathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* **195**, 310–321.
- Capobianco A, Cottone L, Monno A, Manfredi AA & Rovere-Querini P (2017) The peritoneum: healing, immunity, and diseases. *J Pathol* **243**, 137–147.

- 17 Rinkevich Y, Walmsley GG, Hu MS, Maan ZN, Newman AM, Drukker M, Januszyk M, Krampitz GW, Gurtner GC, Lorenz HP *et al.* (2015) Skin fibrosis. Identification and isolation of a dermal lineage with intrinsic fibrogenic potential. *Science* **348**, aaa2151.
- 18 Stramer BM, Mori R & Martin P (2007) The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol* **127**, 1009–1017.
- 19 Followill DS & Travis EL (1995) Differential expression of collagen types I and III in consequential and primary fibrosis in irradiated mouse colon. *Radiat Res* **144**, 318–328.
- 20 De Wever O & Mareel M (2003) Role of tissue stroma in cancer cell invasion: stroma and cancer invasion. *J Pathol* **200**, 429–447.
- 21 Gabison EE, Huet E, Baudouin C & Menashi S (2009) Direct epithelial-stromal interaction in corneal wound healing: role of EMMPRIN/CD147 in MMPs induction and beyond. *Prog Retin Eye Res* **28**, 19–33.
- 22 Barron DA & Rowley DR (2012) The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* **19**, R187–R204.
- 23 Hansen JM, Coleman RL & Sood AK (2016) Targeting the tumour microenvironment in ovarian cancer. *Eur J Cancer* **56**, 131–143.
- 24 Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, Pelon F, Bourachot B, Cardon M, Sirven P, Magagna I, Fuhrmann L, Bernard C *et al.* (2018) Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. *Cancer Cell* **33**, 463–479.e10.
- 25 McKenney JK, Wei W, Hawley S, Auman H, Newcomb LF, Boyer HD, Fazli L, Simko J, Hurtado-Coll A, Troyer DA *et al.* (2016) Histologic grading of prostatic adenocarcinoma can be further optimized: analysis of the relative prognostic strength of individual architectural patterns in 1275 Patients from the canary retrospective cohort. *Am J Surg Pathol* **40**, 1439–1456.
- 26 Pietras K & Östman A (2010) Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* **316**, 1324–1331.
- 27 Brooks SA, Lomax-Browne HJ, Carter TM, Kinch CE & Hall DMS (2010) Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* **112**, 3–25.
- 28 Theocharis AD & Karamanos NK (2019) Proteoglycans remodeling in cancer: underlying molecular mechanisms. *Matrix Biol* **75-76**, 220–259.
- 29 Najafi M, Goradel NH, Farhood B, Salehi E, Solhjo S, Toolee H, Kharazinejad E & Mortezaee K (2018) Tumor microenvironment: interactions and therapy. *J Cell Physiol* **234**, 5700–5721.
- 30 O’Loughlin A (2017) Role for extracellular vesicles in the tumour microenvironment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **373**, 20160488.
- 31 Maquart F-X, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W & Monboisse J-C (2004) An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity: implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**, 199–202.
- 32 Rilla K, Mustonen A-M, Arasu UT, Härkönen K, Matilainen J & Nieminen P (2017) Extracellular vesicles are integral and functional components of the extracellular matrix. *Matrix Biol* **75-76**, 201–219.
- 33 Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW & Simpson RJ (2018) Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 617–638.
- 34 Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C & Karamanos NK (2016) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* **97**, 4–27.
- 35 Shtilbans V (2013) Role of stromal-epithelial interaction in the formation and development of cancer cells. *Cancer Microenviron* **6**, 193–202.
- 36 Bhowmick NA, Neilson EG & Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**, 332–337.
- 37 Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SFT, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W *et al.* (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* **139**, 891–906.
- 38 Barcus CE, O’Leary KA, Brockman JL, Rugowski DE, Liu Y, Garcia N, Yu M, Keely PJ, Eliceiri KW & Schuler LA (2017) Elevated collagen-I augments tumor progressive signals, intravasation and metastasis of prolactin-induced estrogen receptor alpha positive mammary tumor cells. *Breast Cancer Res* **19**, 19.
- 39 Mah EJ, McGahey GE, Yee AF & Digman MA (2018) Collagen stiffness modulates MDA-MB231 cell metabolism through adhesion-mediated contractility. *bioRxiv* [Preprint].
- 40 Walsh AJ, Cook RS, Lee JH, Arteaga CL & Skala MC (2015) Collagen density and alignment in responsive and resistant trastuzumab-treated breast cancer xenografts. *J Biomed Opt* **20**, 26004.
- 41 Shields MA, Dangi-Garimella S, Redig AJ & Munshi HG (2012) Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression. *Biochem J* **441**, 541–552.
- 42 Kalluri R & Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 392–401.
- 43 Guan JL, Trevithick JE & Hynes RO (1990) Retroviral expression of alternatively spliced forms of rat fibronectin. *J Cell Biol* **110**, 833–847.
- 44 Humphries MJ, Obara M, Olden K & Yamada KM (1989) Role of fibronectin in adhesion, migration, and metastasis. *Cancer Invest* **7**, 373–393.
- 45 Han S, Khuri FR & Roman J (2006) Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth

