



Identification d'une signature moléculaire et épigénétique de la sensibilité cutanée aux radiations ionisantes

Joshua Dulong

► To cite this version:

Joshua Dulong. Identification d'une signature moléculaire et épigénétique de la sensibilité cutanée aux radiations ionisantes. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1131 . tel-03325129

HAL Id: tel-03325129

<https://theses.hal.science/tel-03325129>

Submitted on 24 Aug 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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1131

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale **ED 205**

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences – Santé (EDISS)

Spécialité de doctorat :

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutenue publiquement le 20/07/2020, par :

Joshua Dulong

Identification d'une signature moléculaire et épigénétique de la sensibilité cutanée aux radiations ionisantes

Devant le jury composé de :

BALOSSO, Jacques PU - PH	Université Grenoble – Alpes	Rapporteur
BERTRAND, Pascale DR CEA	CEA	Rapporteuse
GUIPAUD, Olivier CR	IRSN	Rapporteur
ANJARD, Christophe PU	Université Claude Bernard Lyon 1	Président du jury
LAMARTINE, Jérôme PU	Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de thèse
MARTIN, Michèle DR CEA	CEA	Directrice de thèse
RODRIGUEZ-LAFRASSE, Claire PU - PH	Université Claude Bernard Lyon 1	Invitée

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury de thèse pour l'intérêt et le temps qu'ils ont accordé à ce travail. Je souhaite remercier le Professeur **Jacques Balosso**, le Docteur **Pascale Bertrand** ainsi que le Docteur **Olivier Guipaud** d'avoir accepté d'évaluer mon travail réalisé durant ces 3 années de thèse. Je tiens également à adresser mes remerciements au Professeur **Claire Rodriguez – Lafrasse** pour avoir accepté d'être membre invité de mon jury et au Professeur **Christophe Anjard** pour avoir présidé ce jury de thèse.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur **Jérôme Lamartine** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse ainsi que pour son soutien, sa rigueur scientifique et ses conseils. Merci de m'avoir accordé votre confiance et l'autonomie qui m'ont permis de m'épanouir pendant mes 3 années de thèse et de devenir le jeune chercheur que je suis aujourd'hui.

Je remercie très sincèrement le Professeur **Michèle Martin** pour m'avoir donné sa confiance afin de réaliser ce travail de thèse. Les moments d'échanges que nous avons partagé ont toujours été pour moi un puits de connaissances. Merci pour vos conseils et votre rigueur scientifique qui m'ont permis d'évoluer au cours de ces 3 années de thèse.

Je remercie également le Docteur **Gerard Benoit** et le Professeur **Claire Rodriguez – Lafrasse** pour leurs conseils avisés lors de mes comités de suivi de thèse.

Je tiens à remercier le Docteur **Alexandre Soulard** qui m'a fait découvrir la recherche en acceptant de me prendre en stage.

Je tiens à adresser mes remerciements au Docteur **Bernard Verrier** de m'avoir accueilli au sein de l'unité « Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie thérapeutique » qu'il dirige.

Merci à tous les membres de l'équipe « Fonctionnalité et Dynamique du Tissu Cutané » dirigée par le Docteur **Dominique Sigaud – Roussel**.

Merci **Dom** de m'avoir accueilli dans votre équipe et pour vos conseils durant ces 3 années de thèse. Merci aux Docteurs **Christelle Bonod, Romain Debret, Bérengère Fromy, Kiaoling Liu, Ming Lo** et **Nicolas Picard** pour tous vos conseils, vos encouragements et surtout votre sympathie.

Merci à **Géraldine Aimond** et à **Aurore Berthier** pour votre aide précieuse (vous savez où tout est rangé dans ce laboratoire, c'est impressionnant).

Merci à **Alexandre Daga** et **Sandra Ferraro** pour votre bonne humeur de tous les jours.

Merci à tous les doctorants, passés et présents. **Benjamin Sanchez** et **Cécile Guillon**, on a commencé tous les 3 ensembles, la thèse a été plus facile avec vous à côté. Plus que quelques mois de thèse pour vous, courage, ça en vaut le coup.

Merci à **Mariana Carranca** et à **Louise Griveau** pour votre bonne humeur, pour ton accent dépaysant **Mariana**, pour tes entrées dans les bureaux **Louise** et pour vos présentations de biomatériaux qui étaient des cours de chimie et physique pour moi.

Merci aux Docteurs **Charlotte Muther, Noëlle Remoué** et **Choua Ya**, la triplète infernale que j'ai connue quand elles étaient encore en thèse. Ce fut un plaisir de travailler avec vous et surtout de se voir en dehors du travail. J'ai beaucoup appris avec vous, en posant beaucoup (parfois trop, n'est-ce pas **Charlotte** ?) de questions.

Gracias Docteur **Alejandro Gonzalez Torres** por tus consejos y por darme la oportunidad de practicar mi español.

Merci tout particulièrement à **Marion Godefroy** (de Montmirail) et à **Julie Rorteau** (Saucisse), ainsi qu'au Docteur **Fabien Chevalier** (Docteur Cool). Merci pour votre soutien, votre bonne humeur, vos blagues (même si la plupart étaient très nulles), vos « Quand est-ce qu'on mange ? », vos « T'as pris ta matinée ? », vos bonbons dans le bureau, vos « On n'est pas rendu ! » et j'en oublie beaucoup. Ces années de thèse n'auraient pas été pareil sans vous et j'espère que vous viendrez me voir en Amérique du Nord.

Je remercie également la team Afterwork : **Charlotte Muther, Guillaume David, Alexis Moreno, Benjamin Sanchez, Cécile Guillon, Mariana Carranca, Louise Griveau, Julie Rorteau, Léa Conchou, Laura Prigent, David Da Costa** et **Jorgaq Pata** pour tous ces afterworks organisés.

Je tiens également à remercier tous les gens de l'institut, passés ou présents, qui ont rendu ces 3 années de thèse plus plaisantes : **Alexandre Aubert, Sophie Liot, Morgane Roussin, Arthur Louche, Jean-Baptiste Luizet, Julien Cayron, Tristan Rubio, Julie Raymond, Chloé Dias, Christophe Vroland, Veronica Zampieri...**

Merci à mes amis d'université, **Gaël Runel, Morgane Bouin, Julie Gorry, Emilie Laurent, Anne-Laurie Pinto, Joffrey Ghirardi** et **Thomas Combet** pour m'avoir sorti la tête du labo quand il y en avait besoin.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Victoria Devaux, Alban Fosse et Benjamin Lotito** pour me rappeler qu'il y a une vie en dehors de la science. Vous êtes ma famille et je vous attends en Amérique du Nord.

Merci à mes **grands-parents, Anaïs, Aurélien, Maëlle**, ma **mère** et mon **père**. Merci de votre soutien et de m'avoir laissé choisir ma voie. Merci à mes **parents** pour les valeurs que vous m'avez enseignées et qui me servent tous les jours.

Enfin, merci à **Maria Romero**, mi boquerona. Sans toi rien n'aurait été possible. Tu me donnes la force tous les jours pour avancer. J'ai hâte de voir ce que la vie nous réserve mais à tes côtés je ne pourrai qu'être heureux.

Table des matières

INTRODUCTION	29
I. Les rayons ionisants en biologie.....	31
1. Découverte des rayons ionisants	31
2. Applications médicales	33
3. Limitations de la radiothérapie	37
4. Effets secondaires en radiothérapie.....	39
5. Variation de la radiosensibilité individuelle	41
6. Conclusion.....	45
II. Radiobiologie cellulaire	47
1. Action des radiations ionisantes	47
a. Phénomènes physiques	47
b. Radiolyse de l'eau	47
c. Autres effets des rayons ionisants.....	49
2. Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)	51
a. Effets des ERO	51
b. Réduction des ERO	57
3. Dommages à l'ADN radioinduits	59
a. ADN génomique (ADNg)	59
b. Les différents dommages radioinduits de l'ADN	61
4. Voies de réparation de l'ADN.....	65
a. Cassures doubles brins (CDB)	65
i. Reconnaissance	65
ii. Réparation	67
b. Les dommages simples brins.....	71
c. Quelle voie de réparation pour quelle lésion ?	77
5. Autophagie	77
a. Mécanismes.....	77
a. Autophagie radio-induite : survie ou mort cellulaire ?	79
6. Morts cellulaires radioinduites	85
a. Apoptose	85
b. Nécrose.....	89
c. Sénescence	91
d. Catastrophe mitotique	95
7. Mécanismes de lésions tissulaires.....	95
a. Structure de la peau	97
b. Réponse tissulaire à l'irradiation ionisante.....	101

8. Conclusion.....	107
III. Mesure de la radiosensibilité individuelle	109
1. Techniques liées au cycle cellulaire	109
a. Tests de clonogénicité	109
b. Expression du gène <i>CDKN1A</i>	111
2. Taux d'Apoptose Lymphocytaire Radio-Induite (TALRI)	113
3. Tests basés sur la réparation de l'ADN	115
a. Micronoyaux.....	115
b. Cassures doubles brins	117
c. Vitesse de translocation d'ATM au noyau	119
4. Approches globales	121
a. Séquençage de l'ADN	123
i. Gène cible	123
ii. Etude d'association pangénomique	125
b. Transcriptomique	127
c. Epigénomique	129
d. Protéomique	131
e. Métabolomique	137
5. Conclusion.....	139
IV. La famille NFAT.....	141
1. Les membres NFAT	141
2. Régulation des NFATs	143
3. NFATs et stress génotoxique.....	147
4. NFATC2	147
a. NFATC2 et immunité	147
b. NFATC2 et cancer	149
OBJECTIFS DE TRAVAIL DE THESE	155
RESULTATS	161
Article 1 (In preparation):.....	163
A transcriptome and methylome analysis identifies a molecular signature of patients suffering from severe side-effects of radiotherapy	163
Article 2 (Submitted):.....	181
NFATC2 modulates radiation toxicity in dermal fibroblasts from patients with severe side-effects of radiotherapy	181
Résultats complémentaires.....	209
1. Transcriptome et méthylome des fibroblastes dermiques de patients radiosensibles..	209
a. Voies de signalisation	209
b. Profil transcriptomique et méthylomique des fibroblastes des patients radiosensibles.....	211

c. Méthylome des patients radiosensibles	213
d. Méthylation des 5 gènes signature.....	217
e. Etude de l'expression de gènes dans les fibroblastes de patients radiosensibles.....	223
2. NFATC2 et radiation ionisante	229
a. Localisation de NFATC2	229
b. NFATC2 et réparation de l'ADN.....	229
c. Les autres membres de la famille NFAT	233
3. Réponse aux dommages de l'ADN	235
4. Etude de l'autophagie radio-induite.....	237
5. Etude de la sensibilité des fibroblastes au TNF α	239
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	245
I. Approches haut débit pour étudier la radiosensibilité individuelle	247
1. Etude du méthylome et du transcriptome de patients radiosensibles.....	247
2. La signature moléculaire des patients radiosensibles	253
3. Méthylome dans la radiosensibilité individuelle	259
4. Vers une signature de la radiosensibilité individuelle ?	263
II. Les mécanismes responsables de la radiosensibilité individuelle	265
1. Identification des mécanismes cellulaires impliqués dans la radiosensibilité individuelle.....	265
2. Le rôle de NFATC2 dans la radiosensibilité individuelle	271
CONCLUSION	283
MATERIELS ET METHODES	287
I. Techniques de biologie cellulaire	289
1. Culture cellulaire.....	289
a. Cellules utilisées.....	289
b. Isolement des fibroblastes.....	292
c. Conditions de culture	295
2. Irradiation des cellules	295
3. Test de clonogénicité.....	296
4. Infection des fibroblastes dermiques	297
5. Analyse des capacités de réparation des dommages l'ADN	298
6. Traitements chimiques	298
II. Techniques de biologie moléculaire	299
1. Analyse d'expression génique.....	299
a. Extractions des ARNs.....	299

b.	RTqPCR des ARNs messagers	300
i.	Transcription inverse	300
ii.	Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR)	301
iii.	Interprétation des résultats.....	304
2.	ARN interférence.....	305
3.	Analyse de la méthylation de l'ADN génomique.....	307
a.	Extraction de l'ADN génomique	307
b.	Conversion au bisulfite	308
c.	Analyse des courbes de fusion à haute résolution (HRM PCR)	311
III.	Techniques de bioinformatique	313
1.	Analyse d'expression par séquençage de l'ARN.....	313
a.	Séquençage en paire (« paired-end »).....	313
b.	Traitement des données brutes et alignement des séquences	313
c.	Analyse des données de séquençage ARN	314
2.	Analyse de la méthylation de l'ADNg	314
IV.	Techniques de biochimie	314
1.	Extraction des protéines	314
2.	Dosage des protéines	315
3.	Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium.....	316
4.	Transfert et immuno-détection des protéines	317
5.	Co-Immunoprécipitation	319
V.	Techniques de microscopie.....	320
1.	Microscopie en fluorescence	320
2.	Observations microscopiques	322
VI.	Analyses statistiques	322
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	323
	ANNEXES	323

Liste des figures

Figure 1 : Cliché radiographique de la main d'Anna Bertha Ludwig Röntgen.....	30
Figure 2 : Effets secondaires dues à la radiothérapie.	38
Figure 3 : Chronologie de l'action des rayons ionisants.	46
Figure 4 : Représentation schématique de l'ionisation d'un atome lors de la radiothérapie.	46
Figure 5 : Schéma représentant les réactions principales lors de la radiolyse de l'eau... 48	48
Figure 6 : Représentation schématique de l'action des ERO sur les lipides..... 50	50
Figure 7 : Schéma représentant la réponse UPR. 54	54
Figure 8 : Réponse mitochondriale aux radiations ionisantes. 56	56
Figure 9 : Structure de l'ADNg..... 58	58
Figure 10 : Les différents niveaux de condensation de l'ADNg dans les cellules eucaryotes. 60	60
Figure 11 : Représentation schématique des différents types de lésions à l'ADN radio-induites. 62	62
Figure 12 : Reconnaissance des cassures doubles brins..... 64	64
Figure 13 : Représentation schématique de la réparation d'une cassure double brin complexe par le mécanisme de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)..... 66	66
Figure 14 : Réparation d'une cassure double brin en fin de phase S/début de phase G2. 68	68
Figure 15 : Réparation des cassures doubles brins par recombinaison homologue. 70	70
Figure 16 : Réparation de l'ADN par la voie d'excision de base. 72	72
Figure 17 : Schéma de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides..... 74	74
Figure 18 : Schéma du processus autophagique..... 78	78
Figure 19 : Voies de signalisation activées par les dommages de l'ADN et induisant l'autophagie..... 80	80
Figure 20 : Voies de la mitophagie..... 82	82
Figure 21 : Voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose. 86	86
Figure 22 : Résumé des événements aboutissant à l'apoptose. 88	88
Figure 23 : Schéma de la nécroptose. 90	90
Figure 24 : Voies moléculaires induisant la sénescence. 92	92
Figure 25 : Représentation schématique de la peau..... 96	96
Figure 26 : Peau humaine composée de l'épiderme et du derme..... 98	98
Figure 27 : Schéma des 4 étapes de la fibroses radioinduites..... 104	104
Figure 28 : Radiosensibilité des lymphocytes du sang périphérique mesuré par la SF2 (Fraction Survivante à 2 Gy) à l'aide d'un test de dilution limitante..... 110	110
Figure 29 : Représentation d'un micronoyau..... 114	114
Figure 30 : Théorie de l'adressage d'ATM au noyau. 118	118
Figure 31 : Structure des NFATs calcium-dépendants..... 140	140
Figure 32 : Voie de signalisation NFAT. 144	144
Figure 33 : Représentation schématique de l'activation de NFAT dans les lymphocytes T. 148	148
Figure 34 : Régulation du cycle cellulaire par NFATC2 (NFAT1)..... 150	150

Figure 35 : Régulation de l'apoptose par NFATC2.	152
Figure 36 : Les profils transcriptomique et méthylomique différencient les patients radiosensibles des individus contrôles.	210
Figure 37 : Méthylation différente entre les fibroblastes des patients radiosensibles et les individus contrôles.	212
Figure 38 : Méthylation et expression du gène GRIK2.	216
Figure 39 : Méthylation du gène LINC01615.	218
Figure 40 : Méthylation du gène ADAMTSL1.	219
Figure 41 : Méthylation du gène TNFRSF19.	220
Figure 42 : Méthylation du gène PLCE1.	221
Figure 43 : Analyse d'expression des gènes identifiés comme différentiellement exprimés chez les patients d'après le RNA seq.	222
Figure 44 : Expression après irradiation des gènes différentiellement exprimés entre les contrôles et les patients radiosensibles.	224
Figure 45 : Expression après irradiation des gènes de la signature des patients radiosensibles.	226
Figure 46 : Localisation de NFATC2 dans des fibroblastes dermiques.	228
Figure 47 : Immunoprécipitation de NFATC2 et XRCC5.	230
Figure 48 : Expression de NFATC1, NFATC3 et NFATC4 dans des fibroblastes dermiques.	232
Figure 49 : Expression de NFATC1, NFATC3 et NFATC4 dans des fibroblastes dermiques après irradiation.	232
Figure 50 : Réponse aux dommages à l'ADN.	234
Figure 51 : Autophagie en réponse à l'irradiation.	238
Figure 52 : Activation de la caspase 3 et de PARP en réponse au TNFα.	240
Figure 53 : Cassures double brin de l'ADN dans les cellules de patients ayant souffert ou non d'effets secondaires sévères de radiothérapie et d'individus sains.	250
Figure 54 : Schéma illustrant la conversion au bisulfite d'ADNg et la HRM PCR	308

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evénements induits par une irradiation de 1 Gy de rayons X ou γ.....	50
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des voies de réparation employées pour chaque type de lésion de l'ADN.	76
Tableau 3 : Analyse des voies de signalisation sur-représentées parmi les 540 gènes différentiellement exprimés communs entre individus grade 2 vs contrôles et grade 3 vs contrôles.	208
Tableau 4 : Liste des 20 régions les plus différentiellement méthylées entre les fibroblastes des patients radiosensibles et des contrôles.....	214
Tableau 5 : Rôle des gènes pouvant être régulés par NFATC2 dans la réponse inflammatoire radio-induite.	272
Tableau 6 : Données cliniques des patientes ayant souffert d'un cancer du sein et présenté des effets secondaires sévères des suites d'une radiothérapie.	290
Tableau 7 : Informations des patients dont les fibroblastes dermiques ont permis la vérification de la signature moléculaire de radiosensibilité.	292
Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées en RTqPCR.....	303
Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées en HRM PCR.....	312
Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés pour détecter les protéines en western blot....	318
Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés pour détecter les protéines en immunofluorescence.....	321

Liste des abréviations

5'-dRP : 5'-deoxyRibose Phosphate

53BP1 : tumour suppressor p53-Binding Protein 1

8-oxoG : 8-Oxoguanine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : Acide DésoxyriboNucléique génomique

AKT : AKT Serine/Threonine Kinase

AMBRA1 : Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy protein 1

AMPK : AMP-activated protein kinase

APAF1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1

APC/C : Anaphase-Promoting Complexe/Cyclosome

APE1 : AP endonuclease 1

APTX : APraTaXin

ARE : Antioxidant Response Elements

ATF2 :Activating Transcription Factor 2

ATF4 : activated transcription factor 4

ATF6 : Activating Transcription Factor 6

ATG101 : autophagy-related 101

ATG12 : autophagy-related 12

ATG13 : autophagy-related 13

ATG14 : autophagy-related 14

ATG16L1 : autophagy-related 16 like 1

ATG3 : autophagy-related 3

ATG5 : autophagy-related 5

ATG8 : autophagy-related 8

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

Bak : BCL2 Antagonist/Killer

Bax : BCL2 Associated X

BCL2A1 : BCL2 related protein A

BER : Base Excision Repair
 BH3-only : BCL-2 homology domain 3
 BID :BH3-Interacting Death omain agonist
 BLM : BLooM syndrom
 BNIP3 : BCL2 interacting protein 3
 BNIP3L : BNIP3 like
 BRCA1 : BReast CAncer susceptibility
 Ca²⁺ : Calcium
 CaMKK-β : Calmodulin-dependent Kinase Kinase-β
 CAT : CATalase
 CDB : Cassure Double Brin
 CDC25 : Cell Division Cycle 2
 CDK2 : Cyclin Dependent Kinase 2
 CDK4 : Cyclin-Dependent Kinase 4
 CDK6 : Cyclin-Dependent Kinase 6
 CDKN1A : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
 CETN2 : CEnTriN2
 CFLAR : CASP8 and FADD like apoptosis regulator
 CHK2 : Checkpoint Kinase 2
 CK1 : Casein Kinase 1
 CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
 COPERNIC : COllection Pour la rEcherche sur la Radiosensibilité au NIveau Clinique
 COX : CycloOxygenase
 COX-2 : CycloOXygenase-2
 CSB : Cassure Simple Brin
 CtIP : CtBP (C-terminal binding protein) Interacting Protein
 DAG : DiAcylGlycérol
 DAMP : Damage Associated Molecular Pattern
 DAPK1 : death-associated protein kinase 1
 DBD : DNA Binding Domain

DDR : DNA Damage Response
 DFCP1 : FYVE domain-containing protein 1
 DGKA : DiacylGlycerol Kinase Alpha
 DNA2 : DNA replication Helicase/Nuclease 2
 DNA-PKcs : DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
 dNTP : désoxyriboNucleoside TriPhosphate
 DRAM1 : DNA damage regulated autophagy modulator 1
 DSBRR : Double-Strand Break Repair
 e^- : Electron
 e^-_{aq} : Electron aqueux
 EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor
 eIF2 : eukaryotic translation Initiation Factor 2
 ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
 ERCC : Excision Repair Cross-Complementation
 ERCC1 : DNA excision repair protein ERCC-1
 ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
 EXO1 : EXOnuclease 1
 Fas : Fas Cell Surface Death Receptor
 FASLG : FAS LiGand
 FEN1 : Flap ENdonuclease 1
 FIP200 : RB1-inducible coiled-coil
 FSHR : Follicle Stimulating Hormone Receptor
 FZR1 : Fizzy And Cell Division Cycle 20 Related 1
 GABARAP : γ -aminobutyric acid receptor-associated proteins
 GG-NER : Global Genome Nucleotide Excision Repair
 GPX : Glutathione PeroXydase
 GSH : Glutathion réduit
 GSK3 β : Glycogen Synthase Kinase 3 β
 GSSG : Disulfure de glutathion

GST : Glutathion Transferases
GWAS : Genome-Wide Association Study
Gy : Gray
 H^+ : Hydron
 H_2 : Dihydrogène
H2AX : H2A.X Variant Histone
 H_2O : Monoxyde de dihydrogène
 $H_2O^{+\bullet}$: Cation radical monoxyde de dihydrogène
 H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
 H_3O^+ : Ion hydronium
HAT : Hydrogen Atom Transfer
HMGB1 : High Mobility Group protein B1
HO-1 : Heme Oxygenase-1
HR : Homologous Repair
IL : Interleukine
 IP_3 : Inositol-1,4,5-triPhosphate
IRE1 : Inositol REquiring 1
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
LC3 : microtubule-associated protein light chain 3
Lig1 : Ligase 1
Lig3 : Ligase 3
Lig4 : Ligase 4
LOX : LipOXygenase
LP BER : Long Patch Base Excision Repair
LPA : Acide lysophosphatidique
MAP1LC3B : microtubule associated protein 1 light chain 3 beta
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAR : Matrix Attachment Region
MDM2 : Murine Double Minute 2
MEC : Matrice ExtraCellulaire

miARNs : micro ARNs

MLKL : Mixed-Lineage Kinase domain-Like

MMPs : Matrix MetalloProteinases

MRN : MRE11 homolog, double strand break repair nuclease, Rad50, Nibrin

mTORC1/2 : mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1 et 2

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate

NER : Nucleotide Excision Repair

NES : Nuclear Export Signal

NFATs : Nuclear Factor of Activated T-cells

NHEJ : Non-Homologous End-Joining

NHR : NFAT-Homology Region

NLS : Nuclear Localization Signal

NO₂ : Dioxyde d'azote

NQO-1 : NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1

NR4A1 : Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1

Nrf2 : Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

O₂ ^{•-} : Ion superoxyde

O₂ : Dioxygène

OH [•] : Radical hydroxile

OH⁻ : Hydroxide

ONOO⁻ : Peroxynitrite

OXPHOS : OXydativ PHOSphorylation

P115 : general vesicular transport factor

PARP1 : poly(ADP-ribose) polymerase 1

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PE : phosphatidylethanolamine

PERK : Protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PGAM5L : PhosphoGlycerAte Mutase family member 5

PGE2 : Prostaglandine E2

PI3K : PhosphoInositide 3-phosphate Kinase
 PI3KC3 : class III PI3K
 PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphatase
 PIKK : PhosphoInositide 3 – Kinase – related Kinase
 PINK1 : PTEN-induced putative kinase 1
 PIP₂ : Phosphatidylinositol-4,5-biPhosphate
 PKC : Protein Kinase C
 PLC : Phospholipase C
 PNKP : PolyNucleotide Kinase Phosphate
 Pol κ : Polymerase κ
 Pol β : ADN polymérase β
 Pol δ : Polymerase δ
 Pol ϵ : Polymerase ϵ
 pRb : Retinoblastoma protein
 PRX : PeroxyRedoXine
 PTEN : Phosphatase and tension homolog
 PUMA : P53-Upregulated Modulator of Apoptosis
 RAD23B : Rad3 Homolog B
 Rad52 : DNA repair protein RAD52 homolog
 RAGE : Receptor for Advanced Glycation End-products
 RAR γ : Retinoic Acid Receptor γ
 RE : Réticulum Endoplasmique
 RFC : Replication Factor C
 RI : Radiations Ionisantes
 RIANS : Radio-Induced ATM NucleoShuttling
 RILA : Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis
 RIPK1 : Receptor Interacting serine/threonine Kinase 1
 RMI1 : RecQ-Mediated genome Instability protein 1
 RMI2 : RecQ-Mediated genome Instability protein 2
 RNAPII : RNA Polymerase II

RPA : Replication Protein A
 SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype
 SDSA : Synthesis-Dependent Strand Annealing
 SET : Single-Electron Transfer
 SF2 : Fraction Survivante à 2 Gy
 SLC36A4 : Solute Carrier Family 36 Member 4
 SMAC : Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
 SNPs : Single Nucleotide Polymorphisms
 SOD : SuperOxyde Dismutase
 SSA : Single-Stranded Annealing
 STIM : STromal Interaction Molecule
 TAD : Transcriptional Activation Domain
 TALRI : Taux d'Apoptose Lymphocytaire Radio-Induite
 TANC1 : Tetratricopeptide Repeat, Ankyrin Repeat And Coiled-Coil Containing 1
 TC-NER : Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair
 T_{fh} : Lymphocyte T follicular helper
 TFIIH : Transcription Factor II H
 TGFβ : Transforming Growth Factor β
 T_H : Lymphocyte T helper
 TIMPs : Tissue Inhibitors of MetalloProteinases
 TLR : Toll-Like Receptor
 TNFα : Tumor Necrosis Factor α
 TRAILR : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor
 TSC1/TSC2 : TSC complex subunit 1 et 2
 UDP : Uridine DiPhosphate
 UGT : UDP-GlucuronosylTransferases
 ULK1 : Uunc-51-like kinase 1
 UPR : Unfolded Protein Response
 UV-DDB : UV-Damaged DNA-Binding
 VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor

VEGFR1 : VEGF Receptor 1
VPS34 : vacuolar protein sorting 34
WIP1 : WD repeat domain phosphoinositide-interacting 2
XBP1 : X-Box Binding Protein 1
XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
XLF : XRCC4-Like Factor
XPA : Xeroderma Pigmentosum A
XPB : Xeroderma Pigmentosum B
XPC : Xeroderma Pigmentosum C
XPD : Xeroderma Pigmentosum D
XPF : Xeroderma Pigmentosum F
XRCC1 : X-ray Repair Cross-Complementing protein 1
XRCC4 : X-ray Repair Cross-Complementing protein 4
 γ -GCS : γ -GlutamylCysteine Synthetase

INTRODUCTION



Figure 1 : Cliché radiographique de la main d'Anna Bertha Ludwig Röntgen.

Première photographie anatomique réalisée avec des rayons X en décembre 1895. Tiré de (Woloshyn 2017).

I. Les rayons ionisants en biologie

Les rayons ionisants sont des rayonnements capables d'induire l'ionisation d'un atome, c'est-à-dire possédant une énergie suffisante pour arracher au moins un électron d'une couche électronique de l'atome irradié. Il en existe plusieurs sortes, caractérisées notamment par les particules qui les forment et leur origine. La radioactivité produit 3 types de rayons ionisants : le rayonnement α composé de 2 protons et 2 neutrons, le rayonnement β composé d'un électron et d'un anti-neutrino électronique ou d'un anti-électron et d'un neutrino électronique et le rayonnement γ composé d'un photon. Les rayons X sont composés également de photons mais sont produits par transition électronique lorsqu'un électron et un atome entrent en collision. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux radiations électromagnétiques ionisantes que sont les rayons X et les rayons γ .

1. Découverte des rayons ionisants

En 1895, le physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen rapporta pour la première fois l'existence « d'un nouveau genre de rayonnement » émis par un tube de Crookes (tube en verre sous vide partiel contenant une cathode et une anode permettant de faire passer un courant électrique à travers le gaz résiduel) pouvant noircir un film photographique ou un écran fluorescent (Röntgen 1896). En mettant plusieurs objets entre le tube et l'écran, il se rend compte que ces rayons, qu'il appelle « rayons X », pouvaient traverser la matière plus ou moins facilement en fonction de sa densité et imprimer l'ombre de l'objet sur le négatif. Ainsi, la première image radiographique connue de l'Histoire est la main d'Anna Bertha Ludwig Röntgen, la femme du physicien allemand (Figure 1).

En 1896, le physicien français Antoine Henri Becquerel s'appuya sur les expériences menées par Wilhelm Conrad Röntgen pour mettre en évidence « des radiations invisibles émises par phosphorescence » à partir de sels d'uranium dont « les effets ont une grande analogie avec les

effets produits par les radiations étudiées par MM. Leanard et Röntgen » (Becquerel 1896). Ce n'est que plus tard, avec des expériences supplémentaires d'Antoine Henri Becquerel et avec les études de Pierre et Marie Curie que ces radiations émises par les sels d'uranium ont été différenciées des rayons X et que le phénomène physique fut nommé radioactivité. Dans les années qui suivirent, la radioactivité fut caractérisée comme étant un mélange de radiations : les rayonnements α et β découverts par Ernest Rutherford et par le rayonnement γ identifié par Paul Villard.

2. Applications médicales

Très vite après leur découverte, l'utilité des rayons ionisants a été notamment démontrée dans le domaine médical. Tout d'abord, les rayons X ont été utilisés pour le diagnostic médical en permettant de réaliser des clichés du corps humains afin de localiser des corps étrangers ou encore d'observer des fractures (Walsh et Greenhill 1897; Ward 1898) : ce fut l'invention de la radiographie. La technologie a changé au fur et à mesure des années, notamment avec l'avènement de l'informatique, mais le principe de la radiographie reste le même (Bercovich et Javitt 2018).

La première utilisation thérapeutique des rayons ionisants fut rapportée en 1896 lorsque le médecin autrichien Léopold Freund traita un naevus pileux avec des rayons X, entraînant sa disparition (Freund et al. 1904; Hall et Giaccia 2006). Les propriétés des rayons ionisants ont également été utilisées pour traiter des tumeurs avec en 1896 la première radiothérapie référencée par le docteur français Victor Despeignes (Foray 2013). Pierre Curie rapporta en 1901 les cas de Friedrich Giesel, Friedrich Walkoff et Henri Becquerel qui ont développé des brûlures suites à une exposition à une source de radium (Curie et Becquerel 1901). En 1901, il fournit une source de radium au médecin Henri Danlos pour qu'il puisse effectuer le premier traitement référencé avec une source radioactive d'un patient souffrant d'un

lupus érythémateux (Danlos et al. 1901; Mould 2007). Deux des premiers traitements réussis d'un cancer avec une source radioactive fut rapporté en 1899, en Suède, lorsque les médecins Thor Stenbeck et Tage Sjögren ont soigné respectivement une patiente atteinte d'un carcinome basocellulaire et un patient atteint d'un carcinome épidermoïde (Berven 1962).

Au début du 20^{ème} siècle, de nombreux cancers ont été traités la plupart du temps avec une exposition unique et longue de la tumeur avec des radiations ionisantes. Malgré l'application des rayons ionisants dirigée contre la tumeur, les tissus sains irradiés présentaient également des dommages importants à cause de cette technique d'exposition et du manque de contrôle de la dose administrée. En 1911, un interne en médecine, Claudius Regaud, s'aperçut qu'il était possible de stériliser des béliers en irradiant leur testicules sans causer de dommages majeurs à la peau en réalisant des irradiations plus courtes mais plus nombreuses et étalées dans le temps, c'est le principe de fractionnement (Regaud 1930). Cette technique fut popularisée au cours de la première moitié du 20^{ème} siècle sans compréhension des bases biologiques ni optimisation des protocoles notamment à cause d'un manque d'outils permettant de mesurer les doses de radiation.

Au fur et à mesure des décennies, les protocoles de radiothérapie ont été améliorés de façon empirique mais la méthode de fractionnement consiste toujours à utiliser des fractions de rayons ionisants délivrées quotidiennement (entre 1,2 et 3 Gy) en fonction de l'individu, du type de cancer ou encore de la zone à irradier (Connell et al. 2009). Ces doses ont été déterminées afin de limiter les effets secondaires chez le plus grand nombre de patients tout en présentant une efficacité maximale contre la tumeur. De plus, les découvertes scientifiques au cours de la seconde moitié du 20^{ème} siècle ont permis d'expliquer que l'avantage du fractionnement par rapport à une irradiation unique et forte vient d'une meilleure capacité de réparation des tissus sains par rapport aux tissus cancéreux (Hall et Giaccia 2006).

De nos jours, la radiothérapie peut être utilisée seule et peut conduire à la guérison totale du cancer, ou peut être utilisée en complément d'une chirurgie et/ou d'une chimiothérapie. Ainsi, il est possible de traiter une tumeur avec l'application de radiations ionisantes (rayons X ou rayons γ) de manière externe (radiothérapie externe) ou de manière interne (brachythérapie). Ce choix appartient aux cliniciens qui décident quelle stratégie est la plus adaptée en fonction du patient et de sa pathologie. De même que la dose de radiation ionisante par fraction, la dose totale va dépendre de la zone irradiée.

La radiothérapie externe est la plus courante, avec une application localisée de rayons X sur la tumeur (radiothérapie conformationnelle 3D). Ce type de radiothérapie peut s'accompagner d'un dispositif radiologique intégré à l'accélérateur de particules pour le guider plus précisément. Le faisceau de rayons X peut également être modulé au cours de la séance d'irradiation pour s'adapter au volume à traiter.

3. Limitations de la radiothérapie

Malgré toutes les méthodes d'imagerie associées à la radiothérapie externe ou les modulations d'intensité, les rayons X atteignent également les tissus sains se situant entre la tumeur et la source de radiation et autour de la tumeur. En effet, les tissus voisins de la tumeur vont recevoir des rayons ionisants qui vont agir sur les cellules saines, ce qui peut provoquer des effets secondaires plus ou moins graves chez certains patients.

Ces effets secondaires sont la limitation majeure de la radiothérapie externe. Ils sont très variables, notamment dans la durée. On parle d'effets secondaires aigus lorsque les effets secondaires apparaissent dans les 6 mois suivants le début de l'irradiation alors que les effets secondaires tardifs apparaissent après ces 6 mois et jusqu'à plusieurs années après le traitement (Cosset 2010).



Figure 2 : Effets secondaires dus à la radiothérapie.

(A) et (B) représentent des radiodermites aiguës de grade 1 avec, respectivement, une hyperpigmentation de la tête et du cou et un érythème de la poitrine. (C) Desquamation exsudative aiguë de grade 2 dans la région de la tête et du cou. (D) Télangiectasie tardive radio-induite. (E) Morphée du sein droit d'une patiente, 20 mois après la fin de la radiothérapie. (F) Angiosarcome 15 ans après la radiothérapie sous forme de lésion violacée avec des nodules satellites dans le champ de l'irradiation. Adaptée de (Leventhal 2017; Partl et al. 2018).

4. Effets secondaires en radiothérapie

Au cours de la radiothérapie externe, les rayons ionisants vont être dirigés contre la tumeur, mais la peau est le premier organe atteint par les radiations. Ainsi, il peut y avoir l'apparition d'effets secondaires très variables dans leur forme et dans leur intensité au niveau de ce tissu qui sont regroupés sous le nom de radiodermites. Les radiodermites peuvent atteindre jusqu'à 95% des patients traités par radiothérapie externes (Ryan 2012; McQuestion 2011) et plusieurs symptômes sont associés (Figure 2). Certains de ces symptômes apparaissent dans les premiers jours ou les premières semaines suivant le début de l'irradiation (érythème, desquamations sèche ou humide, dépilation, hyperpigmentation) alors que d'autres apparaissent plusieurs mois voire plusieurs années après le début de la radiothérapie (fibrose, œdème, dyspigmentation, télangiectasie, morphee ou encore nécrose) (Ryan 2012; Hegedus et al. 2017; Partl et al. 2018). Les radiations ionisantes utilisées en radiothérapies peuvent même mener à l'apparition d'un second cancer dans la zone irradiée tels que des carcinomes épidermoïdes ou basocellulaires ou encore des sarcomes (Cuperus et al. 2013; Leventhal 2017; Grantzau et al. 2016; Burt et al. 2017).

Les autres effets secondaires vont également dépendre de la zone irradiée. Pour les radiothérapies dont les rayons vont atteindre la tête et/ou le cou, les effets secondaires possibles sont des pertes de cheveux, des nausées, une forte fatigue, des troubles neurologiques (perte d'audition, troubles de la mémoire et de la parole ou encore crise d'épilepsie) et des problèmes bucco-dentaires (bouche sèche, dysphagie, perte de dent, mâchoire rigide ou gonflement des gencives) (« Radiation Therapy Side Effects » s. d.). Lorsque les rayons ionisants sont dirigés contre la poitrine, il peut y avoir apparition d'œdèmes, de troubles cardiaques (péricardite, maladie coronaire prématurée, valvulopathie, arythmie ou encore cardiomyopathie) ou pulmonaires (toux, essoufflement, expectoration ou encore fibrose pulmonaire) (Berkey 2010;

Zou et al. 2019). Les risques d'effets secondaires pour une irradiation gastrointestinale ou pelvienne sont des risques de nausées et vomissements, de crampes abdominales, de diarrhée ou de constipation, de télangiectasie rectale, des problèmes de vessie (sang dans les urines, douleurs, cystite, incontinence urinaire), de fertilité ou encore de problèmes sexuels (démangeaison ou sécheresse vaginale, dysfonction érectile) (« Radiation Therapy Side Effects » s. d.; Berkey 2010).

Bien que les effets secondaires dans les tissus sains soient la limitation majeure de la radiothérapie, seuls 5 à 15 % des patients traités présentent des effets secondaires sévères, nécessitant l'intervention de professionnels de santé, selon la Commission Internationale de Protection Radiologique. Le fait que seul un faible pourcentage des patients traités en radiothérapie (avec les mêmes doses de radiations par séance appliquées à tous) développent des séquelles sévères dans les tissus sains met en évidence l'existence d'une radiosensibilité individuelle.

5. Variation de la radiosensibilité individuelle

La notion que chaque individu répond différemment à une même dose de radiation a très vite émergé après la découverte des rayons ionisants. En effet, le docteur Léon Bouchacourt rapporta en 1911 le cas d'un jeune couple ayant insisté pour être épilé à l'aide de rayons X et ayant développé des brûlures et radiodermes que le médecin rapporta dans une étude intitulée « Sur la différence de sensibilité aux rayons de Roentgen de la peau des différents sujets, et, sur le même sujet des différents régions du corps » (Foray et al. 2012). En 1906, Jean Bergonié conclut lors d'un congrès de l'Association française pour l'avancement des sciences que « ...tout le monde s'entend à peu près sur les deux causes d'erreur qui peuvent affecter l'application thérapeutique des rayons X : 1) l'incertitude des mesures [de dose] ; 2) la sensibilité des différents sujets, des diverses parties de la peau... » (Foray et al. 2013).

L'existence d'une variation de la radiosensibilité individuelle a pu être observée tout au long du 20^{ème} siècle, notamment dans les cas d'exposition accidentelle aux radiations ionisantes. Ce fut notamment le cas lors de l'affaire des « Radium girls » au début du 20^{ème} siècle. Des femmes étaient employées pour peindre des cadrans de montre à l'aide d'une peinture au radium. Elles devaient mettre leur pinceau dans la bouche pour que celui-ci soit fin et pointu pour être plus précises, absorbant par la même occasion des résidus de radium (Gunderman et al. 2015). Certaines de ces travailleuses ont développé des cancers radio-induits, des nécroses de la mâchoire, des ulcères, des abcès, des anémies ou encore des fractures spontanées (Cohen et Kim 2017). Le fait que seulement certaines d'entre elles aient développé des symptômes sévères et très variables dans leur forme et dans leur temps d'apparition sont une preuve supplémentaire de l'existence d'une radiosensibilité individuelle variable.

De même, les individus exposés aux radiations ionisantes suites aux explosions des bombes nucléaires d'Hiroshima et Nagasaki (Okita 1975) et ceux exposés aux radiations lors de l'accident de la centrale nucléaire de Tchernobyl (Wagemaker et al. 1996) n'ont pas développé les mêmes symptômes (érythème, desquamation, nécrose) pour une même dose de radiation reçue, en fonction de leur radiosensibilité individuelle.

Plus récemment, l'affaire des surirradiés de l'hôpital d'Epinal a été fortement médiatisée. Il s'agissait d'une exposition excessive de patients lors d'un traitement par radiothérapie. Une erreur de calcul de la dose délivrée a entraîné une sur-irradiation de 30 % chez 24 patients, de 10 % chez 397 patients mais 4900 patients traités entre 1989 et 2000 ont également reçu une dose plus forte d'irradiation dans une moindre mesure (Peiffert et al. 2007). Chez les 24 patients surirradiés de 30 %, tous ont développé des effets secondaires sévères de grade 2 à 5 et la plupart souffraient de rectites et cystites invalidantes de grade 4. Chez les 397 patients ayant reçu une dose supplémentaire de 10 %, il y a une recrudescence de rectites de grades 2-3, mais aussi des patients sans aucun effet secondaire (Peiffert et al. 2007).

Toutes ces expositions aux radiations ionisantes, accidentelles ou volontaires, où les individus ont développé ou non des effets secondaires de différentes formes et intensités sont la preuve d'une radiosensibilité individuelle variable dans la population générale.

6. Conclusion

La radiothérapie est un traitement majeur dans la lutte contre le cancer, mais la radiosensibilité individuelle variable est la limitation principale de celui-ci. C'est pourquoi il est nécessaire de pouvoir estimer la radiosensibilité individuelle chez les patients cancéreux ce qui permettrait d'individualiser les protocoles de radiothérapie. Il serait ainsi envisageable de diminuer les doses de radiation, de fractionner encore plus les séances de radiothérapie, ou d'utiliser d'autres méthodes de radiothérapie comme l'hadronthérapie pour les patients les plus radiosensibles, ou encore d'augmenter les doses de radiations pour les patients plus radio-résistants et ainsi maximiser les chances de guérison.

Pour pouvoir mesurer la radiosensibilité individuelle, il est essentiel de comprendre l'action des rayons ionisants sur les cellules, ce qui sera détaillé dans la suite de cette introduction.

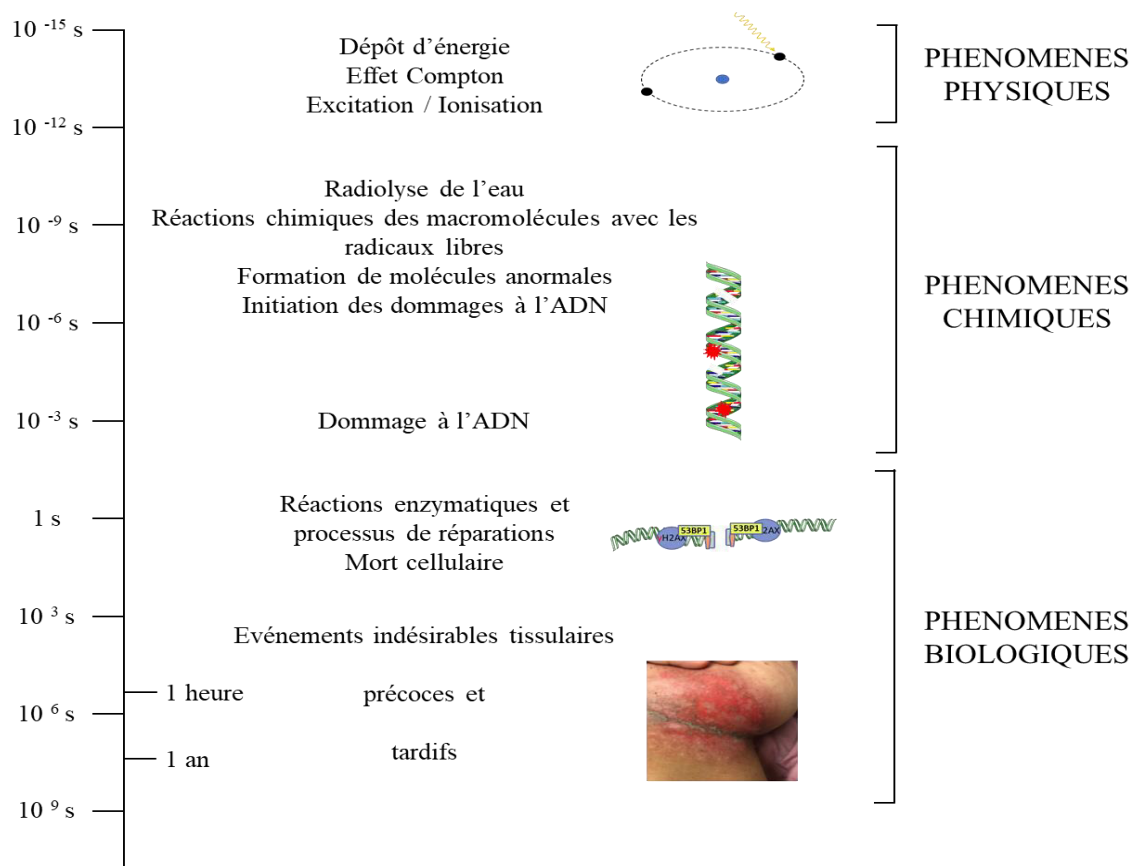


Figure 3 : Chronologie de l'action des rayons ionisants.

Depuis les phénomènes physiques (quelques picosecondes après l'irradiation) aux effets cliniques (plusieurs années après l'irradiation). Adaptée de (Foffa et al. 2009) et image de (Leventhal 2017).

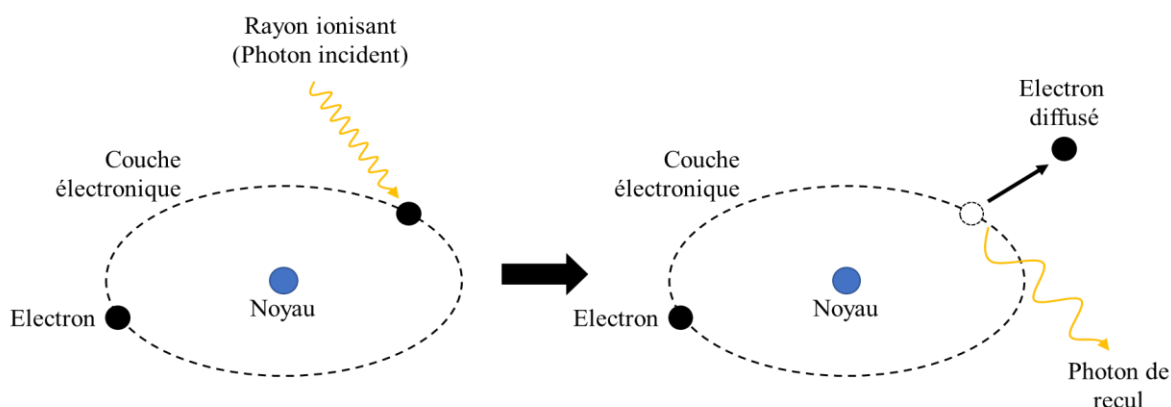


Figure 4 : Représentation schématisée de l'ionisation d'un atome lors de la radiothérapie.

Libération d'un photon de recul et d'un électron diffusé par effet Compton.

II. Radiobiologie cellulaire

Lors de la radiothérapie, les phénomènes induits sont d'abord physiques (de 10^{-18} à 10^{-12} seconde après irradiation), puis chimiques (de 10^{-12} à 1 seconde après irradiation) et enfin biologiques (Figure 3) (Singh et al. 1982; Foffa et al. 2009).

1. Action des radiations ionisantes

a. Phénomènes physiques

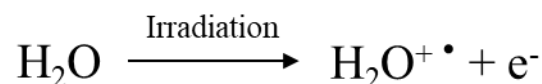
Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques constitués de photons produits lors de la transition électronique (passage d'un électron d'un niveau d'énergie à un autre), alors que les rayons γ sont issus de la désexcitation d'un noyau atomique lors de la désintégration.

Tout de suite après l'irradiation, les photons composant les rayons vont interagir avec le tissu vivant via l'effet Compton (Camphausen 2009). Il y a libération d'un photon de recul et d'un électron diffus pouvant entraîner respectivement excitation et ionisation du milieu irradié (Figure 4).

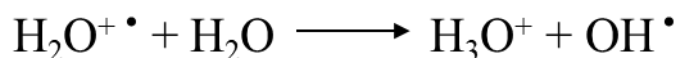
b. Radiolyse de l'eau

Les molécules d'eau composant 70 % du corps humains, la radiolyse de l'eau est un des mécanismes majeurs des phénomènes radio-induits.

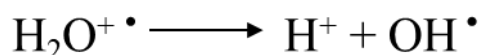
L'interaction d'un photon de rayons X ou γ avec une molécule d'eau peut entraîner son ionisation tel que :



L'ion radical $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$ peut ensuite réagir avec une molécule d'eau de la façon suivante :



ou se dissocier :



D'autre part, l'électron e^- éjecté lors de l'irradiation perd son énergie cinétique dans des processus d'excitation et d'ionisation jusqu'à l'obtention d'électrons primaires et secondaires aqueux e^-_{aq} et d'espèces réductrices (Figure 5) (Le Caër 2011; Jonah 1995; Hall et Giaccia 2006; Pastina et al. 2001). Ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) se propagent ensuite dans la cellule au fur et à mesure des réactions chimiques entraînant des dommages à l'ADN, l'oxydation de protéines ou encore l'inactivation d'enzymes (Azzam et al. 2012).

c. Autres effets des rayons ionisants

Lors de l'irradiation, en présence de dioxygène, des ions superoxydes $\text{O}_2^{\bullet-}$ peuvent également se former via la NADPH oxydase et réagir avec des molécules de monoxyde d'azote NO formant ainsi des espèces réactives de l'azote comme le peroxynitrite ONOO^- et le dioxyde d'azote NO_2 . Ces espèces réactives de l'azote peuvent ensuite oxyder des lipides, des protéines, ou encore l'ADN (Ozcan et al. 2015).

Les rayons ionisants peuvent également ioniser directement des macromolécules comme l'ADN (Cadet et al. 2004), les membranes lipidiques de la cellule, endommager les mitochondries ou encore le réticulum endoplasmique (W. Kim et al. 2019), mais leur action

Type de lésion de l'ADN	Nombre de lésion par cellule pour 1 Gy
Cassures simples brins	1 000
Cassures doubles brins	20 à 40
Autres dommages	> 1 000

Tableau 1 : Evénements induits par une irradiation de 1 Gy de rayons X ou γ .

D'après (Cadet et al. 2003; Stenerl  w et al. 2003).

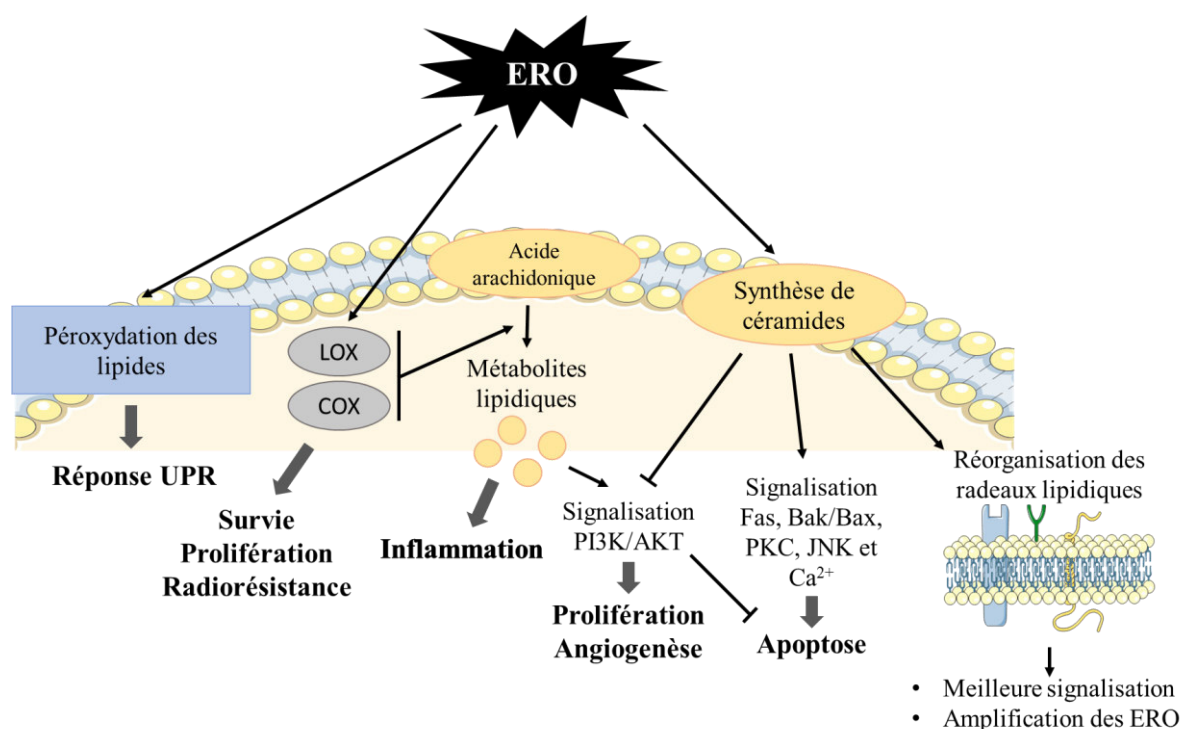


Figure 6 : Représentation schématique de l'action des ERO sur les lipides.

Les ERO entraînent la peroxydation des lipides membranaires conduisant à la réponse UPR ainsi que la production de métabolites lipidiques et de céramides. Les métabolites lipidiques sont associés à l'activation de l'inflammation, à la prolifération cellulaire, à l'angiogénèse et à l'inhibition de l'apoptose. Alors que les céramides peuvent entraîner l'apoptose et la réorganisation des radeaux lipidiques menant à l'amplification des ERO. Adaptée de (W. Kim et al. 2019).

majeure se fait via les ERO issus de la radiolyse de l'eau qui est abondamment présente dans les cellules.

2. Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO)

a. Effets des ERO

Les radiations ionisantes vont ioniser majoritairement des molécules d'eau qui à leur tour vont conduire à l'ionisation d'autres molécules d'eau, de dioxygène et d'oxyde d'azote formant ainsi des espèces réactives de l'oxygène. Les ERO vont induire des dommages à l'ADN, aux lipides membranaires, l'activation de la signalisation des céramides, l'oxydation de protéines et un stress aux organelles (W. Kim et al. 2019).

Il est admis que les effets biologiques des rayons ionisants se font principalement en ciblant l'ADN (Hall et Giaccia 2006). Le nombre de lésions à l'ADN pour 1 Gy d'irradiation ionisante est résumé dans le Tableau 1. Les rayons ionisants vont induire à l'ADN des cassures doubles brins (CDB), des cassures simples brins (CSB), ainsi que d'autres types de dommages tels que des lésions de bases (8-Oxoguanine, thymine glycol), des sites abasiques, des adduits à l'ADN (molécules liées de façon covalente à l'ADN), des pontages inter ou intra brins de l'ADN ou encore des pontages ADN – protéines (Ravanat 2018) qui seront réparés par différents mécanismes décrits dans la section II.4 de l'introduction.

Les lipides des cellules vont également être une cible des ERO (Figure 6). En effet, ils peuvent induire des dommages lipidiques aux cellules via la peroxydation des lipides composant la membrane plasmique des cellules et entraîner sa fragmentation avec comme conséquence la perte de sa fonction barrière (Edimecheva et al. 1997) ou encore l'activation de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) qui sera abordée plus bas (Lin et al. 2014). Les ERO peuvent également favoriser la réorganisation des radeaux lipidiques membranaires en larges

plateformes lipidiques riches en céramides permettant de réorganiser spatialement les récepteurs membranaires (récepteurs de mort, récepteurs Toll-like, récepteurs de cytokines) et les molécules intracellulaires de signalisation (Bionda et al. 2007; Bollinger et al. 2005). Cette réorganisation membranaire faciliterait la transmission de la signalisation à la cellule et participerait également à l'amplification de la production des ERO en recrutant des complexes NADPH oxydases, ces complexes enzymatiques produisant des ions superoxydes $O_2^{\bullet -}$ lors de l'oxydation du NADPH (Corre et al. 2010). L'action des ERO sur les lipides est également caractérisée par l'activation de nombreuses voies de signalisation apoptotiques tel que la signalisation via Fas, la signalisation Bak/Bax, la signalisation via la protéine kinase C, la voie de signalisation JNK, la signalisation calcium Ca^{2+} ou via l'inhibition de la voie Akt (Corre et al. 2010; W. Kim et al. 2019). D'autre part, les ERO peuvent contribuer à la production de métabolites lipidiques à partir d'acide arachidonique dans les membranes plasmiques en activant les cyclooxygénases (COXs) et les lipoxygénases (LOXs). Ces métabolites lipidiques sont impliqués dans la réponse inflammatoire, la prolifération, et à l'angiogenèse via l'activation de la voie de signalisation de l'EGFR et de la voie PI3K/AKT (W. Kim et al. 2018) et l'activation de COX-2 par irradiation peut avoir des effets anti-apoptotiques (W. Kim et al. 2019).

Les ERO peuvent directement oxyder des protéines dans les cellules via différents types de modifications. Ils peuvent cliver la séquence d'acides aminés de la protéine ou provoquer des modifications dans la structure de la protéine (par exemple en formant des dimères de tyrosines intra ou inter protéiques), ajouter un groupement carbonyle aux acides aminés ou encore oxyder les méthionines et les cystéines des protéines (Reisz et al. 2014).

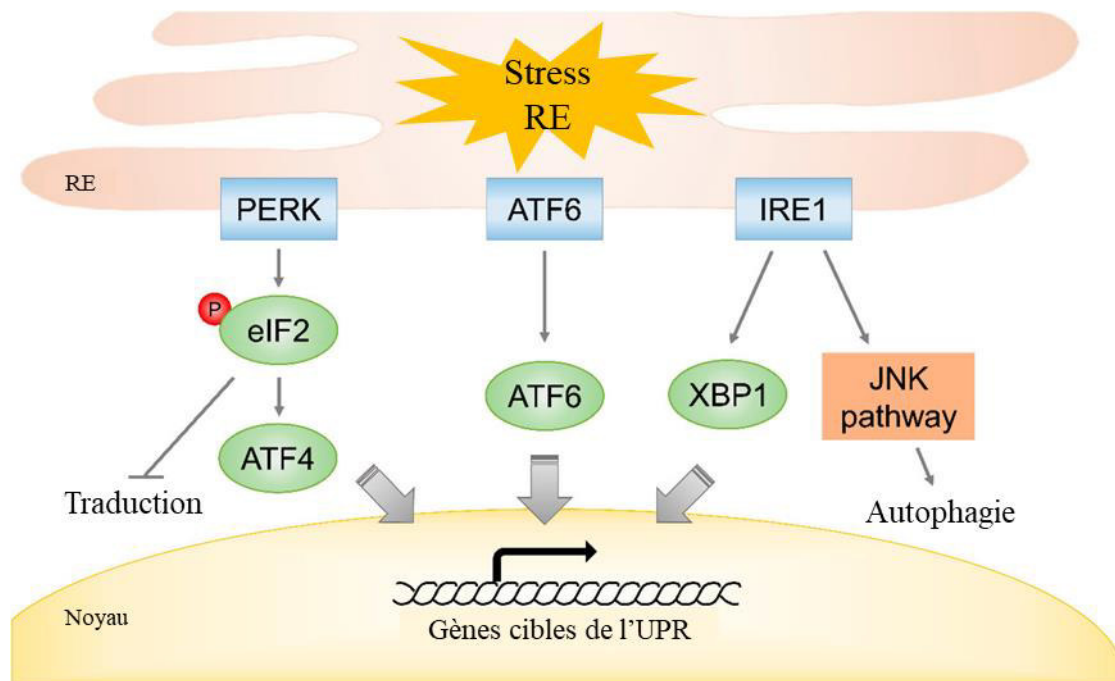


Figure 7 : Schéma représentant la réponse UPR.

En réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE), la réponse UPR est déclenchée via PERK, ATF6 et IRE1 entraînant l'expression des gènes cibles de l'UPR afin d'améliorer les capacités du réticulum endoplasmique (expression de protéines chaperonnes) et d'induire l'autophagie pour éliminer les protéines mal conformées tout en recyclant leurs composants. Adaptée de (W. Kim et al. 2019).

Les ERO peuvent également stresser les organelles et plus particulièrement les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Le réticulum endoplasmique régule la synthèse protéique, le repliement des protéines, la synthèse de lipide et de stérol et le niveau de calcium intracellulaire. Le stress du réticulum endoplasmique est déclenché lorsque les fonctions du réticulum endoplasmique ne sont pas remplies, entraînant la réponse UPR. La réponse UPR est une voie de signalisation adaptative permettant la restauration de l'homéostasie du réticulum endoplasmique en facilitant la dégradation des protéines mal conformées. Cette voie de signalisation est composée de 3 acteurs principaux : l'inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), la protéine kinase RNA-like ER kinase (PERK) et l'activating transcription factor 6 (ATF6) qui vont promouvoir le retour à l'homéostasie de réticulum endoplasmique (Figure 7). Mais si le stress du réticulum endoplasmique est prolongé, la réponse UPR peut entraîner la mort cellulaire par apoptose (Ron et Walter 2007). Il semblerait que l'irradiation puisse activer la réponse UPR via PERK (E. J. Kim et al. 2014) et également IRE1 dans certains types cellulaires, mais pas via ATF6 (K. W. Kim et al. 2010; B. Zhang et al. 2010) et ainsi activer l'apoptose mais également l'autophagie (Chaurasia et al. 2019). Le stress du réticulum endoplasmique pourrait également inhiber la réparation des cassures doubles brins en stimulant la dégradation de la protéine de réparation Rad51 (Yamamori et al. 2013).

Les mitochondries sont des acteurs importants dans la réponse cellulaire aux irradiations. Les ERO produits directement par les rayons ionisants peuvent altérer la fonction des mitochondries, augmenter le stress oxydatif mitochondrial et induire l'apoptose (Kam et al. 2013). Dans des conditions physiologiques, les mitochondries sont la source majeure d'ERO dans les cellules lors de la phosphorylation oxydative et, lors de l'irradiation, il y a une surproduction d'ERO par les mitochondries due à une suractivation de la chaîne de transport d'électrons (Yamamori et al. 2012). Cet excès d'ERO peut également induire des dommages à

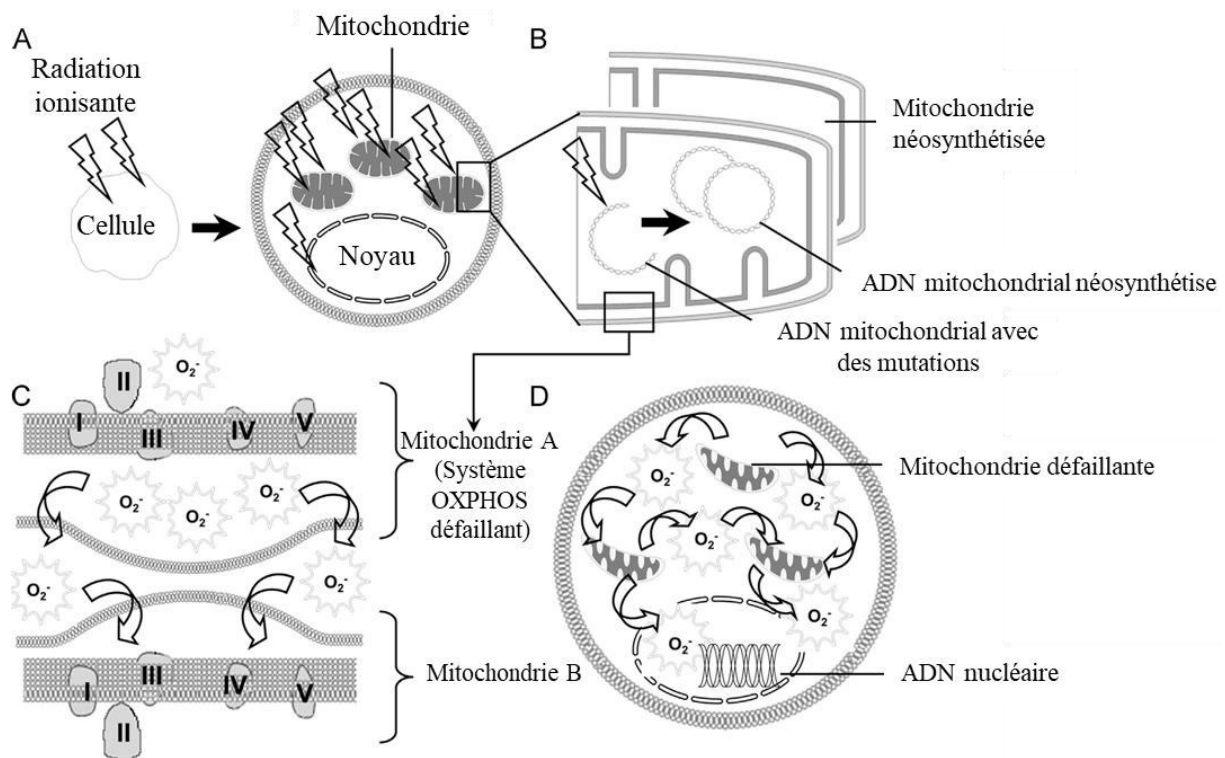


Figure 8 : Réponse mitochondriale aux radiations ionisantes.

(A) Lorsque la cellule est exposée aux radiations ionisantes, les mitochondries et le noyau vont être atteints directement par les rayons et indirectement par la production d'ERO. (B) L'ADN mitochondrial subit des lésions qui sont réparées par des mécanismes semblables à ceux de la réparation de l'ADN génomique, mais il peut y avoir apparition de mutations qui sont ensuite transmises aux mitochondries filles. (C) Les systèmes de phosphorylation oxydative (système OXPHOS) sont également perturbés par les ERO ce qui entraîne une surproduction d'ERO par la chaîne de transport d'électrons dans la membrane mitochondriale qui ciblent également l'ADN mitochondrial mais se propagent aussi aux mitochondries voisines et peuvent même atteindre l'ADN nucléaire (D). Adaptée de (Kam et al. 2013).

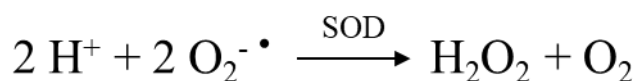
l'ADN mitochondrial qui peut subir les mêmes lésions que l'ADN génomique mais est dépendant du système de réparation codé dans le noyau (García-Lepe et al. 2019). L'ADN mitochondrial code pour les sous-unités de la chaîne de transport d'électrons ainsi que pour la machinerie nécessaire à son propre assemblage, les mutations génétiques causées par les radiations ionisantes peuvent être reliées au mauvais fonctionnement des mitochondries et même mener jusqu'à l'activation de l'apoptose (Azzam et al. 2012; W. Kim et al. 2019). Les mitochondries endommagées peuvent également être transmises aux cellules filles et ainsi perpétuer le stress oxydatif dans d'autres cellules qui n'ont pas été directement irradiées (Azzam et al. 2012) (Figure 8).

Les macromolécules irréversiblement oxydées (ADN, protéines et lipides) et même les mitochondries sont finalement dégradées par le protéasome ou par autophagie (Dunlop et al. 2009; Filomeni et al. 2015).

b. Réduction des ERO

Pour contrer la production d'ERO et revenir à une balance redox stable, les cellules font appel à de nombreuses enzymes et protéines antioxydantes.

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des enzymes majeures dans la réduction des ERO. Il en existe 3 isoformes : SOD1 ou CuZnSOD, SOD2 ou MnSOD et SOD3. SOD1 est retrouvée dans le cytoplasme, l'espace intermembranaire mitochondrial, le noyau et les lysosomes, alors que SOD2 et SOD3 sont retrouvés respectivement dans les mitochondries et dans le milieu extracellulaire (Trachootham et al. 2008). Ces 3 enzymes permettent la dismutation des ions superoxydes $O_2^{\bullet -}$ en dioxygène O_2 et peroxyde d'oxygène H_2O_2 selon la formule :



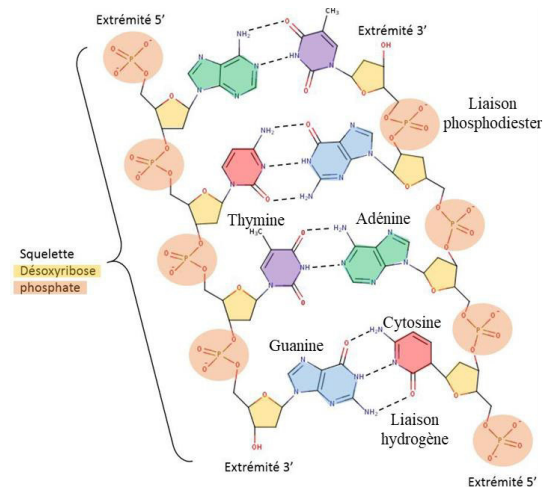


Figure 9 : Structure de l'ADNg.

Les cytosines (rouge) interagissent avec les guanines (bleu) et les adénines (vert) avec les thymines (violet) via des liaisons hydrogènes. Les nucléotides forment des brins via des liaisons phosphodiester (orange) au niveau de leur désoxyribose (jaune). Adaptée de (Rieux 2017).

Le peroxyde d'oxygène peut ensuite être converti en molécule d'eau H₂O et dioxygène O₂ sous l'action de la catalase CAT ou en molécule d'eau H₂O lors de la conversion du glutathion réduit GSH en glutathion oxydé GSSG par la glutathione peroxydase GPX (Valko et al. 2006) ou encore par les peroxyrédoxines PRX à l'aide de protéines contenant des groupements thiols (Rhee et al. 2005).

D'autres molécules comme la vitamine C ou les caroténoïdes permettent également de réduire les ERO par 2 méthodes : le transfert d'électron simple (SET) et par transfert d'atome d'hydrogène (HAT) (Santos-Sánchez et al. 2019).

De plus, l'irradiation par des rayons ionisants peut induire la libération du facteur de transcription Nrf2 et son adressage au noyau où il va se fixer sur l'ADN au niveau des séquences régulatrices appelées élément de réponse antioxydant (ARE) et entraîner l'expression de gènes cytoprotecteurs tels que les glutathions transférases (GSTs), l'UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), la γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), les glutathion peroxydases (GPXs), l'hème oxygenase-1 (*HO-1*), la catalase (*CAT*), et la NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 (*NQO-1*) qui participent à la réduction des ERO (McDonald et al. 2010; Tonelli et al. 2017).

3. Dommages à l'ADN radioinduits

Il est admis en radiobiologie que les effets biologiques majeurs des radiations ionisantes sont liés aux dommages à l'ADN génomique, même si des études récentes pointent de plus en plus l'importance d'autres cibles (Reisz et al. 2014).

a. ADN génomique (ADNg)

L'ADNg est une macromolécule contenue dans le noyau, dans les cellules eucaryotes, et renfermant le code génétique essentiel, avec l'ADN mitochondrial, pour qu'un organisme se développe, vive et se reproduise (Figure 9).

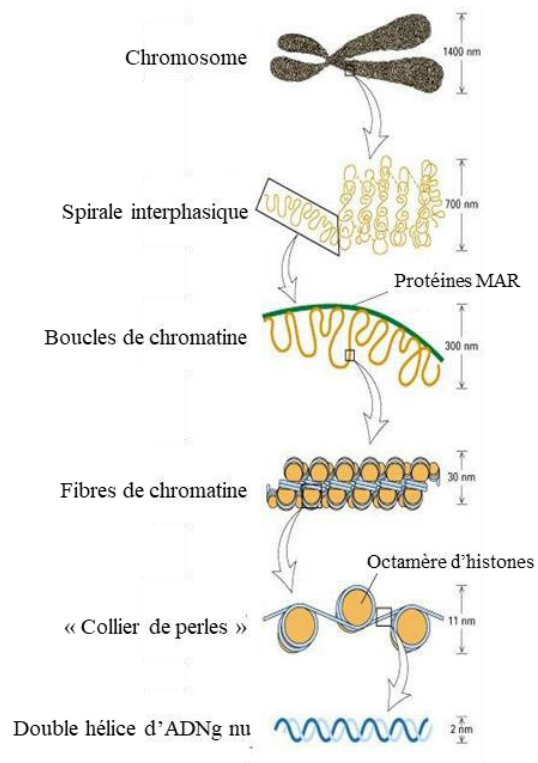


Figure 10 : Les différents niveaux de condensation de l'ADNg dans les cellules eucaryotes.

Adaptée de (Lodish et al. 2000).

Sous forme déroulée, l'ADNg d'une cellule mesure 2 mètres. Il est donc compacté à plusieurs niveaux pour être contenu dans le noyau. L'ADNg nu est enroulé autour d'octamères d'histones formant ainsi un « collier de perles » qui lui-même est surenroulé en une fibre de chromatine qui est maintenue sous forme de boucles par les protéines d'attachement de la matrices nucléaires (protéines MAR) (Figure 10). En fonction de l'étape du cycle cellulaire ces fibres de chromatines sont plus ou moins compactées pour permettre l'expression génique (en permettant à la machinerie de transcription l'accès à l'ADN), la réplication ou encore la distribution d'un chromosome dans chaque cellule fille lors de la division cellulaire.

b. Les différents dommages radioinduits de l'ADN

Les radiations ionisantes vont endommager l'ADN directement et indirectement via les ERO (Figure 11).

Les 4 bases composant l'ADN peuvent être endommagées par oxydation, ce qui provoque l'apparition de thymines glycols ou encore de 8-Oxoguanines. Les 8-oxoG sont les dommages des bases de l'ADN les plus courants car lorsque les 3 autres bases de l'ADN subissent une oxydation, les guanines avoisinantes ont tendance à donner un électron à la base oxydée (Ravanat et al. 2016).

Les cassures simples brins sont également la conséquence d'une exposition aux radiations ionisantes. Il s'agit d'une cassure d'un des 2 brins de l'ADN au niveau du désoxyribose ou de la liaison phosphodiester (Caldecott 2008; Ravanat 2018).

Les liaisons glycosidiques entre les désoxyriboses et les bases azotées peuvent également être coupées lors d'une irradiation, il s'agit alors de sites abasiques (Ravanat 2018). Il est à noter que lors de la réparation de l'ADN par le système de réparation par excision de base (BER) qui sera décrit plus précisément dans la section II.4.b.i, une des étapes de réparation fait intervenir

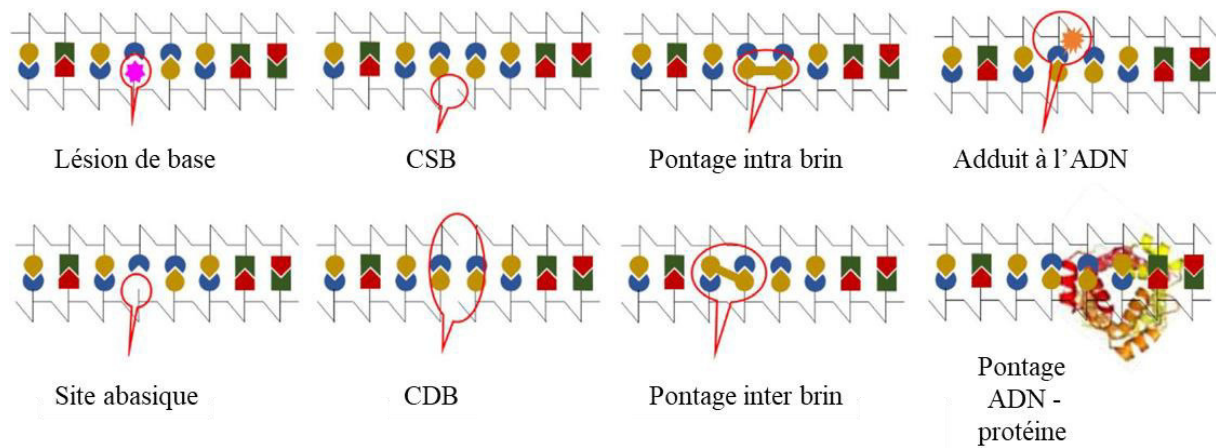


Figure 11 : Représentation schématique des différents types de lésions à l'ADN radio-induites.

Lésions de base, cassures simples brins (CSB), pontages intra brin, adduits à l'ADN, sites abasiques, cassures doubles brins (CDB), pontages inter brin et pontages ADN – protéines.

Adaptée de (Ravanat 2018).

la coupure de la liaison glycosidique entre la base et le désoxyribose, créant ainsi un site abasique (Schermerhorn et al. 2014).

Sous l'action des ERO produits par les radiations ionisantes, les bases azotées de l'ADN peuvent se lier de façon covalente à d'autres agents. Lorsque les bases se lient de façon covalente entre elles, on parle alors d'un pontage intra brin si elles sont sur le même brin d'ADN et si elles sont sur 2 brins différents, il s'agit d'un pontage inter brin (Dextraze et al. 2010 ; Colis et al. 2008). Lorsqu'une liaison covalente se forme entre une base azotée de l'ADN et une molécule endogène ou exogène, on parle alors d'un adduit à l'ADN (Cadet et al. 2012) et lorsque la base interagit avec une protéine, il s'agit alors d'un pontage ADN – protéine (Ide et al. 2015).

Enfin, les cassures doubles brins (CDB) sont les dommages à l'ADN radio-induits les plus étudiés. Ce sont des cassures des 2 brins de l'ADN au niveau du squelette composée des désoxyriboses et des phosphates dans une zone réduite. Les CDB peuvent être produits directement par les radiations ionisantes, indirectement par les ERO et les espèces réactives de l'azote ou encore lors de la réparation de certains dommages à l'ADN par excision de nucléotide (NER) ou BER (Cannan et al. 2016; Lehoczký et al. 2007).

Ainsi, les radiations ionisantes induisent de nombreux dommages à l'ADN qui sont réparés par des voies de réparation variant en fonction du type de dommage, mais également de la phase du cycle dans lequel se trouve la cellule.

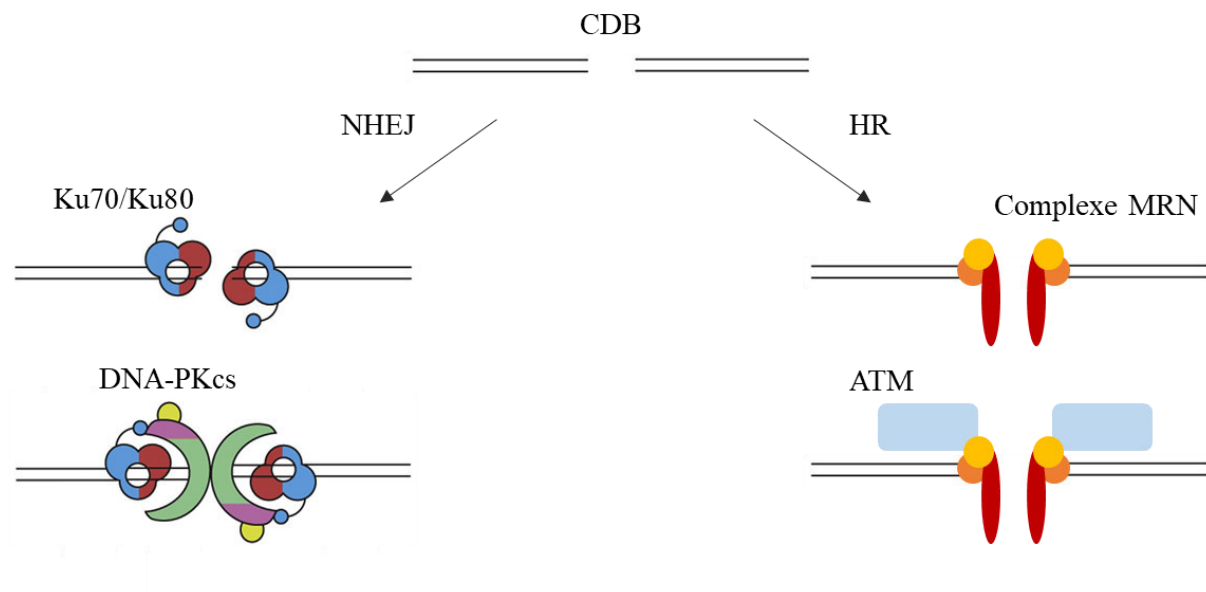


Figure 12 : Reconnaissance des cassures doubles brins.

Lors de la réparation par NHEJ, les CDB sont reconnues par les hétérodimères formés de Ku70 (en bleu) et Ku80 (en rouge) permettant le recrutement de la kinase DNA-PKcs. Lors de la réparation par HR, les CDB sont reconnues par les complexes MRN formés de Mre11 (en orange), Rad50 (en rouge) et NBS1 (en jaune) permettant le recrutement de la kinase ATM. Adaptée de (Jette et al. 2015).

4. Voies de réparation de l'ADN

a. Cassures doubles brins (CDB)

i. Reconnaissance

Les toutes premières étapes de réparation des CDB sont leur reconnaissance et l'activation de kinases de la famille phosphoinositide 3 – kinase (PI3K) – related kinases (PIKK) qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire pour réparer les dommages à l'ADN et recruter les protéines de réparation au niveau des CDB.

Les kinases DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) et ATM (ataxia telangiectasia mutated) sont les 2 protéines PIKK qui peuvent être recrutées au niveau des CDB respectivement par le complexe Ku70/Ku80 et le complexe MRN composé des protéines Mre11 (Double-strand break repair protein MRE11), Rad50 (DNA repair protein RAD50) et Nbs1 (Nibrin). DNA-PKcs est impliquée seulement dans la réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), majoritaire en phases G0/G1 du cycle cellulaire et même à la fin de la phase G2, et ATM est impliquée dans la réparation par NHEJ et dans la réparation par recombinaison homologue (HR), majoritaire en fin de phases S et début de G2 (Karanam et al. 2012) (Figure 12). Lorsque ces protéines sont recrutées, elles phosphorylent les histones H2AX au niveau de la serine 139 de part et d'autres de la CDB (Stiff et al. 2004) ce qui permet ainsi le recrutement des protéines de réparation propres à chaque voie (Podhorecka et al. 2010).

De plus, la kinase ATM joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, mais également dans l'induction de l'apoptose lorsque les dommages sont trop importants. En cas de CDB, ATM peut directement phosphoryler la protéine p53 au niveau de la serine 15 et la protéine checkpoint kinase 2 (Chk2) au niveau de la thréonine 68 qui à son tour peut phosphoryler la serine 20 de p53, entraînant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire au niveau des points de contrôle du cycle

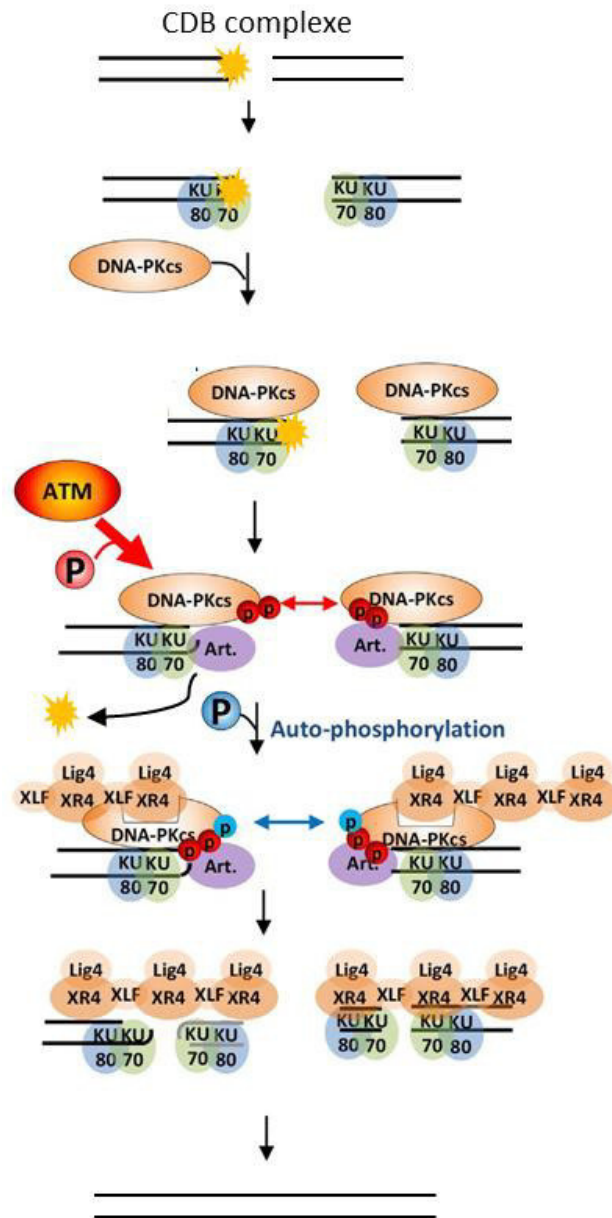


Figure 13 : Représentation schématique de la réparation d'une cassure double brin complexe par le mécanisme de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). Adaptée de (Jiang et al. 2015).

cellulaire G1/S et G2/M et régulant l'apoptose (Matsuoka et al. 1998; Hirao et al. 2000).

ii. Réparation

La réparation NHEJ est le système préférentiel de réparation des CDB en phases G0/G1 et à la fin de la phase G2 (Karanam et al. 2012). Au tout début de la réparation, 2 hétérodimères formés de Ku70 et Ku80 se fixent de part et d'autre de la CDB et recrutent chacun une kinase DNA-PKcs qui s'autophosphorylent sur de nombreux sites mais qui seraient également phosphorylées par ATM permettant ainsi le recrutement de l'endonucléase Artemis qui éliminerait les bases endommagées aux extrémités de l'ADN libre au site des CDB lorsque les dommages sont complexes (Jette et al. 2015; Jiang et al. 2015). DNA-PKcs phosphorylent également les histones H2AX de part et d'autre de la CDB, un rôle en commun avec ATM, ce qui permet le recrutement et l'assemblage des protéines de réparation au niveau de la CDB (Podhorecka et al. 2010), notamment le recrutement de la protéine Tumor suppressor p53-binding protein 1 (53BP1) qui inhibe la réparation par HR et promeut la réparation par NHEJ (Burger et al. 2019). La protéine X-ray repair cross-complementing protein 4 (XRCC4) est recrutée au niveau des CDB et va à son tour participer au recrutement de protéines, notamment la protéine polynucleotide kinase-phosphatase (PNKP) et les ADN polymérases μ et/ou λ qui vont permettre l'ajout de nucléotides pour obtenir une coupure à bouts francs (Jette et al. 2015). Enfin, un complexe formé de XRCC4, la DNA ligase 4 (Lig4) et XRCC4-like Factor (XLF) est constitué au niveau de la CDB et lie les 2 extrémités de l'ADN (Figure 13) (McElhinny et al. 2000; Hammel et al. 2010).

Il s'agit ici d'un modèle possible de NHEJ et ce recrutement séquentiel d'effecteurs pourrait ne pas être aussi clair et délimité dans la cellule, vu que le recrutement de XRCC4, XLF et Lig4 n'est pas dépendant de DNA-PKcs (Mari et al. 2006; Yano et al. 2008). Les simples CDB

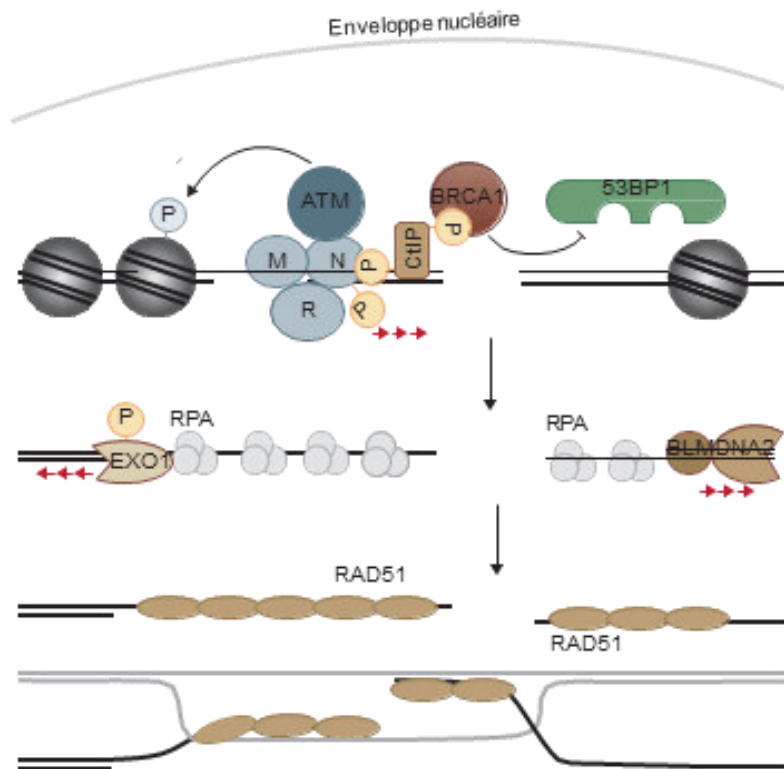


Figure 14 : Réparation d'une cassure double brin en fin de phase S/début de phase G2.

Le complexe MRN reconnaît la CDB et recrute la kinase ATM qui phosphoryle les histones H2AX de part et d'autre de la cassure ainsi que le complexe MRN favorisant son activité endonucléasique permettant de recruter CtIP. Ce dernier recrute BRCA1 ce qui promeut la HR tout en défavorisant la NHEJ via l'inhibition de 53BP1. Les exonucléases EXO1, BLM et DNA2 sont recrutées au niveau de la CDB et résèquent l'ADN de part et d'autre de la cassure créant ainsi de l'ADN simple brin qui est protégé par l'ajout de RPA. Ces dernières sont remplacées par des protéines Rad51 et ce complexe nucléoprotéique peut ainsi envahir la séquence homologue non lésée présente dans la chromatide sœur. Adaptée de (Hustedt et al. 2017).

pourraient être réparées rapidement sans requérir l'action d'ATM et même de DNA-PKcs (Reynolds et al. 2012).