- through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res* **66**, 315–323.
- 46 Wang JP & Hielscher A (2017) Fibronectin: how its aberrant expression in tumors may improve therapeutic targeting. *J Cancer* **8**, 674–682.
 - 47 Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G & Zardi L (1994) The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer* **59**, 612–618.
 - 48 Arnold SA, Loomans HA, Ketova T, Andl CD, Clark PE & Zijlstra A (2016) Urinary oncofetal ED-A fibronectin correlates with poor prognosis in patients with bladder cancer. *Clin Exp Metastasis* **33**, 29–44.
 - 49 Witz IP & Levy-Nissenbaum O (2006) The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett* **242**, 1–10.
 - 50 Ayala G, Tuxhorn JA, Wheeler TM, Frolov A, Scardino PT, Ohori M, Wheeler M, Spitzer J & Rowley DR (2003) Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 4792–4801.
 - 51 Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD & Rowley DR (2002) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* **8**, 2912–2923.
 - 52 Sternlicht MD & Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 463–516.
 - 53 Kessenbrock K, Wang C-Y & Werb Z (2015) Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol* **44–46**, 184–190.
 - 54 Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G & Schultz G (1999) Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* **7**, 442–452.
 - 55 Martin TA, Ye L, Sanders AJ, Lane J & Jiang WG (2013) Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. Landes Bioscience, Austin, TX.
 - 56 Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, Thompson SK, Zollo M, Spano D, Dhawan P et al. (2015) Tissue invasion and metastasis: molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol* **35**, S244–S275.
 - 57 Darby IA, Zakuan N, Billet F & Desmoulière A (2016) The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci* **73**, 1145–1157.
 - 58 Hinz B (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* **127**, 526–537.
 - 59 Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F & Gabbiani G (1993) Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **122**, 103–111.
 - 60 Verrecchia F & Mauviel A (2007) Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* **13**, 3056–3062.
 - 61 De Wever O, Nguyen Q-D, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C & Mareel M (2004) Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts *in vitro* provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J* **18**, 1016–1018.
 - 62 De Wever O, Westbroek W, Verloes A, Bloemen N, Bracke M, Gespach C, Bruyneel E & Mareel M (2004) Critical role of N-cadherin in myofibroblast invasion and migration *in vitro* stimulated by colon-cancer-cell-derived TGF-beta or wounding. *J Cell Sci* **117**, 4691–4703.
 - 63 Verrecchia F & Mauviel A (2002) Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* **118**, 211–215.
 - 64 Desmoulière A, Guyot C & Gabbiani G (2004) The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* **48**, 509–517.
 - 65 Paraiso KHT & Smalley KSM (2013) Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol* **85**, 1033–1041.
 - 66 Garin-Chesa P, Old LJ & Rettig WJ (1990) Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 7235–7239.
 - 67 O'Brien P & O'Connor BF (2008) Seprase: an overview of an important matrix serine protease. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 1130–1145.
 - 68 Zi F, He J, He D, Li Y, Yang L & Cai Z (2015) Fibroblast activation protein α in tumor microenvironment: recent progression and implications (review). *Mol Med Rep* **11**, 3203–3211.
 - 69 Miyazaki K, Oyanagi J, Hoshino D, Togo S, Kumagai H & Miyagi Y (2019) Cancer cell migration on elongate protrusions of fibroblasts in collagen matrix. *Sci Rep* **9**, 292.
 - 70 Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H & Nabeshima K (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* **55**, 434–439.
 - 71 Nagase H, Visse R & Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* **69**, 562–573.
 - 72 Huet E, Gabison EE, Mourah S & Menashi S (2008) Role of emmprin/CD147 in tissue remodeling. *Connect Tissue Res* **49**, 175–179.