La réparation par HR, majoritaire en fin de phase S et en début de phase G2 (Karanam et al. 2012), fait intervenir certains acteurs en commun avec la réparation NHEJ (ATM ou encore H2AX), mais possède aussi ses propres effecteurs. En effet, lors de la réparation des CDB par HR, 2 complexes MRN se fixent de part et d'autre de la cassure et recrutent la kinase ATM qui phosphoryle de nombreux effecteurs dont les complexes MRN eux-mêmes et les histones H2AX. Ces phosphorylations permettent de recruter de nombreux acteurs de la réparation dont CtIP (You et al. 2009), mais également d'activer l'activité endonucléasique de la protéine Mre11 du complexe MRN. Cette activation permet à la protéine BRCA1 de se lier à CtIP, d'inhiber ainsi la réparation par NHEJ et de promouvoir la réparation par HR en inhibant 53BP1 de part et d'autre de la CDB et en permettant ainsi la résection de l'ADN par 2 complexes protéiques à l'activité exonucléasique, un complexe comprenant BLM (BLoom syndrom protein) – DNA2 (DNA Replication Helicase/Nuclease 2) et un complexe comprenant EXO1 (Exonuclease 1) – BLM. De plus, des protéines RPA (Replication Protein A) sont déposées le long de l'ADN simple brin mis à nu pour le protéger et sont ensuite remplacées par des protéines Rad51 (Figure 14) (Nimonkar et al. 2011; Shibata 2017; Burger et al. 2019). Une fois l'ADN réséqué, 2 voies majeures sont possibles : le DSBR (Double-Strand Break Repair) et la SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing). Dans les 2 cas, le filament nucléoprotéique (ADN simple brin + Rad51) envahit la séquence homologue sur la chromatide sœur non endommagée, et forme une boucle avec l'apparition d'une jonction de Holiday pour la SDSA et 2 jonctions de Holiday pour le DSBR (Sung et al. 2006). Dans le système SDSA, après la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase δ (McVey et al. 2016), la boucle est ouverte à l'aide du complexe BTR, composé de BLM, la topoisomérase III α et des

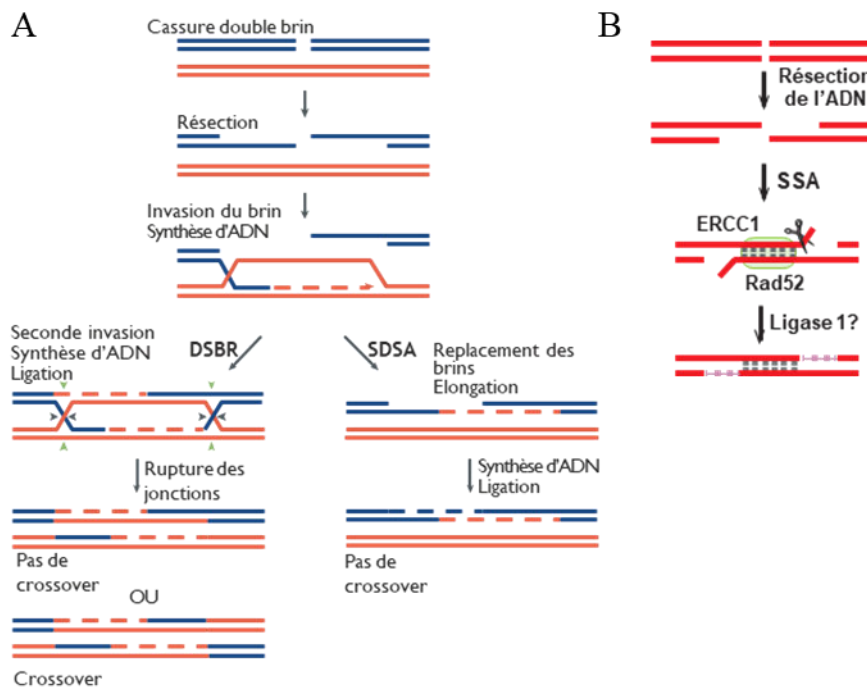


Figure 15 : Réparation des cassures doubles brins par recombinaison homologue.

(A) Après la résection de l'ADN et l'invasion de la chromatide sœur, la CDB est réparée par DSBR avec l'invasion par l'autre partie de la CDB et la rupture des 2 jonctions de Holiday ainsi formées, ou par SDSA avec ouverture de la boucle de réparation puis synthèse de l'ADN complémentaire. (B) Après la résection de l'ADN, la CDB peut être réparée par SSA si des séquences homologues sont proches de part et d'autre de la CDB. Adaptée de (Sung et al. 2006; Verma et al. 2016).

protéines RMI1 et RMI2 (RecQ-mediated genome instability protein). Lors de la voie DSBR, les 2 jonctions de Holiday sont cassées sous l'action de plusieurs endonucléases séparant les chromatides sœurs et permettant l'apparition de crossover (Figure 15) (Sung et al. 2006; Hustedt et al. 2017). L'ADN est finalement lié par une ligase qui pourrait être la Ligase 1 (Lig1) (Verma et al. 2016).

Alternativement et lorsque la résection de l'ADN met à jour des séquences homologues flanquant la CDB, il peut y avoir réparation par SSA (Single-Stranded Annealing). La reconnaissance de séquences homologues proches se fait via Rad52 (DNA repair protein RAD52 homolog), la nucléase ERCC1 (DNA excision repair protein ERCC-1) clive l'ADN excédentaire et la ligase Lig1 lierait enfin l'ADN (Figure 15) (Verma et al. 2016).

Il est important de noter qu'il existe une fine régulation de ces 2 voies de réparation des CDB, que les acteurs de la réparation NHEJ peuvent jouer plusieurs rôles dans la réparation HR (et réciproquement) et qu'il y a des communications entre ces 2 systèmes de réparations.

b. Les dommages simples brins

Dans le cas de l'apparition d'une base azotée lésée ou d'un site abasique, la voie de réparation utilisée est la réparation par excision de base (BER) (Ravanat 2018).

Lorsqu'une base est endommagée, la première étape est assurée par une ADN glycosylase qui reconnaît et clive la base lésée, faisant apparaître ainsi un site abasique. Il existe au moins 11 glycosylases connues qui sont spécifiques des différents types de dommages des bases azotées (Krokan et al. 2013). L'AP endonuclease 1 (APE1) clive ensuite le squelette de désoxyribose permettant ainsi d'ouvrir l'ADN créant une extrémité 3'-OH et une extrémité 5'-deoxyribose phosphate (5'-dRP), l'ADN polymérase β (Pol β) catalyse la conversion de

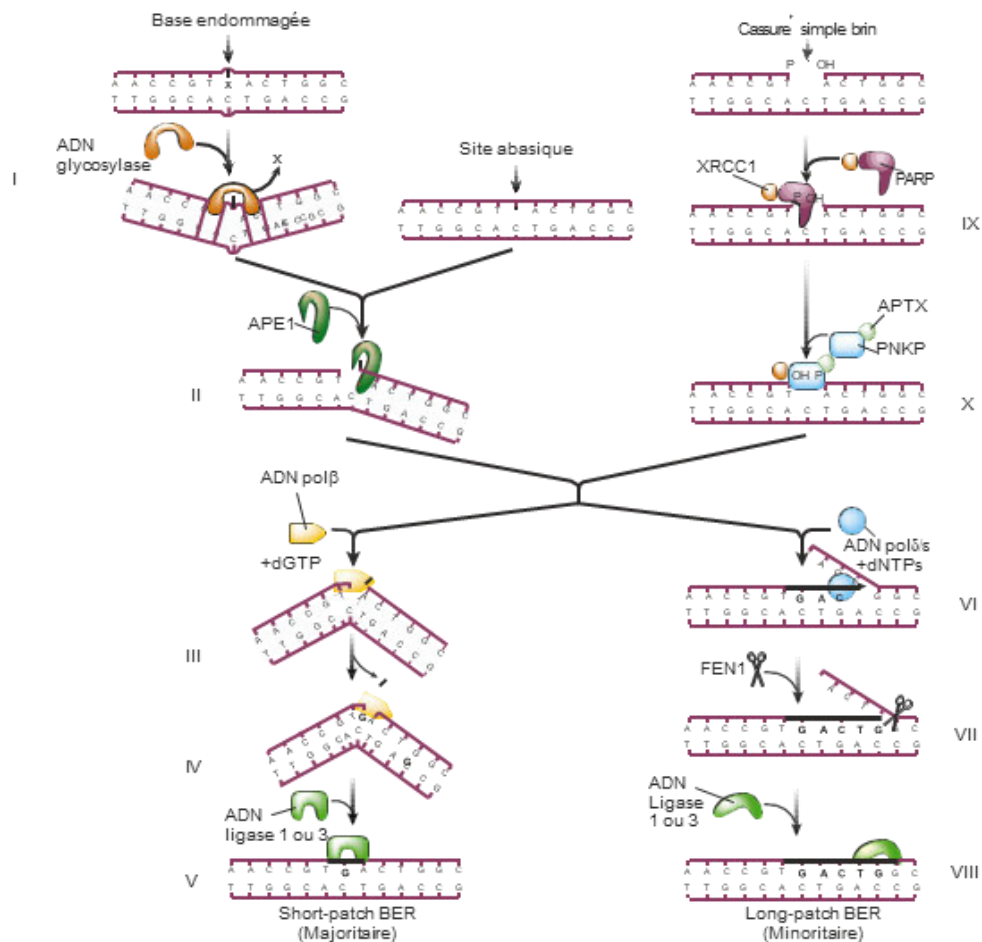


Figure 16 : Réparation de l'ADN par la voie d'excision de base.

I) Clivage de la base endommagée par une ADN glycosylase pour produire un site abasique. II) Clivage du squelette de désoxyribose par l'endonucléase APE1 pour ouvrir l'ADN double brin. Pour la réparation short patch, III) la polymérase Polβ catalyse la conversion de l'extrémité du squelette de désoxyribose et IV) l'ajout d'une base azotée complémentaire au second brin d'ADN non endommagé et V) la ligase Lig1 ou Lig3 lie l'ADN. Pour la réparation long patch, VI) la polymérase Polδ ou ε catalyse la conversion de l'extrémité du cytosquelette et l'ajout de plusieurs nucléotides. VII) L'endonucléase FEN1 clive l'ADN simple brin excédentaire et VIII) la ligase Lig1 ou Lig3 lie l'ADN. Pour les cassures simples brins, IX) la cassure est reconnue par la protéine PARP1 interagissant avec XRCC1 et X) ces 2 protéines recrutent un complexe composé de PNKP et APTX qui préparent les extrémités du brin lésé pour la suite de la réparation par la voie BER. Adaptée de (Hoeijmakers 2001).

l'extrémité 5'-dRP en 5'-phosphate l'incorporation d'un nucléotide complémentaire au second brin non lésé et les ADN ligases Lig1 et Lig3, en complexe avec la protéine XRCC1 (X-ray repair cross complementing 1), catalysent la liaison phosphodiester entre les extrémités 3'-OH et 5'-phosphate finale pour lier l'ADN (Schermerhorn et al. 2014). Il s'agit de la voie short patch BER (SP BER), mais dans certains cas, notamment lorsque le squelette de désoxyribose est modifié à son extrémité 5'-dRP, bloquant sa conversion par la Pol β , il y a incorporation de plusieurs nucléotides (2 à 10) par les ADN polymérases δ ou ϵ en remplaçant les anciens nucléotides et générant ainsi une séquence d'ADN simple brin. Cette séquence est clivée par la flap endonuclease 1 (FEN1) et la ligase Lig1 lie les 2 extrémités d'ADN, c'est la long patch BER (LP BER) (Figure 16) (Schermerhorn et al. 2014).

Les cassures simples brins directes, c'est-à-dire formées lors de la cassure du squelette de désoxyribose de l'ADN par l'irradiation ionisante ou les ERO, peuvent être réparées par la voie BER. La protéine PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) en complexe avec la protéine XRCC1 reconnaît la CSB et recrute la kinase-phosphatase PNKP, la protéine APTX (Aprataxin) pour préparer les extrémités à la suite de la réparation par la voie BER (polymérisation et ligation) (Figure 16) (Hoeijmakers 2001; Chaudhuri et al. 2017).

Il existe une autre voie de réparation des lésions simples brins, la réparation par excision de nucléotides (NER). Il y a 2 voies NER qui se différencient par leur système de reconnaissance de la lésion de l'ADN, la global genome NER (GG-NER) et la transcription-coupled NER (TC-NER). Pour le GG-NER, un complexe protéique composé de la protéine XPC (Xeroderma Pigmentosum C) qui reconnaît la distorsion de l'ADN, de la protéine RAD23B (Rad 23 homolog B) qui stabilise XPC et de la protéine CETN2 (centrin 2) qui améliore les capacités de reconnaissance de XPC, se fixe sur le brin non endommagé opposé à la lésion à l'ADN.

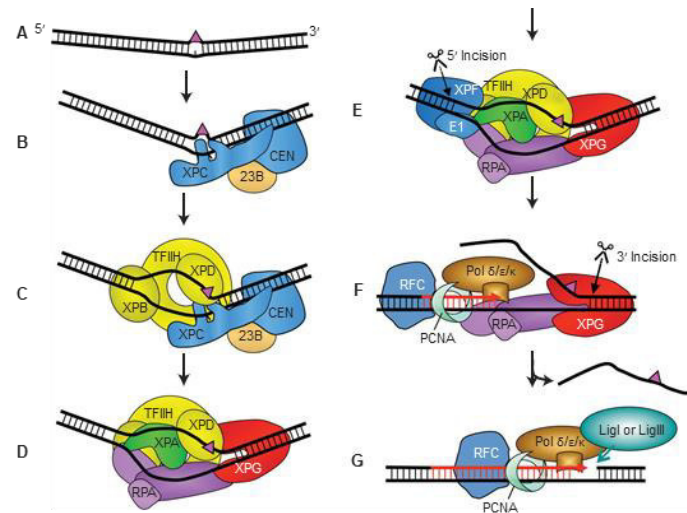


Figure 17 : Schéma de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides.

A) Lésion d'un nucléotide. B) Reconnaissance de la distorsion de l'ADN par le complexe XPC-RAD23B-CEN. C) Recrutement du complexe TFIIH qui ouvre l'ADN double brin. D) Recrutement de XPA, XPG et de protéines RPA pour protéger l'ADN simple brin et empêcher le rappariement. E) Recrutement de ERCC1-XPF et clivage de l'ADN en 5'. F) Initiation de la synthèse du brin complémentaire au brin non lésé par les polymérases δ et κ ou ϵ et clivage du brin lésé en 3' par XPG. F) Ligation de l'ADN par la ligase Lig1 ou Lig3. Adaptée de (Schärer 2013).

Lorsque le dommage de l'ADN n'entraîne pas une distorsion suffisante pour être reconnue par XPC, le complexe UV-DDB (UV-Damaged DNA-binding protein) reconnaît la lésion et recrute ensuite XPC. Le complexe TFIIH (Transcription Factor II H) comprenant notamment les ATPases/helicases XPD (Xeroderma Pigmentosum D, TFIIH core complex helicase subunit) et XPB (Xeroderma Pigmentosum B, TFIIH core complex helicase subunit) est ensuite recruté au niveau de la lésion et ce complexe ouvre l'ADN sur 20-30 nucléotides autour de la lésion. Cette structure permet le recrutement de XPA (Xeroderma Pigmentosum A, DNA damage recognition and repair factor), XPG (Xeroderma Pigmentosum G, endonuclease) et de protéines RPA qui se fixent sur l'ADN simple brin pour qu'il ne s'hybride pas de nouveau et pour le protéger. Le complexe XPF-ERCC1 (Xeroderma Pigmentosum F-ERCC excision repair 1, endonuclease catalytic subunit – ERCC1) est recruté et clive l'ADN en 5' de la lésion. La machinerie de réplication composée des ADN polymérases δ , ϵ et κ (Pol $\delta/\epsilon/\kappa$), de la protéine PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) et de la protéine RFC (Replication factor C) synthétise de l'ADN complémentaire du brin non endommagé et enfin l'ADN est lié sous l'action de la Lig1 ou la Lig3 avec l'aide de la protéine XRCC1 en fonction du cycle cellulaire. Pour le TC-NER, qui a lieu au niveau des gènes activement transcrits, la protéine CSB (ERCC excision repair 6, chromatin remodeling factor) est recrutée au niveau de la lésion, où l'ARN polymérase RNAPII est bloquée, qui recrute à son tour le complexe CSA (ERCC excision repair 8, CSA ubiquitin ligase complex subunit) et d'autres facteurs de la NER qui vont inhiber la reconnaissance de la lésion par XPC mais la suite de la réparation est similaire à la GG-NER (Figure 17) (Schärer 2013; Spivak 2015; Kobaisi et al. 2019).

Type de lésion de l'ADN	Voie de réparation de l'ADN
Lésion de base	BER
Site abasique	BER
Cassure simple brin	BER
Cassure double brin	NHEJ/HR
Pontage intra brin	NER
Pontage inter brin	NHEJ/HR
Adduit à l'ADN	NER
Pontage ADN - protéine	NER /HR

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des voies de réparation employées pour chaque type de lésion de l'ADN.

c. Quelle voie de réparation pour quelle lésion ?

Les radiations ionisantes induisent directement et indirectement de nombreux dommages à l'ADN qui sont réparés par des voies différentes. Le Tableau 2 résume quelles sont les voies impliquées en priorité en fonction des lésions. Il est important de noter que les protéines de réparation peuvent participer à plusieurs voies avec des rôles différents et qu'il y a des communications entre les différents systèmes de réparation.

5. Autophagie

L'autophagie est un processus physiologique permettant de recycler les protéines ou organites endommagés et qui peut ainsi protéger les cellules en limitant l'apoptose. Il est admis que l'autophagie est un mécanisme de protection contre les radiations ionisantes en « nettoyant » la cellule et en limitant l'apoptose, mais des études récentes ont montré que l'autophagie pouvait également entraîner la mort en réponse à l'irradiation.

a. Mécanismes

L'autophagie est activée par de nombreuses conditions de stress comme le stress oxydatif, l'agrégation des protéines, les dommages à l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique et d'autres. La cible commune de ces voies de signalisation est le complexe protéique ULK1 (Unc-51-like kinase 1), comprenant les protéines ULK1, autophagy-related 13 (ATG13), RB1-inducible coiled-coil (FIP200) et autophagy-related 101 (ATG101), qui activent la nucléation de la membrane de la vésicule de dégradation, ou autophagophore, en phosphorylant les composants du complexe I PI3KC3 (class III PI3K) (composé des protéines PI3KC3, vacuolar protein sorting 34 (VPS34), Beclin 1, autophagy-related 14 (ATG14), activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy protein 1 (AMBRA1) et general vesicular transport factor (p115)), qui active à son tour la production locale de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique dans une structure appelée omegasome.

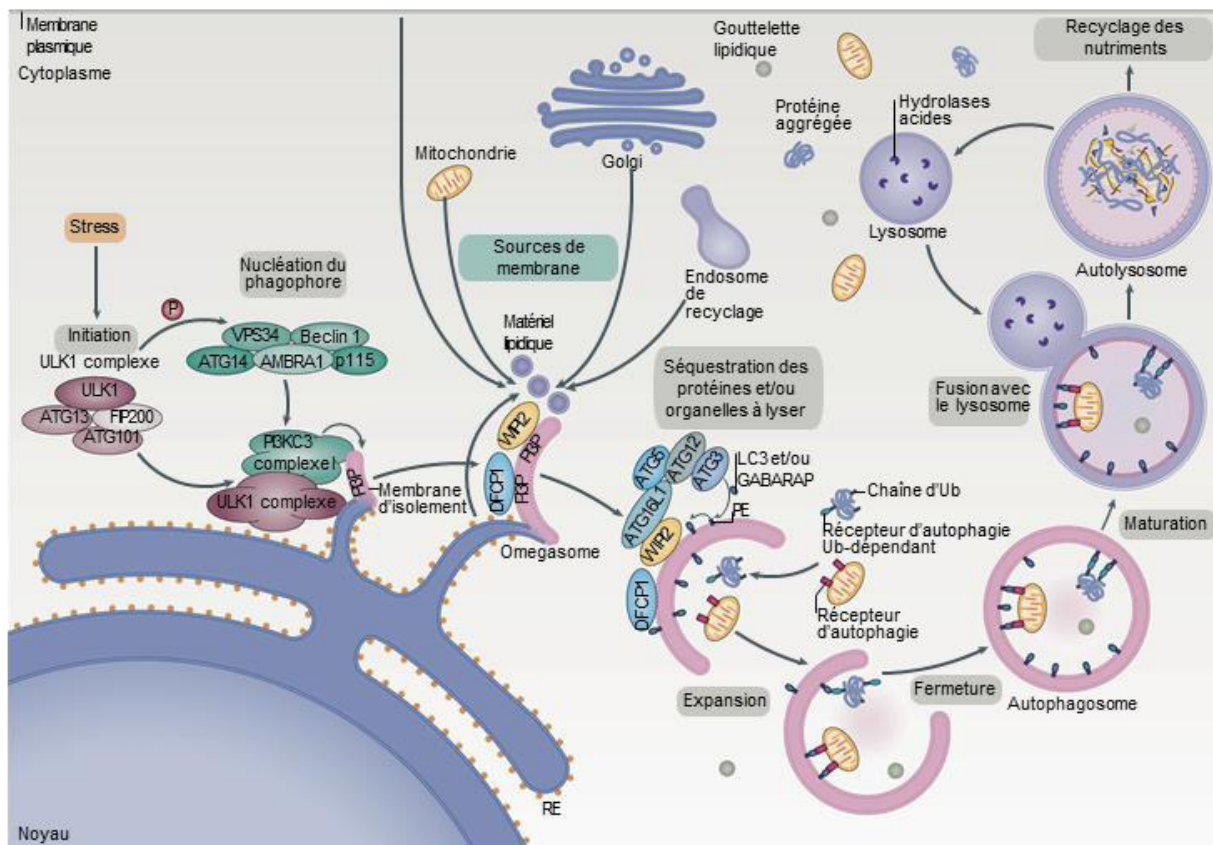


Figure 18 : Schéma du processus autophagique.

Un stress induit la nucléation du phagophore à partir de la membrane du réticulum endoplasmique qui est ensuite chargée en lipide PI3P et se détache du réticulum endoplasmique. La membrane lipidique augmente de taille pour englober les protéines et/ou organites à lyser qui sont reconnus par des protéines ancrées sur la face interne de la membrane du phagophore. Lorsque celle-ci est scellée, l'autophagosome ainsi formé fusionne avec le lysosome, ce qui entraîne la lyse des protéines et/ou organites présents dans l'autophagosome par les hydrolases acides du lysosome. Enfin, les nutriments issus de cette dégradation sont relargués dans le cytoplasme pour être réutilisés. Adaptée de (Dikic et al. 2018).

PI3P recrute ensuite d'autres protéines effectrices comme la protéine WD repeat domain phosphoinositide-interacting 2 (WIPI2) et la protéine FYVE domain-containing protein 1 (DFCP1). WIPI2 est capable de recruter un complexe protéiques comprenant ATG16L1 (autophagy-related 16 like 1), ATG12 (autophagy-related 12) et ATG5 (autophagy-related 5) améliorant les capacités d'ATG3 (autophagy-related 3) à associer des protéines à la membrane lipidique qui est en train d'être formée. ATG3 permet d'associer les protéines de la famille ATG8 (autophagy-related 8) dont notamment les protéines LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) et GABARAP (γ -aminobutyric acid receptor-associated proteins) aux liens phosphatidylethanolamines (PE) présents dans la membrane lipidique, LC3-I est ainsi converti en LC3-II qui est une protéine signature majeure de l'autophagie (Klionsky et al. 2016). Les protéines de la famille ATG8 attirent les composants de la machinerie autophagique mais participent également à l'élongation et à la fermeture de la membrane de l'autophagosome. De plus, LC3 est impliquée spécifiquement dans la séquestration des protéines et organelles marquées dans les autophagosomes. L'élongation de la membrane de l'autophagosome est assurée par l'ajout de matériel membranaire originaire de la membrane plasmique, des mitochondries, des endosomes et de l'appareil de Golgi. La fermeture de la membrane de l'autophagosome permet l'apparition d'une vésicule avec une bicouche lipidique qui mature et finalement fusionne avec le lysosome. Les hydrolases acides du lysosome dégradent le contenu de l'autophagosome et les nutriments résultants sont relargués dans le cytoplasme pour être de nouveau utilisés (Figure 18) (Glick et al. 2010; Yu et al. 2018; Dikic et al. 2018).

a. Autophagie radio-induite : survie ou mort cellulaire ?

L'autophagie peut être activée par les radiations ionisantes via de nombreuses voies de signalisation. Comme mentionné précédemment, les dommages à l'ADN sont un des effets

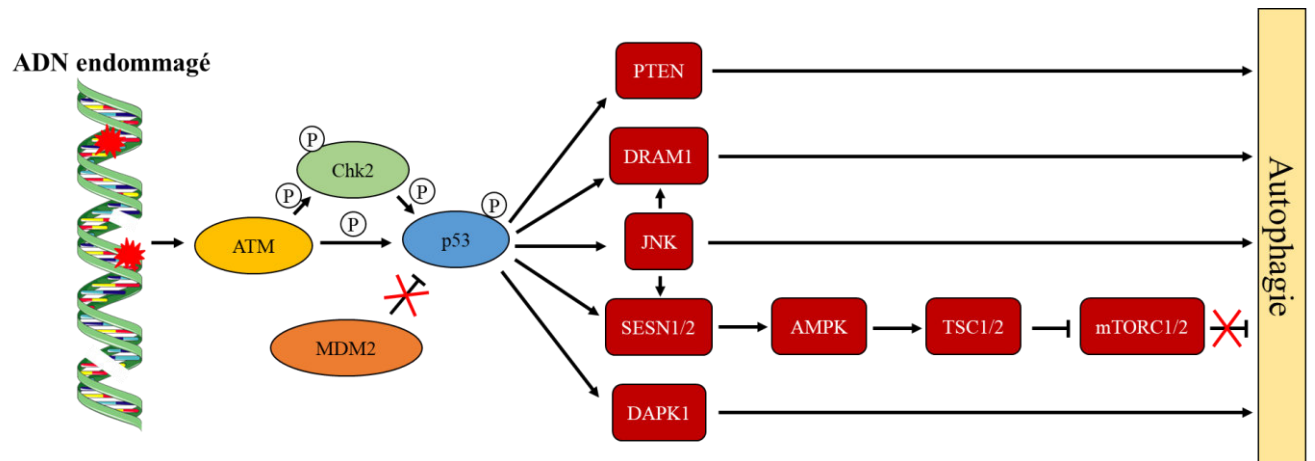


Figure 19 : Voies de signalisation activées par les dommages de l'ADN et induisant l'autophagie.

p53 activé en réponse aux dommages de l'ADN entraîne l'expression de gènes pro-autophagiques incluant *PTEN*, *DRAM1*, *JNK*, *SESN1*, *SESN2* et *DAPK1*. La voie JNK peut également induire l'expression de *SESN2* qui participe à l'inhibition de la voie mTOR.

majeurs des rayons ionisants. En réponse à ces lésions, les cellules activent différentes voies de signalisation permettant l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, il s'agit de la réponse aux dommages de l'ADN (DNA Damage Response en anglais DDR). Comme décrit précédemment, les dommages à l'ADN permettent l'activation de la kinase ATM qui peut phosphoryler directement, ou via la kinase Chk2, la protéine p53 au niveau des résidus serine 15 et serine 20 ce qui la stabilise en empêchant sa dégradation via la E3 ubiquitin ligase MDM2 (Murine Double Minute 2). p53 peut notamment activer l'autophagie en induisant l'expression de *SESN1* et *SESN2* qui activent la kinase AMPK (AMP-activated protein kinase). AMPK active le complexe TSC1/TSC2 (TSC complex subunit 1 et 2) qui inhibe les complexes mTORC1 et 2 (mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1 et 2) qui sont eux-mêmes des inhibiteurs de la formation du complexe ULK1 (Budanov et Karin 2008). ATM peut directement activer directement l'AMPK et induire ainsi l'autophagie (Alexander et al. 2010). p53 peut également induire l'expression de plusieurs gènes activateurs de l'autophagie comme *DRAM1* (DNA damage regulated autophagy modulator 1) qui joue un rôle dans la fusion des autophagosomes et des lysosomes, *PTEN* (Phosphatase and tension homolog) qui est un régulateur de la voie PI3K/Akt, elle-même régulatrice du complexe mTORC1, le gène codant pour la sous-unité TSC2, *DAPK1* (death-associated protein kinase 1) qui peut inhiber un séquestrateur de LC3 et activer Beclin 1, ou encore *JNK* (c-Jun N-terminal kinase) qui peut contribuer à la formation du complexe PI3KC3 et renforcer la régulation positive de DRAM1 (Figure 19) (Tang et al. 2015; Chaurasia et al. 2016). L'activation de PARP1 lors de la réparation des dommages à l'ADN peut également conduire à la déplétion en ATP et activer l'AMPK conduisant à l'activation de l'autophagie (Muñoz-Gámez et al. 2009; Rodríguez-Vargas et al. 2012). Les radiations ionisantes endommagent également les mitochondries, plus précisément l'ADNmt ainsi que les protéines et les lipides de la membrane mitochondriale.

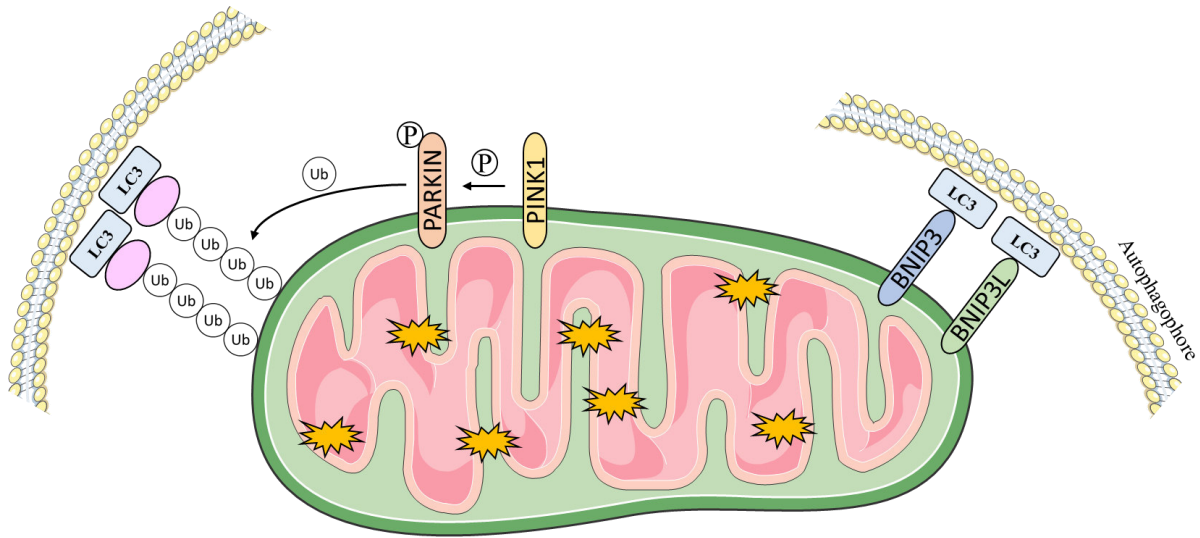


Figure 20 : Voies de la mitophagie.

Lorsque la mitochondrie est trop endommagée pour être réparée, PINK1 est accumulée sur la surface externe de la membrane mitochondriale et phosphoryle PARKIN, ce qui entraîne l'ubiquitination de la mitochondrie et son adressage à l'autophagosome. BNIP3 et BNIP3L sont recrutés à la membrane externe mitochondriale et possèdent un domaine reconnu par la protéine LC3 ancrée dans l'autophagosome, ce qui permet la formation de l'autophagosome autour de la mitochondrie endommagée.

Lorsque celles-ci sont trop endommagées, elles peuvent être dégradées par autophagie, on parle alors de mitophagie. Il existe 2 voies majeures d'induction de la mitophagie. La principale consiste en l'accumulation de protéines PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) sur la surface externe de la membrane mitochondriale en réponse aux radiations ionisantes, ce qui phosphoryle les ubiquitine ligases PARKIN qui ubiquitinent la mitochondrie qui est ainsi adressée aux autophagosomes. La deuxième voie fait intervenir BNIP3 (BCL2 interacting protein 3) et BNIP3L (BNIP3 like) qui sont recrutés à la membrane externe des mitochondries endommagées et qui permettent l'adressage aux autophagosomes (Figure 20) (Youle et al. 2011 ; Hu et al. 2016).

La réponse UPR déclenchée par l'irradiation et par la peroxydation des lipides peut déclencher l'autophagie. Comme décrit précédemment, la réponse UPR est déclenchée via PERK, ATF6 et IRE1. En réponse à l'irradiation, l'autophagie est activée via PERK et/ou IRE1 (Ogata et al. 2006 ; Chaurasia et al. 2019). PERK active le facteur de transcription ATF4 (activated transcription factor 4) qui régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie dont *MAP1LC3B* (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta) (B'chir et al. 2013). L'action d'IRE1 pourrait passer via la voie JNK et participer ainsi à la formation du complexe PI3KC3 (Urano et al. 2000). Il est important de noter que si le stress du réticulum endoplasmique est trop important, PERK et IRE1 peuvent induire la mort cellulaire (Sano et Reed 2013).

Après l'irradiation, un influx de calcium originaire du réticulum endoplasmique ou de l'extérieure de la cellule augmente la concentration cytoplasmique activant la kinase CaMKK- β (Calmodulin-dependent Kinase Kinase- β), ce qui active à son tour l'AMPK qui elle-même inhibe le complexe mTOR activant ainsi l'autophagie (Høyer-Hansen et al. 2007; Decuypere et al. 2011). La forte concentration de calcium intracellulaire peut également

mener à l'activation de la kinase DAPK qui phosphoryle Beclin 1 lui permettant de participer à la formation du complexe PI3KC3 (Zalckvar et al. 2009). Enfin, la concentration élevée en calcium peut également endommager les mitochondries et activer la mitophagie (Brookes et al. 2004).

La synthèse de céramides induites par les radiations ionisantes peuvent également mener à l'activation de la voie JNK et à la surexpression de Beclin 1 qui va participer à la formation du complexe PI3KC3 (D.-D. Li et al. 2009).

Finalement, les protéines oxydées et qui ne peuvent pas être réparées peuvent être dégradées par autophagie (Cecarini et al. 2007).

Il est admis que l'autophagie est un système pro-survie en réponse aux radiations ionisantes. L'autophagie permet de lyser les protéines et organelles endommagées tout en recyclant les nutriments ce qui permet à la cellule de se protéger en réponse aux rayonnements. Il a ainsi été proposé de bloquer l'autophagie pour radiosensibiliser les tumeurs dans les traitements par radiothérapie (Lomonaco et al. 2009; Ko et al. 2014; Yang et al. 2015; Maier et al. 2016; He et al. 2017; X. Chen et al. 2017). Mais il a également été montré que l'autophagie peut induire la mort cellulaire plutôt que la survie en réponse aux radiations ionisantes notamment dans les cellules où l'apoptose est déficiente (Kim et al. 2006; Gewirtz et al. 2009; Palumbo et al. 2012; Palumbo et al. 2013; Sharma et al. 2014; Classen et al. 2019).

6. Morts cellulaires radioinduites

a. Apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire enclenché en réponse à un signal externe ou interne.

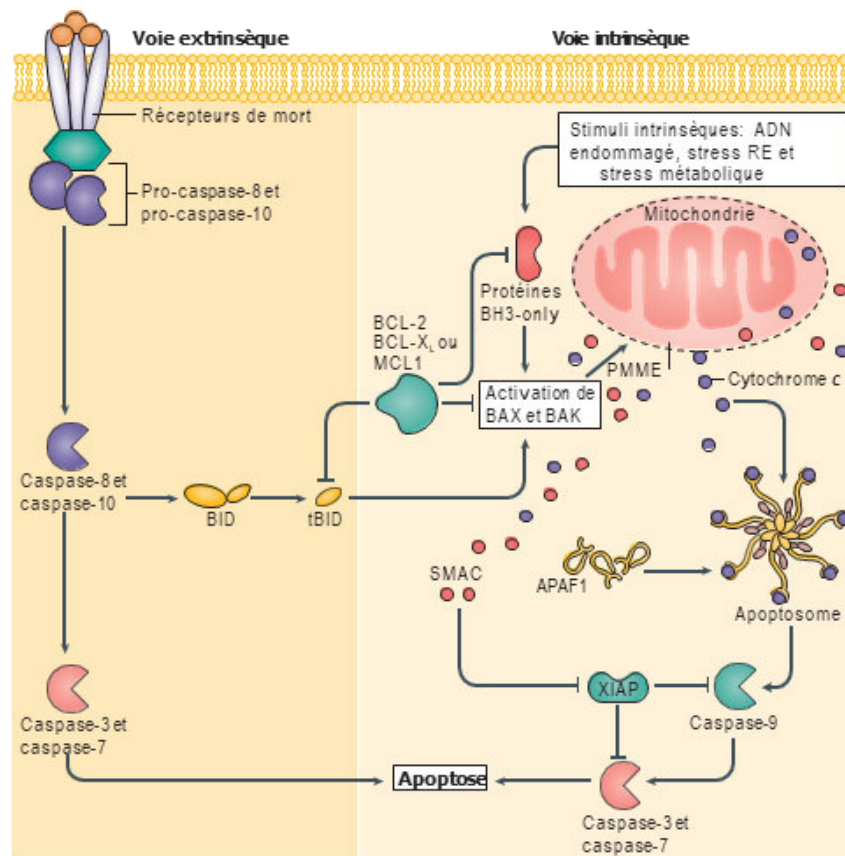


Figure 21 : Voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.

PMME = Perméabilisation de la Membrane Mitochondriale Externe. Adaptée de (Ichim et al. 2016).

La voie apoptotique extrinsèque est activée lorsque des ligands spécifiques se fixent sur leur récepteur de mort tels que les récepteurs TRAILR (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor) ou FAS (Fas cell surface death receptor) activant ainsi les caspases effectrices 8 et 10. Ces dernières peuvent activer directement les caspases exécutrices 3 et 7 et déclencher l'apoptose.

La voie intrinsèque est enclenchée par un stimulus intrinsèque à la cellule comme les dommages à l'ADN, le stress du réticulum endoplasmique ou le stress métabolique qui peuvent activer des protéines de la famille BH3-only (BCL-2 homology domain 3) activant à leur tour les protéines Bax (BCL2 associated X) et Bak (BCL2 antagonist/killer) menant à la perméabilisation de la membrane des mitochondries. Il est à noter que lors de la voie extrinsèque, la caspase effectrice 8 peut cliver la protéine BID (BH3-Interacting Death domain agonist) de la famille BH3-only, ce qui active les protéines Bax et Bak. Les protéines présentes dans l'espace inter-membranaires des mitochondries, comme SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) et le cytochrome C, sont relarguées dans le cytoplasme. Le cytochrome C active APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) conduisant à la formation de l'apoptosome qui clive la caspase effectrice 9, qui peut à son tour activer les caspases 3 et 7 en les clivant. Les protéines SMAC peuvent elles-mêmes inhiber l'inhibiteur d'apoptose XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) (Figure 21).

L'activation des caspases exécutrices mène à la fragmentation de l'ADN par des endonucléases, la destruction des protéines nucléaires et du cytosquelette, l'expression de ligands reconnus par les cellules phagocytaires et l'apparition de corps apoptotiques (Figure 22) (Poon et al. 2014; Ichim et al. 2016; Galluzzi et al. 2018; D'Arcy 2019).

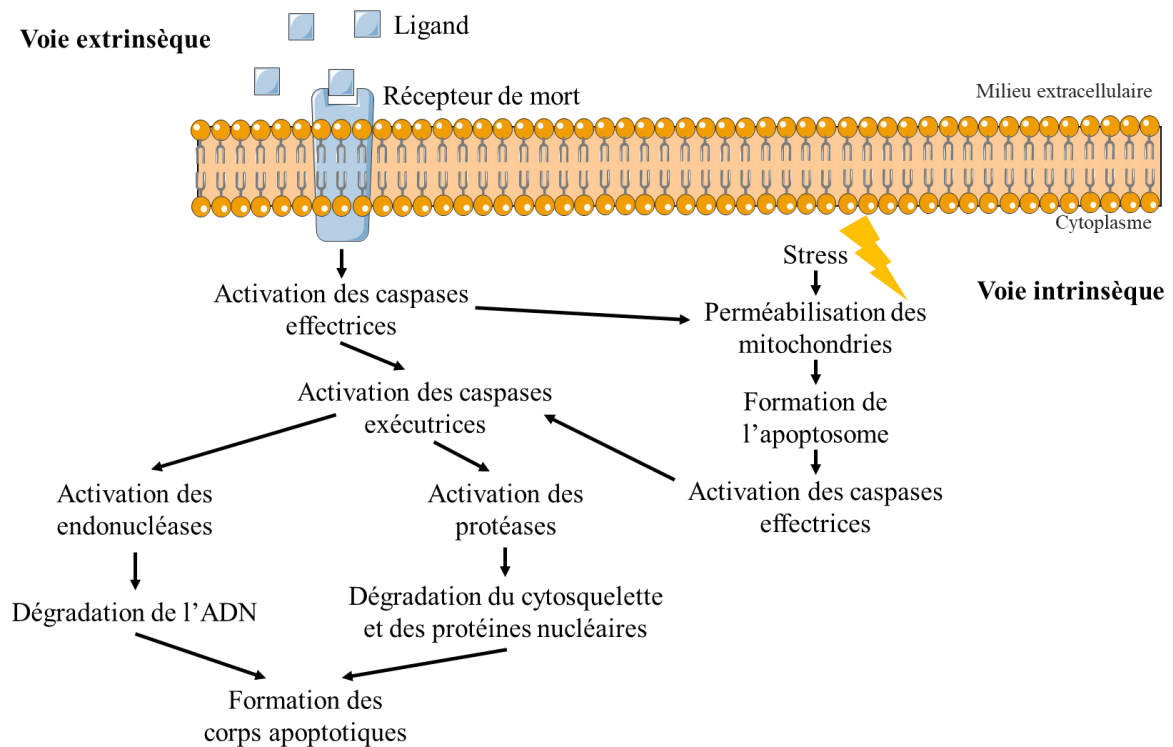


Figure 22 : Résumé des événements aboutissant à l'apoptose.

Les voies extrinsèque et intrinsèque mènent à l'activation des caspases exécutrices qui induisent la fragmentation de l'ADN, la destruction du cytosquelette et la formation de corps apoptotiques qui sont finalement dégradés par des cellules phagocytaires.

Les rayons ionisants et les ERO formées peuvent directement cibler les mitochondries entraînant la perméabilisation de leur membrane et l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose (Ogura et al. 2009). De même, l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire peut endommager les membranes des mitochondries (Richter et al. 1991).

Comme mentionné précédemment, en réponse aux dommages à l'ADN, p53 est stabilisée dans la cellule et peut activer l'expression de plusieurs gènes pro-apoptotiques dont ceux codant pour la protéine BH3-only PUMA (P53-Upregulated Modulator of Apoptosis) ou encore la protéine Bax entraînant ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose, mais aussi le gène codant pour le récepteur Fas, pouvant ainsi activer la voie extrinsèque (Sheard 2001; Kuribayashi et al. 2008; Czarny et al. 2015).

L'apoptose via la voie intrinsèque peut également être déclenchée par la réponse UPR avec notamment PERK qui peut entraîner l'expression de gènes pro-apoptotiques et IRE1 via la voie JNK (Moretti et al. 2007; Sano et al. 2013).

Les céramides synthétisées sous l'action des rayons ionisants et des ERO peuvent activer l'apoptose par la voie intrinsèque via la voie JNK (Verheij et al. 1998).

b. Nécrose

La mort cellulaire par nécrose peut également intervenir des suites de l'irradiation, mais lorsqu'il s'agit d'une forte dose (Panganiban et al. 2013).

En revanche, une forme programmée de nécrose, appelée la nécroptose peut être déclenchée par des doses proches de celles utilisées en radiothérapie, notamment lorsque l'apoptose est inhibée (Nehs et al. 2011).

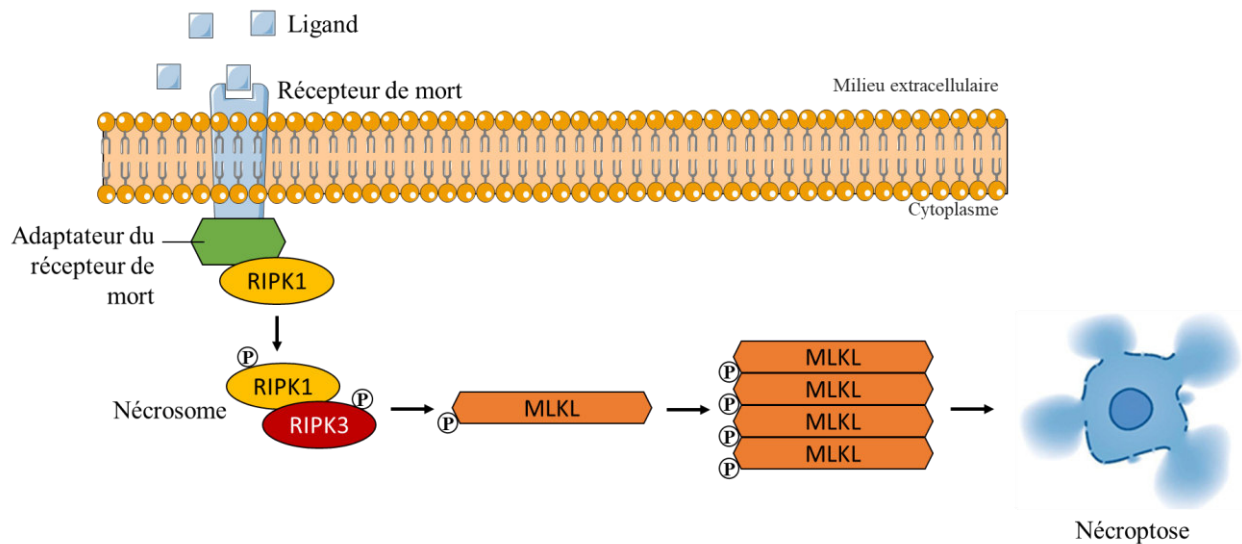


Figure 23 : Schéma de la nécroptose.

Lorsqu'un récepteur de mort reconnaît son ligand et que l'apoptose est inhibée, RIPK1 phosphoryle RIPK3 formant ainsi le nécrosome pouvant phosphoryler MLKL qui s'oligomériser et s'intègre dans la membrane plasmique pour perturber sa fonction barrière.

La nécroptose utilise une voie proche de celle de l'apoptose extrinsèque. Lorsque les récepteurs de mort reconnaissent leur ligand, ils activent la caspase effectrice 8 dans la voie apoptotique via la kinase RIPK1 (Receptor Interacting serine/threonine Kinase 1), mais lorsque l'activation de la caspase 8 est inhibée, RIPK1 forme un complexe protéique avec RIPK3 appelé le nécrosome et se transphosphorylent. La protéine MLKL (Mixed-Lineage Kinase domain-Like) est phosphorylée par la kinase RIPK3 active du nécrosome, s'oligomérisent et s'intègrent dans la membrane plasmique où elle perturbe l'intégrité membranaire conduisant à la lyse de la cellule (Figure 23). La protéine PGAM5L (PhosphoGlycerate Mutase family member 5) est également phosphorylée par le nécrosome et interagit avec la protéine PGAM5S sur la membrane mitochondriale aboutissant à la fission et à la fragmentation de la mitochondrie (Fulda 2013; Paganiban et al. 2013; Su et al. 2016).

L'ADN endommagé peut également entraîner la mort nécrotique via la production de TNF α (Tumor Necrosis Factor α) qui peut activer le récepteur de mort TNFR1 ou via le récepteur RAR γ (Retinoic Acid Receptor γ) qui peut activer RIPK1 et ainsi participer à la formation du nécrosome (Kadigamuwa et al. 2019).

c. Sénescence

La sénescence est caractérisée par l'arrêt irréversible du cycle cellulaire et peut être causée par les radiations ionisantes. Les cellules sénescents sont toujours vivantes et métaboliquement actives, mais ne peuvent pas se diviser.

Comme décrit précédemment, les radiations ionisantes provoquent des dommages à l'ADN directement ou indirectement via les ERO. Ces lésions conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN. Lorsque les dégâts de l'ADN sont irréparables, la sénescence cellulaire peut être enclenchée. Dans la réparation des CDB, la kinase ATM permet d'arrêter le cycle cellulaire aux points de contrôle G1/S ou G2/M en phosphorylant directement

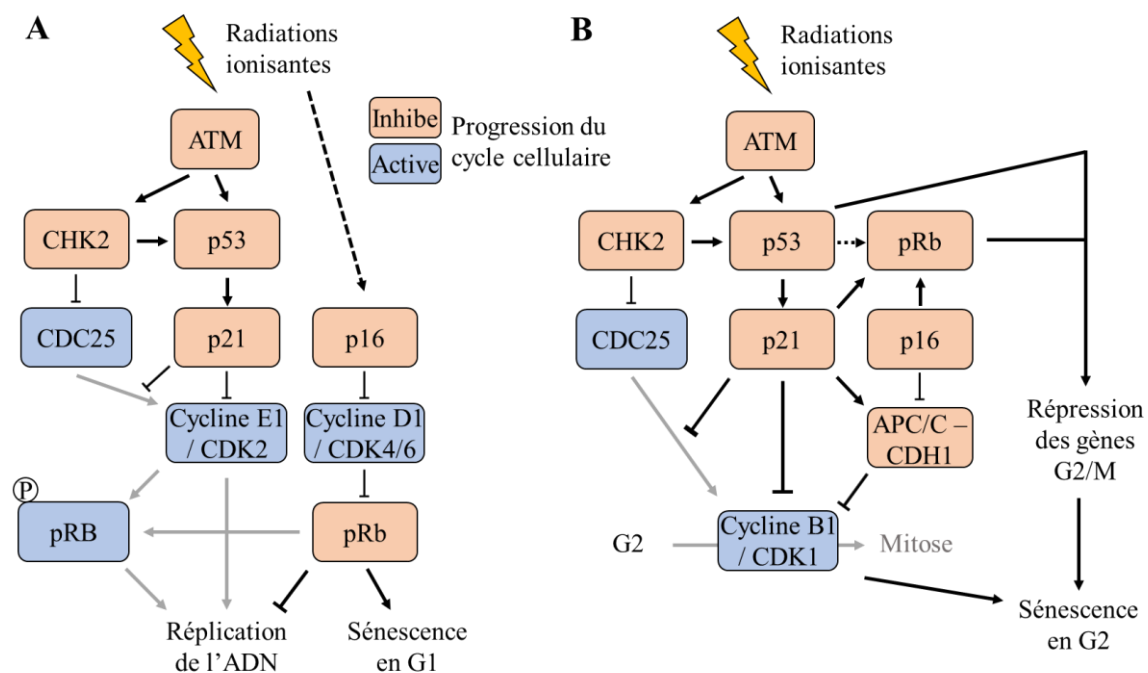


Figure 24 : Voies moléculaires induisant la sénescence.

A) En phase G1, l'ADN endommagé active ATM qui phosphoryle CHK2 et p53. CHK2 inhibe CDC25 et p53 entraîne l'expression de p21, aboutissant à l'inhibition du complexe Cycline E1/CDK2 qui contrôle la machinerie de réplication de l'ADN. p21 inhibe également la phosphorylation de pRb en inhibant les complexes Cycline D1/CDK4/6 et Cycline E1/CDK2, ce qui permet à pRb d'inhiber l'expression des gènes participant à la progression G1/S. p16 participe au maintien de la sénescence en inhibant CDK4 et CDK6. B) En phase G2, ATM active CHK2 qui inhibe CDC25 et empêche ainsi l'activation du complexe Cycline B1/CDK1. ATM active également p53 qui induit l'expression de p21 qui inhibe directement le complexe Cycline B1/CDK1 et indirectement en activant le complexe APC/C – CDH1 menant à la dégradation de la Cycline B1. p21 active également pRb en inhibant sa phosphorylation, il peut ainsi réprimer les gènes responsables de la transition G2/M. p53 pourrait également activer pRb dans un mécanisme indépendant de p21. Enfin, p16 participe au maintien de la sénescence en bloquant l'inhibition de pRb. Adaptée de (Gire et al. 2015).

p53 ou via la kinase CHK2. ATM et CHK2 inhibent également les phosphatases CDC25 (Cell Division Cycle 25) en les phosphorylant et empêchant ainsi l'activation du complexe Cyclin E1/CDK2 (Cyclin Dependent Kinase 2) qui contrôle la machinerie de réplication de l'ADN (Falck et al. 2001). En phase G1, p53 phosphorylée active l'expression de p21 qui est un inhibiteur de CDK2 et aussi un inhibiteur de CDK4 et CDK6 empêchant ainsi la phosphorylation de pRb (Retinoblastoma protein) qui peut ainsi inhiber l'expression des gènes participant à la progression G1/S (Gire et al. 2015; Y. Wang et al. 2016; M. Li et al. 2018). La protéine p16 participe également à la sénescence en inhibant CDK4 et CDK6, mais contrairement à p21, elle stabilise la sénescence alors que p21 l'induit et son expression n'est pas p53-dépendante mais serait contrôlée par les ERO (Figure 24) (Rayess et al. 2012). L'arrêt du cycle cellulaire peut aussi se produire en phase G2. ATM et CHK2 peuvent inactiver les phosphatases CDC25 empêchant ainsi l'activation des complexes Cyclin B1/CDK1 qui permet normalement le passage en mitose. p53, activée directement par ATM ou via CHK2, induit l'expression de p21 qui en retour agit directement sur le complexe Cyclin B1/CDK1 en le bloquant dans le noyau sous forme inactive et indirectement en activant le complexe APC/C (Anaphase-Promoting Complexe/Cyclosome) et son coactivateur FZR1 (Fizzy And Cell Division Cycle 20 Related 1) menant à la dégradation de la Cyclin B1. p21 bloque également la phosphorylation de pRb qui inhibe ainsi l'expression des gènes permettant la transition G2/S. Ce mécanisme pourrait également se faire indépendamment de p21 mais toujours via p53, et p16 pourrait participer au maintien de la sénescence en bloquant l'inhibition de pRb (Figure 24) (Gire et al. 2015; Y. Wang et al. 2016; M. Li et al. 2018).

La sénescence est également caractérisée par la production de facteurs sécrétés associés à la sénescence (SASP en anglais pour Senescence-Associated Secretory Phenotype). Le recrutement d'ATM au niveau des CDB active la voie NFκB qui entraîne l'expression de

facteurs inflammatoires comme IL-1 α / β , IL-6, TGF- β ou encore TNF- α , de facteurs de croissance mais aussi de métalloprotéinases qui agissent sur l'environnement des cellules irradiées. Ces facteurs SASP participent également au renforcement de la sénescence cellulaire de façon autocrine et paracrine (Orjalo et al. 2009).

d. Catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique est un processus précédant la mort cellulaire et pouvant intervenir dans les cellules en cycle. Elle est définie par l'induction de la mitose avant l'achèvement des phases G2 et S. Elle peut être causée par plusieurs événements tels que l'hyper-amplification des centrosomes résultant d'un défaut de réparation de l'ADN ou un défaut de signalisation des dommages à l'ADN empêchant l'arrêt du cycle cellulaire. La catastrophe mitotique est caractérisée par la condensation prématurée des chromosomes autour du nucléole puis par la mitose aberrante de la cellule, pouvant aboutir à une ségrégation atypique des chromosomes et à la production de cellules présentant des noyaux avec une morphologie aberrante, avec des micronoyaux ou même plusieurs noyaux (Castedo et al. 2004; Dodson et al. 2007; Maier et al. 2016).

Il est à noter que les cellules non cancéreuses ayant subi une catastrophe mitotique peuvent rentrer en apoptose dans la phase M ou en apoptose, en nécrose ou en sénescence lors du cycle cellulaire suivant (Vakifahmetoglu et al. 2008; Vitale et al. 2011; Huber et al. 2015).

7. Mécanismes de lésions tissulaires

Tous ces effets cellulaires des radiations ionisants ont des conséquences au niveau tissulaire, qu'ils soient cancéreux ou sains. Les effets secondaires induits par la radiothérapie au niveau des tissus sains étant nombreux et variés, j'ai décidé de me concentrer principalement sur ceux

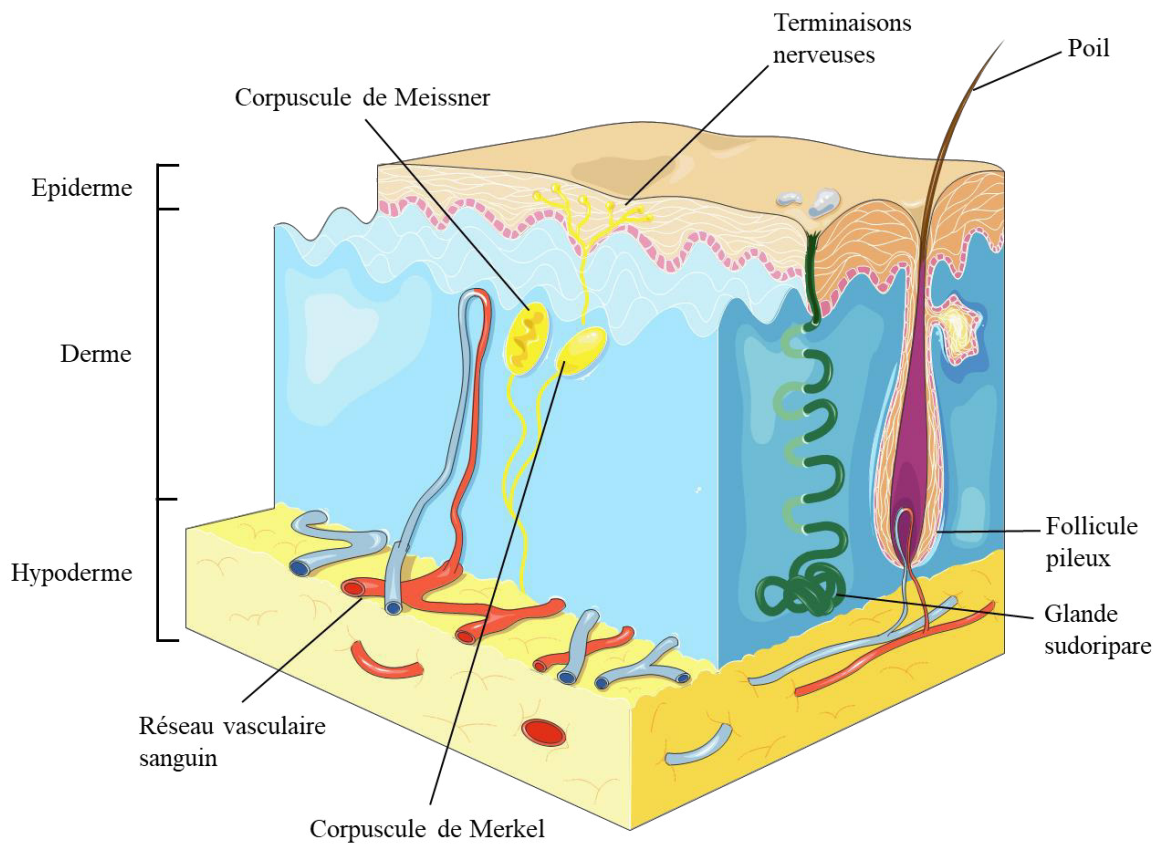


Figure 25 : Représentation schématique de la peau.

induits au niveau de la peau, qui est le premier organe atteint par les radiations lors des protocoles de radiothérapie externe. La peau est de plus au centre des travaux de notre équipe de recherche.

a. Structure de la peau

La peau est l'organe le plus dense du corps humain (environ 18% du poids du corps chez l'adulte) et également le plus étendu (la surface représente en moyenne 1,8 à 2m²). Son rôle principal est de protéger l'organisme des agressions extérieures, qu'elles soient chimiques, physiques ou encore microbiologiques.

La peau est composée de 3 tissus superposés et interagissant ensemble : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 25).

L'épiderme est la couche la plus externe. Il s'agit d'un épithélium pluristratifié composé majoritairement de kératinocytes qui subissent une différenciation verticale orientée vers l'extérieur. L'épiderme est en renouvellement constant grâce à un équilibre entre la prolifération des kératinocytes au niveau basal et leur différenciation puis élimination dans les couches supérieures. L'épiderme contient également de nombreuses terminaisons nerveuses, des mélanocytes responsables de la pigmentation de la peau, des cellules de Langerhans présentatrices d'antigènes et des cellules de Merkel possédant un rôle neurosensoriel.

L'épiderme et le derme sont séparés par la jonction dermo-épidermique qui est une région acellulaire. Elle est constituée d'un maillage de protéines matricielles produites par les kératinocytes basaux et les fibroblastes directement sous la jonction dermo-épidermique et elle permet de faire le lien entre les 2 tissus.

Le derme est le tissu conjonctif se trouvant sous l'épiderme. Il est composé d'une matrice extracellulaire (MEC) dont les constituants sont synthétisés par les fibroblastes dermiques, principales cellules de ce tissu.

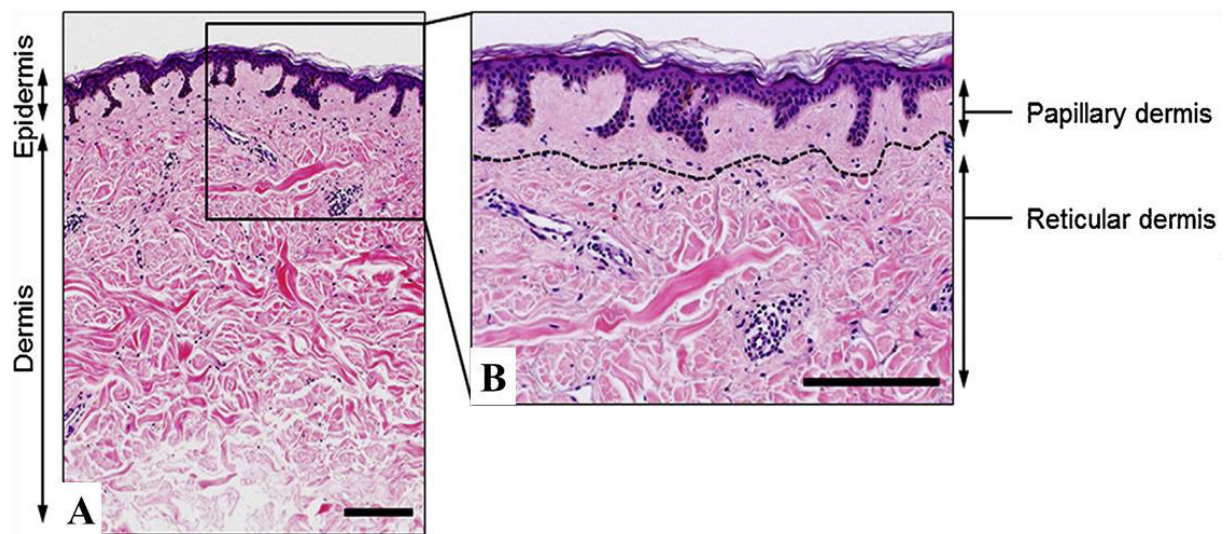


Figure 26 : Peau humaine composée de l'épiderme et du derme.

A) Epiderme et derme humains colorés à l'hématoxyline et à l'éosine. B) Le derme est sous-divisé en 2 parties : le derme papillaire directement sous l'épiderme et le derme réticulaire, plus profond. Barre d'échelle = 200 μm . Adaptée de (Sriram et al. 2015).

La MEC permet d'assurer la résistance de la peau grâce sa composition en fibres de collagène et d'élastine, mais également de retenir l'eau dans l'organisme grâce à l'acide hyaluronique et aux protéoglycanes qui la composent. Deux populations majeures de fibroblastes dermiques existent : les fibroblastes papillaires, les plus proches de l'épiderme, et les fibroblastes réticulaires, les plus profonds dans le derme. Cette différence de population est caractérisée par une différence des constituants de la MEC. Ainsi, sous l'épiderme se trouvent de nombreux fibroblastes papillaires dans une MEC fine et pauvrement organisée, alors que les fibroblastes réticulaires sont moins nombreux et entourés d'une MEC très organisée (Figure 26). La MEC du derme papillaire est composée majoritairement de fibres de collagène de types I et III, même si ces dernières sont plus nombreuses dans le derme réticulaire. D'autres protéines sont ainsi différenciellement proportionnées entre les dermes papillaires et réticulaires. La décorine est un protéoglycane très exprimé dans le derme papillaire mais plus rare dans le derme réticulaire. Au contraire, le versican, un autre protéoglycane, est lui plus exprimé dans le derme réticulaire, où il est associé avec les fibres d'élastine, alors qu'il est associé avec les microfibrilles de fibrilline dans le derme papillaire. Il est à noter que les fibroblastes papillaires produisent également des constituantes de la jonction dermo-épidermiques tels que les collagènes de types IV et VII et de la laminine-1 (Sorrell et al. 2004; Sriram et al. 2015; Stunova et al. 2018). Les fibroblastes des 2 sous-compartiments dermiques présentent plusieurs différences. Les fibroblastes papillaires sont fuselés et prolifèrent plus que les fibroblastes réticulaires qui sont plus étoilés (Stunova et al. 2018). Le derme réticulaire contient également plus de fibroblastes produisant du TGF β 1 et de l' α -SMA, 2 acteurs majeurs des myofibroblastes et de la cicatrisation (Janson et al. 2012). En plus de certains constituants de la MEC, il a été montré que les fibroblastes réticulaires surexpriment des gènes impliqués dans la motilité cellulaire, l'organisation du cytosquelette ainsi que dans la voie de contraction

des muscle lisses tel qu' α -SMA, alors que les fibroblastes papillaires surexpriment des gènes relatifs au système du complément, soulignant ainsi leur rôle dans la réponse immunitaire (Janson et al. 2012).

Le derme comprend également des cellules immunitaires telles que des macrophages, des lymphocytes T, des cellules dendritiques ou encore des mastocytes et de fibres nerveuses. Le derme est en outre traversé par des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

L'hypoderme est le tissu conjonctif le plus profond de la peau. Il est constitué d'adipocytes organisés en lobules permettant le stockage de lipides et assure la protection de l'organisme contre les chocs physiques, participe à l'homéothermie et constitue une réserve énergétique. L'hypoderme contient également des macrophages et comprend un réseau nerveux riches et des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

La peau contient également des annexes comme les follicule pileux qui sont des cavités où les poils sont situés mais également des réservoirs de cellules souches épidermiques, mélanocytaires et mésenchymateuses, les glandes sébacées sécrétant du sébum pour éviter le dessèchement de la peau, les glandes sudoripares jouant un rôle dans la thermorégulation et la sécrétion de molécules organiques.

b. Réponse tissulaire à l'irradiation ionisante

Au niveau tissulaire, une réponse inflammatoire se met en place suite à l'irradiation. Les mécanismes de cette réponse sont multiples. Lorsque les cellules meurent par nécroptose, des motifs moléculaires associés aux dégâts (MMAD, ou DAMP en anglais Damage Associated Molecular Pattern) sont libérés dans le milieu extracellulaire et activent la réponse inflammatoire (Mavragani et al. 2015).

Par exemple, la protéine HMGB1 (High Mobility Group protein B1) peut être relarguée dans

le milieu extracellulaire en réponse à une irradiation de rayons X et peut être reconnue par les récepteurs TLR2, TLR4, TLR9 (Toll-Like Receptor 2, 4 et 9) ou encore RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products) (Wang et al. 2016). Ces récepteurs sont présents dans les cellules immunitaires avoisinantes mais également dans des cellules non immunitaires comme les kératinocytes (Lebre et al. 2007) ou les cellules endothéliales (Liu et al. 2013) et la fixation de leur ligand entraîne la production de cytokines, chémokines pro-inflammatoires permettant le recrutement et l'activation de cellules immunitaires au niveau du site irradié qui sécrètent à leur tour d'autres médiateurs de l'inflammation pour perpétuer le signal de dommage, mais également des facteurs anti-inflammatoires pour réguler l'inflammation et permettre la réparation du tissu. (Sprung et al. 2015). Les érythèmes radio-induits sont une des manifestations de cette activité inflammatoire.

Les cellules entrées en sénescence à la suite de l'irradiation participent également au recrutement des cellules immunitaires dans la zone irradiée via la sécrétion de facteurs SASP (Li et al. 2018).

Dans un premier temps, les cellules immunitaires nettoient le tissu irradié en lysant les cellules endommagées. Puis dans un second temps, elles favorisent la réparation du tissu en activant la prolifération des cellules et la production de MEC. Lorsqu'il y a un déséquilibre entre la lyse des cellules endommagées et la réparation du tissu, il y a l'apparition d'effets secondaires. Par exemple, la desquamation sèche, résulte d'une prolifération rapide des kératinocytes dans l'épiderme alors que la desquamation humide résulte d'une perte de la fonction barrière de l'épiderme due à une perte trop importante de kératinocytes (Singh et al. 2016). De plus, les cytokines produites agissent également sur les cellules non immunitaires. Par exemple, le facteur $TNF\alpha$ qui est sécrété par les cellules lors de l'irradiation et permet de recruter de nouvelles cellules immunitaires peut aussi agir sur les kératinocytes en modulant l'expression

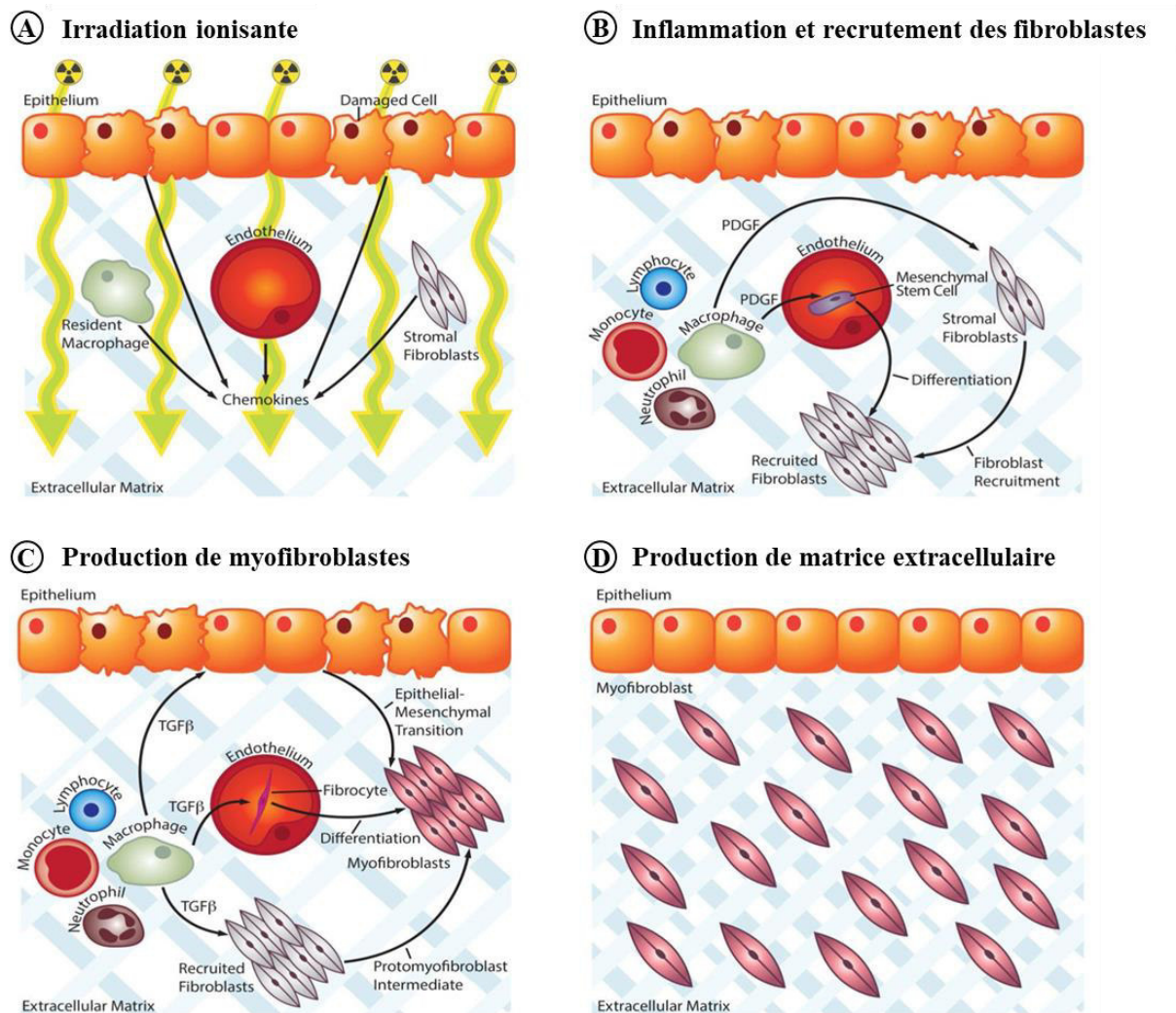


Figure 27 : Schéma des 4 étapes de la fibrose radioinduite.

A) Les cellules irradiées produisent des cytokines pro-inflammatoires. B) Les cellules immunitaires (lymphocytes, monocytes et neutrophiles) sont recrutées sur le site endommagé et les macrophages différenciés M2 produisent du PDGF pour recruter des fibroblastes. C) Les macrophages M2 sécrètent du TGFβ pour différencier les fibroblastes, les cellules souches mésenchymateuses recrutées au site endommagés et les cellules épithéliales avoisinantes en myofibroblastes. D) Les myofibroblastes prolifèrent et produisent de la matrice extracellulaire de façon excessive. Adaptée de (Straub et al. 2015).

de gènes impliqués notamment dans la régulation du cycle cellulaire, du cytosquelette ou encore de l'apoptose (Banno et al. 2004). Un des effets secondaires sévères de radiothérapie le plus étudié est la fibrose radio-induite. Comme mentionné précédemment, des cellules immunitaires sont recrutées au niveau du site irradié. Parmi celles-ci, les monocytes se différencient en macrophages M1 pro-inflammatoires ou M2 anti-inflammatoires en fonction des cytokines présentent. Les macrophages M2 sécrètent le facteur de croissance PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) promouvant ainsi la néo-angiogenèse et la migration des fibroblastes au niveau du tissu lésé à partir des zones avoisinantes ou des cellules souches mésenchymateuses circulantes. Les macrophages M2 sécrètent également du TGF β (Transforming Growth Factor β) induisant ainsi la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, activant la production des protéines de la MEC (collagènes, fibronectine et protéoglycanes), inhibant l'expression des protéases de la MEC (les MMPs, Matrix MetalloProteinases) et augmentant l'expression des inhibiteurs des MMPS, les TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) (Figure 27) (Martin et al. 2000; Straub et al. 2015; Mavragani et al. 2015; Dombrowsky et al. 2019). Les myofibroblastes produisent aussi du TGF β perpétrant ainsi la synthèse de MEC (Sprung et al. 2015). Les cellules sénescents participent à la mise en place de la fibrose via la sécrétion des facteurs SASP (Nguyen et al. 2018). L'excès de matrice extracellulaire dans les tissus fibreux agit également au niveau de l'épiderme qui présente une hyperplasie due à une hyperprolifération ainsi qu'un défaut de différenciation des kératinocytes (Sivan et al. 2002).

La réponse immunitaire complexe suivant l'irradiation est la base des effets secondaires sévères causés par la radiothérapie. Mais il n'est pas encore établi pourquoi cette réponse est anormale chez certains patients et l'identification d'une signature de la radiosensibilité individuelle pourrait également permettre de comprendre les mécanismes responsables des effets secondaires.

8. Conclusion

Les rayons ionisants impactent les cellules directement ou indirectement. Ces effets touchent tous les compartiments cellulaires, mais les effets sur l'ADN sont les plus étudiés. Il est important de noter que les radiations ionisantes exercent des effets multiples sur les différents compartiments cellulaires et que ceux-ci sont encore loin d'être totalement compris. De plus, les effets cellulaires des radiations ionisantes se répercutent au niveau tissulaire avec l'activation de l'inflammation en réponse à l'irradiation, pouvant aboutir à l'apparition d'effets secondaires sévères.

La troisième partie de l'introduction de ce mémoire permettra de faire le point sur les stratégies qui ont été utilisées jusqu'à présent pour évaluer la radiosensibilité individuelle, en étudiant certains effets des radiations ionisantes sur les cellules.

III. Mesure de la radiosensibilité individuelle

Plusieurs stratégies ont été développées depuis une trentaine d'années afin de mesurer la radiosensibilité individuelle et d'identifier les patients les plus à risque de développer des effets secondaires sévères causés par la radiothérapie. Deux types cellulaires sont principalement utilisés pour identifier une telle signature, les fibroblastes dermiques (atteints par les rayons ionisants lors de la radiothérapie et faciles à cultiver) et les lymphocytes sanguins (faciles à prélever).

1. Techniques liées au cycle cellulaire

a. Tests de clonogénicité

La mesure de la survie cellulaire en réponse à l'irradiation est une méthode utilisée depuis longtemps afin de déterminer la sensibilité de cellules de patients au stress ionisant. Celle-ci peut être mesurée à l'aide d'un test de clonogénicité permettant de mesurer la capacité des cellules à former des colonies après ensemencement à faible densité.

Il a été montré dans plusieurs études une hypersensibilité des fibroblastes dermiques aux radiations ionisantes chez des patients ayant soufferts d'effets secondaires de radiothérapie (Smith et al. 1980; Woods, Byrne, et Kim 1988; Loeffler et al. 1990; Plowman et al. 1990; Brock et al. 1995) et même une corrélation entre la radiosensibilité des fibroblastes dermiques et la sévérité des effets secondaires aigus et tardifs (Burnet et al. 1992) ou juste tardifs (Geara et al. 1993). Mais dans d'autres études, il n'a été rapporté aucune corrélation entre les effets secondaires et la radiosensibilité des fibroblastes dermiques (Russell et al. 1998; Peacock et al. 2000).

En revanche, il ne semble pas y avoir de corrélation évidente entre la radiosensibilité des lymphocytes et les effets secondaires aigus ou tardifs (Geara et al. 1993). West et al., ont mis à

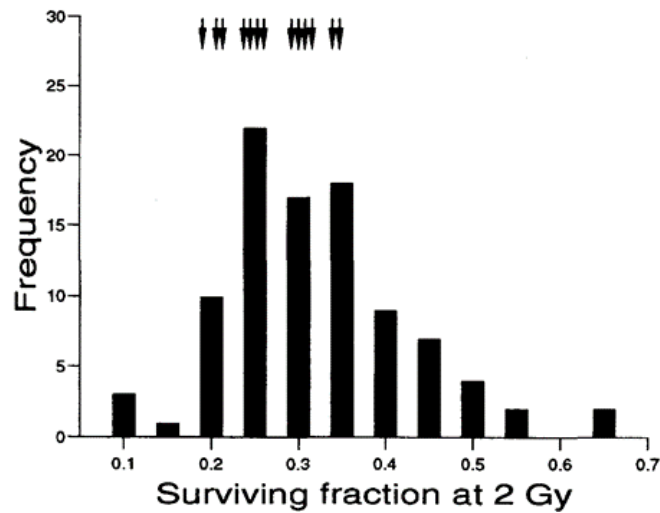


Figure 28 : Radiosensibilité des lymphocytes du sang périphérique mesurés par la SF2 (Fraction Survivante à 2 Gy) à l'aide d'un test de dilution limite.

Les flèches représentent les valeurs obtenues pour les patients ayant soufferts d'effets secondaire aigus et sévères des suites de radiothérapie. Issue de (C. M. West 1995).

jour une corrélation entre la radiosensibilité des lymphocytes et la sévérité des effets secondaires de radiothérapie, mais les lymphocytes les plus radiosensibles n'étaient pas issus des patients les plus radiosensibles (Figure 28) (West 1995).

Même s'il semble y avoir une connexion entre la radiosensibilité cellulaire et la radiosensibilité individuelle, les résultats sont très variables d'une étude à l'autre, probablement à cause de variations au niveau technique. En effet, la méthode d'analyse de la clonogénicité est très dépendante du protocole choisi (densité d'ensemencement, irradiation des cellules avant ou après ensemencement, utilisation de cellules « feeder ») et nécessite plusieurs semaines de culture, ce qui rend son application en routine peu évidente. Cependant, elle reste une méthode de référence en recherche.

b. Expression du gène *CDKN1A*

p21 joue un rôle dans la mise en place de la sénescence radio-induite et il a été proposé que l'expression du gène correspondant, *CDKN1A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A), puisse être relié à la prédiction des effets secondaires dus à la radiothérapie. Badie et al., ont montré que les lymphocytes issus de patientes ayant souffert d'un cancer du sein et ayant présenté des effets secondaires aigus sévères (sans distinction de sévérité) présentaient, en moyenne, une expression plus faible de *CDKN1A* après irradiation comparée à des lymphocytes de patientes atteintes de cancer du sein mais ayant présenté une réaction normale à la suite de la radiothérapie (Badie et al. 2008). Mais dans cette étude, il n'y a pas de limite précise entre l'expression de *CDKN1A* chez les patientes radiosensibles et radio-résistantes (une patiente peut avoir un profil d'expression de *CDKN1A* comparable aux patientes radio-résistantes mais développer quand même des effets secondaires sévères de radiothérapie), limitant ainsi l'application de cette technique. D'autre part, les résultats obtenus restent à confirmer dans une cohorte plus importante.

Il est intéressant de noter que l'expression de *CDKN1A* a également été associée à une fatigue accrue causée par la radiothérapie chez des patients atteints de cancer du sein ou de cancer de la tête et du cou (Palumbo et al. 2012).

2. Taux d'Apoptose Lymphocytaire Radio-Induite (TALRI)

Parmi les tests proposés pour identifier les patients à risque de développer des effets secondaires de radiothérapie, le test TALRI (ou RILA en anglais pour Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis) est l'un des plus prometteurs et des plus développés.

Ozsahin et al., ont observé une corrélation inverse entre les capacités des lymphocytes CD8+ à rentrer en apoptose après une irradiation de 8 Gy et les effets secondaires sévères et tardifs de radiothérapie quel que soit le type de cancer, mais aucune avec les effets secondaires sévères aigus. C'est-à-dire que les patients présentant des effets secondaires tardifs sévères étaient caractérisés par un taux d'apoptose faible de leur lymphocytes après une irradiation de 8 Gy (Ozsahin et al. 2005).

D'autres études ont permis d'obtenir des résultats similaires dans d'autres populations lymphocytaires et chez des patients souffrant de cancers différents mais toujours avec la même technique de détection d'apoptose (irradiation 8 Gy + cytométrie de flux) (Schnarr et al. 2009; Bordón et al. 2009; 2010; 2011; Foro et al. 2014; Fuentes-Raspall et al. 2015).

Dans une deuxième étude prospective, Azria et al., ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre le taux d'apoptose des lymphocytes CD8+ après une irradiation de 8 Gy et le risque de développer des effets secondaires sévères aigus (Azria et al. 2015). Ils ont également montré que 91% des patients avec un TALRI $\geq 20\%$ ne développaient pas de fibrose de grade 2 ou plus (valeur prédictive négative). En revanche, la valeur prédictive positive restait faible (elle était de 22%) pour les patients avec un TALRI $\leq 12\%$, c'est-à-dire que 22% des patients

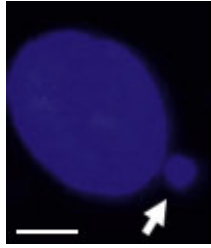


Figure 29 : Représentation d'un micronoyau.

Noyau d'un fibroblaste dermique coloré au DAPI. La flèche blanche indique un micronoyau.

La barre d'échelle blanche représente 5 μm . Issue de (COPERNIC project investigators et al. 2016).

avec un TALRI $\leq 12\%$ avaient développé une fibrose sévère de grade 2 ou plus (Azria et al. 2015). De plus, le lien mécanistique entre les effets secondaires sévères tardifs et le défaut d'apoptose des lymphocytes CD8+ n'est pas encore élucidé.

Dans une étude récente, Talbot et al., ont observé de fortes différences dans la mesure du TALRI entre plusieurs centres de recherche. Ces variations pouvaient être éliminées en ajustant le score en fonction du type de cancer, des temps d'incubation pendant l'expérimentation ainsi que les données des patients. Il est important de noter qu'il faut 1 jour de culture des lymphocytes avant l'irradiation et 2 jours après et que ces temps de manipulation rentrent en compte dans la mesure du TALRI. Il est ainsi nécessaire de mettre au point un protocole précis pour limiter la variabilité (Talbot et al. 2019).

3. Tests basés sur la réparation de l'ADN

a. Micronoyaux

Les micronoyaux sont des petits noyaux composés d'un fragment perdu de chromosome ou d'un chromosome entier perdu (Figure 29). Ils apparaissent suite à la catastrophe mitotique que subissent certaines cellules exposées à l'irradiation.

Plusieurs groupes de recherche ont essayé de corrélérer l'apparition de ces micronoyaux au risque d'effets secondaires de radiothérapie. Ainsi, certains auteurs ont montré une corrélation entre le nombre de micronoyaux résiduels après irradiation *in vitro* des lymphocytes ou des fibroblastes et le risque de développer des effets secondaires de radiothérapie aigus seulement (Djuzenova et al. 2006), tardifs seulement (Barber et al. 2000) ou encore des effets secondaires aigus et/ou tardifs (Nachtrab et al. 1998; Widel et al. 2003; COPERNIC project investigators et al. 2016). En revanche, Rached et al., n'ont pas mis à jour de corrélation entre les micronoyaux et le risque de développer des effets secondaires de radiothérapie aigus et/ou

sévères (Rached et al. 1998). De plus, la technique de mesure du nombre de micronoyaux nécessite d'isoler les cellules et de les mettre en culture (1-2 jours pour les lymphocytes et 3 semaines pour les fibroblastes), d'irradier les cellules puis de compter les micronoyaux sans pour autant différencier les grades cliniques des patients qui ont souffert d'effets secondaires, ce qui diminue l'attractivité du comptage des micronoyaux pour mesurer la radiosensibilité individuelle en routine avant la radiothérapie.

b. Cassures doubles brins

Parmi les dommages à l'ADN radio-induits, les CDB sont les plus létales pour la cellule. En effet, une seule CDB non réparée peut entraîner la mort de la cellule (Radford 1985) et plusieurs maladies génétiques causées par une mutation d'un acteur des réparations des CDB, par exemple ATM ou encore LIG4, entraînent une radiosensibilité sévère et même létale lorsque les patients sont traités par radiothérapie (Gotoff et al. 1967; Cunliffe et al. 1975; Pollard et al. 2009).

Les CDB sont classiquement étudiées par immunofluorescence contre γ H2AX, cette phosphorylation étant une étape précoce de réparation commune à la NHEJ et à la HR. Ainsi, il a été montré qu'il y a autant de CDB radio-induites dans les lymphocytes et les fibroblastes dermiques des patients avec et sans effets secondaires sévères (aigus et tardifs) (Vasireddy et al. 2010; COPERNIC project investigators et al. 2016). En revanche, certaines études ont observé un excès de CDB résiduelles 24h après irradiation (caractérisées par d'avantages de foci γ H2AX résiduels) dans les lymphocytes et dans les fibroblastes dermiques de patients ayant soufferts d'effets secondaires sévères aigus et/ou tardifs de radiothérapie sans différence entre les grades cliniques (Bourton et al. 2011; P. Li et al. 2013; COPERNIC project investigators et al. 2016). Néanmoins, d'autres études n'ont pas mis à jour de corrélation entre les CDB

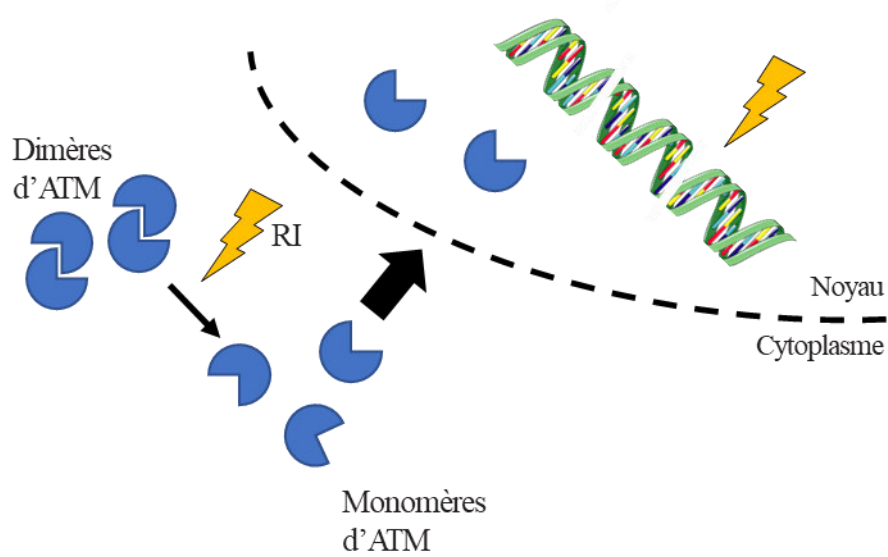


Figure 30 : Théorie de l'adressage d'ATM au noyau.

L'irradiation entraîne la monomérisation des homodimères d'ATM qui se transphosphorylent et les pATM monomérisés sont adressés au noyau. RI = Radiations ionisantes. Adaptée de (Bodgi et al. 2016).

résiduelles et la radiosensibilité individuelle (Olive et al. 2008; Werbrouck et al. 2010; Vasireddy et al. 2010; Werbrouck et al. 2011). Ces différences pourraient être également liées aux protocoles utilisés, par exemple selon que les cellules étudiées sont ou non en prolifération.

Il serait ainsi intéressant d'étudier les CDB résiduelles dans des cellules proliférantes ou non afin d'évaluer l'impact des différentes voies de réparation des CDB et confirmer une possible corrélation entre les CDB résiduelles et la radiosensibilité individuelle.

c. Vitesse de translocation d'ATM au noyau

D'autres groupes de recherche se sont intéressés à d'autres protéines de réparation des CDB et notamment ATM. Il a ainsi été proposé un modèle d'adressage radio-induit d'ATM au noyau (RIANS en anglais pour Radio-Induced ATM NucleoShuttling) dont l'efficacité réduite dans certaines cellules pourrait expliquer les effets secondaires de radiothérapie. Dans ce modèle, ATM forme un homodimère cytoplasmique sous sa forme inactive et l'irradiation entraîne sa trans-phosphorylation et son adressage au noyau (Figure 30) (Bodgi et al. 2013; Bodgi et al. 2016).

Ainsi, en 2016, il a été montré par les chercheurs participant au projet COPENIC (Collection Pour la rEcherche sur la Radiosensibilité au NIveau Clinique) que des fibroblastes dermiques de patients ayant soufferts d'effets secondaires sévères aigus et/ou tardifs de radiothérapie présentaient un retard d'adressage d'ATM phosphorylé sur son résidu serine 1981 au noyau en réponse à une irradiation de 2 Gy (COPENIC project investigators et al. 2016). Une corrélation inverse entre le nombre de foci pATM nucléaire maximale 10 minutes ou 1 heure après irradiation et le grade clinique des patients a été observée. Toutefois, les valeurs de pATMmax se superposant entre les différents grades cliniques, la mesure de celui-ci seul ne suffit pas à pouvoir classer les patients.

Il a également été montré que la quantification de pATMmax dans le noyau par test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) permettait d'identifier les patients ayant souffert d'effets secondaires sévères aigus et/ou tardifs de radiothérapie de grade 2 ou plus selon la classification CTCAE (« Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) », s. d.) avec une sensibilité de 80 et 100% pour une spécificité de 100 et 75% respectivement (Pereira et al. 2018). C'est-à-dire que 80% des patients ayant souffert d'effets secondaires de grade 2 ou plus peuvent être identifiés avec 0% de faux positif (individu sain avec un pATMmax de patient radiosensible), ou 100% des patients ayant souffert d'effets secondaires de grade 2 ou plus peuvent être identifiés avec 20% de faux positifs. Cette technique serait plus rapide mais elle n'a pas encore été testée sur des biopsies de patients (uniquement sur des fibroblastes en culture) et elle permet d'identifier seulement les patients avec des effets secondaires sévères de radiothérapie (grade 2 et plus selon le CTCAE).

Il serait également intéressant de voir si le retard d'adressage de pATM au noyau est observable dans d'autres cellules plus facile d'accès tels que les lymphocytes.

4. Approches globales

La radiobiologie a bénéficié du développement des outils d'analyse génomique haut débit notamment pour identifier une signature des patients à même de développer des effets secondaires de radiothérapie. Ainsi, une telle signature a été recherchée au niveau des séquences d'ADN (génomique), via l'expression génique (transcriptomique), via la régulation épigénétique (épigénomique), plus récemment via l'expression protéique (protéomique) et via les biomarqueurs métaboliques (métabolomique).

a. Séquençage de l'ADN

La recherche de variations génétiques en radiobiologie s'appelle la radiogénomique. Celle-ci est notamment utilisée pour rechercher des polymorphismes nucléotidiques (SNPs en anglais pour Single Nucleotide Polymorphisms) associés avec des effets secondaires de radiothérapie.

i. Gène cible

Les premières études d'identification de variants génétiques associés aux effets secondaires de radiothérapie ont été réalisées avec l'approche du gène candidat. C'est-à-dire que la voie biologique impliquée dans la radiosensibilité est déjà identifiée et que les SNPs sont recherchés dans ou à proximité des gènes codants pour les acteurs de cette voie.

Ainsi de nombreuses études se sont concentrées sur la recherche de variants génétiques dans les gènes codants pour les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Les premières études ont montré des associations entre des SNPs de gènes tels que *ATM*, *LIG4*, *XRCC1* ou encore *XRCC3* et le risque de développer des effets secondaires de radiothérapie (fibrose cutanée, télangiectasie, ou encore toxicité rectale) (Rosenstein 2011; El Naqa et al. 2017; Rosenstein 2017).

L'étude de SNPs dans d'autres gènes que ceux impliqués dans la réparation de l'ADN a également été réalisée. Par exemple, certains SNPs des gènes *TGFB1* et *SOD2* ont été associés avec la fibrose cutanée (Andreassen et al. 2003) et le saignement rectal (Peters et al. 2008), ou encore certains SNPs de *TNF* ont été corrélés avec le risque de pneumopathie radique (Hildebrandt et al. 2010).

Mais la majorité de ces résultats n'ont pas été validés dans des cohortes complémentaires, avec quelques exceptions (Talbot et al. 2012; Seibold et al. 2015) et certains ont même été réfutés (Barnett et al. 2012).

L'avantage avec l'approche du gène candidat est de réduire considérablement le nombre de SNPs étudiés en se concentrant seulement sur quelques gènes d'intérêt, mais d'un point de vue biologique cette approche peut paraître trop restrictive du fait que tous les gènes participant à la réponse aux radiations ionisantes ne sont pas connus (Kerns et al. 2014).

ii. Etude d'association pangénomique

L'avancée technologique en matière de puce de génotypage a permis l'apparition des études d'association pangénomique (GWAS en anglais pour Genome-Wide Association Study) qui permettent d'étudier des centaines de milliers de SNPs sans a priori et de pouvoir associer certains polymorphismes avec des observations cliniques.