- 73 Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A & Menashi S (2005) EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie* **87**, 361–368.
- 74 Ju X-Z, Yang J-M, Zhou X-Y, Li Z-T & Wu X-H (2008) EMMPRIN expression as a prognostic factor in radiotherapy of cervical cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 494–501.
- 75 Huang X-Q, Chen X, Xie X-X, Zhou Q, Li K, Li S, Shen L-F & Su J (2014) Co-expression of CD147 and GLUT-1 indicates radiation resistance and poor prognosis in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 1651–1666.
- 76 Muramatsu T & Miyauchi T (2003) Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* **18**, 981–987.
- 77 Sameshima T, Nabeshima K, Toole BP, Yokogami K, Okada Y, Goya T, Koono M & Wakisaka S (2000) Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. *Cancer Lett* **157**, 177–184.
- 78 Sier CFM, Zuidwijk K, Zijlmans HJMAA, Hanemaaijer R, Mulder-Stapel AA, Prins FA, Dreef EJ, Kenter GG, Fleuren GJ & Gorter A (2006) EMMPRIN-induced MMP-2 activation cascade in human cervical squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **118**, 2991–2998.
- 79 Lim M, Martinez T, Jablons D, Cameron R, Guo H, Toole B, Li J & Basbaum C (1998) Tumor-derived EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) stimulates collagenase transcription through MAPK p38. *FEBS Lett* **441**, 88–92.
- 80 Grass GD & Toole BP (2015) How, with whom and when: an overview of CD147-mediated regulatory networks influencing matrix metalloproteinase activity. *Biosci Rep* **36**, e00283.
- 81 Igakura T, Kadomatsu K, Kaname T, Muramatsu H, Fan QW, Miyauchi T, Toyama Y, Kuno N, Yuasa S, Takahashi M *et al.* (1998) A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol* **194**, 152–165.
- 82 Kuno N, Kadomatsu K, Fan QW, Hagihara M, Senda T, Mizutani S & Muramatsu T (1998) Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. *FEBS Lett* **425**, 191–194.
- 83 Huet E, Vallée B, Delbé J, Mourah S, Prulière-Escabasse V, Tremouilleres M, Kadomatsu K, Doan S, Baudouin C, Menashi S *et al.* (2011) EMMPRIN modulates epithelial barrier function through a MMP-mediated occludin cleavage: implications in dry eye disease. *Am J Pathol* **179**, 1278–1286.
- 84 Huet E, Vallée B, Szul D, Verrecchia F, Mourah S, Jester JV, Hoang-Xuan T, Menashi S & Gabison EE (2008) Extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 promotes myofibroblast differentiation by inducing alpha-smooth muscle actin expression and collagen gel contraction: implications in tissue remodeling. *FASEB J* **22**, 1144–1154.
- 85 Hasaneen NA, Cao J, Pulkoski-Gross A, Zucker S & Foda HD (2016) Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) promotes lung fibroblast proliferation, survival and differentiation to myofibroblasts. *Respir Res* **17**, 17.
- 86 Huet E, Gabison E, Vallée B, Mougnot N, Linguet G, Riou B, Jarosz C, Menashi S & Besse S (2015) Deletion of extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 induces altered cardiac extracellular matrix remodeling in aging mice. *J Physiol Pharmacol* **66**, 355–366.
- 87 Attia M, Huet E, Delbé J, Ledoux D, Menashi S & Martelly I (2011) Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN/CD147) as a novel regulator of myogenic cell differentiation. *J Cell Physiol* **226**, 141–149.
- 88 Attia M, Huet E, Gossard C, Menashi S, Tassoni M-C & Martelly I (2013) Early events of overused supraspinatus tendons involve matrix metalloproteinases and EMMPRIN/CD147 in the absence of inflammation. *Am J Sports Med* **41**, 908–917.
- 89 Shi Y & Massagué J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700.
- 90 Olivier J, Stavrinides V, Kay J, Freeman A, Pye H, Ahmed Z, Carmona Echeverria L, Heavey S, Simmons LAM, Kanthabalan A *et al.* (2018) Immunohistochemical biomarker validation in highly selective needle biopsy microarrays derived from mpMRI-characterized prostates. *Prostate* **78**, 1229–1237.