Ainsi, la première GWAS effectuée chez les patients traités par radiothérapie pour un cancer de la prostate a permis de corrélérer un SNP présent dans le gène *FSHR* (Follicle Stimulating Hormone Receptor) et le risque de développer des dysfonctions érectiles (Kerns et al. 2010). Mais encore une fois, ce résultat n'a pas pu être répliqué dans une seconde cohorte (Schack et al. 2017). Une technique proposée pour tenter de contourner ce problème de validation des SNPs corrélés aux effets secondaires de radiothérapie est de diviser la cohorte initiale en 2 : une première sous-cohorte qui sert à identifier les SNPs corrélés aux effets secondaires et une deuxième sous-cohorte pour les valider. Mais cette approche nécessite beaucoup de patients.

Cette méthode a néanmoins permis d'identifier un SNP présent dans le gène *TANCI* (Tetratricopeptide Repeat, Ankyrin Repeat And Coiled-Coil Containing 1), connu pour être impliqué dans la régénération du muscle après des dommages radio-induits et qui est associé à la toxicité globale causée par la radiothérapie chez des patients souffrant d'un cancer de la prostate (Fachal et al. 2014). Elle a également permis d'identifier 2 SNPs en amont du gène *SLC36A4* (Solute Carrier Family 36 Member 4), connu pour produire un transporteur d'acide aminé qui pourrait moduler l'activité du complexe mTORC1 et qui est corrélé au risque de

saignement rectal causé par la radiothérapie chez les patients atteints de cancer de la prostate (Kerns et al. 2013).

Il est intéressant de noter que les variants génétiques corrélés aux effets secondaires semblent être spécifiques du type de cancer (un SNP associé à un effet secondaire dans un type de cancer) (Barnett et al. 2014).

Ces GWAS pourraient éventuellement permettre d'identifier des SNPs prédictifs des effets secondaires de radiothérapie. Mais pour cela, les études doivent comprendre un nombre très important d'individus et prendre en compte de nombreux paramètres dont les facteurs de comorbidité (tabagisme, maladie chronique, etc.), les protocoles de radiothérapie ou encore les autres traitements anti-cancéreux que les patients suivent (chimiothérapie, hormonothérapie, etc.).

Il est également important de noter que l'un des atouts majeurs des GWAS est le fait qu'elles permettent de mettre à jour de nouveaux acteurs de la réponse aux irradiations.

b. Transcriptomique

Ces 20 dernières années ont également vu l'apparition de la transcriptomique, c'est-à-dire l'étude à haut débit de l'expression des gènes. Ainsi plusieurs équipes de recherche ont utilisé des puces à ADNc (ADN complémentaire) pour mettre à jour une signature de gènes dont l'expression permettrait d'identifier les patients risquant de développer des effets secondaires sévères de radiothérapie.

Plusieurs études ont montré que les lymphocytes de patients souffrant d'effets secondaires sévères de radiothérapie ne présentaient pas la même réponse à une irradiation *in vitro* par rapport à des lymphocytes de patients radio-résistants et que cette différence de réponse pouvait permettre d'identifier ces patients radiosensibles sans pour autant différencier les sévérités des effets secondaires (Svensson et al. 2006; Mayer et al. 2011; Finnon et al. 2012).

Rodningen et al, ont montré que la différence d'expression de 18 gènes en réponse à l'irradiation dans des fibroblastes dermiques permettaient d'identifier les patientes ayant développé des fibroses cutanées après la radiothérapie d'un cancer du sein (Rødningen et al. 2008). Cette signature composée de 18 gènes a été testée dans une cohorte plus grande et composée de patients ayant souffert de cancer de la sphère ORL. Ainsi, aucun des patients identifié comme radio-résistant par l'analyse du génome n'a développé de fibrose cutanée mais seulement 34% des patients identifiés comme radiosensibles ont développé une fibrose cutanée ce qui limite la puissance de ce test (Andreassen et al. 2013).

Henríquez-Hernández et al., ont montré qu'il était possible de corréler les grades cliniques de patients souffrant d'effets secondaires sévères aigus ou tardifs sur la base du niveau de d'expression de plusieurs gènes sans avoir besoin d'irradier les lymphocytes (Henríquez-Hernández et al. 2009). Mais cette étude a été réalisée sur un faible nombre de patients (12 individus) et il faudrait la valider dans une cohorte beaucoup plus importante.

Jusqu'à présent les études publiées laissent entrevoir qu'il serait possible d'identifier des gènes dont l'expression permet de prédire le risque d'effets secondaires de radiothérapie. Cependant, la plupart de ces recherches ont été effectuées à l'aide de puces à ADNc qui ne mesurent pas l'expression de l'ensemble du génome. De plus, l'expression des gènes dépend fortement du type cellulaire étudié ainsi que des conditions de culture, donc les conditions pour identifier une signature basée sur l'expression génique devront être standardisées.

Il est également important de noter que la recherche d'une signature basée sur l'expression génique permet d'identifier des acteurs encore inconnus de la réponse à l'irradiation.

c. Epigénomique

Ces dernières années, des études ont mis à jour l'importance de la régulation épigénétique dans

l'apparition des effets secondaires sévères de radiothérapie et notamment de la fibrose radio-induite (Weigel et al. 2015). Ainsi, des études se sont intéressées au pouvoir prédictifs des régulateurs épigénétiques.

A ce jour, une seule étude a étudié l'expression de l'ensemble des miARNs (micro ARNs) du génome (miRnome) dans des lymphocytes du sang circulant de patients atteints d'un cancer de la prostate à l'aide de puces à miARNs (Someya et al. 2015). Les auteurs ont identifié 3 miARNs (dont miR-99a) différemment exprimés à l'état basal entre 2 patients ayant souffert de saignements rectaux et 2 individus radio-résistants, 1 miARN différemment exprimé après l'irradiation *in vitro* des cellules et 11 miARNs dont l'expression induite par l'irradiation (ratio « expression après irradiation/expression avant irradiation ») était différente. En revanche, les auteurs n'ont pas confirmé l'expression différentielle de miR-99a dans les cellules de patients supplémentaires.

Weigel et al., ont étudié la méthylation de l'ADN (méthylome) dans des fibroblastes dermiques de patientes ayant souffert d'une fibrose radio-induite (Weigel et al. 2016). Ils ont montré que l'hypo-méthylation du gène *DGKA* (DiacylGlycerol Kinase Alpha) était corrélée avec le risque de développer une fibrose dermique radio-induite. La méthylation de l'ADN pourrait ainsi participer à la mise en place de la radiosensibilité. Cependant, ils n'ont pas proposé de signature de méthylation à même de prédire les risques de fibrose radio-induite.

En outre, il n'y a pas à ce jour d'étude sur les modifications des histones comme signature des risques d'effets secondaires de radiothérapie.

d. Protéomique

Basées sur les mêmes principes du gène candidat, des études protéomiques sur des protéines connues pour jouer un rôle dans la réponse à l'irradiation ont été menées pour tester si leur

expression pouvait être corrélée au risque de développer des effets secondaires sévères de radiothérapie.

Ainsi, la majorité des recherches se sont concentrées sur les cytokines présentes dans le plasma sanguin, telles que TGF β , IL-1A, IL-6, IL-8 ou encore KL-6 (Anscher et al. 1998; Goto et al. 2001; Chen et al. 2005; Hart et al. 2005; Arpin et al. 2005; Evans et al. 2006). Bien que plusieurs études aient montré une différence de quantité pour ces cytokines entre les patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie et les patients radio-résistants, le pouvoir prédictif de ces cytokines reste faible (un nombre important de patients radiosensibles présentent un taux de cytokines semblables aux patients radio-résistants et inversement). De plus, l'approche protéine candidate limite l'étude à des protéines qui sont déjà connues pour jouer un rôle dans la réponse aux irradiations.

Les avancées technologiques de ces dernières années ont permis d'étudier sans a priori les protéines pouvant potentiellement servir de signature de radiosensibilité individuelle. Ainsi, Cai et al., ont révélé dans 2 études que l'abondance de certaines protéines dans le plasma sanguin pouvait être corrélée aux risques de patients atteint d'un cancer du poumon de souffrir de pneumopathie radique sévère (Cai et al. 2010; 2011). La majorité de ces protéines sont liées à la réponse inflammatoire, mais leur rôle précis dans la réponse à l'irradiation n'est pas encore caractérisé.

Outre l'amélioration des techniques de criblage, de nouvelles méthodes bio-informatiques d'identification et de sélection des protéines candidates ont vu le jour. Ainsi, Oh et al., ont développé un nouvel algorithme basé sur les protéines connues pour participer aux effets secondaires étudiés (pneumopathie radique dans cette étude) et leurs liens avec les nouvelles protéines identifiées par l'approche haut débit (chromatographie en phase liquide – spectrométrie de masse) permettant de pallier en partie le nombre faible d'individus dans la

cohorte (Oh et al. 2011). Les auteurs ont montré que le dosage de l' α -2-macroglobuline était capable d'identifier de manière significative les patients atteints de pneumopathie radique sévère (Oh et al. 2011).

D'autres équipes ont utilisé une approche protéomique sur les cellules des patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie. Ainsi, dans une étude rétrospective chez des patientes atteintes de cancer du sein, Skiöld et al., ont identifié 37 protéines différemment exprimées dans les leucocytes de patientes ayant souffert d'effets secondaires sévères aigus de radiothérapie de grade 4 (selon la classification RTOG) par rapport à des cellules de patientes sans effet secondaire (Skiöld et al. 2015). Cette étude permet d'envisager qu'une signature protéique pourrait aider à l'identification des patients à risque de développer des effets secondaires sévères de radiothérapie, sans avoir besoin d'irradier les cellules des patients. Une confirmation prospective dans une cohorte plus importante est néanmoins nécessaire. Lacombe et al., ont montré dans une étude prospective que la protéine AK2 était surexprimée après une irradiation de 8 Gy dans des lymphocytes T de patientes atteintes d'un cancer du sein et ayant souffert de fibrose cutanée par rapport à des lymphocytes T de patientes sans fibrose cutanée (Lacombe et al. 2019). Mais les auteurs ne se sont intéressés qu'aux différences d'expression induites par l'irradiation et il serait intéressant de voir si une signature prédictive pouvait être identifiée avec le moins de manipulation possible.

Les résultats des approches protéomiques exhaustives sont prometteurs mais ils restent à être validés dans de plus grandes cohortes. De plus, la faible abondance de certaines protéines qui pourraient permettre l'identification des patients à risque, ou encore leur localisation compliquent l'utilisation de la protéomique pour identifier une telle signature.

Par ailleurs, il est admis que les modifications post-traductionnelles des protéines jouent un rôle majeur dans la régulation de leur activité, c'est le cas notamment des phosphorylations des

protéines de la réponse aux dommages de l'ADN. Ainsi, une signature prédictive des effets secondaires de radiothérapie pourrait être identifiée par l'analyse des modifications post-traductionnelles des protéines en réponse à l'irradiation.

e. Métabolomique

L'étude de l'ensemble des métabolites par spectrométrie de masse a également été utilisée pour identifier une signature des effets secondaires sévères de radiothérapie.

Ainsi, Tandberg et al., ont essayé de corréler les métabolites présents dans le plasma sanguin de patients atteints de cancer du poumon et traités par radiothérapie et le risque de développer une œsophagite aigue (Tandberg et al. 2017). Ils n'ont pas identifié de métabolites en quantité différente entre les patients radiosensibles et résistants et leur approche de machine learning n'a permis la bonne classification des patients que dans 33% des cas lorsque les métabolites ont été étudiés avant la radiothérapie et 50% des cas lorsqu'ils ont été étudiés 2 semaines après le début de la radiothérapie.

En revanche, Cheema et al., ont identifié 3 métabolites dont la quantité avant la radiothérapie était prédictive du risque de développer une rectite (sans préciser la gravité) et 9 métabolites prédictifs du risque de développer une incontinence urinaire (Cheema et al. 2019). Ces résultats prometteurs sont encore à confirmer dans une cohorte plus grande. Il y a encore très peu d'études métabolomiques pour identifier une signature prédictive des effets secondaires sévères de radiothérapie et l'approche métabolomique n'est pas optimale pour comprendre les mécanismes responsables de la radiosensibilité.

5. Conclusion

De nombreuses approches ont donc été proposées pour identifier une signature des patients à risque de développer des effets secondaires sévères de radiothérapie.

Malheureusement, le fait que les séquelles de radiothérapie puissent apparaître plusieurs années après le traitement complique la classification des effets secondaires des patients en grades cliniques et rend donc difficile l'identification d'une signature prédictive de la radiosensibilité individuelle.

Ces dernières années, les approches haut débit laissent envisager la possibilité d'identifier une signature de la radiosensibilité individuelle, de mieux comprendre les effets des rayonnements et la réponse qu'ils entraînent. Mais de telles approches nécessitent des cohortes importantes, ainsi qu'une collecte rigoureuse des données cliniques des patients et de leurs traitements pour que les signatures soient les plus précises possibles.

Il est également admis que la complexité de la radiosensibilité individuelle rend nécessaire l'utilisation simultanée de plusieurs tests afin d'espérer prédire les risques d'effets secondaires de radiothérapie. Ainsi, le projet REQUITE (Reduce side-effects and improve quality of life) a débuté en 2013 et a pour but de créer une cohorte de 5300 patients atteints de cancer du sein, de la prostate ou du poumon (West et al. 2014). Des prélèvements sanguins ont été effectués chez ces patients et leurs données cliniques ainsi que les données thérapeutiques ont été référencées. Cette cohorte sera à disposition pour valider des prédicteurs de risques d'effets secondaires sévères de radiothérapie tels que le TALRI, la vitesse d'adressage de pATM au noyau ou encore les SNPs identifiés précédemment, mais également pour étudier le transcriptome de ces patients.

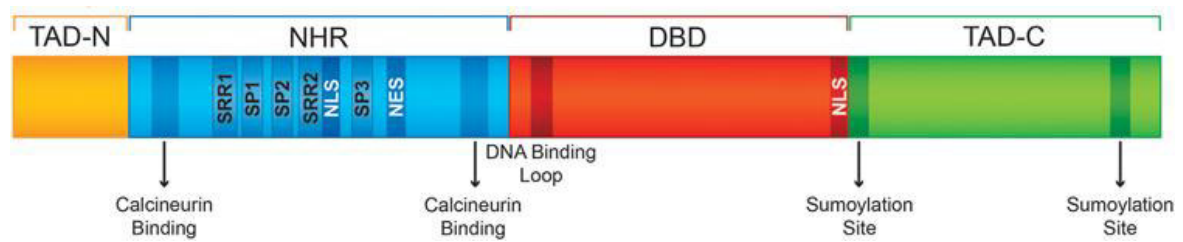


Figure 31 : Structure des NFATs calcium-dépendants.

NFAT1 à NFAT4 sont composés d'un domaine de régulation NHR (NFAT-Homology Region), d'un domaine de fixation à l'ADN (DBD) et de 2 domaines de transactivations TAD-N et TAD-C. Le domaine NHR comprend 2 sites de fixation de la calcineurine, un motif d'adressage au noyau (NLS), un motif d'exportation du noyau (NES) ainsi que 5 régions riches en résidus phosphorylés lorsque NFAT est cytoplasmique et déphosphorylés quand il est nucléaire (SRR1, SRR2, SP1, SP2 et SP3). Le domaine DBD contient une région qui interagit directement avec l'ADN (DNA Binding Loop) et d'un motif d'adressage au noyau (NLS). Adaptée de (Mognol et al. 2016).

IV. La famille NFAT

Ce travail de thèse m'a amené à m'intéresser à un facteur de transcription de la famille des NFATs (Nuclear Factor of Activated T-cells), en l'occurrence le facteur NFATC2, également appelé NFAT1.

1. Les membres NFAT

La famille de facteurs de transcription NFAT est composée de 5 membres (NFAT1 – 5) qui ont été étudié d'abord dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T (Rao et al. 1997). NFAT1 – 4 sont régulés par les voies de signalisation du calcium et de la calcineurine, alors que NFAT5 est activé en réponse au stress osmotique. NFAT5 étant très différent des autres NFATs calcium-dépendants, seuls ces derniers seront discutés dans cette partie. Bien que les protéines de la famille NFAT aient été découvertes dans les lymphocytes T, il a été montré qu'elles étaient exprimées dans de nombreux types cellulaires, telles que les cellules du cartilage, les adipocytes, les cellules nerveuses ou encore les cellules cardiaques (de la Pompa et al. 1998; Ho et al. 1998; Nguyen et al. 2008; Ranger et al. 2000). Il est important de noter que la nomenclature des NFATs peut être piégeuse, NFATC1 peut être nommé NFAT2, NFATC2 peut être appelé NFAT1, NFATC3 peut être nommé NFAT4 et enfin NFATC4 peut être appelé NFAT3.

Il y a 2 domaines conservés entre toutes les protéines NFATs régulées par le calcium : la région régulatrice NFAT-homology (NHR) et le domaine de fixation de l'ADN (DBD pour DNA-binding domain) (Figure 31). Le domaine DBD partage 64 – 72% d'homologie entre les différents NFATs ce qui fait que toutes les protéines NFATs peuvent théoriquement reconnaître le même motif de l'ADN : (A/T)GGAAA (Rao et al. 1997). De part et d'autre des 2 régions conservées se trouvent 2 domaines TADs (Transcriptional Activation Domains) très

variables entre les différents NFATs et leurs isoformes. Même si toutes les régions des NFATs peuvent interagir avec des cofacteurs de transcription, ce sont majoritairement les 2 domaines TADs (TAD-N en N-terminale et TAD-C en C-terminale) qui permettent d'interagir avec différents cofacteurs propres à chaque NFAT (Figure 31) (Rao et al. 1997; Hogan et al. 2003). Ces partenaires sont nombreux, régulés par d'autres voies de signalisation et peuvent interagir avec les domaines plus conservés NHR et DBD des NFATs mais également les domaines TADs. Cette interaction est un mécanisme de régulation des NFATs et peut aboutir à l'activation en synergie de l'expression d'un gène, ou à sa répression. L'un des partenaires les plus connus des NFATs calcium-dépendants est le facteur de transcription AP-1 avec lequel ils agissent en synergie pour induire l'expression de nombreux gènes codant pour des cytokines et possédant un site de fixation d'AP-1 et un site de fixation de NFAT dans leur région promotrice (Macián et al. 2001). De plus, Gabriel et al., ont mis à jour plus de 170 partenaires de NFATC1 et NFATC2 qui participent à la régulation de l'expression de gènes avec les NFATs, mais également qui peuvent réguler l'état d'activation des NFATs et d'autres dont le lien avec NFATC1 et NFATC2 est encore inconnu (Gabriel et al. 2016).

Bien que de nombreux variants de chaque NFAT aient été caractérisés et soient exprimés différemment en fonction des tissus, la signification fonctionnelle de ces différentes isoformes n'est pas encore établie, mais il est raisonnable de penser qu'ils participent à la régulation de fonctions distinctes dans la cellule (Vihma et al. 2008).

2. Régulation des NFATs

Sous leur forme inactive, les NFATs sont richement phosphorylés dans leur région NHR par plusieurs kinases dont la MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), la CK1 (Casein Kinase 1) ou encore la GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β), les maintenant ainsi dans le cytoplasme. Une augmentation de la concentration cytoplasmique du calcium entraîne

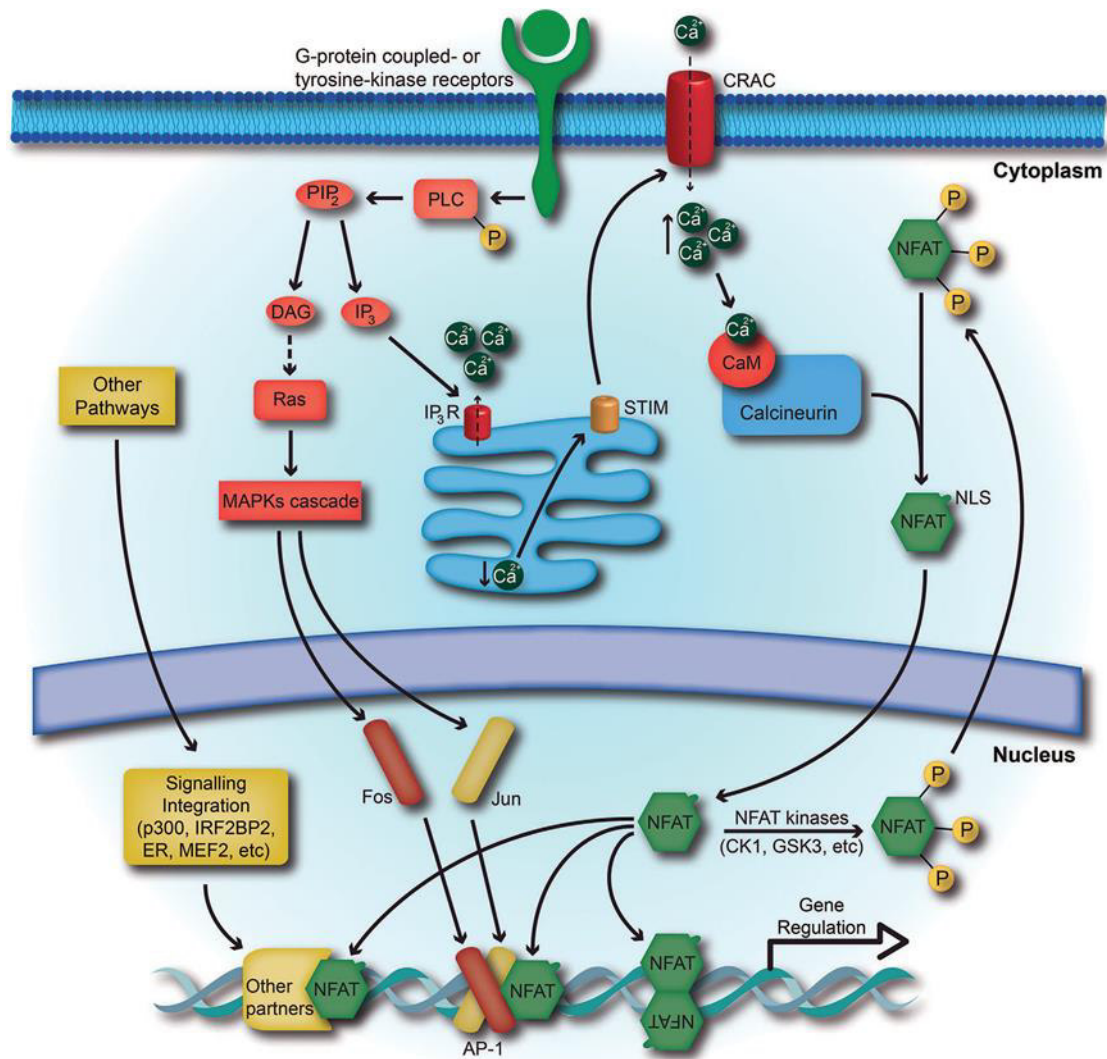


Figure 32 : Voie de signalisation NFAT.

Les NFATs sont contrôlés par le calcium cytoplasmique qui active la calcineurine, ce qui déphosphoryle les NFATs, les adressant au noyau. Dans le noyau, les NFATs régulent l'expression de plusieurs gènes, seuls ou en interagissant avec d'autres partenaires et peuvent être inactivés par phosphorylation par une kinase et transloqués dans le cytoplasme. Adaptée de (Mognol et al. 2016).

l'activation de la calcineurine qui déphosphoryle la région NHR des NFATs, mettant ainsi à jour la séquence d'adressage au noyau (NLS) et induisant sa translocation dans le noyau (Figure 32) (Rao et al. 1997; Hogan et al. 2003).

Lors de l'activation des lymphocytes T, cellules dans lesquelles les NFATs ont été découverts, le récepteur des cellules TCR (T Cell Receptor) reconnaît son ligand et phosphoryle la phospholipase C (PLC). La PLC activée entraîne l'hydrolyse du PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-biPhosphate) en DAG (DiAcylGlycérol) et en IP₃ (Inositol-1,4,5-triPhosphate). Le DAG active la voie des MAPK aboutissant à l'adressage au noyau des sous-unités Fos et Jun qui forment le complexe AP-1 qui est un des cofacteurs de transcription majeur des NFATs (Macián et al. 2001). L'IP₃ se fixe sur son récepteur sur la membrane du réticulum endoplasmique entraînant le relargage du calcium dans le cytoplasme. La diminution de la concentration de calcium dans le réticulum endoplasmique active la protéine STIM (STromal Interaction Molecule) calcique présente dans la membrane cytoplasmique de la cellule ce qui entraîne une deuxième augmentation de la concentration de calcium dans le cytoplasme. Les ions calcium cytoplasmiques se fixent sur la calmoduline, ce qui active la calcineurine qui est une phosphatase capable de déphosphoryler la région NHR des NFATs. Les NFATs ainsi déphosphorylés changent de conformation exposant le motif NLS entraînant leur translocation au noyau. Dans le noyau, les NFATs jouent leur rôle de facteurs de transcription, seuls ou en interagissant avec d'autres partenaires tel que AP-1. Les NFATs peuvent être inactivés dans le noyau par phosphorylation de leur domaine NHR par les kinases GSK3 β ou encore CK1, ce qui entraîne un changement de leur conformation et l'exposition de leur séquence d'exportation du noyau (NES) jusqu'au cytoplasme (Figure 32) (Mognol et al. 2016). En fonction des résidus ciblés, la phosphorylation des NFATs dans le noyau n'entraîne pas systématiquement leur inactivation et leur exportation dans le cytoplasme, mais au contraire participe à leur maintenance dans le noyau (Singh et al. 2011).

Les NFATs possèdent également 2 sites de sumoylation qui pourraient contrôler leur localisation, mais également leur activité transcriptionnelle (Terui et al. 2004; Nayak et al. 2009).

3. NFATs et stress génotoxique

A ce jour, seulement 3 études ont montré que l'expression de gènes induits par une exposition aux rayons ionisants était NFAT dépendante, mais aucune n'a montré directement un changement de localisation des NFATs en réponse aux irradiations ionisantes (Lu-Hesselmann et al. 1997; Daino et al. 2003; Glover et al. 2003). En revanche, il a été observé que les rayons UV contrôlent la localisation des NFATs et leur activité (Huang et al. 2000; Mazière et al. 2005; Flockhart et al. 2008). De plus, de nombreuses études ont montré que la concentration en calcium cytoplasmique augmente en réponse aux rayonnements ionisants (Szumiel, et al. 1990; Voerhinger et al. 1997; Schmidt-Ullrich et al. 1997; Qing-Li 1999; Yan et al. 2000), renforçant l'hypothèse que les NFATs pourraient être régulés par les radiations ionisantes.

4. NFATC2

Mon travail de thèse m'a conduit à étudier NFATC2 comme potentiel régulateur de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes.

a. NFATC2 et immunité

Comme tous les NFATs classiques, NFATC2 est contrôlé par la concentration en calcium cytoplasmique et a été découvert dans l'étude de l'activation des lymphocytes T (McCaffrey et al. 1993).

L'activation des lymphocytes T se produit lors de la stimulation simultanée du récepteur TCR et d'un co-stimulateur comme CD28. Cela entraîne l'activation des NFATs, dont notamment NFATC2, mais également de la voie des MAPK aboutissant à la formation du complexe AP-1

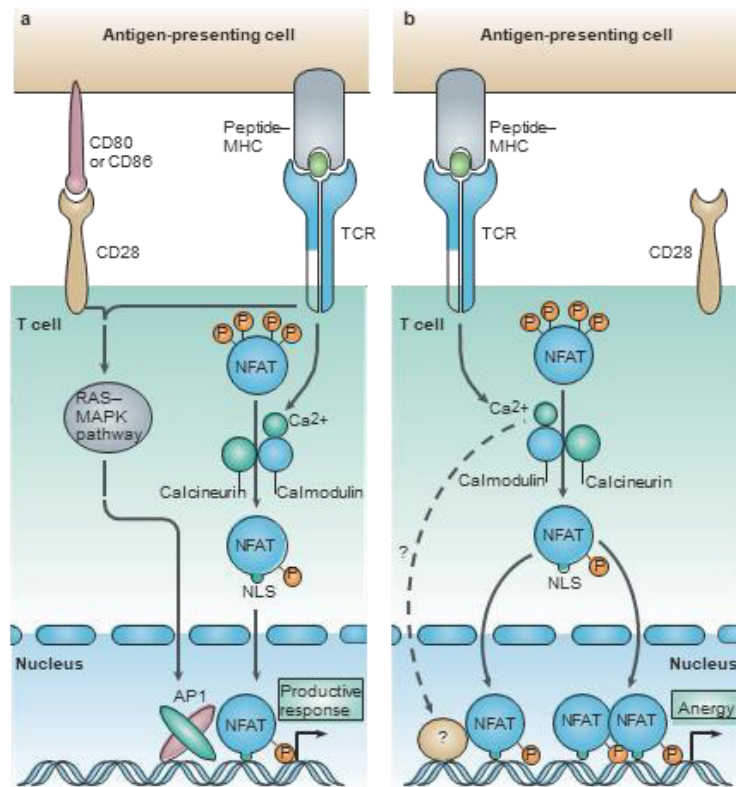


Figure 33 : Représentation schématique de l'activation de NFAT dans les lymphocytes T.

A) Lorsque le récepteur TCR et le récepteur CR28 reconnaissent respectivement le complexe CMH – peptide (Complexe Majeur d’Histocompatibilité) et le ligand CD80 ou CD86, NFATC2 est activé et transloqué dans le noyau et la voie MAPK est enclenchée, aboutissant à la formation du complexe AP-1 dans le noyau. NFATC2 et AP-1 interagissent ensemble et induisent l’expression des gènes de la réponse immunitaire. B) Lorsque seul le récepteur est activé, NFATC2 est activé et transloqué dans le noyau où il induit l’expression des gènes responsables de la désactivation des lymphocytes (anergie), seul ou en interagissant avec d’autres partenaires. Adaptée de (Macian 2005).

(Figure 33). NFATC2 et AP-1 interagissent ensemble pour induire la production d'IL-2, d'IL-4, d'IL-10, d'IFN- γ , de TNF α , d'IL-5, de CD40L ou encore de CD95L, caractéristique de la réponse immunitaire (Peng et al. 2001; Macian 2005; Kaminuma et al. 2008). En revanche, lorsque le récepteur TCR est stimulé seul, les NFATs sont activés, mais pas la voie des MAPK. NFATC2 seul ou interagissant avec d'autres partenaires induit l'expression d'autres gènes inactivant ainsi les lymphocytes par anergie (Figure 33) (Macián et al. 2002; Martinez et al. 2015). NFATC2 participe ainsi à 2 fonctions opposées dans les lymphocytes, l'activation et l'anergie, ce qui signifie que ses co-partenaires sont essentiels dans son activité. NFATC2 participe également à la différenciation des lymphocytes T auxiliaires (lymphocyte T helper en anglais) en T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, T_{reg} (régulateur) et T_{fh} (follicular helper) via des mécanismes complexes et redondants avec les autres NFATs (Macian 2005; J.-U. Lee et al. 2018).

NFATC2 possède une place centrale, avec les autres NFATs, dans la machinerie qui régule les lymphocytes dans le système immunitaire.

b. NFATC2 et cancer

En plus de son rôle dans le système immunitaire, il a été montré ces dernières années que NFATC2 était surexprimé dans plusieurs types de cancer et pouvait également réguler des gènes impliqués dans des mécanismes liés au cancer (Qin et al. 2014).

Ainsi, Robbs et al., ont montré que l'expression de NFATC2 constitutivement actif entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose dans une lignée de fibroblastes de souris tout en empêchant la transformation cellulaire induite par un plasmide induisant l'expression de H-*rasV12* (Robbs et al. 2008). Le rôle de NFATC2 dans la progression du cycle cellulaire est dual. Il peut ainsi activer la progression du cycle cellulaire en inhibant l'expression de la CDK4 (Cyclin-Dependent Kinase 4) (Baksh et al. 2002) ou en activant l'expression de CDK6 (Cyclin-Dependent Kinase 6) (Figure 34) (Baumgart et al. 2016). Au contraire, NFATC2 peut

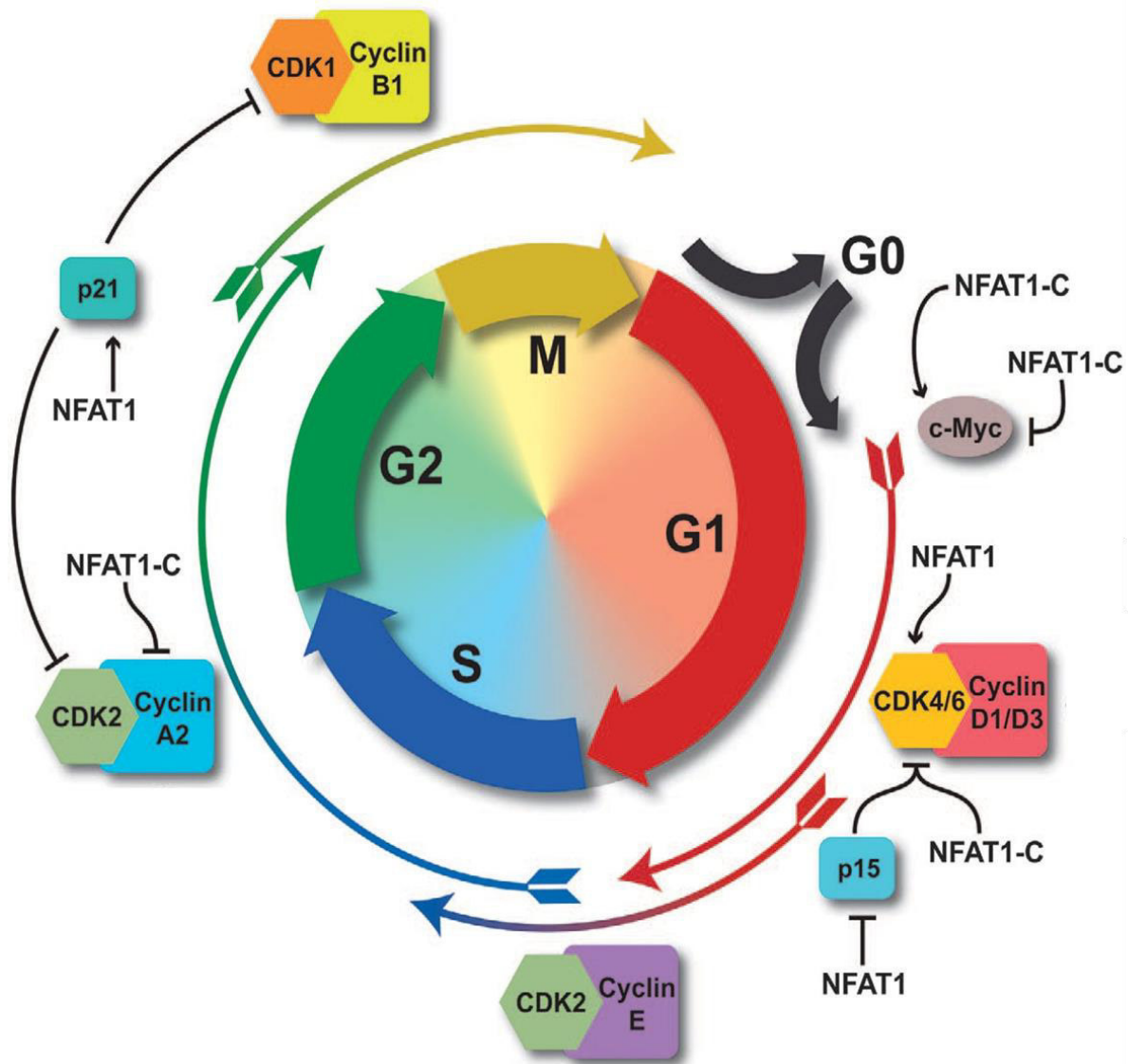


Figure 34 : Régulation du cycle cellulaire par NFATC2 (NFAT1).

NFATC2 entraîne la progression du cycle cellulaire en contrôlant l'expression de CDK4 et CDK6 et au contraire l'inhibe en contrôlant l'expression de la Cycline A2, de p15 et de p21. NFATC2 contrôle également l'expression de c-Myc positivement ou négativement ce qui peut activer ou inhiber la progression du cycle cellulaire. NFAT1-C : NFATC2 isoforme C. Adaptée de (Mognol et al. 2016).

inhiber la progression du cycle cellulaire en restreignant l'expression de la Cycline A2 (Carvalho et al. 2007), de p15^{INK4b} (Baumgart et al. 2012) ou encore en activant l'expression de p21 (Figure 34) (Santini et al. 2001). NFATC2 peut également contrôler l'expression de *MYC* en l'activant ou en le réprimant en fonction de ses co-partenaires et des sites où il se fixe dans le promoteur, activant ou inhibant ainsi la progression du cycle cellulaire (Figure 34) (Mognol et al. 2012).

NFATC2 participe également à la régulation de l'apoptose avec encore cette fois-ci un rôle dichotomique. Il peut avoir une fonction pro-apoptotique en induisant l'expression de *FASLG* (FAS LiGand) (Latinis et al. 1997; Holtz-Heppelmann et al. 1998) ou anti-apoptotique en induisant l'expression de *CFLAR* (CASP8 and FADD like apoptosis regulator) (Ueffing et al. 2008), de *BCL2A1* (BCL2 related protein A1) (Ullerås et al. 2008) ou encore de *MDM2* (X. Zhang et al. 2012) (Figure 35). NFATC2 peut également induire l'expression de *TNFA* (McCaffrey et al. 1994; Park et al. 1996; Oum et al. 2002) et de *NR4A1* (Nuclear Receptor subfamily 4 group A member 1) (Youn et al. 2000; Wu et al. 2002) qui sont à la fois pro- et anti-apoptotiques (Figure 35).

NFATC2 est également acteur de l'invasion tumorale en contrôlant la motilité cellulaire (Jauliac et al. 2002; Yoeli-Lerner et al. 2005; 2009) notamment via l'induction de l'expression de COX-2 (CycloOXYgenase-2). COX-2 catalyse la synthèse de prostaglandines et notamment la prostaglandine E2 (PGE2) (Yiu et al. 2006). Il est important de noter que la PGE2 participe également à l'inflammation (Kalinski 2012). De plus, NFATC2 active l'expression du gène codant pour l'autotaxine, une protéine sécrétée qui convertit la lysophosphatidylcholine en acide lysophosphatidique (LPA) (M. Chen et al. 2005). La PGE2 et la LPA sont ainsi 2 protéines sécrétées qui peuvent agir sur les cellules de manière paracrine en induisant la migration, via la dégradation de la matrice extracellulaire par des métalloprotéinases (Shoshan et al. 2016) ou possiblement en activant les voies de signalisation responsables du remodelage

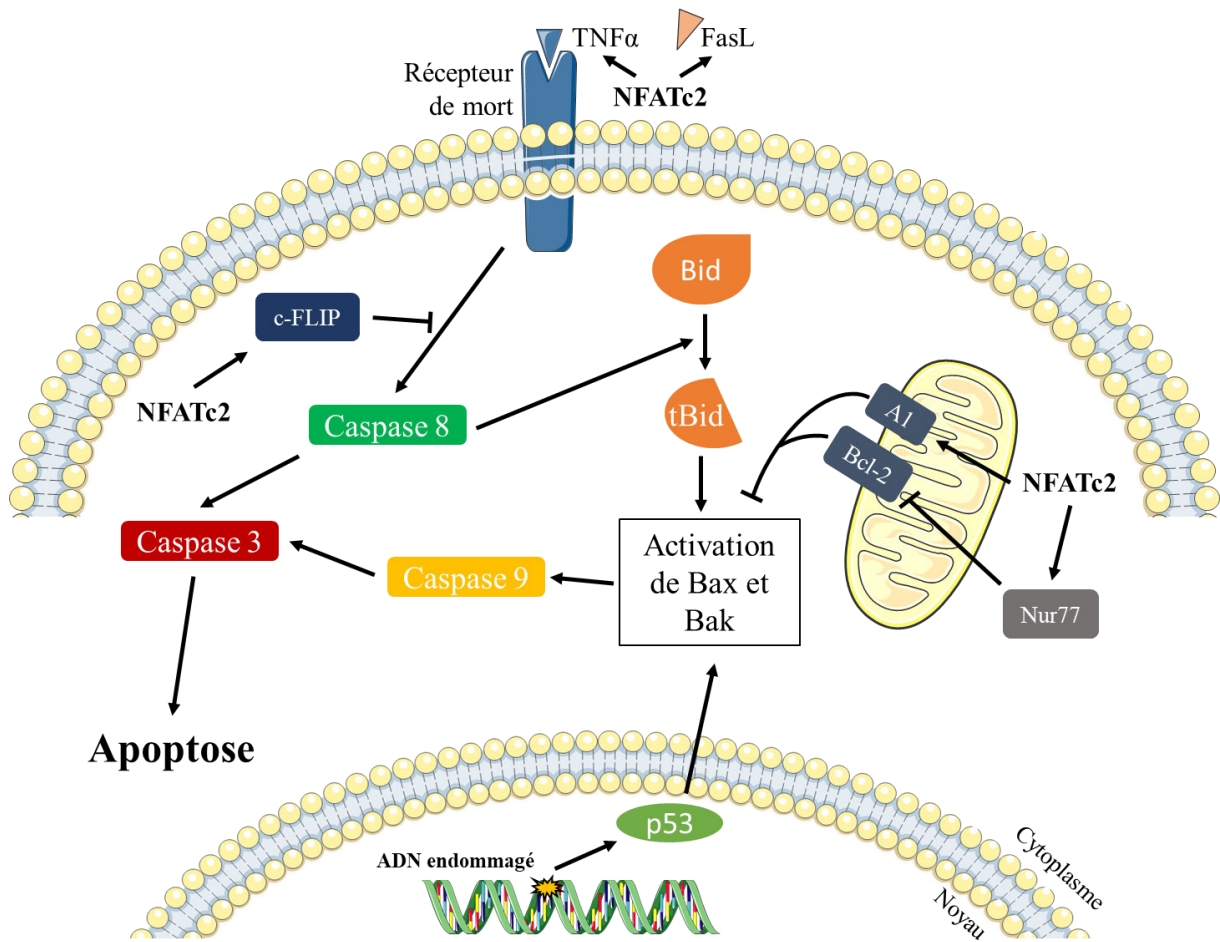


Figure 35 : Régulation de l'apoptose par NFATC2.

NFATC2 active l'expression de FasL qui est un acteur pro-apoptotique, mais également de BCL2A1 (A1) et c-FLIP qui sont eux anti-apoptotiques. NFATC2 active également l'expression de Nur77 (NR4A1) et de TNFα qui sont à la fois pro- et anti-apoptotiques.

du cytosquelette d'actine (Stracke et al. 1992; X. Lu et al. 2017). NFATC2 contrôle l'expression de VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) par une boucle de rétrocontrôle positive. VEGF se fixe sur son récepteur VEGFR1 (VEGF Receptor 1) activant NFATC2 qui induit l'expression de *VEGFR1* (Jinnin et al. 2008), mais également de *COX-2* qui entraîne la production de PGE2 qui active la migration des cellules endothéliales et leur formation en tube (Hernández et al. 2001). En outre, il a été montré que NFATC2 participait à la dédifférenciation de cellules tumorales de mélanome et à l'échappement à la réponse immunitaire antitumorale (Perotti et al. 2016).

NFATC2 joue un ou plusieurs rôles dans différents mécanismes impliqués dans le cancer mais qui sont également importants dans la réponse aux radiations ionisantes tels que l'apoptose, le cycle cellulaire et le remodelage de la matrice extracellulaire.

OBJECTIFS DE TRAVAIL DE THESE

Comme nous l'avons discuté dans l'introduction bibliographique de ce mémoire, la radiothérapie est un traitement majeur dans la lutte contre le cancer, mais dont les effets secondaires au niveau des tissus sains irradiés limitent son utilisation. C'est pourquoi, au cours de ces 30 dernières années, de nombreuses études ont cherché à mieux comprendre la réponse cellulaire et tissulaire aux radiations ionisantes et ont tenté de caractériser une signature biologique ou moléculaire de la sensibilité aux radiations qui permettrait d'identifier les patients à risques de développer des effets secondaires sévères. Ainsi, plusieurs tests ont été proposés pour évaluer la radiosensibilité individuelle, basés sur des mécanismes de réponse aux rayonnements ionisants ou obtenus par des criblages haut débit, mais sans qu'aucun ne soit à ce jour applicable en routine clinique. La mise au point de nouvelles méthodes de prédictions est donc un objectif ambitieux mais qui répond à une forte demande des cliniciens pour améliorer la prise en charge des patients en individualisant les protocoles de traitement.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés d'étudier le transcriptome et le méthylome de fibroblastes dermiques de patientes ayant eu un cancer du sein et ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie.

Au cours de mon stage de Master 2, j'ai commencé à travailler sur une maladie génétique rare, le syndrome de Gorlin, principalement causée par une mutation hétérozygote du gène *PTCH1* conduisant chez certains patients à l'apparition d'une forte radiosensibilité cellulaire. En collaboration avec le groupe de Michèle Martin au Commissariat à l'Energie Atomique et aux énergies alternatives, j'avais commencé à m'intéresser à la réparation des cassures doubles brins dans les cellules de ces patients (voir l'article Vulin et al., dans la partie Annexe) et analysé l'expression et le taux de méthylation de certains gènes pouvant jouer un rôle dans la radiosensibilité des fibroblastes cutanés de ces patients. Le travail du groupe de Michèle Martin a permis de montrer que chez ces patients, la radiosensibilité cellulaire est directement corrélée à l'expression de *PTCH1* (et donc à la nature de la mutation causale).

Au-delà des cas particuliers de quelques syndromes génétiques dont les mécanismes conduisant à une forte radiosensibilité cellulaire sont clairs, la question des bases mécanistiques de la radiosensibilité individuelle dans la population générale reste non résolue.

Pour tenter de répondre à cette question cruciale, nous avons pu disposer de 2 atouts majeurs : une cohorte nationale composée de plus d'une centaine de patients souffrant d'effets secondaires de radiothérapie (la cohorte COPENIC dont la mise en place a été coordonnée par Nicolas Foray au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) et la possibilité d'effectuer des études génomiques exhaustives sur des prélèvements cellulaires de ces patients grâce au centre génomique du CEA à Evry et à l'expertise de notre groupe dans les études pangénomiques, notamment transcriptomiques. Nous avons réparti le travail entre notre laboratoire et celui de Michèle Martin au CEA d'Evry : nous nous sommes proposés d'étudier le transcriptome ARNm et la méthylation de l'ADN des fibroblastes de patients de la cohorte COPENIC, alors que la laboratoire d'Evry se focalisait sur leur transcriptome ARN non-codants et leur génome ADN.

Les objectifs de ces analyses et donc de mon projet de thèse étaient donc :

- D'identifier une signature moléculaire, d'expression et de méthylation, des cellules de patients radiosensibles à un état de base (cellules non irradiées) si possible pouvant permettre de discriminer la sévérité des effets secondaires et pouvant servir de base à la mise au point d'un test prédictif de la radiosensibilité individuelle
- De mieux comprendre les bases moléculaires et cellulaires de cette radiosensibilité, les approches globales devant nous permettre de mettre à jour de nouveaux acteurs et de nouveaux mécanismes pouvant être impliqués dans la réponse aux radiations

Je vais tâcher dans ce mémoire de vous présenter les résultats obtenus pour répondre à ces 2 objectifs complémentaires.

RESULTATS

Article 1 (In preparation):

A transcriptome and methylome analysis identifies a molecular signature of patients suffering from severe side-effects of radiotherapy

Joshua Dulong¹, Christophe Vroland¹, Yasmina Mesloub², Sandra Moratille², Raphaël Terreux¹, Nicolas Foray³, Michèle T Martin² and Jérôme Lamartine^{1#}

¹ Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, CNRS UMR5305, University of Lyon, Claude Bernard University Lyon I, 7 passage du Vercors. F69367 Lyon – France

² CEA, Genomics and Radiobiology of Keratinopoiesis, IBFJ/DRF/iRCM, Université Paris-Saclay, 2 rue Gaston Cremieux. F91057 Evry, France.

³ INSERM UA8, Radiation: Defense, Health and Environment Unit, 28 rue Laennec, F69008 Lyon, France

Corresponding author: Jerome.lamartine@univ-lyon1.fr

LBTI CNRS UMR5305 – 7 passage du Vercors – F69367 Lyon – France

Bullet points:

- Genomic profiling discriminates radiosensitive patients from control individuals
- A molecular signature of radiosensitive patients was established
- An expression analysis of 5 genes identifies radiosensitive patients

Abstract

Although radiotherapy is a major treatment against cancer, 5-10% of patients exhibit severe side-effects limiting its use. By an exhaustive methylome and transcriptome analysis followed by machine-learning classification, we identified a molecular signature of radiosensitive patients, thus paving the way for future predictive tests.

Introduction

Radiotherapy is a major treatment for solid cancer, used in about half of cancers [1], with rates increasing regularly in Europe [2]. However, 5-10% of patients develop severe side-effects in exposed normal tissue [3], restricting efficacy and impacting quality of life. To date, no universal marker or prognostic reference methods easily applicable in routine testing are available to identify at-risk patients.

Several parameters have been used to evaluate individual radiosensitivity and predict onset of radiation toxicity: chromosome abnormalities in irradiated patient-derived blood lymphocytes [4,5], radiation-induced CD8-T lymphocyte apoptosis [6], and ATM nucleo-shuttling speed in irradiated cells [7]. Although useful to predict radiosensitivity, these assays are technically demanding and unsuited to routine use. Radiation oncologists are looking for new easily implemented methods in addition to these gold-standards.

The development of large-scale genomic methods enables screening of numerous individuals for a specific gene signature easily revealed by classical molecular biology. This was frequently used to classify patients without a-priori hypotheses such as response to a specific therapy or cancer subtype [8,9]. These methods are promising tools to identify patients at risk of radiotherapy side-effects. A few studies of radiation-induced gene expression of patients' derived cells identified responding genes possibly predictive of radiosensitivity [10,11]. These studies were promising but suffered from several limitations: small samples, non-exhaustive gene set screening, and choice of experimental conditions for cell irradiation.

To overcome these limitations, we performed whole genome methylome and transcriptome analysis of non-irradiated cell samples from 16 patients with post-radiation side-effects. We identified a molecular signature of radiosensitivity, using a machine-learning approach, and defined a reduced gene set discriminating patients from controls based on their basic genomic profile. This gene signature was validated in 30 additional individuals and effectively

discriminated radiosensitive patients from controls. Our work opens up new strategies for the development of predictive tests to identify patients at risk of severe radiotherapy side-effects.

Materials and Methods

Cell samples

The study was conducted on non-immortalized dermal fibroblasts from 38 patients showing severe radiotherapy side-effects, taken from the COPERNIC collection [7]. Severity was graded by 2 independent radio-oncologists according to the CTCAE scale version 4.03 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, s. d.). Fibroblast cell strains were obtained with a standard dermatologic punch from non-irradiated skin areas after local anesthesia. Patients were anonymous and provided signed informed consent in line with ethical guidelines. Cell strains were declared to the French Ministry of Research under the numbers DC2008-585 and DC2011-1437. The study database was derived from the COPERNIC database, protected under reference IDN.FR.001.510017.000.D.P.2014.000.10300. Primary dermal fibroblasts from 17 healthy individuals were used as controls.

Cell cultures were performed in Dulbecco's Modified Eagle Medium – Glutamax medium (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (ThermoFisher) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Studies were performed at mean passage 8 in culture for all cell strains and at confluency.

Training data set and validating data set

The training data set comprised 8 healthy female controls (C1 – 8) and 16 radiosensitive women patients from the COPERNIC cohort, selected according to cancer type (breast cancer) and CTCAE grade (8 grade 2 [P1 – 8] and 8 grade 3 [P9 – 16]) to limit variability. The validating data set comprised 8 healthy controls (X1 – 8: 7 women and 1 man) and 22 radiosensitive COPERNIC patients (X9 – 30) (3 grade 2 [2 men and 1 woman], 14 grade 3 [9 men and 5 women] and 5 grade 4 [4 men and 1 woman]). Supplementary Figure S1 summarizes the composition of the training and validating data sets.

All information about methylome and transcriptome analysis, gene signature identification and RT-PCR analysis are available in the supplementary methods file.

Results

Methylome and transcriptome profiling discriminates radiosensitive patients from controls

We performed a whole genome transcriptome and methylome analysis comparing 16 patients suffering from severe radiotherapy side-effects after breast cancer and 8 normal individuals. Eight grade 2 and 8 grade 3 patients, according to the CTCAE criteria, were included. Both patients and controls were women. We used methylation bead chips for methylome analysis and next-generation RNA sequencing for transcriptome analysis. Principal component analysis (PCA) of whole DNA methylation data (Figure 1A) and whole gene expression data (Figure 1B) clearly separated controls from radiosensitive patients. In methylome analysis, however, 1 control was closer to the radiosensitive group. Within the patient group, there was no clear separation between grades 2 and 3. To go further into the patient's methylome profile, we focused on genes with a differentially methylated region (DMR) in their promoter. We identified 1701 of these genes (Figure 1C and Table S1 Supplementary data), common to grade 2 and grade 3 patients compared to controls, but none between grade 2 and 3 patients (data not shown).

We also identified 540 genes differentially expressed between grade 2 and 3 radiosensitive patients versus controls (Figure 1D and Table S2 Supplementary data). Functional annotation of these 540 genes revealed no enriched functions or pathways relative to cancer status. Of these, 101 showed a DMR in their promoter (Figure 1E), suggesting possible epigenetic regulation. Interestingly, no gene was expressed differentially between grade 2 and grade 3 patients in agreement with the transcriptome PCA profile. None of the 101 differentially expressed genes with a DMR in their promoter were involved in genetic syndromes associated with radiosensitivity.

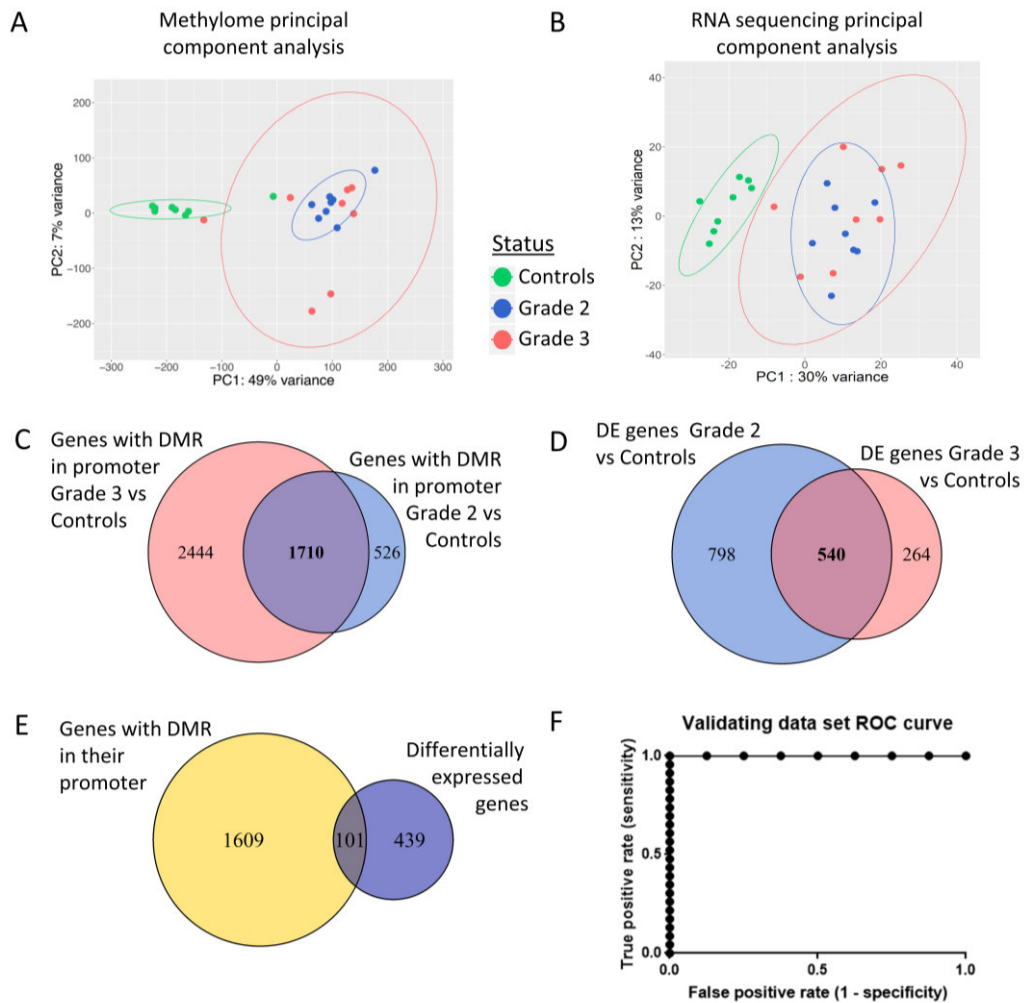


Figure 1: Clinically radiosensitive patients exhibit different methylome and transcriptome profiles. Principal component analysis from methylome (A) and transcriptome data (B). (C) Genes with a differentially methylated region (DMR) in their promoter between grade 2 vs controls and grade 3 vs controls. (D) Differentially expressed genes between grade 2 vs controls and grade 3 vs controls. (E) Differentially expressed genes with a DMR in their promoter. (F) ROC curve resulting from the statistical analysis of the signature in the validating data set.

Identification of a gene signature for radiosensitive patients

To identify a potentially gene signature of radiosensitivity, grade 2 and 3 individuals were pooled, as there was no discrimination between them on methylome and transcriptome data. A machine learning approach using recursive memetic algorithm (RMA) was employed to select a small subset of genes that could identify radiosensitive patients according to expression (Figure S2 Supplementary data). Applying this method to our transcriptome data, we identified

TNFRSF19, *NFATC2*, *WTAPP1*, *LINC01615*, *SLC17A7*, *PLCE1* and *ADAMTSL1* as the most frequent genes in the final solution enabling identification of radiosensitive patients in the dataset of 16 patients and 8 controls (training dataset). RNA sequencing analysis found *TNFRSF19*, *NFATC2*, *WTAPP1*, *LINC01615* and *SLC17A7* to be less expressed in fibroblasts from radiosensitive patients, whereas *PLCE1* and *ADAMTSL1* were overexpressed (Figure S3 Supplementary data). Among these signature genes, *WTAPP1* and *SLC17A7* were not sufficiently expressed to be detected by real-time PCR (data not shown) and were not used in the next step of validation. A mathematical formula was then developed to calculate a score discriminating all controls and all radiosensitive patients in the training dataset, based on expression of *TNFRSF19*, *NFATC2*, *LINC01615*, *PLCE1* and *ADAMTSL1* (data not shown).

Expression analysis of *TNFRSF19*, *NFATC2*, *LINC01615*, *PLCE1* and *ADAMTSL1* is sufficient to enable identification of radiosensitive patients

To confirm that the expression analysis of *TNFRSF19*, *NFATC2*, *LINC01615*, *PLCE1* and *ADAMTSL1* alone was able to identify radiosensitive status, qPCR was performed on these 5 genes in a validating dataset of 30 new samples: 8 new controls and 22 new radiosensitive patients, chosen independently of donor gender and cancer type. In the validating dataset, fibroblasts from radiosensitive patients exhibited lower expression of *NFATC2*, *TNFRSF19* and *LINC01615* and overexpression of *PLCE1* and *ADAMTSL1* compared to controls, like in the training dataset. Furthermore, applying the mathematical formula identified patient versus control status in all samples with 100% accuracy (Figure 1F). These results validated this 5-gene signature as able to identify radiosensitive patients independently of gender and cancer type.

Discussion

Cancer treatments cause side-effects in normal tissue; the rate of severe radiotherapy side-effects is 5-10%. Nevertheless, there is no consensus on a routine radiosensitivity testing. The present study aimed to establish a gene signature discriminating radiosensitivity by analyzing the methylation pattern of the whole genome and the expression pattern of the whole transcriptome. We chose a highly sensitive RNA sequencing approach, avoiding the previously reported biases of pre-designed DNA arrays [13,14]. The methylome and transcriptome profiles of patients with post-radiotherapy overreaction segregated them from normal controls, but did not distinguish between clinical CTCAE grades 2 and 3. This could be due to the slowness of the differences between grades 2 and 3 on the CTCAE criteria, or to the present sample size;

including grade 4 patients in the whole transcriptome analysis would be certainly of interest to segregate patients according to severity of side-effects. We further identified, using machine learning, an expression signature comprising only 5 genes (*ADAMTSL1*, *LINC01615*, *NFATC2*, *PLCE1* and *TNFRSF19*) that identified radiosensitive patients regardless of gender or cancer type. These signature genes have not yet been investigated in tissue radiosensitivity but might play roles in important pathways involved in response to ionizing radiation. Little is known about *ADAMTSL1*, a secreted protein that may have functions in the extracellular matrix [15,16]. The extracellular matrix has been shown to act on cellular radiosensitivity [17], while ionizing radiation acts on the extracellular matrix [18,19]. *PLCE1* can also activate the NFκB pathway, and act on the cell cycle, apoptosis and autophagy [20,21]. *LINC01615* produces a long non-coding RNA of which the functions are unknown but which was described in a meta-analysis in primary human dermal fibroblasts as playing a regulatory role in several pathways such as TNFα signaling via NFκB, Akt signaling, VEGF signaling and Wnt signaling [22]. The TNF Receptor Super Family *TNFRSF19* is far less well-described than other members of its family, but several studies showed its role as a regulator of TGFβ signaling [23]. TGFβ is a major inducer of radiation-induced complications in normal tissue [24,25] and a target for their treatment [26]. *TNFRSF19* also acts as an activator of the NFκB pathway and Akt signaling in response to ionizing radiation [27], and has been described as a target [28] or regulator of Wnt signaling [29], a pathway involved in ionizing radiation response [30,31]. Among the 5 signature genes, *NFATC2* is the most widely studied. It encodes for a transcription factor which was first described as playing a role in T-cell activation [32]. However, due to its transcription factor role, *NFATC2* has been shown also to play a role in numerous cellular functions such as apoptosis, cell cycle [33] and extracellular matrix formation [34], and may also play a role in DNA repair [35–37]. Due to this large set of interactions, these genes deserve further study.

The present study also found a specific DNA methylation profile in patients with post-radiotherapy overreaction. Interestingly, 18.7% of genes differentially expressed between control and radiosensitive patient cells also showed a DMR in their promoter and, in 67.3% of them, level of methylation was inversely correlated to expression level, as expected.

Our study gives proof of concept that a global genomic analysis of cells from a limited number of radiosensitive patients is able to provide a simple molecular signature of patients of unknown status identified on a machine-learning approach, without a-priori hypotheses. The size of the training dataset from which the radiosensitivity signature was identified could be a concern, as could the fact that only women with the same type of cancer were included in this training

subset. Nevertheless, the validation of the signature in a bigger dataset comprising men and women with different cancer types partly overcomes these limitations and strengthens the value of the signature. We will need further studies to investigate the predictive potential of this signature in large prospective cohorts, to contribute to establishing prognostic tests identifying patients at risk severe side-effects ahead of radiotherapy.

Acknowledgements

We thank Christine Oger (PRABI, University of Lyon) for help in the analysis of RNAseq data. This study was supported by a grant from La Ligue Nationale contre le Cancer, comité de Saône et Loire.

Supplementary Materials and Methods

DNA extraction and Methylome analysis

DNA was extracted from fibroblast using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. DNA methylation profiles were obtained by IntegraGen Genomics Services (IntegraGen, Evry, France) using Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit (Illumina, Evry, France) investigating over 850 000 methylation sites. Data analysis was performed by AltraBio (Lyon, France). Detection p-values were computed using function detection from package minfi1. This function determines, for each genomic position of each sample, if the total DNA signal (methylated plus un-methylated) is significantly higher than the background signal. A multi-step filtering method was then applied to the probes 1) which failed based on detection p-value ($p > 0.01$) in one or more samples, 2) that are known to have common SNPs at the CpG site and 3) that have been demonstrated to map to multiple places in the genome. Principal Component Analysis was performed using stats package in R.

Transcriptome analysis

Total RNA was isolated from fibroblasts with the NucleoSpin RNA plus kit (Macherey – Nagel, Hoerd, France) or RNeasy Plus Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions. RNA sequences were captured using a TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina, Evry, France) with an input of 1 µg. Paired-end RNA sequencing was performed on HiSeq4000 at CNRGH (CEA, Evry, France) with 100 bp paired-end reads. Quality control of sequencing data was performed using FastQC 0.11.7 before and after

trimming of the adapters by Cutadapt 1.13 (parameters: -q 15 -a AGA TCG GAA GAG CAC ACG TCT GAA CTC CAG TCA C – AAG ATC GGA AGA GCG TCG TGT AGG GAA AGA GTG TAG ATC TCG GTG GTC GCC GTA TCA TT). The reads were mapped to the human genome (GRCh37/hg19) using HISAT2 2.0.5. For a single gene, sequences were aligned versus all known exons of all gene isoforms. The resulting BAM files were sorted by reads pair (using SAMtools 1.3.1) and counted using the tool HtSeq-count of HtSeq 0.6.1.

For transcriptome analysis, a filtering was applied to genes with low expression (mean number of reads in the training set < 10). Principal component analysis and hierarchical clustering were performed using DEseq2 and stats packages in R. VennDiagram package in R were used to obtain Venn diagram and figures were made using ggplot2 package.

Real-time quantitative PCR

An equal amount of RNA was used for reverse transcription with PrimeScriptTM RT reagent kit (Takara, Shiga, Japan) and analyzed by Real-Time QPCR using SYBR[®] Premix ExTaqII (Takara) on an AriaMx Realtime PCR system (Agilent Genomics, Santa Clara, CA, USA). All primers (listed Table S3 Supplementary data) were provided by Eurogentec. Results were normalized to *TBP* and *RPS17* expression level.

Gene signature identification

To select genes enabling the best identification of radiosensitive patients, a method based on Recursive Memetic Algorithm proposed by Ghosh et al. 2019 were used in Python. Briefly, all genes – called features – formed the original feature space where a solution was searched. Each gene was ranked using ReliefF algorithm within the feature space. Then, a population of 15 subsets formed by features was created randomly and the accuracy of these solutions to predict the state of the samples was measured. If mean accuracy of the 3 best subsets reached a dynamic threshold ϕ , reduction of the feature space was performed by keeping only the genes from the 3 best solutions and the 5% genes with the higher ReliefF score. Remaining genes were ranked using ReliefF algorithm within the new feature space and a new population of 15 subsets was created. If the threshold was not reached, solutions were improved by performing a memetic algorithm (MA). It consists of a basic local search of a better solution, following by random crossover and random mutation of the subsets. The dynamic threshold ϕ was decay if no feature space was created since a certain time. These were repeated until a final solution composed by 5 genes or less was found and which reached an accuracy of 100%. RMA was performed over 1000 times and appearance frequency of genes in final solutions was calculated.

Then, a mathematic formula was established to calculate a radiosensitive score.

$$\begin{aligned} \text{Score} = & -0,23426012 \times \text{TNFRSF19} \\ & + 0,00742318 \times \text{NFATc2} - 0,59628113 \times \text{LINC01615} \\ & + 0,7849952 \times \text{PLCE1} \\ & + 0,66330896 \times \text{ADAMTSL1} - 1,78247589 \end{aligned}$$

If the score were negative, the sample were identified non radiosensitive, and if the score is positive the sample were identified radiosensitive.

Receiver Operating Characteristic (ROC) curve establishment

ROC curve was established using Prism (version 8.0, GraphPad Software) with radiosensitive scores calculated in the samples from validating data set.

Supplementary data

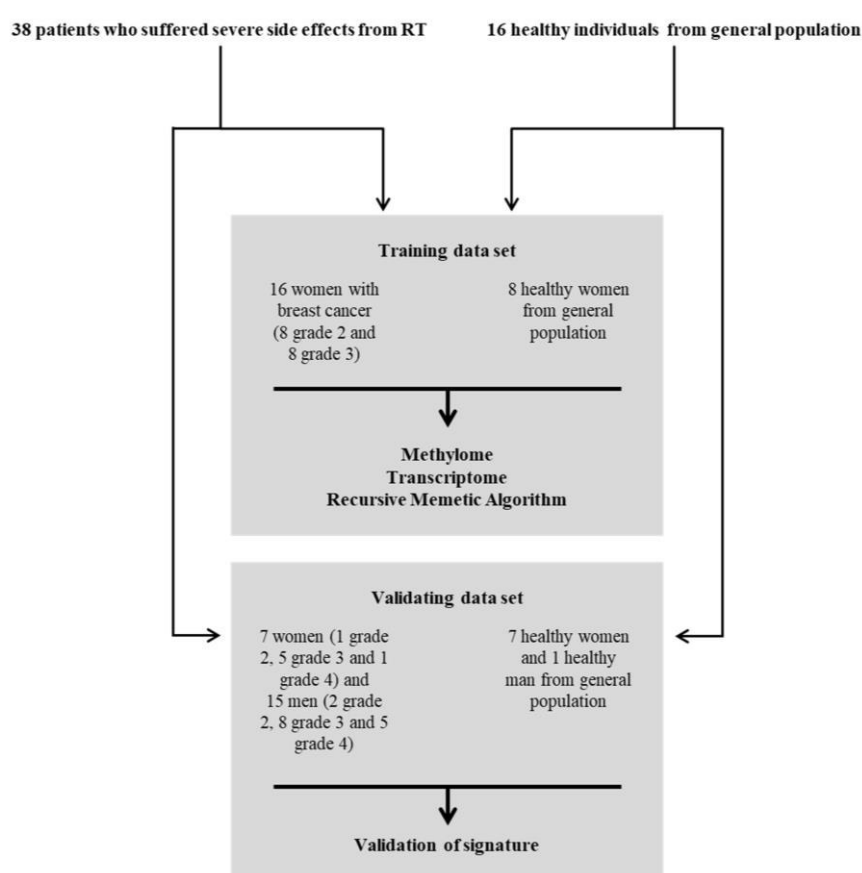


Figure S1: Selection and inclusion flowchart.

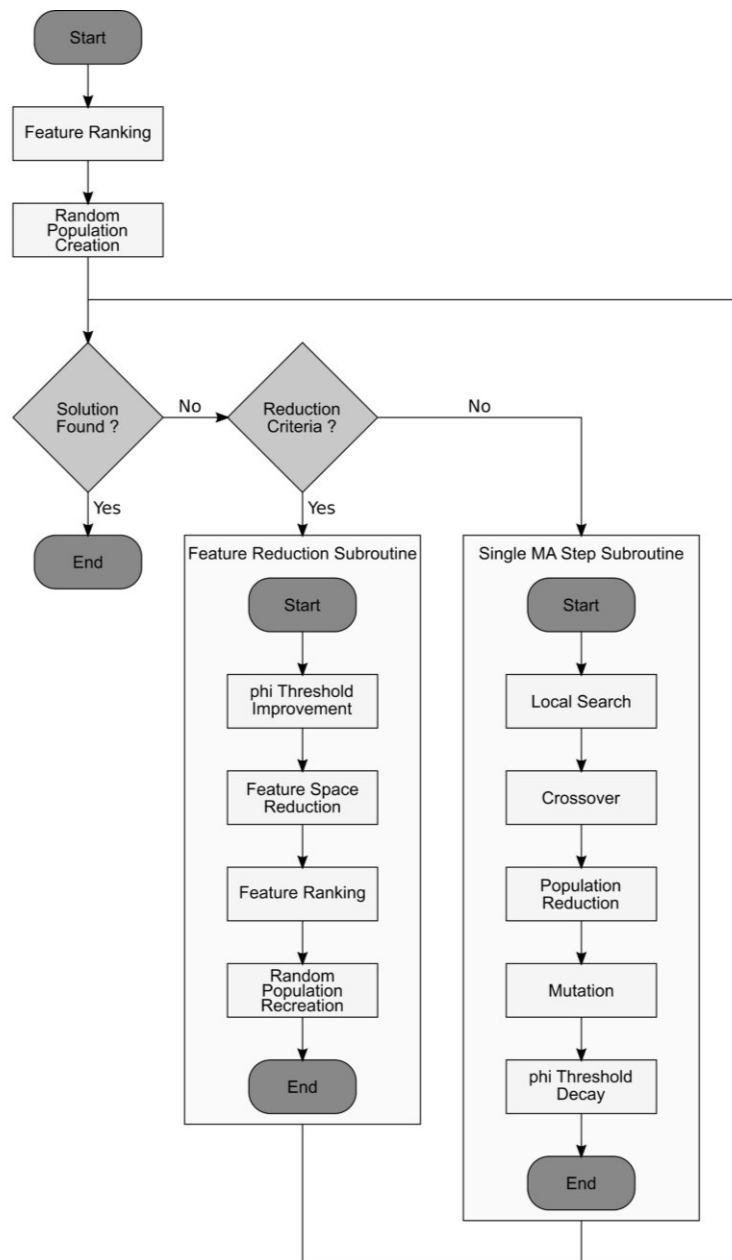


Figure S2: Flowchart of the Recursive Memetic Algorithm used to determine optimal genes for radiosensitive patient identification.

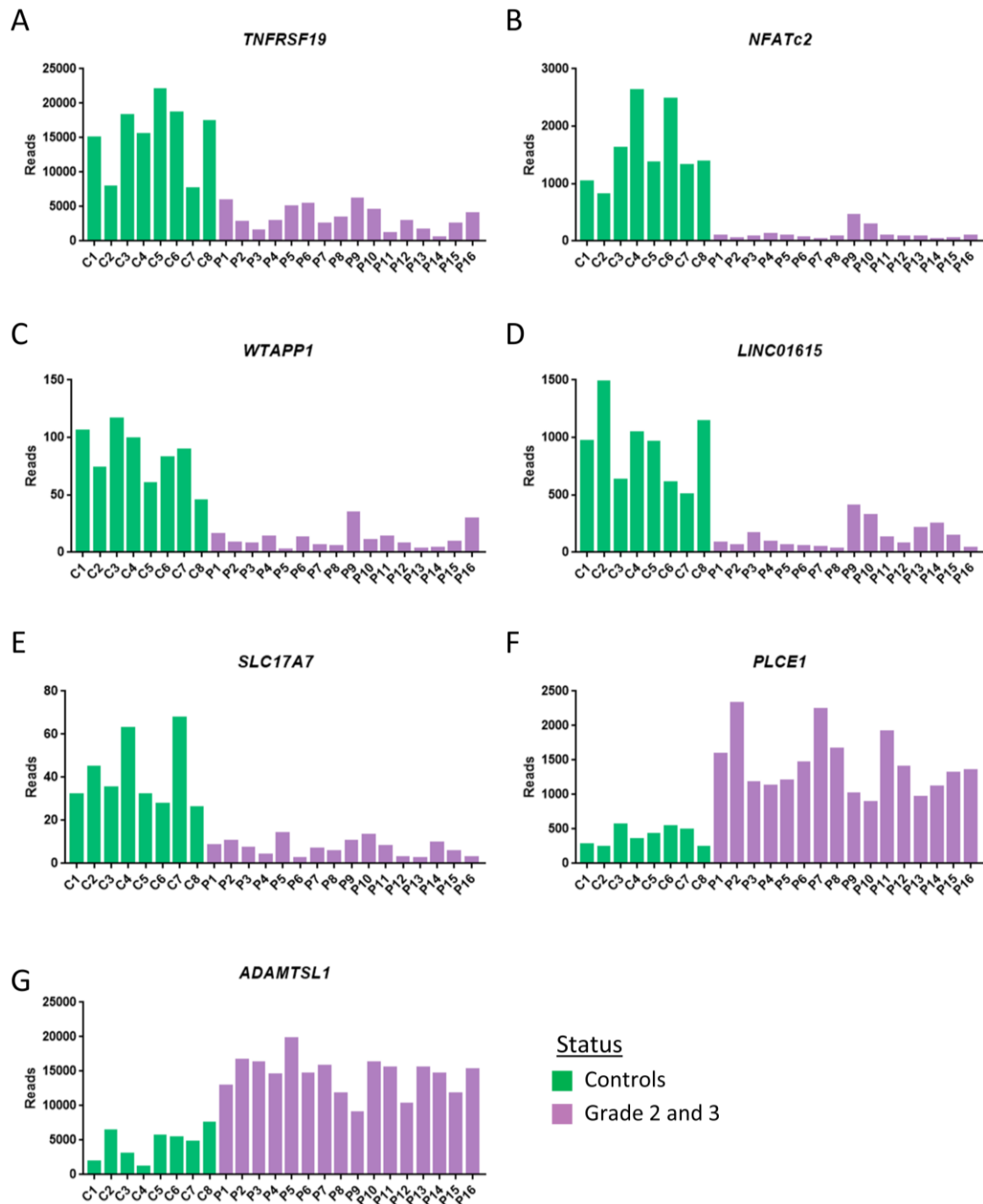


Figure S3: Gene expression of *TNFRSF19*, *NFATC2*, *WTAPP1*, *LINC01615*, *SLC17A7*, *PLCE1* and *ADAMTSL1* in the training data set. The expression levels of *TNFRSF19* (A), *NFATC2* (B), *WTAPP1* (C), *LINC01615* (D), *SLC17A7* (E), *PLCE1* (F) and *ADAMTSL1* (G) measured by RNA sequencing in dermal fibroblasts from 8 controls (in green) and 16 grade 2 and 3 radiosensitive patients (in purple).

Available online in the journal website

Table S1: List of genes with a DMR in their promoter common to grade 2 vs controls and grade 3 vs controls.

Available online in the journal website

Table S2: List of differentially expressed genes common to grade 2 vs controls and grade 3 vs controls.

Gene	Gene ID	Primer	Primer sequence
<i>TBP</i>	6908	Forward	5' – TCA AAC CCA GAA TTG TTC TCC TTA T – 3'
		Reverse	5' – CCT GAA TCC CTT TAG AAT AGG GTA GA – 3'
<i>RPS17</i>	6218	Forward	5' – CTC TTT TAC CAA GGA CCC GCC – 3'
		Reverse	5' – AGG TTG GAC AGA CTG CCG AAG – 3'
<i>ADAMTSL1</i>	92949	Forward	5' – GGC TTC CTG TGT CTA ATG ACC – 3'
		Reverse	5' – TTA GGT GCT AGT TCA ACA ACC AG – 3'
<i>PLCE1</i>	51196	Forward	5' – GCT TCT TAA CAC GGG ACT TGG – 3'
		Reverse	5' – CTT CAA GGG CAT TGT GCT CTC – 3'
<i>NFATC2</i>	4773	Forward	5' – TTG GAA GAA AGA ACA CGC GG – 3'
		Reverse	5' – GAG CAC TCG ATG GGG TTA GA – 3'
<i>LINC01615</i>	101929484	Forward	5' – ACT GTC TCT GGT AAA GGG GC – 3'
		Reverse	5' – GGT GCC CAT AAG AGT TTG CA – 3'
<i>TNFRSF19</i>	55504	Forward	5' – CCA GCA AGG TCA ACC TCG T – 3'
		Reverse	5' – CAG AGC CGT TGT ACT GAA TGT – 3'

Table S3: Details of specific primers and targets used in real-time qPCR experiments.

References

- [1] Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment. *Cancer* 2005;104:1129–37. <https://doi.org/10.1002/cncr.21324>.
- [2] Borrás JM, Lievens Y, Barton M, Corral J, Ferlay J, Bray F, et al. How many new cancer patients in Europe will require radiotherapy by 2025? An ESTRO-HERO analysis. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 2016;119:5–11. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.02.016>.
- [3] Schaake W, Wiegman EM, de Groot M, van der Laan HP, van der Schans CP, van den Bergh ACM, et al. The impact of gastrointestinal and genitourinary toxicity on health related quality of life among irradiated prostate cancer patients. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 2014;110:284–90. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.11.011>.
- [4] Barber JBP, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, et al. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 2000;55:179–86. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(99\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(99)00158-9).
- [5] Borgmann K, Hoeller U, Nowack S, Bernhard M, Röper B, Brackrock S, et al. Individual Radiosensitivity Measured With Lymphocytes May Predict the Risk of Acute Reaction After Radiotherapy. *Int J Radiat Oncol • Biol • Phys* 2008;71:256–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.01.007>.
- [6] Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C, et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine* 2015;2:1965–73. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.024>.
- [7] 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;94:450–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.11.013>.
- [8] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene

- Expression Monitoring. Science 1999;286:531–7.
<https://doi.org/10.1126/science.286.5439.531>.
- [9] Wong YF, Selvanayagam ZE, Wei N, Porter J, Vittal R, Hu R, et al. Expression Genomics of Cervical Cancer: Molecular Classification and Prediction of Radiotherapy Response by DNA Microarray. *Clin Cancer Res* 2003;9:5486–92.
- [10] Mayer C, Popanda O, Greve B, Fritz E, Illig T, Eckardt-Schupp F, et al. A radiation-induced gene expression signature as a tool to predict acute radiotherapy-induced adverse side effects. *Cancer Lett* 2011;302:20–8.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.12.006>.
- [11] Forrester HB, Li J, Leong T, McKay MJ, Sprung CN. Identification of a radiation sensitivity gene expression profile in primary fibroblasts derived from patients who developed radiotherapy-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 2014;111:186–93.
<https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.03.007>.
- [12] Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) n.d.:80.
- [13] Zhao S, Fung-Leung W-P, Bittner A, Ngo K, Liu X. Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. *PLoS ONE* 2014;9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078644>.
- [14] Rao MS, Van Vleet TR, Ciurlionis R, Buck WR, Mittelstadt SW, Blomme EAG, et al. Comparison of RNA-Seq and Microarray Gene Expression Platforms for the Toxicogenomic Evaluation of Liver From Short-Term Rat Toxicity Studies. *Front Genet* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00636>.
- [15] Hirohata S, Wang LW, Miyagi M, Yan L, Seldin MF, Keene DR, et al. Punctin, a novel ADAMTS-like molecule, ADAMTSL-1, in extracellular matrix. *J Biol Chem* 2002;277:12182–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109665200>.
- [16] Schlage P, Egli FE, Nanni P, Wang LW, Kizhakkedathu JN, Apte SS, et al. Time-resolved Analysis of the Matrix Metalloproteinase 10 Substrate Degradome. *Mol Cell Proteomics MCP* 2014;13:580–93. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035139>.
- [17] Cordes N, Blaese MA, Plasswilm L, Rodemann HP, Van Beuningen D. Fibronectin and laminin increase resistance to ionizing radiation and the cytotoxic drug Ukrain in human tumour and normal cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 2003;79:709–20.
<https://doi.org/10.1080/09553000310001610240>.
- [18] Rodemann HP, Blaese MA. Responses of Normal Cells to Ionizing Radiation. *Semin Radiat Oncol* 2007;17:81–8. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2006.11.005>.

- [19] Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: Review of the literature. *Radiat Oncol Lond Engl* 2012;7:162. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-162>.
- [20] Chen Y, Wang D, Peng H, Chen X, Han X, Yu J, et al. Epigenetically upregulated oncoprotein PLCE1 drives esophageal carcinoma angiogenesis and proliferation via activating the PI-PLC ϵ -NF- κ B signaling pathway and VEGF-C/ Bcl-2 expression. *Mol Cancer* 2019;18:1. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0930-x>.
- [21] Chen Y, Xin H, Peng H, Shi Q, Li M, Yu J, et al. Hypomethylation-linked activation of PLCE1 impedes autophagy and promotes tumorigenesis through MDM2-mediated ubiquitination and destabilization of p53. *Cancer Res* 2020. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1912>.
- [22] Ramilowski J, Yip CW, Agrawal S, Chang J-C, Ciani Y, Kulakovskiy IV, et al. Functional Annotation of Human Long Non-Coding RNAs via Molecular Phenotyping. *BioRxiv* 2019:700864. <https://doi.org/10.1101/700864>.
- [23] Deng C, Lin Y-X, Qi X-K, He G-P, Zhang Y, Zhang H-J, et al. TNFRSF19 Inhibits TGF β Signaling through Interaction with TGF β Receptor Type I to Promote Tumorigenesis. *Cancer Res* 2018;78:3469–83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3205>.
- [24] Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:277–90. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)00435-1](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)00435-1).
- [25] Martin MT, Vulin A, Hendry JH. Human epidermal stem cells: Role in adverse skin reactions and carcinogenesis from radiation. *Mutat Res* 2016;770:349–68. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.08.004>.
- [26] Delanian S, Porcher R, Rudant J, Lefaix J-L. Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2005;23:8570–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.4729>.
- [27] Loftus JC, Dhruv H, Tuncali S, Kloss J, Yang Z, Schumacher CA, et al. TROY (TNFRSF19) promotes glioblastoma survival signaling and therapeutic resistance. *Mol Cancer Res MCR* 2013;11:865–74. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0008>.
- [28] Qiu W, Hu Y, Andersen TE, Jafari A, Li N, Chen W, et al. Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19 (TNFRSF19) regulates differentiation fate of human

- mesenchymal (stromal) stem cells through canonical Wnt signaling and C/EBP. *J Biol Chem* 2010;285:14438–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052001>.
- [29] Fafilek B, Krausova M, Vojtechova M, Pospichalova V, Tumova L, Sloncova E, et al. Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with lgr5 to inhibit wnt signaling in intestinal stem cells. *Gastroenterology* 2013;144:381–91. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.048>.
- [30] Gurung A, Uddin F, Hill RP, Ferguson PC, Alman BA. β -Catenin Is a Mediator of the Response of Fibroblasts to Irradiation. *Am J Pathol* 2009;174:248–55. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080576>.
- [31] Karimaian A, Majidinia M, Bannazadeh Baghi H, Yousefi B. The crosstalk between Wnt/ β -catenin signaling pathway with DNA damage response and oxidative stress: Implications in cancer therapy. *DNA Repair* 2017;51:14–9. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.01.003>.
- [32] Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707–47. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.707>.
- [33] Mogno GP, Carneiro FRG, Robbs BK, Faget DV, Viola JPB. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis* 2016;7:e2199. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.97>.
- [34] Shoshan E, Braeuer RR, Kamiya T, Mobley AK, Huang L, Vasquez M, et al. NFAT1 directly regulates IL-8 and MMP-3 to promote melanoma tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2016;76:3145–55. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2511>.
- [35] Yarosh DB, Pena AV, Nay SL, Canning MT, Brown DA. Calcineurin inhibitors decrease DNA repair and apoptosis in human keratinocytes following ultraviolet B irradiation. *J Invest Dermatol* 2005;125:1020–5. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23858.x>.
- [36] Canning MT, Nay SL, Peña AV, Yarosh DB. Calcineurin inhibitors reduce nuclear localization of transcription factor NFAT in UV-irradiated keratinocytes and reduce DNA repair. *J Mol Histol* 2006;37:285–91. <https://doi.org/10.1007/s10735-006-9034-9>.
- [37] Gabriel CH, Gross F, Karl M, Stephanowitz H, Hennig AF, Weber M, et al. Identification of Novel Nuclear Factor of Activated T Cell (NFAT)-associated Proteins in T Cells. *J Biol Chem* 2016;291:24172–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.739326>.

Article 2 (Submitted):

**NFATC2 modulates radiation toxicity in dermal fibroblasts from patients
with severe side-effects of radiotherapy**

Joshua Dulong¹, Clara Kouakou¹, Yasmina Mesloub², Julie Rorteau¹, Sandra Moratille², Fabien Chevalier¹, Tatiana Vinasco-Sandoval ², Michèle T Martin²
and Jérôme Lamartine^{1#}

¹ Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, CNRS UMR5305, University of Lyon, Claude Bernard University Lyon I, IBCP - 7 Passage du Vercors. F69367 Lyon – France

² CEA, Genomics and Radiobiology of Keratinopoiesis, DRF/IBFJ/iRCM, Université Paris-Saclay, 2 Rue Gaston Cremieux. F91057 Evry, France.

Corresponding author:

Jerome.lamartine@univ-lyon1.fr. LBTI CNRS UMR5305 – 7 Passage du Vercors – F69367 Lyon – France +33 4 72 72 26 66

Key words: radiotherapy, radiosensitivity, skin fibroblasts, transcriptome, NFATC2, normal tissue side effects

The authors have no competing financial interests to declare.

Abstract

Although it is well established that 5% to 15% of radiotherapy patients exhibit severe side-effects in non-cancerous tissues, the molecular mechanisms involved are still poorly known, and the links between cellular and tissue radiosensitivity are still debated. We here studied fibroblasts from non-irradiated skin of patients with severe sequelae of radiotherapy, to determine whether specific basal cell activities might be involved in susceptibility to side-effects in normal tissues. Compared to control cells, patient fibroblasts exhibited higher radiosensitivity together with defects in DNA repair. Transcriptome profiling of dermal fibroblasts from 16 radiotherapy patients with severe side-effects and 8 healthy individuals identified 540 genes specifically deregulated in the patients. Nuclear factor of activated T cells 2 (*NFATC2*) was the most differentially expressed gene, poorly expressed at both transcript and protein level, whereas the *NFATC2* gene region was hypermethylated. Furthermore, *NFATC2* expression correlated with cell survival after irradiation. Finally, silencing *NFATC2* in normal cells by RNA interference led to increased cellular radiosensitivity and defects in DNA repair. This study demonstrates that patients with clinical hypersensitivity also exhibit intrinsic cellular radiosensitivity in their normal skin cells. It further reveals a new role for *NFATC2* as a potential regulator of cellular sensitivity to ionizing radiation.

Introduction

Radiosensitivity is the relative sensitivity of cells, tissues, organs and organisms to the injurious effects of ionizing radiations. This notion includes very different outcomes according to the scale at which it is analyzed. At cellular level, sensitivity to ionizing radiation is notably evaluated by the rate of immediate or delayed death in irradiated cell cultures and by cell capacity to repair DNA damage. At organism level, radiosensitive individuals are those that develop severe effects in irradiated tissue whereas the majority of the population exposed to the same dose show no or only mild effects. This is particularly obvious in the context of radiotherapy (RT), the main source of human exposure to high-dose ionizing radiation, where 5-15% of patients exhibit severe side-effects in irradiated normal tissues (1,2), including fibrosis (3), necrosis and sometimes radio-induced secondary cancers (4,5). A central question regarding the multi-scale nature of radiosensitivity is whether intrinsic cellular radiosensitivity is a mirror of organism sensitivity. If that is the case, cellular testing would be a means of identifying radiosensitive patients and predicting deleterious outcome of radiation exposure. Moreover, using cultured cells as models of radiation sensitivity would shed light on the intrinsic mechanisms, which are far from clear. However, to date, data on the correlation between cellular and organism radiosensitivity are contradictory, especially regarding skin fibroblasts, a cell type which has been directly involved in the development of radiotherapy side-effects (6). Previous studies reported higher radiation toxicity in dermal fibroblasts from radiosensitive patients (7–10) and a correlation between clinical grades and cellular radiosensitivity (11,12). However, other authors reported no difference in dermal fibroblast radiosensitivity between radiosensitive and radio-tolerant individuals (13,14).

To further investigate this question, we used cutaneous fibroblasts from a collection of RT patients exhibiting severe side-effects of radiotherapy, that were classified according to side-effect severity (15). The first goal of this study was to investigate the link between cellular and individual radiosensitivity. The second goal was to shed light on the complex molecular mechanisms of the cellular response to ionizing radiation.

Here, we investigated the radiation toxicity and the DNA repair ability of skin fibroblasts from patients with RT severe side effect and we observed that patient fibroblasts exhibited higher cell death and profound DNA repair defects compared to normal control cell samples. By a transcriptomic analysis, we identified the transcription factor NFATC2 as being strongly repressed in patient fibroblasts, with hypermethylation on the coding sequence. Finally, we

demonstrate that the repression of NFATC2 is able to increase the radiation sensitivity of normal fibroblasts, suggesting that this protein is involved in the establishment of the radiosensitive phenotype.

Materials and Methods

Cell culture

Fibroblasts from patients were obtained from the INSERM UMR1052 COPENIC cell collection (15). This collection was approved by the regional Ethical Committee (CPP Sud-Est, Lyon, France) and cell lines were declared under the numbers DC2008-585 and DC2011-1437 to the Ministry of Research. The database derived from the COPENIC collection is protected under the reference IDDN.FR.001.510017.000.D.P.2014.000.10300.

All the anonymous patients were informed and signed consent according to the ethics recommendations. This collection is composed of cancer patients presenting with overreactions in normal tissues after radiotherapy. Severity of side-effects was graded for each patient according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events scale, version 4.03 (16). Sampling was performed in non-irradiated, non-photo-exposed anatomical region after local anesthesia. Standardized dermatological punch and untransformed fibroblast cell strains were prepared from skin biopsies. In the present study, 16 breast cancer patient cells were studied, comprising 8 cell strains from grade 2 patients, here referenced as P1 to P8, and 8 cell strains from grade 3 patients (P9 to P16). Cells were studied between passage 7 to 10 in culture (mean population doublings: 35 to 50), before any senescence occurrence.