Titre : Radiosensibilité des sous-populations lymphocytaires T et sénescence radio-induite

Mots clés : radiothérapie, radiosensibilité, fibrose, sénescence, lymphocytes CCR6⁺Th17

Résumé : Environ 60 % des personnes atteintes d'un cancer auront au moins une séance de radiothérapie au cours de la prise en charge thérapeutique de leur maladie. Les doses de radiothérapie sont limitées en raison du risque important de fibrose séquellaire des tissus sains. Les rayonnements ionisants (RI) peuvent induire différents types de mort cellulaire y compris l'apoptose et la sénescence. Les cellules sénescentes ont une sensibilité réduite à l'apoptose et un phénotype sécrétoire inflammatoire. De plus, les RI peuvent induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui provoquent des lésions de l'ADN dans les tissus non ciblés, et des effets systémiques associés à l'inflammation. Différentes équipes ont proposé des tests prédictifs de la radiosensibilité individuelle des patients basés sur l'évaluation du taux d'apoptose radio-induite des lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺ (LT). Cependant, l'impact des différences de sensibilité à l'apoptose/sénescence des sous-populations de LT sur le taux d'apoptose n'a pas été étudié

Notre hypothèse est que la sensibilité à l'apoptose/sénescence radio-induite des LT circulants est associée à la sur/sous-représentation de sous-populations particulières de LT CD4⁺ dont les fonctions sont en rapport avec la survenue de fibrose. Nos résultats chez le donneur sain montrent que les LT CCR6⁺Th17 pro-fibrogéniques sont moins sensibles à l'apoptose et plus sensibles à la sénescence que les LT CCR6^{neg}Th et les Treg. Cette sénescence peut être préjudiciable via l'IL-8 et le VEGF-A que sécrètent les lymphocytes CCR6⁺Th17 qui migrent dans les tissus irradiés. La modulation des voies ERO/MAPKs ou mTOR pourrait être une cible potentielle pour la prévention de la toxicité radio-induite par les CCR6⁺Th17 sénescents. Enfin, le ratio de cellules circulantes CCR6⁺Th17 sénescentes H2A.J⁺ / CCR6⁺Treg pourrait être utilisé comme marqueur potentiel de la radiosensibilité individuelle.

Title : Radiosensitivity of CD4⁺T-lymphocyte subsets and radiation-induced senescence

Keywords : radiotherapy, radiosensitivity, fibrosis, senescence, CCR6⁺Th17 lymphocyte

Abstract: On average, 60% of cancer patients have at least one radiation session during their care throughout the history of their disease. The doses of radiotherapy are limited because of the high risk of fibrosis-type side effects of healthy tissues. Ionizing radiations can induce a variety of cell death responses including apoptosis, but also senescence. Senescent cells have reduced sensitivity to apoptosis, and a pro-inflammatory secretory phenotype. In addition, ionizing radiations can induce the production of reactive oxygen species (ROS) that cause DNA damage in non-target tissues, and systemic effects associated with inflammation. In order to improve the personalization of radiotherapy, different teams proposed predictive tests of the individual radiosensitivity of patients by establishing a relationship between a low rate of radio-induced

apoptosis of CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes (LT) and a high risk of secondary fibrosis. However, whether differences in individual cell-subpopulation sensitivity to radiation-induced senescence impact the ratio between LT cell subpopulations has not been studied. Our results on healthy donors show that pro-fibrogenic CCR6⁺ Th17 cells are less sensitive to apoptosis and more sensitive to senescence compared to CCR6^{neg} LT. This senescence can be detrimental as irradiated CCR6⁺Th17 lymphocytes secrete IL-8 and VEGF-A and can migrate in the irradiated tissues. Modulation of ROS/MAPK or mTOR signaling pathways could be potential targets for the prevention of radiation-induced toxicity by CCR6⁺Th17 senescence. Finally, the ratio of circulating H2A.J⁺ senescent CCR6⁺ Th17/CCR6⁺Treg cells may be used as a potential marker of individual radiosensitivity.