As control, primary dermal fibroblasts were obtained from 8 non-irradiated female healthy donors (C1 to C8). Surgical samples were obtained from the Hospitals Board of Lyon, France (Hospices Civils de Lyon), with the subjects' informed consent. Cells were subcultured up to 7 passages and studied between passage 7 to 10, to have similar age in culture as patient cells (mean population doublings: 35 to 50). As fibroblasts are quiescent cells in the dermis, most studies were performed on confluent cells, in the G0/G1 cell cycle phase, both for patient and control cells.

Cultures were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium – Glutamax medium (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) supplemented with 10% fetal bovine serum

(ThermoFisher) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Cell irradiation

Primary dermal fibroblasts were irradiated after reaching confluency with 2 Gy using an XRAD320 X-ray generator (Precision X-Ray, North Brandford, CT, USA) at a dose rate of 0.8 Gy.min⁻¹ and then further cultured for indicated times depending on the assay.

Colony survival assay

Dermal fibroblasts were irradiated with 2 Gy X-rays after reaching confluency and seeded at low density (5 to 40 cells/cm²) 24h after irradiation. Two weeks later, cell cultures were fixed with EtOH 100% for 15 minutes and stained with hematoxylin/eosin. Only colonies formed by more than 50 fibroblasts were considered for calculating survival fraction at 2 Gy (SF2), expressed as the ratio between colonies formed with and without irradiation.

γ H2AX and 53BP1 foci assays

Irradiated fibroblasts were further cultured for the indicated times (0min, 15min, 2h, 6h and 24h) and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes. Then, cells were permeabilized (0.1% Triton X-100 and 0.1 M Glycine) and incubated in blocking buffer (5% goat serum, 2% BSA, 0.1% Triton X-100 and 0.05% Tween-20) for 15 minutes prior to immunostaining with anti- γ H2AX antibody (05-636, Millipore) or anti-53BP1 antibody (PA1-46147, ThermoFisher). For immunodetection, goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG Alexa Fluor-488 or -546 conjugated secondary antibody (ThermoFisher) was incubated for 1 hour and nuclei were counterstained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). The resulting foci were counted in at least 50 nuclei per condition using an Eclipse Ti-E inverted microscope (Nikon).

DNA repair chip assay

Fibroblast DNA repair was measured on ExSy-SPOT assay (LXRepair). Protein extracts from lysed cells were applied directly on the biochip containing plasmids with well-characterized DNA lesions (8-Oxoguanine, Ethenobase, Abasic site, Glycols, Photoproducts and Cisplatin adducts) and incubated with fluorescent nucleotides to allow DNA repair. Effective DNA repair was quantified for each type of lesion by CT measurement of the resulting fluorescence signal. Thus, fluorescence level was proportional to cell ability to repair the specific DNA damage within the prescribed time.

Transcriptome analysis

Total RNA was isolated from fibroblasts at confluency with the NucleoSpin RNA plus kit (Macherey – Nagel, Hoerdlt, France) or RNeasy Plus Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

For next-generation RNA sequencing, RNA sequences were captured using a TruSeq RNA Library Prep Kit v2 (Illumina, Evry, France) with input of 1 µg. Paired-end RNA sequencing was performed on HiSeq4000 at CNRGH (CEA, Evry, France) with 100 bp paired-end reads. Sequencing data quality control was performed using FastQC 0.11.7 before and after adapter trimming by Cutadapt 1.13 (parameters: -q 15 -a 5'-AGA TCG GAA GAG CAC ACG TCT GAA CTC CAG TCA C-3' – 5-AAG ATC GGA AGA GCG TCG TGT AGG GAA AGA GTG TAG ATC TCG GTG GTC GCC GTA TCA TT-3'). The reads were mapped to the human genome (GRCh37/hg19) using HISAT2 2.0.5. For a single gene, sequences were aligned versus all known exons of all gene isoforms. The resulting BAM files were sorted by read pairs (using SAMtools 1.3.1) and counted using the HtSeq-count tool of HtSeq 0.6.1.

For transcriptome analysis, filtering was applied to genes with low expression (mean number of reads in the training set < 10). Principal component analysis and hierarchical clustering were performed using the R DEseq2 and stats packages. VennDiagram and plots were made using the VennDiagram and ggplot2 package. Functional annotation of the gene list was performed using the WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt) and the KEGG database 2019. Gene Ontology (GO) was performed using the clusterProfiler package in R software (17). GO and KEGG enrichment analyses were based on a false discovery rate (FDR) threshold of < 0.05. The Enrichedplot package was used for graphical visualization of the result from enriched analysis. Transcriptome data have been deposited into the GEO database and are available under the accession number GSE154559.

Real-Time quantitative PCR

An equal amount of total RNA (500 ng) was used as template for reverse transcription with PrimeScript™ RT reagent kit (Takara, Shiga, Japan) and analyzed by Real-Time QPCR using SYBR® Premix ExTaqII (Takara) on an AriaMx Realtime PCR system (Agilent Genomics, Santa Clara, CA, USA). All primers listed below were provided by Eurogentec. *NFATC2* expression level was normalized to *TBP* and *RPS17* housekeeping gene expression level.

NFATC2f: 5'-TTGGAAGAAAGAACACGCGG-3',

NFATC2r: 5'-GAGCACTCGATGGGGTTAGA-3',

TBPf: 5'-TCAAACCCAGAATTGTTCTCCTTAT-3',

TBPr: 5'-CCTGAATCCCTTTAGAATAGGGTAGA-3',

RPS17f: 5'-CTCTTTTACCAAGGACCCGCC-3',

RPS17r: 5'-AGGTTGGACAGACTGCCGAAG-3'

Protein extraction and immunoblotting

Total proteins were extracted using RIPA buffer (50mM Tris-HCl pH = 8, 150 mM NaCl, 1.5 mM KCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA) containing protease inhibitor cocktail (cOmplete mini, Roche Diagnostics) and phosphatase inhibitor cocktail (5 mM NaF, 50 mM β -glycerophosphate, 5 mM orthovanadate). Proteins were quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher), loaded on an 8% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-rad). The membrane was blocked for 1h at room temperature in TBS-Tween20 0.1% - 5% BSA and immunoblotted overnight at 4°C for primary antibodies specific to NFATC2 (#4389, Cell Signaling Technology) or VINCULIN (V9131, Sigma-Aldrich). After washing, goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibodies (Bio-rad) were incubated for 1h at room temperature. Proteins were revealed using SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher) and the signal was detected by the Fusion Fx system (Vilber Smart Imaging). Immunoblot quantifications were performed using GelAnalyzer software.

DNA extraction and Bisulfite conversion and HRM PCR

DNA was extracted from fibroblasts using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. To assess methylation of a specific DNA region, DNA was converted with bisulfite treatment, using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Then, HRM PCR was performed using the EpiTect HRM PCR kit (Qiagen) to amplify the specific DNA region and to measure the melting temperature of the amplicon on an AriaMx Realtime PCR system (Agilent Genomics). 100% methylated DNA, 100% unmethylated DNA and bisulfite unconverted DNA from the EpiTect Control DNA Set kit (Qiagen) were used as controls. Figures with methylation peaks were produced with Agilent Aria 1.5 Software (Agilent Genomics). Primers were designed with Methyl Primer Express

Software v1.0 (ThermoFisher Scientific) and were provided by Eurogentec. The following primers were used for methylation study:

NFATC2mF: 5'-TTTAGATGAATAGTGTTTTGGG-3',

NFATC2mR: 5'-ATTATCATTTTCCTTCCTCTACTTC-3'.

RNA interference

Control fibroblasts were transduced with lentiviral vectors from NFATC2 Human shRNA Plasmid Kit (OriGene). Lentiviral vector particles were produced by the vector facility at SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (Lyon, France) as previously described (18). Control cells were infected at 40% confluency with lentiviral particles (MOI at 10) containing a vector with a shRNA targeting *NFATC2* (sh-*NFATC2*) or a plasmid with a non-effective shRNA sequence (sh-*SCR*) for 12h. At confluency, cells were trypsinized and seeded in another plate. Then, transduced cells were maintained under puromycin selection for 1 week and then selected cells were amplified for 1 week before analysis.

Statistics

Statistical significance was calculated by Student's t-test, one-way analysis of variance (ANOVA), two-way analysis of variance (ANOVA2) or Pearson correlation using Prism software (version 8.0, GraphPad Software). Mean differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Results

Fibroblasts from patients with severe radiotherapy side-effects exhibit decreased tolerance to radiation toxicity

We analyzed ionizing radiation toxicity in cultured dermal fibroblasts from 16 breast cancers patients with severe radiotherapy (RT) side-effects (8 grade 2, 8 grade 3) and 8 control individuals. To estimate radiation-induced toxicity, we used the reference method of colony survival fraction measurement after a standard dose of 2 Gy X-irradiation (SF2). The colony survival assay showed that dermal fibroblasts from the 8 control biopsies presented a mean 48% survival fraction, whereas cells from patients with RT over-reaction exhibited significantly lower SF2, with 28% and 27% survival fraction for cells of grade 2 and grade 3 patients respectively (Figure 1). Since no significant difference in cellular radiosensitivity was observed

between cells from grade 2 and grade 3 patients, the 16 cell strains were pooled for the following experiments.

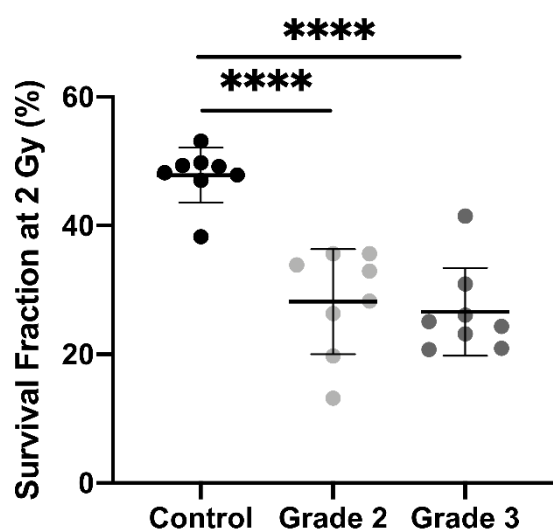


Figure 1: Dermal fibroblasts from patients with severe side-effects of radiotherapy exhibit higher radiosensitivity. Colony survival assays showed that survival fraction at 2 Gy was higher in control cells (n = 8) than in cells from overreacting patients, with no difference according to clinical grade (n = 8 grade 2 and n = 8 grade 3). Results are

mean $\pm$ SD. The p-value was calculated by one-way ANOVA. Significant at **** $P < 0.0001$.

Fibroblasts from patients with severe radiotherapy side-effects exhibit DNA repair defects

To study patient cell DNA repair ability, we first performed immunofluorescence against γ H2AX and 53BP1, two early markers of DNA double-strand breaks (DSB), in 4 control and 4 radiosensitive cell strains after 2 Gy irradiation. The number of γ H2AX and 53BP1 foci 15min after 2 Gy irradiation was identical in control and patient fibroblasts, with a mean 40 foci per nucleus in both (Figure 2A and 2B). However, more γ H2AX foci were detected in patient than control cells 2h, 6h and 24h after irradiation: 2.7, 4.13 and 2.03 additional foci per cell respectively (Figure 2A). More 53BP1 foci were also detected 6h and 24h after 2 Gy irradiation in patient than control fibroblasts: respectively + 2.65 and + 5.55 foci per cell (Figure 2B).

We also assessed patient cell ability to repair various DNA lesions, using the ExSy-SPOT chip, a microsystem developed to measure excision-synthesis activity in immobilized plasmid DNA (19). Repair activity was reflected by the incorporation of fluorescent nucleotides at the lesion site. Fluorescence in plasmids containing 8-oxoGuanine and abasic sites was higher in control than patient samples (Figure 2C), and in plasmids containing glycol-damaged bases, although the difference did not quite reach significance ($P = 0.062$) (Figure 2C). Thus, ability to repair 8-oxoGuanine, abasic site and glycol-damaged bases, three types of DNA damage induced by

oxidative stress and known to be repaired by the BER pathway, seemed to be impaired in dermal fibroblasts from patients with severe radiotherapy side-effects.

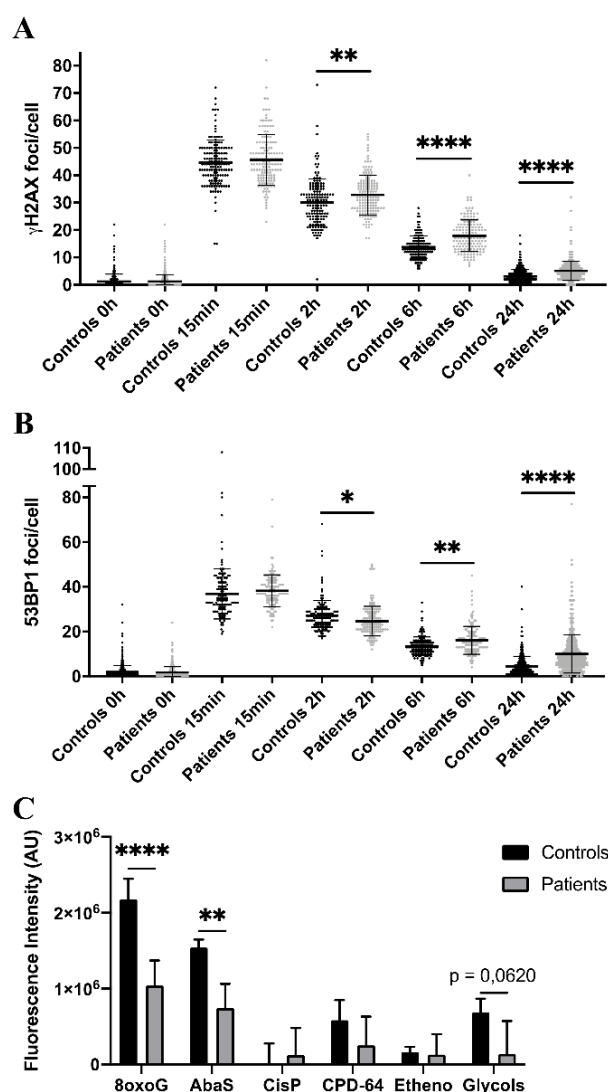


Figure 2: Impaired DNA repair in dermal fibroblasts from overreacting patients. Immunofluorescence detection of γ H2AX (A) and 53BP1 (B) foci, investigated 0h, 15min, 2h, 6h and 24h after 2 Gy irradiation in cells from patients with severe radiotherapy side-effects. The number of foci was assessed in at least 100 cells in 4 normal (C1, C2, C4 and C8) and 4 patient cell strains (P1, P6, P10 and P15). Results are mean $\pm$ SD. The p-value was calculated by one-way ANOVA. Significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$. (C) DNA damage repair ability was measured using the ExSy-SPOT chip. Fluorescence was proportional to cell ability to repair indicated DNA lesions. 8oxoG = 8-oxoGuanine. AbaS = Abasic site. CisP = Cisplatin adducts. CPD-64 =

Cyclobutane pyrimidine dimer - pyrimidine-(6,4)-pyrimidone photoproducts. Etheno = Etheno adducts. Results are mean $\pm$ SD from 4 control fibroblast strains (C1, C2, C4 and C6) and 4 radiosensitive fibroblast strains (P2, P7, P8 and P10). The p-value was calculated by Student's t-test. Significant at ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$.

Identification of a specific transcriptome profile in patients' fibroblasts

To investigate the mechanisms underlying individual radiosensitivity at cellular level, we used next-generation RNA sequencing to profile the whole genome transcriptome of the 16 patient and 8 control fibroblast cultures. Principal component analysis (PCA) of whole gene expression data clearly separated controls from over-reacting patients (Figure 3A). However, one patient's cell strain was classified as being in the control group by hierarchical cluster analysis (Figure

3B). Within the patient group, there was no clear separation between grades 2 and 3, whether on PCA or hierarchical cluster analysis (Figure 3A and 3B).

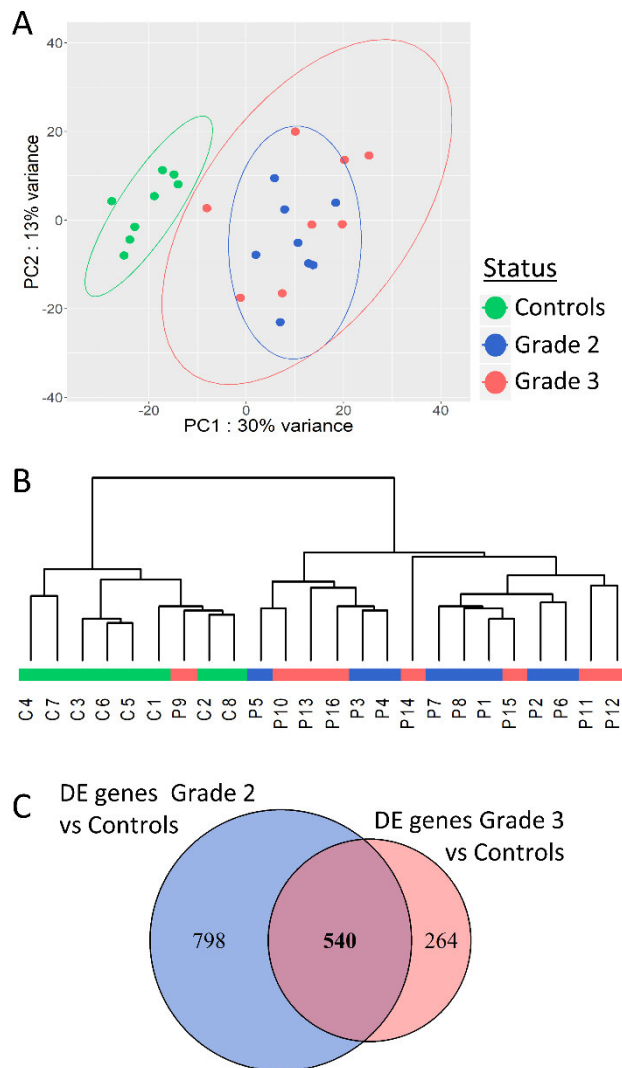


Figure 3: Patients with severe radiotherapy side-effects show a specific transcriptome profile. Principal component analysis (A) and hierarchical clustering of patients and controls based on RNA sequencing data. (C) Venn diagram showing the 540 differentially expressed genes in common between grade 2 vs control and grade 3 vs control RNAseq data.

We identified 1,338 genes differentially expressed (adjusted p-value < 0.05) between fibroblasts from grade 2 patients and controls (Figure 3C), and 804 genes differentially expressed between fibroblasts from grade 3 patients and controls (Figure 3C). 540 of these differentially expressed genes were in common between grade 2 patients vs controls and grade 3 patients vs controls (Figure 3C and Supplementary Table S1). Interestingly, no genes were differentially expressed between grade 2 and grade 3 patients, in agreement with the PCA and hierarchical cluster classification of the transcriptome data.

445 of the 540 differentially expressed genes were protein-coding and were used for functional enrichment analysis. Gene ontology analysis highlighted 93 significantly enriched GO

biological processes with $FDR < 0.05$ (Figure S1 Supplementary data). Functions with the smallest FDRs comprised regulation of GTPase activity regulation, of organ development and of cell adhesion and junction (Figure S1 Supplementary data). All these functions might be involved in cellular radiation toxicity, but correspond to multiple intracellular pathways. We then searched for enriched pathways involving the 445 differentially expressed protein-coding genes using the WebGestalt and the KEGG database 2019. We found only 1 significantly enriched pathway (Supplementary Table S2): Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (adjusted p-value 0.0065733 - 10 genes out 72 modulated), a pathology of cardiac muscles with progressive loss of myocytes replaced by adipocytes. Systematic analysis of our gene list revealed that none of these genes was directly involved in any known genetic syndrome leading to increased radiosensitivity.

NFATC2 is downregulated in patient cells and correlated with radiosensitivity

Among the most differentially expressed genes between control and patient fibroblasts identified by our RNA sequencing approach, we focused on *NFATC2*, which encodes a transcription factor initially described in T-cell activation and involved in numerous cellular functions such as apoptosis and the cell cycle (20). We therefore carefully analyzed *NFATC2* gene and protein expression in patient cells extracted from non-irradiated skin. Dermal fibroblasts from patients with severe radiotherapy side-effects exhibited much lower *NFATC2* gene expression than control cells (Figure 4A). Similarly, *NFATC2* protein expression was lower in patient cells (Figure 4B and 4C). *NFATC2* gene and protein expressions were assessed after irradiation to determine whether *NFATC2* could be a radiation-responding gene, potentially involved in cellular radiation response. *NFATC2* gene overexpression was detected in response to 2 Gy irradiation, with a 4-fold peak at 3h in control fibroblasts and a 15-fold peak in patient fibroblasts, with return to baseline after 24h (Figure 4D). *NFATC2* protein was detected in greater quantities (x 1.8) after 2 Gy irradiation with a peak between 3h and 6h in normal fibroblasts, but the difference was not statistically significant due to interindividual variability ($P = 0.1192$ and $P = 0.1553$, respectively) (Figure 4E and 4F). Furthermore, *NFATC2* protein was barely detected in cells from radiosensitive patients (Figure 4E and 4F). Interestingly, there was a significant correlation between *NFATC2* transcriptional expression and irradiated cell survival (Pearson correlation coefficient, $R^2 = 0.4949$, $P = 0.0001254$) (Figure 4G), suggesting a possible role for *NFATC2* in cellular radiosensitivity. Taken together, these results suggest that *NFATC2* is a radiation-responding gene potentially involved in cellular response to ionizing radiation.

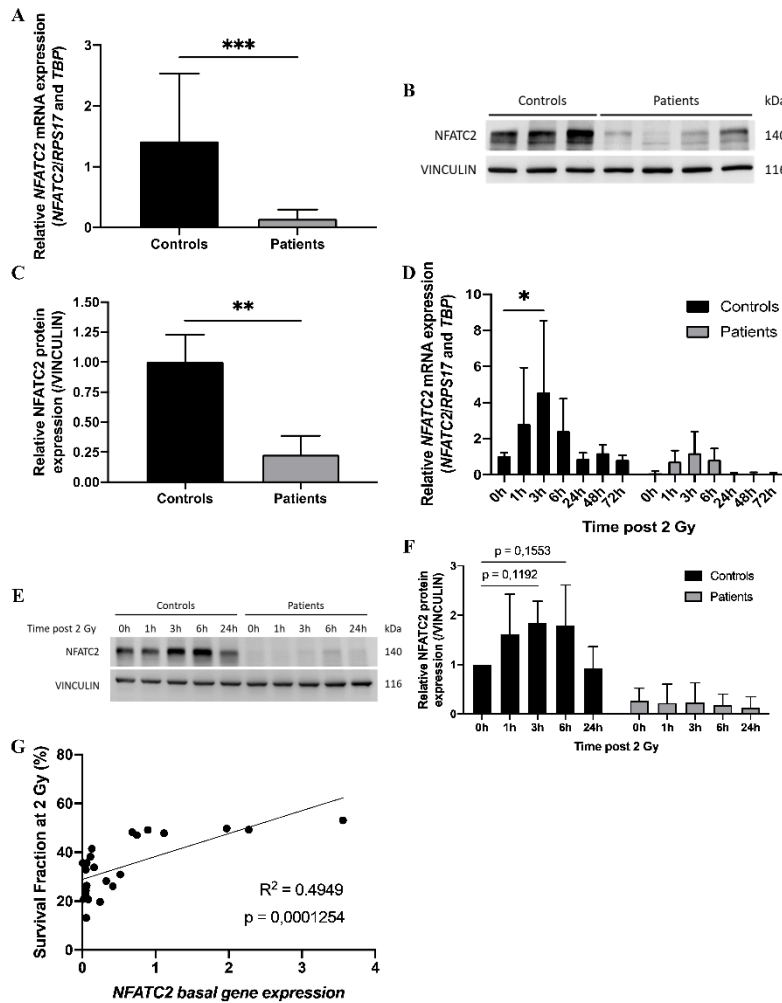


Figure 4: NFATC2 downregulation in fibroblasts from overreacting patients. (A) *NFATC2* mRNA levels were measured by RTqPCR in control cells (n = 8) and in fibroblasts from patients with severe radiotherapy side-effects (n = 16). Results are mean +/- SD. The p-value was calculated by Student's t-test. Significant at *** $P < 0.001$. (B) *NFATC2* protein expression was evaluated by immunoblotting in control (n = 3) and patient fibroblasts (n = 4) and quantified (C), with VINCULIN as loading control. Results are mean +/- SD. The p-value was calculated by Student's t-test. Significant at ** $P < 0.01$. (D) *NFATC2* gene expression was assessed at various time points after 2 Gy irradiation in 3 control cell strains (C1, C5 and C8) and 3 cell strains from overreacting patients (P7, P8 and P10). Results are mean +/- SD. The p-value was calculated by two-way ANOVA. Significant at * $P < 0.05$. (E) Representative image of immunoblotting analysis of *NFATC2* protein expression at various time points after 2 Gy irradiation on one control cell strain (C4) and one patient cell strain (P8) and quantification (F). Results are mean +/- SD from 3 independent immunoblotting analyses of 3 control (C4, C5 and C8) and 3 patient fibroblast strains (P6, P8 and P10). The p-value was calculated by two-way ANOVA. (G) Pearson correlation between *NFATC2* gene expression and SF2.

***NFATC2* is hypermethylated in patient fibroblasts**

To elucidate the regulatory mechanisms underlying *NFATC2* differential expression in non-irradiated fibroblasts from controls and patients, we compared gene methylation level between patients and controls. The methylation pattern of the *NFATC2* gene region was extracted from genome-wide methylation profiling using methylation bead chips performed on patient and control fibroblasts (data not shown), identifying 34 differentially methylated sites (CpGs) (33 hyper- and 1 hypo-methylated) (Figure 5). This hypermethylation of the *NFATC2* gene in patients' fibroblasts was consistent with its lower gene expression. Interestingly, the upstream region of the transcription starting site (TSS) exhibited the same methylation profile in patient and control cells (Figure 5). However, among the hypermethylated CpGs, cg00418183, cg00401091, cg11086066, cg10226546, cg11074047, cg18302534, cg16419175, cg21610125, cg15497991, cg26408896, cg22243637, cg09740920, cg00498368, cg08637147, cg09465142, cg03986956 and cg00689890 belong to a gene region identified as promoter-associated regions according to the ENCODE consortium. This hypermethylation of these regulatory regions could, at least in part, explain the weak expression of *NFATC2* in patient fibroblasts.

To confirm these results by an independent method, we performed HRM PCR to evaluate the methylation state of the CpG00498368 in 4 patient and 2 control cell strains. HRM PCR is a PCR measuring the melting temperature of a specific amplicon. After bisulfite conversion, an amplicon comprising a methylated CpG would exhibit a higher melting temperature than an amplicon with an unmethylated CpG. We detected a higher melting temperature peak, corresponding to a methylated state of this CpG in patient fibroblasts and to an unmethylated state in control fibroblasts (Figure S2B Supplementary data), in agreement with the global methylome data (Figure S2A Supplementary data).

These results suggest that *NFATC2* down-regulation could, at least in part, be due to hypermethylation of the gene in fibroblasts from patients with severe radiotherapy side-effects.

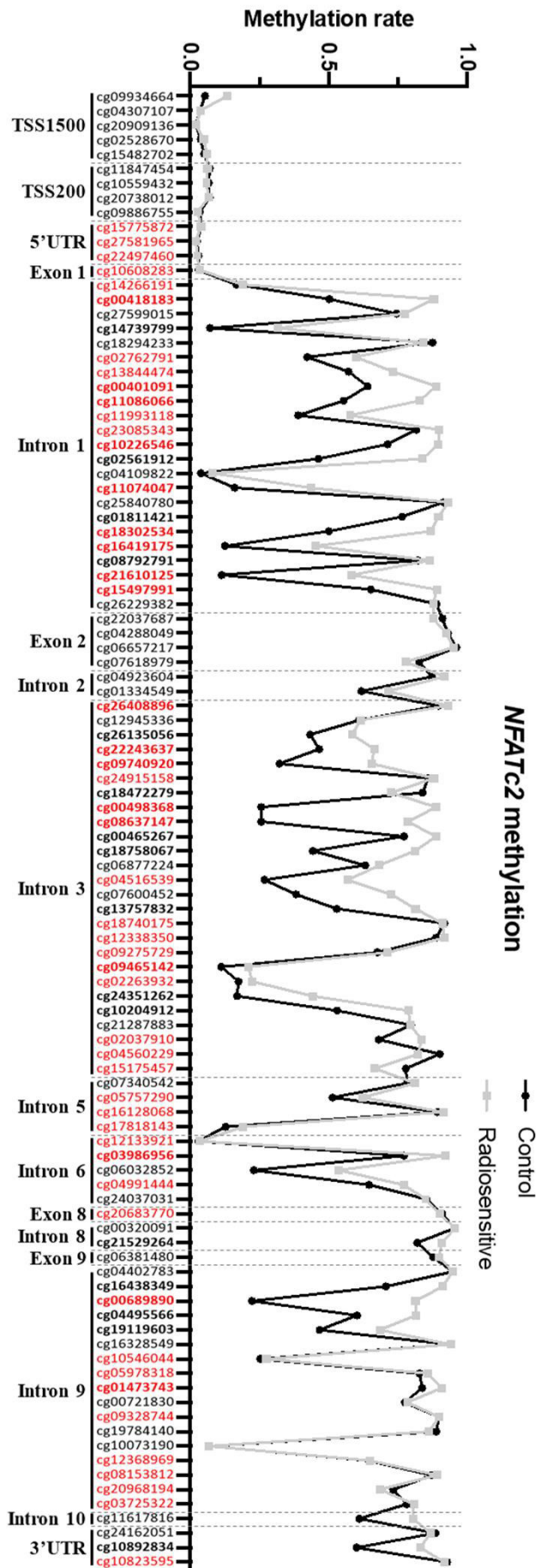


Figure 5: *NFATC2* is hypermethylated in patient fibroblasts. *NFATC2* methylation in cells from patients with severe radiotherapy side-effects (n = 16) and controls (n = 8) were investigated on genome-wide methylation analysis. CpG sites in bold are differentially methylated between control and patient cells. CpG sites in red are part of promoter-associated regions defined by the ENCODE consortium.

NFATC2 silencing in normal dermal fibroblasts leads to increased cellular radiosensitivity and DNA DSB defects

To evaluate the functional impact of NFATC2 in cellular radiosensitivity, *NFATC2* expression was silenced in cells from healthy individuals by stable RNA interference mediated by a lentiviral vector. We tested 4 lentiviral vectors, each containing a different short hairpin RNA (shRNA) targeting *NFATC2*, and chose the most efficient in terms of silencing for the further experiments (Figure S3 Supplementary data). NFATC2 expression was reduced by 48% on average at gene level (Figure 6A) and by 70% on average at protein level in transduced fibroblasts expressing the shRNA targeting the *NFATC2* transcript (Figures 6B and 6C).

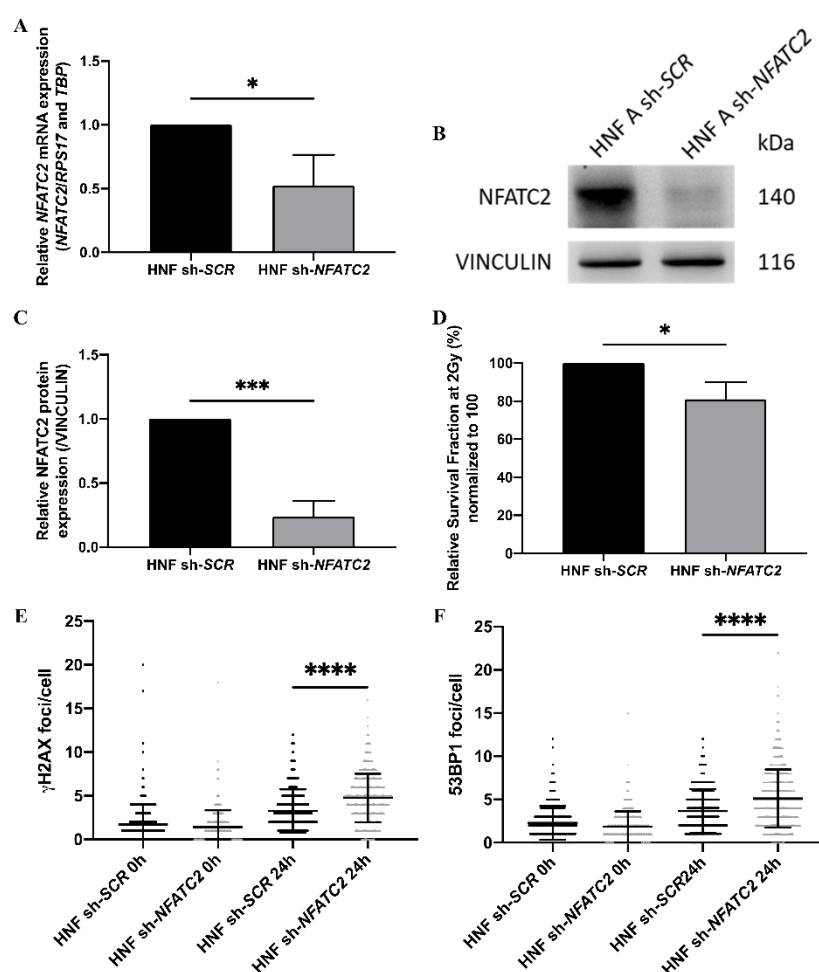


Figure 6: NFATC2 down-regulation leads to cellular radiosensitivity. (A) *NFATC2* mRNA levels were measured by RT-qPCR in 3 control fibroblast strains (HNF) infected with a lentiviral vector carrying either a shRNA scramble (sh-SCR) sequence or a shRNA targeting *NFATC2* (sh-NFATC2). Results are mean $\pm$ SD. The p-value was calculated using a

Student's t-test. Significant at * $P < 0.05$. (B) Representative image of immunoblotting analysis of NFATC2 protein expression in one control cell strain (HNF A) infected with lentiviral vectors sh-SCR or sh-NFATC2, and quantification (C). Results are mean $\pm$ SD from immunoblotting analysis of 3 different cell strains infected with lentiviral vectors sh-SCR or sh-NFATC2. The p-value was calculated using a Student's t-test. Significant at *** $P < 0.001$. (D) Lower SF2 was measured by colony survival assays in cells infected with lentiviral vector sh-

NFATC2 compared to cells infected with lentiviral vector sh-*SCR*. Results are mean $\pm$ SD from 3 cell strains. The p-value was calculated using a Student's t-test. Significant at * $P < 0.05$. More numerous γ H2AX (E) and 53BP1 (F) residual foci, investigated by immunofluorescence, 24h after 2 Gy irradiation in fibroblasts infected with lentiviral vector sh-*NFATC2*. Assessed in at least 100 cells in 3 cell strains infected with lentiviral vectors sh-*SCR* or sh-*NFATC2*. Results are mean $\pm$ SD. The p-value was calculated using a two-way ANOVA. Significant at **** $P < 0.0001$.

Colony survival assays revealed that cells with lower *NFATC2* expression (HNF sh-*NFATC2*) exhibited a significantly lower SF2 compared to their control (HNF sh-*SCR*) (20% decrease in cell survival in response to irradiation) (Figure 6D). To better understand the molecular mechanisms of this cell death elevation in sh-*NFATC2* expressing cells, we investigated their DNA DSB repair ability, and detected more residual γ H2AX and 53BP1 foci 24h after 2 Gy irradiation in HNF sh-*NFATC2* cells than in control cells (HNF sh-*SCR*) (respectively, + 1.49 γ H2AX versus + 1.46 53BP1 foci per nucleus on average) (Figures 6E and 6F), corresponding to an excess of residual unrepaired DNA double-strand breaks. These results suggest that the *NFATC2* down-regulation observed in patient cells is involved in their cellular radiation sensitivity.

Discussion

The mechanisms responsible for individual sensitivity to ionizing radiations are not yet fully elucidated. The present study investigated the radiation sensitivity of dermal fibroblasts from patients showing severe side-effects of radiotherapy (RT). A key result was that patient dermal fibroblasts were intrinsically more radiosensitive than cells from healthy individuals. We also detected more γ H2AX and 53BP1 foci from 6h to 24h after irradiation in patient dermal fibroblasts, suggesting slower DNA DSB repair ability.

DNA DSB repair abilities in cells from radiosensitive patients have been widely studied. Some authors identified a link between residual unrepaired DNA DSB and risk of severe RT side-effects (15,21,22), whereas others found no DNA DSB repair defect in cells from radiosensitive patients (23–25). Once again, these differences could be due to differences in the methods used to assess DSB repair ability, highlighting the necessity of more standardized protocols, especially regarding cell culture conditions, type of irradiation and DSB detection kinetics (26).

Moreover, using the ExSy-SPOT assay, we showed that cells from patients with severe RT side-effects also exhibited repair defects for 8-oxoGuanine, abasic sites and glycol-damaged

bases. All these types of DNA damage, induced by ionizing radiation and the resulting oxidative stress, are usually repaired by base excision repair mechanisms (27). Batar et al. showed that a decrease in *XRCC1* expression, an actor in base excision repair, was associated with acute side-effects in breast cancer patients (28). However, no *XRCC1* differential expression was detected between control and patient fibroblasts and further investigations will be needed to elucidate at which level dermal fibroblasts from radiosensitive patients fail in their base excision repair mechanism.

Patient cells exhibited a specific transcriptome profile compared to controls, with no segregation at transcriptional level between clinical grades 2 and 3. Side-effect severity is probably highly multifactorial and modulated by complex interaction between intrinsic and extrinsic factors during radiotherapy treatment. This could explain why we were not able to distinguish clinical grades on transcriptome analysis of patients' cells obtained several months after end of treatment. Nevertheless, we were able to identify 540 genes differentially expressed between dermal fibroblasts from grade 2 and 3 patients versus controls. This list of genes is a potentially valuable resource for identifying new modulators of radiation toxicity in tissues and cells. Surprisingly, only one biological process, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC), was significantly over-represented in this gene list. ARVC is a non-genetic disease without any evidence of associated radiosensitivity. The link between ARVC and individual radiation response seems to be incidental, but it has been shown that inhibition of the Wnt pathway is a causal mechanism in ARVC (29), and it is clearly established that the Wnt pathway plays an important role in cell survival after irradiation, as previously shown in several cell types (30–32).

Transcriptome analysis identified *NFATC2* as one of the genes the most differentially expressed between cells from over-reacting patients and controls. We confirmed that *NFATC2* expression at gene and protein levels at basal state was lower in fibroblasts from patients with severe RT side-effects, and that *NFATC2* gene expression was modulated in response to irradiation. Furthermore, we highlighted the global hypermethylated state of *NFATC2* in patient fibroblasts, suggesting a role of methylation in the regulation of *NFATC2* expression. Particularly, 17 CpG sites located in the promoter-associated regions defined by the ENCODE consortium (33) were identified as hypermethylated in patient fibroblasts. These promoter-associated regions were identified by ChIP seq analysis against transcription factors in 91 different cell lines. Several transcription factors were identified by the ENCODE consortium as able to recognize the DNA region where the 17 CpG sites are located, including CTCF, E2F6, ZBTB7A, ZNF143, JUND,

MEF2A, EGR1, RUNX3 and EBF1. ChIP analysis against these transcription factors in irradiated fibroblasts and at basal state would be of interest to elucidate the regulatory mechanisms of *NFATC2* expression modulated by epigenetic mechanisms.

Moreover, the present study showed that *NFATC2* silencing using RNA interference leads to increased cellular radiosensitivity and to a defect in DNA DSB repair. To our knowledge, this was the first study linking *NFATC2* and cellular sensitivity to ionizing radiation. NFAT family members have been shown to be able to induce *GJA1* and *GADD45A* gene expressions in response to ionizing radiation (34,35) and *NFATC2* has been shown to induce *IL-5* expression in response to ionizing radiation (36). However, NFAT response to UV irradiation has been more thoroughly studied. It has been shown that NFAT positively regulates apoptosis in response to UV-radiation in keratinocytes (37) but, in contrast, inhibiting NFAT signaling promoted apoptosis in response to UV irradiation in a human embryonic fibroblast cell line (38). Moreover, inhibiting NFAT signaling has been shown to reduce keratinocyte ability to repair UV-induced DNA damages (39,40). However, these studies used chemical inhibitors of NFAT signaling, while the specific roles of each NFAT family member in response to radiation remain unknown.

NFATC2 has been shown to regulate apoptosis and cell cycle progression, two major mechanisms involved in cellular radiosensitivity. *NFATC2* controls the expression of *FASLG*, a pro-apoptotic regulator (41,42), and of *CFLAR*, *BCL2A1* and *MDM2*, known for their anti-apoptotic abilities (43–45). Moreover, *NFATC2* can also regulate *TNFA* and *NR4A1* expression, both known for their dual pro- and anti-apoptotic roles (46,47). Furthermore, *NFATC2* has been shown to regulate cell cycle progression positively by inducing expression of *CDK6* (48) or inhibiting expression of *CDK4* (49), or negatively by inducing expression of *CDKN1A* (50) or repressing expression of *CCNA2* (51) and *p15^{INK4b}* (52). *NFATC2* has also been reported in positive or negative regulation of *MYC* expression, promoting or blocking cell cycle progression (53). These dual roles of *NFATC2* in apoptosis and cell cycle control highlight the importance of its different isoforms and partners.

In a 2016 study, Gabriel et al. investigated *NFATC2* isoform C partners in a Jurkat human T-cell line (54). In addition to transcription factors, the authors pointed out new potential *NFATC2* partners, including several actors of DNA damage response: notably those involved in DNA DSB repair, such as XRCC5/Ku80 and PRKDC, and in base or nucleotide excision repair, such as RFC, LIG3 and XRCC1. They also found an interaction between *NFATC2* and PARP1, which is involved in recognition of DNA damage, and RPA, which binds to single-strand DNA

during DNA repair. Interestingly, the authors detected these associations between actors of DNA damage response and NFATC2, but not with NFATC1, which suggests a specific role for NFATC2 in the DNA damage response (54). We performed preliminary experiments to clarify the interactions between NFATC2 and a few DNA repair proteins such as XRCC1 and XRCC5 in irradiated and non-irradiated fibroblasts, but did not observe any consistent co-immunoprecipitation (data not shown). Further specific investigations will be necessary to clarify these putative interactions, using tagged versions of the NFATC2 protein.

The present study found increased cellular radiosensitivity and a defect in DNA repair in dermal fibroblasts from patients with severe side-effects of RT, and also highlighted a specific transcriptome profile. These data pave the way for cellular and molecular strategies to identify radiosensitive patients. The study also showed the involvement of NFATC2 in cellular sensitivity to ionizing radiation and in DNA repair. However, the mechanisms by which NFATC2 contributes to the cellular response to ionizing radiation remain to be clarified: a transcription factor role, or another function such as interaction with actors of the DNA damage response. To go further into these questions, the study of the NFATC2 interactome in response to ionizing radiation would be of interest. Moreover, RNA sequencing and ChIP sequencing would also be useful, to identify NFATC2 target genes in response to ionizing irradiation.

Acknowledgments

We thank Christine Oger (PRABI, University of Lyon), Pascal Soularue (CEA, LGRK, Evry) and Olivier Alibert (CEA, CNRGH, Evry) for help in the analysis of the RNAseq data. We also thank Gisèle Froment, Didier Nègre and Caroline Costa from the lentivectors production facility/SFR Biosciences Gerland - Lyon Sud (UMS3444/US8). The study was supported by a grant from La Ligue Contre le Cancer, Comité de Saône-et-Loire, and by ANR-RSNR-INDIRA.

Author contributions

JL, JD and MTM designed the study. JD, CK, YM, JR, SM, TD and FC acquired, analyzed and interpreted the data. JD, JR, FC, MTM and JL critically revised the manuscript for important intellectual content. JL and MTM obtained funding. CK, SM, MTM and JL provided the administrative, technical and material support. JL is the guarantor of this work and, as such, has full access to all of the data and the accuracy of the data analysis.

Supplementary Figures

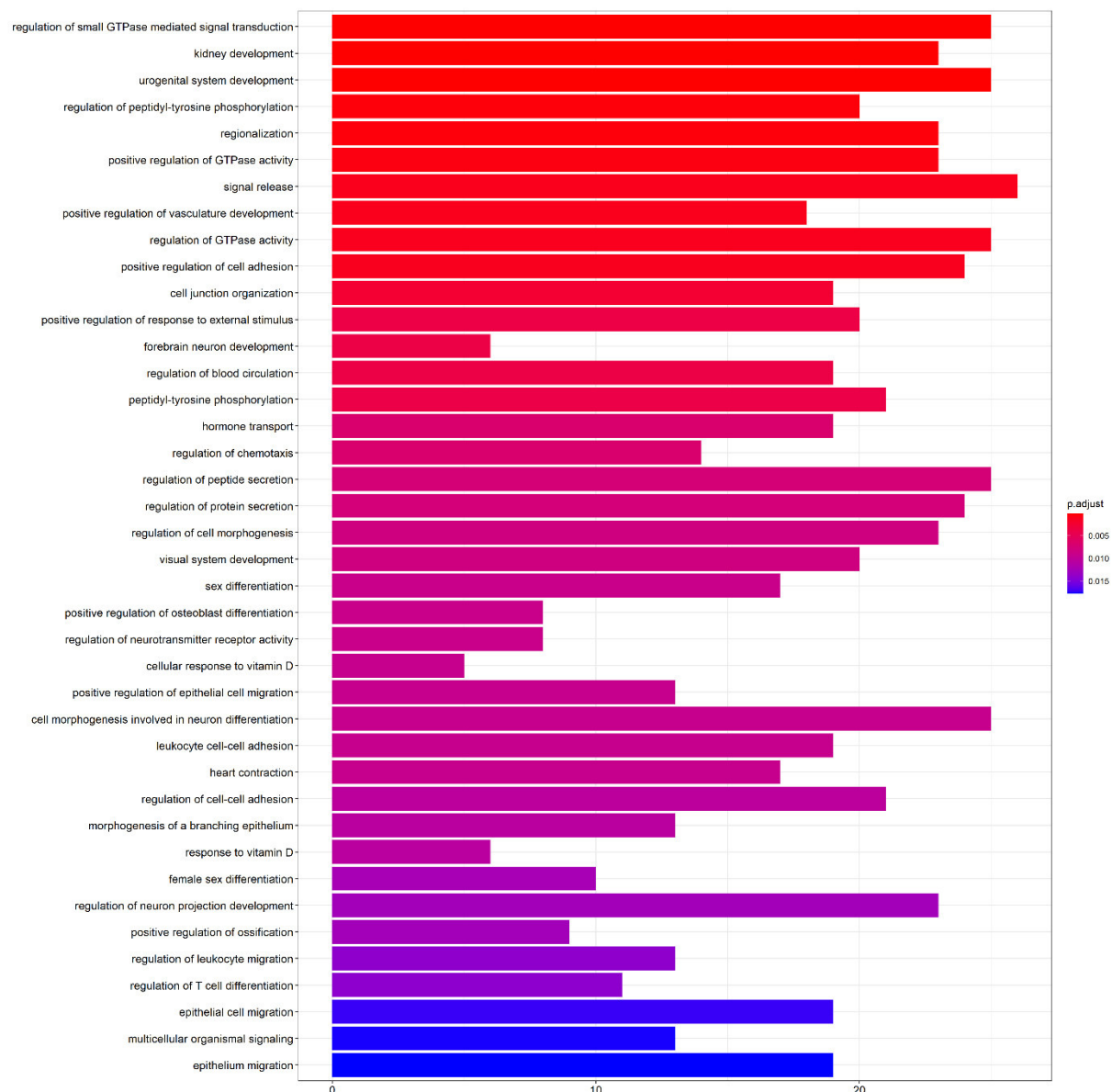


Figure S1: Barplot of the 40 most enriched GO biological processes identified with the 445 differentially expressed protein coding genes common between grade 2 vs controls and grade 3 vs controls.

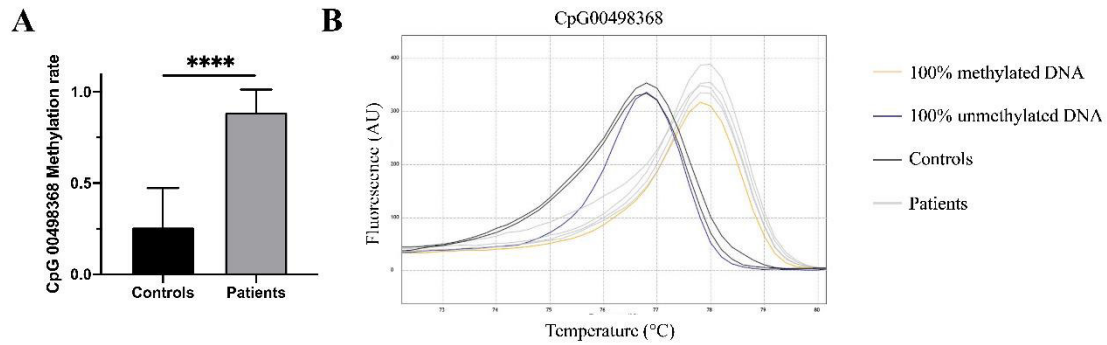


Figure S2: Hypermethylation of CpG00498368 in fibroblasts from patients who suffered severe radiotherapy side-effects. (A) Methylation rate of CpG00498368 from global methylome data (N = 8 controls and 16 patients). (B) CpG00498368 methylation state investigated by HRM PCR in 2 controls' cell strains and 4 patients' cell strains.

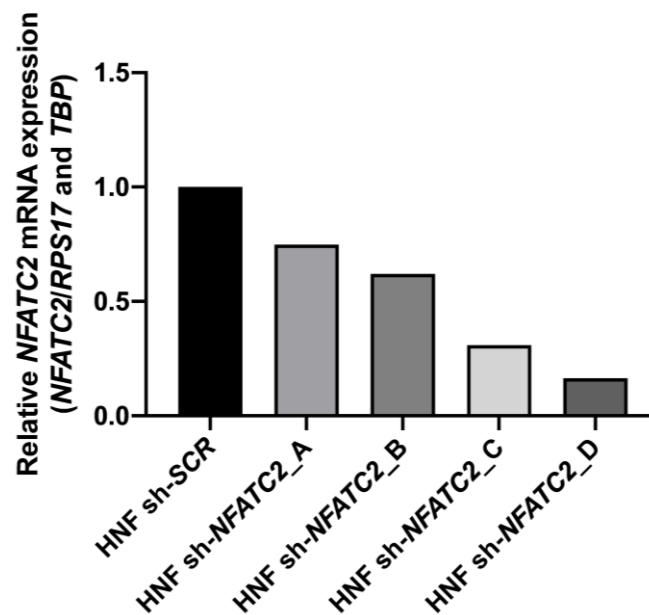


Figure S3: Effect of 4 different shRNA targeting *NFATC2* on its expression. *NFATC2* mRNA levels were measured by RTqPCR after infection of control fibroblasts with a lentiviral vector carrying either a shRNA scramble sequence or a shRNA targeting *NFATC2*. sh-*NFATC2*_D were used for next experiments.

Supplementary Tables

Table S1: List of differentially expressed genes common between grade 2 patients vs controls and grade 3 patients vs controls. (Available online).

Signaling pathway	Number of genes in the pathway	Number of differentially expressed genes	Adjusted p-value
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	72	10	0,0065733
Basal cell carcinoma	63	7	0,23347
cAMP signaling pathway	199	13	0,29533
Wnt signaling pathway	146	10	0,44634
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	83	7	0,44634

Table S2: List of over-represented signaling pathways among the 445 differentially expressed protein coding genes common between grade 2 patients vs controls and grade 3 patients vs controls.

References

1. Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nature Reviews Cancer* (2006) **6**:702–713. doi:10.1038/nrc1950
2. Schaake W, Wiegman EM, de Groot M, van der Laan HP, van der Schans CP, van den Bergh ACM, Langendijk JA. The impact of gastrointestinal and genitourinary toxicity on health related quality of life among irradiated prostate cancer patients. *Radiother Oncol* (2014) **110**:284–290. doi:10.1016/j.radonc.2013.11.011
3. Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2000) **47**:277–290. doi:10.1016/s0360-3016(00)00435-1
4. Jonathan Leventhal MD. Radiation Dermatitis: Recognition, Prevention, and Management. *Cancer Network* (2017) Available at: <https://www.cancernetwork.com/article/radiation-dermatitis-recognition-prevention-and-management> [Accessed April 1, 2020]
5. Partl R, Regitnig P, Tauber G, Pötscher M, Bjelic-Radisic V, Kapp KS. Radiation-induced morphea—a rare but severe late effect of adjuvant breast irradiation. *Strahlenther Onkol* (2018) **194**:1060–1065. doi:10.1007/s00066-018-1336-9
6. Delanian S, Martin M, Bravard A, Luccioni C, Lefaix J-L. Cu/Zn superoxide dismutase modulates phenotypic changes in cultured fibroblasts from human skin with chronic radiotherapy damage. *Radiotherapy and Oncology* (2001) **58**:325–331. doi:10.1016/S0167-8140(00)00332-7
7. Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT, Earle JD. Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from patients with a severe skin reaction to radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1980) **6**:1573–1575. doi:10.1016/0360-3016(80)90017-6
8. Woods WG, Byrne TD, Kim TH. Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity. *Cancer* (1988) **62**:2341–2345. doi:10.1002/1097-0142(19881201)62:11<2341::aid-cnrc2820621114>3.0.co;2-w
9. Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK, Little JB. In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from women with unusually sensitive clinical responses to definitive radiation therapy for breast cancer. *Radiat Res* (1990) **121**:227–231.
10. Plowman PN, Bridges BA, Arlett CF, Hinney A, Kingston JE. An instance of clinical radiation morbidity and cellular radiosensitivity, not associated with ataxia-telangiectasia. *Br J Radiol* (1990) **63**:624–628. doi:10.1259/0007-1285-63-752-624
11. Burnet NG, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH, Nyman J, Turesson I. Prediction of normal-tissue tolerance to radiotherapy from in-vitro cellular radiation sensitivity. *The Lancet* (1992) **339**:1570–1571. doi:10.1016/0140-6736(92)91833-T
12. Geara FB, Peters LJ, Ang KK, Wike JL, Brock WA. Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1993) **27**:1173–1179. doi:10.1016/0360-3016(93)90540-c
13. Russell NS, GRUMMELS A, HART AAM, SMOLDERS IJH, BORGER J, BARTELINK H, BEGG AC. Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer. *International Journal of Radiation Biology* (1998) **73**:661–670. doi:10.1080/095530098141915
14. Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J. Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* (2000) **55**:173–178. doi:10.1016/S0167-8140(00)00173-0

15. COPERNIC project investigators, Granzotto A, Benadjaoud MA, Vogin G, Devic C, Ferlazzo ML, Bodgi L, Pereira S, Sonzogni L, Forcheron F, et al. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2016) **94**:450–460. doi:10.1016/j.ijrobp.2015.11.013
16. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE).80.
17. Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* (2012) **16**:284–287. doi:10.1089/omi.2011.0118
18. Fusil F, Calattini S, Amirache F, Mancip J, Costa C, Robbins JB, Douam F, Lavillette D, Law M, Defrance T, et al. A Lentiviral Vector Allowing Physiologically Regulated Membrane-anchored and Secreted Antibody Expression Depending on B-cell Maturation Status. *Mol Ther* (2015) **23**:1734–1747. doi:10.1038/mt.2015.148
19. Millau J-F, Raffin A-L, Caillat S, Claudet C, Arras G, Ugolin N, Douki T, Ravanat J-L, Breton J, Oddos T, et al. A microarray to measure repair of damaged plasmids by cell lysates. *Lab Chip* (2008) **8**:1713–1722. doi:10.1039/b806634e
20. Mognol GP, Carneiro FRG, Robbs BK, Faget DV, Viola JPB. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis* (2016) **7**:e2199. doi:10.1038/cddis.2016.97
21. Bourton EC, Plowman PN, Smith D, Arlett CF, Parris CN. Prolonged expression of the γ -H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment. *Int J Cancer* (2011) **129**:2928–2934. doi:10.1002/ijc.25953
22. Li P, Du C, Xu W, Shi Z, Zhang Q, Li Z, Fu S. Correlation of dynamic changes in γ -H2AX expression in peripheral blood lymphocytes from head and neck cancer patients with radiation-induced oral mucositis. *Radiat Oncol* (2013) **8**:155. doi:10.1186/1748-717X-8-155
23. Olive PL, Banáth JP, Keyes M. Residual γ H2AX after irradiation of human lymphocytes and monocytes in vitro and its relation to late effects after prostate brachytherapy. *Radiotherapy and Oncology* (2008) **86**:336–346. doi:10.1016/j.radonc.2007.09.002
24. Werbroutck J, De Ruyck K, Beels L, Vral A, Van Eijkeren M, De Neve W, Thierens H. Prediction of late normal tissue complications in RT treated gynaecological cancer patients: Potential of the γ -H2AX foci assay and association with chromosomal radiosensitivity. *Oncology Reports* (2010) **23**:571–578. doi:10.3892/or_00000671
25. Vasireddy RS, Sprung CN, Cempaka NL, Chao M, McKay MJ. H2AX phosphorylation screen of cells from radiosensitive cancer patients reveals a novel DNA double-strand break repair cellular phenotype. *Br J Cancer* (2010) **102**:1511–1518. doi:10.1038/sj.bjc.6605666
26. Habash M, Bohorquez LC, Kyriakou E, Kron T, Martin OA, Blyth BJ. Clinical and Functional Assays of Radiosensitivity and Radiation-Induced Second Cancer. *Cancers (Basel)* (2017) **9**: doi:10.3390/cancers9110147
27. Ravanat J-L. Endogenous natural and radiation-induced DNA lesions: differences and similarities and possible implications for human health and radiological protection. *Radioprotection* (2018) **53**:241–248. doi:10.1051/radiopro/2018039
28. Batar B, Guven G, Eroz S, Bese NS, Guven M. Decreased DNA repair gene XRCC1 expression is associated with radiotherapy-induced acute side effects in breast cancer patients. *Gene* (2016) **582**:33–37. doi:10.1016/j.gene.2016.01.040
29. van Tintelen JP, Hofstra RM, Wiesfeld AC, van den Berg MP, Hauer RN, Jongbloed JD. Molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: emerging horizon? *Curr Opin Cardiol* (2007) **22**:185–192. doi:10.1097/HCO.0b013e3280d942c4

30. Chang HW, Roh J-L, Jeong E-J, Lee S, Kim S-W, Choi S-H, Park S-K, Kim SY. Wnt signaling controls radiosensitivity via cyclooxygenase-2-mediated Ku expression in head and neck cancer. *Int J Cancer* (2008) **122**:100–107. doi:10.1002/ijc.23069
31. Gurung A, Uddin F, Hill RP, Ferguson PC, Alman BA. β -Catenin Is a Mediator of the Response of Fibroblasts to Irradiation. *Am J Pathol* (2009) **174**:248–255. doi:10.2353/ajpath.2009.080576
32. Karimaian A, Majidinia M, Bannazadeh Baghi H, Yousefi B. The crosstalk between Wnt/ β -catenin signaling pathway with DNA damage response and oxidative stress: Implications in cancer therapy. *DNA Repair (Amst)* (2017) **51**:14–19. doi:10.1016/j.dnarep.2017.01.003
33. ENCODE consortium. An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome. *Nature* (2012) **489**:57–74. doi:10.1038/nature11247
34. Glover D, Little JB, Lavin MF, Gueven N. Low dose ionizing radiation-induced activation of connexin 43 expression. *Int J Radiat Biol* (2003) **79**:955–964. doi:10.1080/09553000310001632895
35. Daino K, Ichimura S, Neno M. Comprehensive Search for X-ray-responsive Elements and Binding Factors in the Regulatory Region of the GADD45a Gene. *J Radiat Res* (2003) **44**:311–318. doi:10.1269/jrr.44.311
36. Lu-Hesselmann J, Messer G, van Beuningen D, Kind P, Peter RU. Transcriptional regulation of the human IL5 gene by ionizing radiation in Jurkat T cells: evidence for repression by an NF-AT-like element. *Radiat Res* (1997) **148**:531–542.
37. Flockhart RJ, Diffey BL, Farr PM, Lloyd J, Reynolds NJ. NFAT regulates induction of COX-2 and apoptosis of keratinocytes in response to ultraviolet radiation exposure. *FASEB J* (2008) **22**:4218–4227. doi:10.1096/fj.08-113076
38. Mazière C, Morlière P, Louandre C, Conte M-A, Gomilla C, Santus R, Antonicelli F, Hornebeck W, Mazière J-C. Low UVA doses activate the transcription factor NFAT in human fibroblasts by a calcium-calcineurin pathway. *Free Radic Biol Med* (2005) **39**:1629–1637. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.003
39. Yarosh DB, Pena AV, Nay SL, Canning MT, Brown DA. Calcineurin inhibitors decrease DNA repair and apoptosis in human keratinocytes following ultraviolet B irradiation. *J Invest Dermatol* (2005) **125**:1020–1025. doi:10.1111/j.0022-202X.2005.23858.x
40. Canning MT, Nay SL, Peña AV, Yarosh DB. Calcineurin inhibitors reduce nuclear localization of transcription factor NFAT in UV-irradiated keratinocytes and reduce DNA repair. *J Mol Histol* (2006) **37**:285–291. doi:10.1007/s10735-006-9034-9
41. Latinis KM, Carr LL, Peterson EJ, Norian LA, Eliason SL, Koretzky GA. Regulation of CD95 (Fas) ligand expression by TCR-mediated signaling events. *The Journal of Immunology* (1997) **158**:4602–4611.
42. Holtz-Heppelmann CJ, Algeciras A, Badley AD, Paya CV. Transcriptional Regulation of the Human FasL Promoter-Enhancer Region. *J Biol Chem* (1998) **273**:4416–4423. doi:10.1074/jbc.273.8.4416
43. Ueffing N, Schuster M, Keil E, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Up-regulation of c-FLIPshort by NFAT contributes to apoptosis resistance of short-term activated T cells. *Blood* (2008) **112**:690–698. doi:10.1182/blood-2008-02-141382
44. Ullerås E, Karlberg M, Möller Westerberg C, Alfredsson J, Gerondakis S, Strasser A, Nilsson G. NFAT but not NF- κ B is critical for transcriptional induction of the prosurvival gene A1 after IgE receptor activation in mast cells. *Blood* (2008) **111**:3081–3089. doi:10.1182/blood-2006-10-053371

45. Zhang X, Zhang Z, Cheng J, Li M, Wang W, Xu W, Wang H, Zhang R. Transcription Factor NFAT1 Activates the mdm2 Oncogene Independent of p53. *J Biol Chem* (2012) **287**:30468–30476. doi:10.1074/jbc.M112.373738
46. Youn H-D, Chatila TA, Liu JO. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J* (2000) **19**:4323–4331. doi:10.1093/emboj/19.16.4323
47. Wu Q, Liu S, Ye X, Huang Z, Su W. Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. *Carcinogenesis* (2002) **23**:1583–1592. doi:10.1093/carcin/23.10.1583
48. Baumgart, Chen N, Zhang J-S, Billadeau DD, Gaisina I, Kozikowski AP, Singh S, Fink D, Ströbel P, Klindt C, et al. GSK-3 β governs inflammation-induced NFATC2 signaling hubs to promote pancreatic cancer progression. *Mol Cancer Ther* (2016) **15**:491–502. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0309
49. Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, Du J, Fosmire S, Fisher DE, DeCaprio JA, Modiano JF, Burakoff SJ. NFATC2-Mediated Repression of Cyclin-Dependent Kinase 4 Expression. *Molecular Cell* (2002) **10**:1071–1081. doi:10.1016/S1097-2765(02)00701-3
50. Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP. Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21WAF1/CIP1 expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) **98**:9575–9580. doi:10.1073/pnas.161299698
51. Carvalho LDS, Teixeira LK, Carrossini N, Caldeira ATN, Ansel KM, Rao A, Viola JPB. The NFAT1 transcription factor is a repressor of cyclin A2 gene expression. *Cell Cycle* (2007) **6**:1789–1795. doi:10.4161/cc.6.14.4473
52. Baumgart, GLESEL E, SINGH G, CHEN N-M, REUTLINGER K, ZHANG J, BILLADEAU DD, FERNANDEZ-ZAPICO ME, GRESS TM, SINGH SK, et al. Restricted Heterochromatin Formation Links NFATC2 Repressor Activity With Growth Promotion in Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* (2012) **142**:388-98.e1–7. doi:10.1053/j.gastro.2011.11.001
53. Mogno, Araujo-Souza PS de, Robbs BK, Teixeira LK, Viola JPB. Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements. *Cell Cycle* (2012) **11**:1014–1028. doi:10.4161/cc.11.5.19518
54. Gabriel CH, Gross F, Karl M, Stephanowitz H, Hennig AF, Weber M, Gryzik S, Bachmann I, Hecklau K, Wienands J, et al. Identification of Novel Nuclear Factor of Activated T Cell (NFAT)-associated Proteins in T Cells. *J Biol Chem* (2016) **291**:24172–24187. doi:10.1074/jbc.M116.739326

Voie de signalisation	Nombre de gènes dans la voie	Nombre de gènes différentiellement exprimés	p value ajustée
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	72	10	0,0054608
Basal cell carcinoma	63	7	0,20614
cAMP signaling pathway	199	13	0,24493
Wnt signaling pathway	146	10	0,39785
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	83	7	0,39785

Tableau 3 : Analyse des voies de signalisation sur-représentées parmi les 540 gènes différentiellement exprimés communs entre individus grade 2 vs contrôles et grade 3 vs contrôles.

Résultats complémentaires

1. Transcriptome et méthylome des fibroblastes dermiques de patients radiosensibles

a. Voies de signalisation

L'étude du transcriptome des fibroblastes dermiques de patientes ayant souffert d'un cancer du sein et d'effets secondaires sévères de radiothérapie (8 grade 2 et 8 grade 3 selon le CTCAE) nous a permis d'identifier 540 gènes différentiellement exprimés en commun entre Grade 2 vs Control et Grade 3 vs Control (cf. Article 1 « A transcriptome and methylome analysis identifies a molecular signature of patients suffering from severe side-effects of radiotherapy »).

A l'aide de l'outil WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit et de la base de données KEGG 2019, nous avons réalisé une analyse de ces 540 gènes pour déterminer s'ils pouvaient participer à des voies de signalisation ou des mécanismes cellulaires spécifiques. Aucune voie de signalisation directement impliquée dans la réponse aux radiations ionisantes n'a été identifiée (Tableau 3). Seule la voie de signalisation « cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit (CARVD) » a été identifiée comme sur-représentée de façon significative parmi les gènes différentiellement exprimés (Tableau 3). Cette voie comprend 72 acteurs dont 10 sont présents parmi les gènes différentiellement exprimés dans les fibroblastes de patients radiosensibles. La CARVD est une maladie non-héréditaire du muscle cardiaque due à une perte progressive des myocytes et à leur remplacement par du tissu adipeux épicardique empêchant la transmission du signal électrique entre les cellules et pouvant provoquer une arythmie et une insuffisance cardiaque et même la mort (Herren et al. 2009). Un défaut au niveau des desmosomes, qui assurent normalement la transmission du signal électrique, peut conduire à

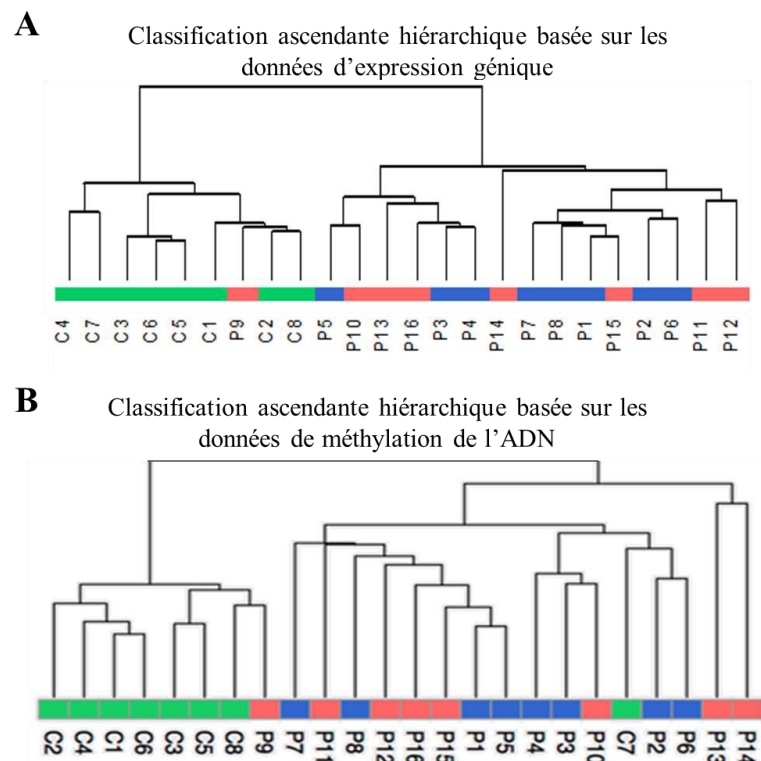


Figure 36 : Les profils transcriptomique et méthylomique différencient les patients radiosensibles des individus contrôles.

(A) Classification ascendante hiérarchique des patients radiosensibles et des individus contrôles basées sur l'expression des 250 gènes avec la plus forte variance entre les 3 groupes. Méthode de Ward. (B) Classification ascendante hiérarchique des patients radiosensibles et des individus contrôles basée sur la méthylation des 10 000 CpGs avec la plus forte variance entre les 3 groupes. Méthode de Ward. Vert = Individus contrôles. Bleu = Patients radiosensible grade 2. Rouge = Patients radiosensibles grade 3.

l'inhibition de la voie Wnt (Wingless-related integration site) et à un changement du destin cellulaire de myocyte à cellule adipocytaire (van Tintelen et al. 2007).

Selon la base de données KEGG, cette voie de signalisation est en relation avec la voie Wnt et l'interaction matrice extracellulaire – récepteur. La voie de signalisation Wnt est impliquée dans la réponse aux radiations ionisantes notamment dans la survie cellulaire en réponse à l'irradiation (Chang et al. 2008; Gurung et al. 2009; Karimaian et al. 2017). La matrice extracellulaire agit sur la radiosensibilité cellulaire (Cordes et al. 2003) mais est également une cible des radiations ionisantes (Rodemann et al. 2007; Haubner et al. 2012).

b. Profil transcriptomique et méthylomique des fibroblastes des patients radiosensibles

Dans l'article 1, nous avons montré que les analyses en composantes principales (ACP) à partir des données du transcriptome et de la méthylation de l'ADN permettaient de séparer les fibroblastes des patients radiosensibles de ceux des contrôles sans pour autant distinguer les patients grade 2 des patients grade 3 (Article 1 Figure 1 A et B). Cette délimitation au niveau de l'expression génique et de la méthylation de l'ADN entre les cellules des individus contrôles et des patients radiosensibles a également été observée par une approche de classification ascendante hiérarchique (CAH) (Figure 36 A et B). De façon semblable à l'ACP basée sur les résultats du méthylome dans l'article 1 (Article 1 Figure 1B), un échantillon d'un individu contrôle (C7) a été classé plus proche du groupe radiosensible et un échantillon d'un patient radiosensible (P9) a été détecté plus proche du groupe contrôle dans l'analyse de CAH issue des données de méthylation de l'ADN (Figure 36 B). De plus, l'échantillon du patient P9 a également été classé plus proche des individus contrôles dans l'analyse de CAH des données d'expression génique (Figure 36 A). Cela signifie qu'en prenant en compte les gènes les plus différenciellement exprimés ou les sites CpGs les plus différenciellement méthylés, ces 2

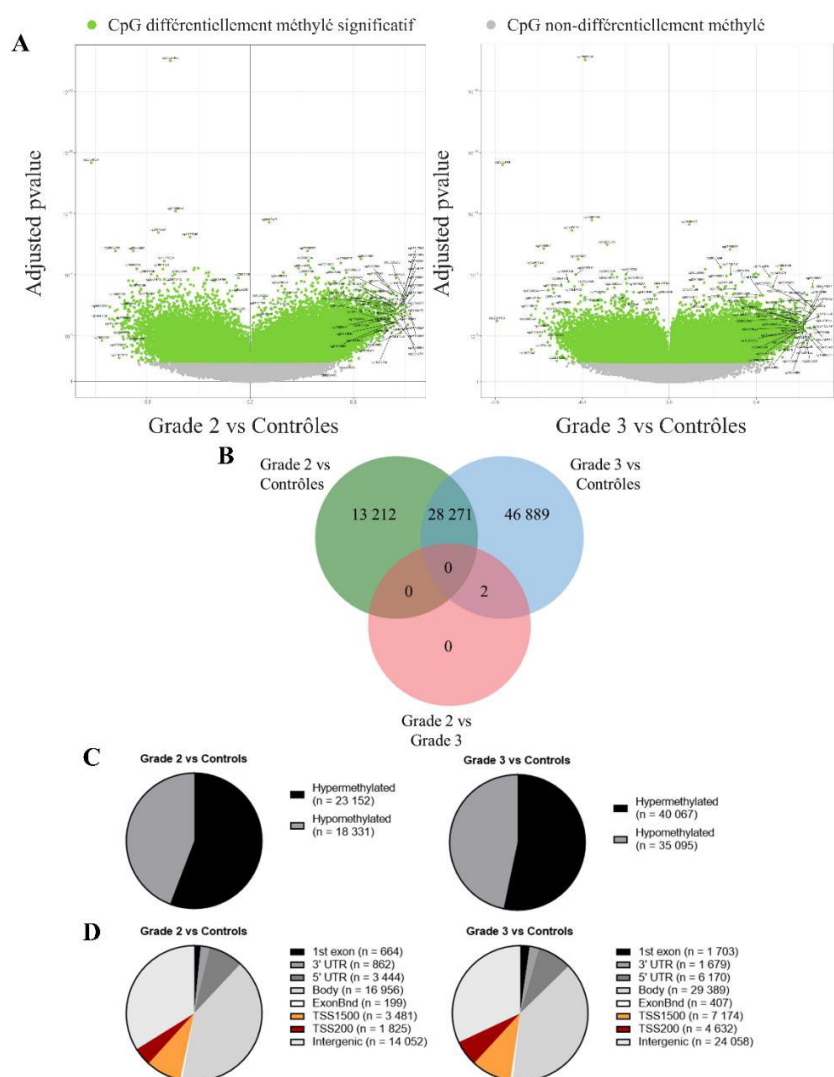


Figure 37 : Méthylation différente entre les fibroblastes des patients radiosensibles et les individus contrôles.

(A) Volcanoplots des sites CpGs différenciellement méthylés entre les cellules des patients radiosensibles grade 2 et grade 3 et des individus contrôles et diagramme de Venn (B) de ces sites CpGs. L'axe des abscisses représente la différence de méthylation entre les 2 groupes. Distribution de la méthylation différentielle (C) et de leur localisation génomique (D) dans les fibroblastes des patients radiosensibles grade 2 et grade 3 et des individus contrôles. 3' UTR : 3' Untranslated Transcribed Region. 5' UTR : 5' Untranslated Transcribed Region. ExonBnd : Exon Boundaries. TSS1500 : Transcription Start Site 1500. TSS200 : Transcription Start Site 200. N = 8 contrôles, 8 grade 2 et 8 grade 3.

individus (C7 et P9) présentent des profils intermédiaires (entre le groupe de contrôles et le groupe de patients radiosensibles).

c. Méthylome des patients radiosensibles

L'analyse de plus de 800 000 sites de méthylation de l'ADN génomique humain nous a permis d'identifier 41 483 sites CpGs (Cytosine – phosphate – Guanine) différentiellement méthylés entre les fibroblastes cutanés des patients radiosensibles grade 2 et les contrôles (Figure 37 A), 75 162 sites CpGs différentiellement méthylés entre les cellules des patients radiosensibles grade 3 et les contrôles (Figure 37 A) et seulement 2 sites CpGs différentiellement méthylés entre les cellules des patients radiosensibles grade 2 et grade 3. Parmi ces CpGs différentiellement méthylés, 28 271 sont communs entre grade 2 vs contrôles et grade 3 vs contrôles (Figure 37 B). Les 2 CpGs différentiellement méthylés entre les patients radiosensibles grade 2 et grade 3 sont également différentiellement méthylés entre les patients grade 3 et les contrôles (Figure 37 B). Un des 2 CpGs se situe dans le promoteur du gène *SYT8* (SYNaptotagmin 8) qui n'est pas exprimé à l'état basal dans les fibroblastes dermiques (données du RNA seq) mais dont il serait intéressant d'étudier l'expression en réponse à une irradiation. Le 2^{ème} CpG se situe dans le promoteur du gène *TLE4* (Transducin Like Enhancer of split 4), mais la différence de méthylation entre les cellules des patients grade 2 et grade 3 est très faible (environ 8%), ce qui n'est pas détectable par des techniques d'analyse ciblée de la méthylation d'un seul site CpG (comme la HRM PCR). Etrangement, le gène *TLE4* est sous-exprimé dans les cellules de patients grade 2 par rapport aux contrôles, mais il n'y a pas de différence d'expression pour ce gène entre les fibroblastes des patients grade 3 et les contrôles. La différence de méthylation est plutôt en faveur d'une hyper-méthylation dans les fibroblastes des patients radiosensibles (+23 152 CpGs hyper-méthylés chez les patients grade 2 et +40 067 CpGs hyper-méthylés chez les grade 3) par rapport aux individus contrôles (Figure 37 C).

		Localization	Number of cpgs	Adj. pvalue	Meanbetafc	Overlapping promoting sequence	Differentially expressed
Grade 2 vs Control	1	chr6:101844626-101848236	23	6,1048E-41	-0,40	<i>GRIK2</i>	Down
	2	chr16:1577092-1582581	26	1,7922E-37	0,26	<i>TMEM204, IFT140</i>	-
	3	chr11:1888965-1892888	25	2,0765E-31	-0,28	<i>LSP1</i>	-
	4	chr5:1049232-1054795	20	8,9658E-27	0,27	<i>SLC12A7</i>	Down
	5	chr16:86608910-86613731	19	1,6035E-26	-0,28	<i>FOXJ1</i>	Up
	6	chr20:19914995-19916159	10	1,0206E-25	0,41	<i>RIN2</i>	-
	7	chr1:34328907-34330389	9	9,6459E-23	0,16	<i>HMGB4</i>	-
	8	chr17:63534340-63535567	6	1,3674E-22	0,41	<i>AXIN2</i>	Down
	9	chr6:50060598-50061398	6	1,0935E-21	-0,40	<i>RP11-397G17.1</i>	-
	10	chr22:47069632-47070492	6	1,3172E-21	0,39	<i>GRAMD4</i>	-
	11	chr17:17480461-17481392	11	2,5678E-20	0,25	<i>RNU6-468P, PEMT</i>	-
	12	chr5:168358896-168358939	2	3,0086E-20	-0,33	<i>SLIT3</i>	-
	13	chr12:52432565-52437571	15	5,9832E-20	0,23	<i>NR4A1</i>	-
	14	chr5:955332-959141	14	2,7210E-19	0,34		
	15	chr16:85607562-85609071	10	3,9704E-19	0,32		
	16	chr8:101348359-101349699	11	4,5641E-19	-0,27	<i>RNF19A, KB-1991G8.1</i>	-
	17	chr4:7281755-7283551	8	7,4806E-19	0,33	<i>SORCS2</i>	Up
	18	chr10:126330161-126332072	11	1,3393E-18	0,30	<i>FAM53B</i>	-
	19	chr5:17708304-17708607	4	1,8246E-18	0,50		
	20	chr19:45259535-45262055	11	3,9783E-18	0,30	<i>BCL3</i>	-
Grade 3 vs Control	1	chr16:1577092-1582581	26	7,3441E-44	0,25	<i>TMEM204, IFT140</i>	-
	2	chr17:46666926-46675072	40	3,0996E-43	0,38	<i>HOXB5, HOXB-AS3, HOXB3, HOXB6</i>	-, Down, -, -
	3	chr6:101845219-101848236	22	1,1304E-37	-0,38	<i>GRIK2</i>	Down
	4	chr17:46625332-46634546	29	1,2491E-35	0,39	<i>HOXB2, HOXB-AS2, HOXB-AS3, HOXB3, HOXB-AS1</i>	-, -, Down, -, -
	5	chr17:46650310-46660940	63	2,2547E-32	0,25	<i>HOXB3, HOXB4, MIR10A</i>	-
	6	chr5:1049232-1054795	20	1,3019E-27	0,24	<i>SLC12A7</i>	-
	7	chr12:52432565-52437571	15	5,9573E-23	0,22	<i>NR4A1</i>	-
	8	chr20:19914995-19916159	10	7,8524E-23	0,37	<i>RIN2</i>	-
	9	chr7:157474409-157482215	19	1,6875E-22	-0,14	<i>PTPRN2</i>	-
	10	chr16:86609136-86613731	18	8,6099E-22	-0,25	<i>FOXJ1</i>	Up
	11	chr11:1889178-1892888	24	8,7818E-21	-0,24	<i>LSP1</i>	-
	12	chr17:63534340-63535567	6	1,3878E-20	0,39	<i>AXIN2</i>	Down
	13	chr1:34328907-34330389	9	2,6210E-20	0,16	<i>HMGB4</i>	-
	14	chr7:4761793-4763655	11	7,6321E-20	0,30	<i>FOKK1</i>	-
	15	chr5:92904875-92911154	19	8,1112E-20	0,20	<i>NR2F1-AS1</i>	-
	16	chr16:85607562-85609071	10	1,1186E-19	0,32		
	17	chr5:168358896-168358939	2	3,6152E-19	-0,32	<i>SLIT3</i>	-
	18	chr17:17480461-17481392	11	3,7387E-18	0,23	<i>RNU6-468P, PEMT</i>	-
	19	chr17:200717-203392	15	1,1263E-17	0,12	<i>RPH3AL, RP11-1260E13.3, RP11-1260E13.2</i>	-
	20	chr2:223164459-223170370	32	2,5105E-17	-0,37	<i>PAX3, CCDC140</i>	-

Tableau 4 : Liste des 20 régions les plus différenciellement méthylées entre les fibroblastes des patients radiosensibles et des contrôles.

Meanbetafc : Différence de méthylation entre les 2 groupes. Si la meanbetafc est positive, alors la région est hyper-méthylée dans les cellules des patients radiosensibles et inversement si ce score est négatif. Down : Gène identifié comme sous-exprimé dans les cellules des patients radiosensibles par rapport aux contrôles dans les données de RNA seq. Up : Gène identifié comme surexprimé dans les cellules des patients radiosensibles par rapport aux contrôles dans les données de RNA seq. - : Gène non identifié comme différenciellement exprimé.

De plus, la majorité des CpGs différentiellement méthylés se situent dans les régions non-promotrices des gènes (1st Exon, 3'UTR, 5'UTR, Body, ExonBnd, Intergenic) (Figure 37 D).

Grâce à l'analyse du méthylome, nous avons identifié 6441 régions différentiellement méthylées (RDM) entre les fibroblastes des patients radiosensibles grade 2 et les contrôles, et 10 032 RDM entre les fibroblastes des patients radiosensibles grade 3 et les contrôles. Le tableau 4 listent les 20 RDM les plus significatifs entre les cellules des patients grade 2 et des contrôles et les cellules des patients grade 3 et des contrôles.

Dans le top 20 des RDM entre les patients grade 2 et les contrôles, cinq se situent dans des régions promotrices de gènes dont *GRIK2*, *SLC12A7*, *FOXLI*, *AXIN2* et *SORCS2* qui ont également été identifiés comme différentiellement exprimés entre ces 2 groupes par l'analyse RNA seq (Tableau 4). Etrangement, *GRIK2* possède un promoteur hypo-méthylé alors qu'il est sous-exprimé dans les fibroblastes des patients radiosensibles grade 2 par rapport aux contrôles (Figure 38 A et C). En revanche, les 4 autres gènes présentent le schéma classique hyper-méthylation de la région promotrice avec sous-expression du gène, ou inversement (Tableau 4).

Parmi le top 20 des RDM entre les patients grade 3 et les contrôles, cinq se situent dans des régions promotrices de 4 gènes, *GRIK2*, *HOXB-AS3*, *FOXLI* et *AXIN2* (Tableau 4). De façon similaire, *GRIK2* possède une région hypo-méthylée dans son promoteur dans les cellules des patients grade 3 alors qu'il est sous-exprimé par rapport aux contrôles (Figure 38 B et C). En revanche, les autres gènes présentent une région hypo-méthylée dans leur promoteur et sont surexprimés dans les fibroblastes des patients radiosensibles grade 3 ou inversement (Tableau 4).

Le gène *GRIK2* code pour une sous-unité d'un récepteur au glutamate et a été principalement

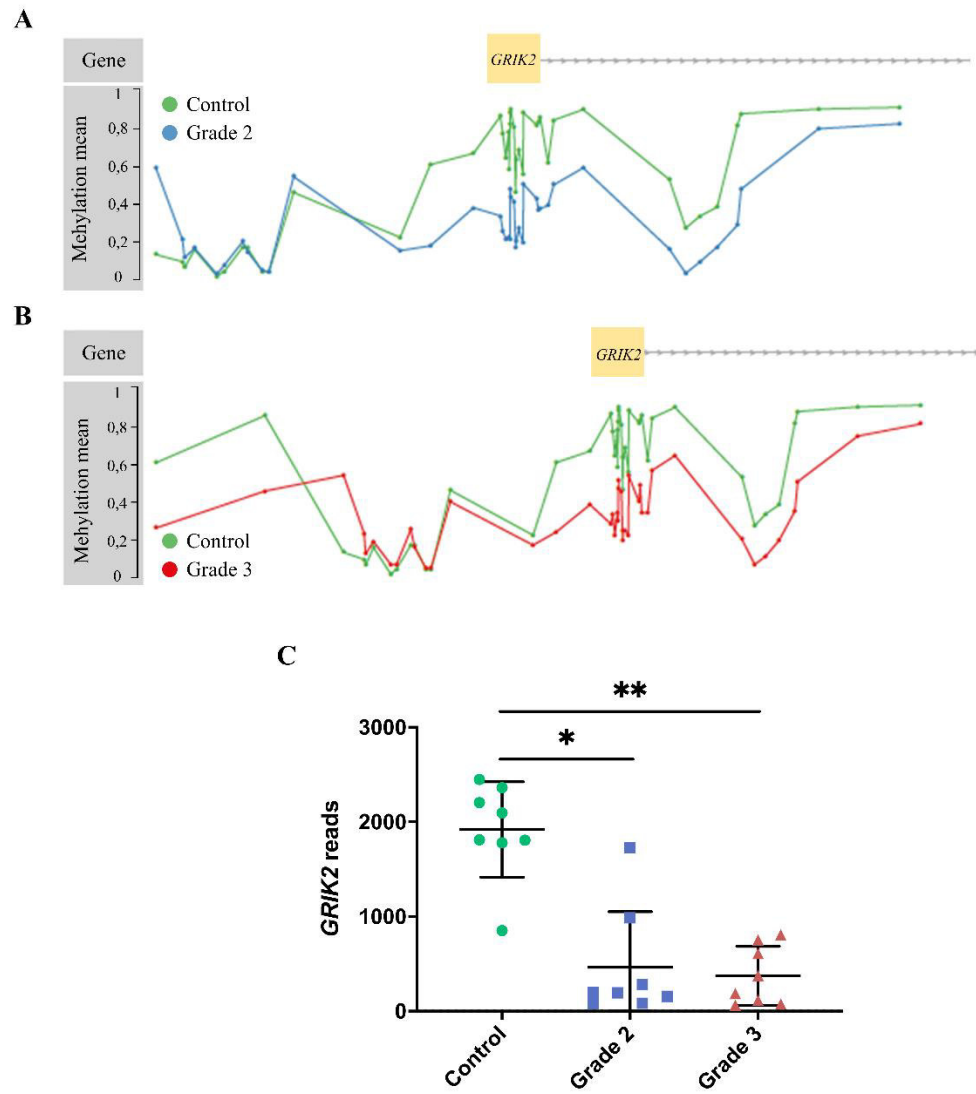


Figure 38 : Méthylation et expression du gène *GRIK2*.

Le promoteur du gène *GRIK2* est hypo-méthylé dans les fibroblastes des patients grade 2 (A) et grade 3 (B) alors que son expression est moins forte chez les patients (C).

étudié dans les neurones. Plus récemment, il a été décrit comme pouvant réguler l'activation d'Akt dans des cellules cancéreuses ovarienne (Zhawar et al. 2019). Ainsi, il serait intéressant de vérifier la sous-expression de *GRIK2* par RT-qPCR dans les fibroblastes des patients radiosensibles, à l'état basal et en réponse à l'irradiation, et d'étudier l'état d'activation d'Akt qui participe à la voie PI3K/Akt, une voie majeure de la survie cellulaire en réponse à l'irradiation.

d. Méthylation des 5 gènes signature

Nous avons identifié, par une approche de machine learning, une signature de 5 gènes dont l'expression permet de discriminer les fibroblastes dermiques des patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie par rapport aux fibroblastes contrôles (Article 1).

Parmi ces 5 gènes, *NFATC2* présente 18 sites CpGs hyper-méthylés dans les fibroblastes des patients radiosensibles par rapport aux contrôles se situant dans des régions identifiées comme associées au promoteur par le consortium ENCODE (ENCODE consortium 2012) (voir Article 2). Dans les cellules des patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie, le gène *LINC01615* possède 4 CpGs hyper-méthylés dans la séquence du 1^{er} intron et est sous-exprimé chez les patients (Figure 39). Le gène *ADAMTSL1* est hypo-méthylé au niveau de son promoteur dans les fibroblastes des patients radiosensibles, ce qui est cohérent avec sa surexpression chez les patients (Figure 40). Le gène *TNFRSF19*, dont l'expression est réduite chez les patients, est hyper-méthylé dans son promoteur dans les cellules des patients et possède 6 CpGs hyper-méthylés dans son 1^{er} intron, dont un est situé dans une région associée au promoteur (Figure 41). Etrangement, le promoteur du gène *PLCE1* n'est pas différentiellement méthylé dans les fibroblastes des patients et présente 38 CpGs hyper-méthylés et seulement 2 hypo-méthylés alors que le gène est surexprimé (Figure 42).

Pour étudier si les CpGs identifiés comme différentiellement méthylés peuvent participer à la régulation du gène par interaction avec des facteurs de transcription, alors qu'ils

n'appartiennent pas à des régions régulatrices connues, il serait intéressant de synthétiser des oligonucléotides biotinylés correspondant à la séquence contenant le CpG, d'incuber ces oligonucléotides avec un extrait protéique des fibroblastes dermiques, de purifier les oligonucléotides avec les protéines qui ont pu reconnaître les séquences d'ADN et enfin d'identifier ces protéines par spectrométrie de masse (Hubner et al. 2015). On pourrait également envisager de cloner la région contenant le CpG et d'étudier son pouvoir régulateur dans un système de gène rapporteur luciférase en transfection transitoire dans des fibroblastes irradiés.

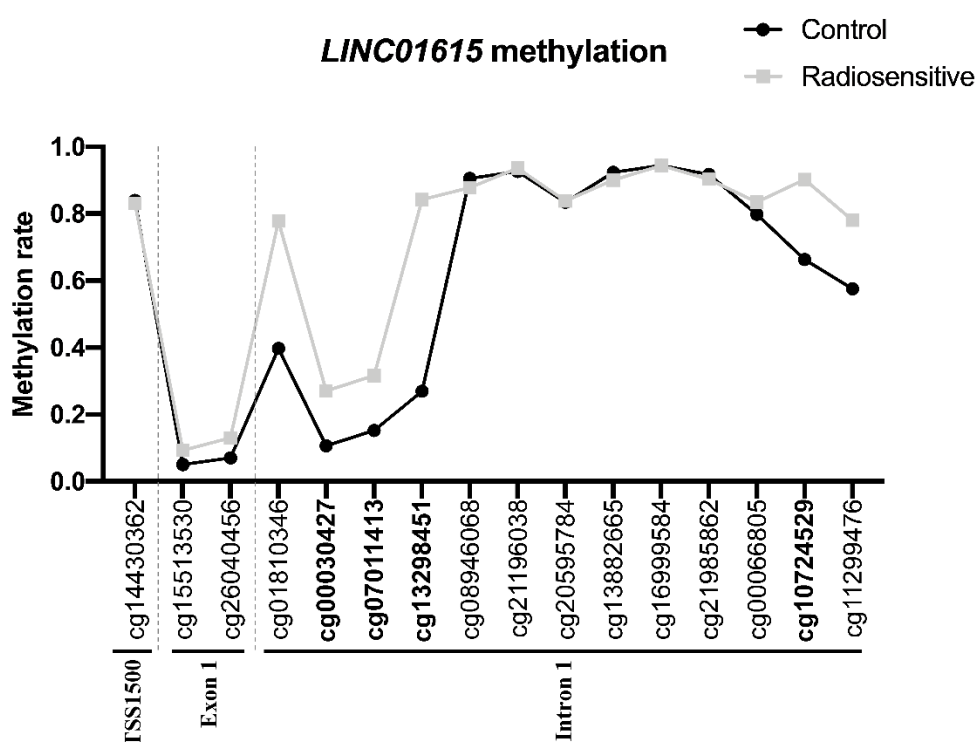


Figure 39 : Méthylation du gène *LINC01615*.

Les sites CpGs écrits en gras sont différentiellement méthylés entre les fibroblastes des patients radiosensibles et les contrôles.

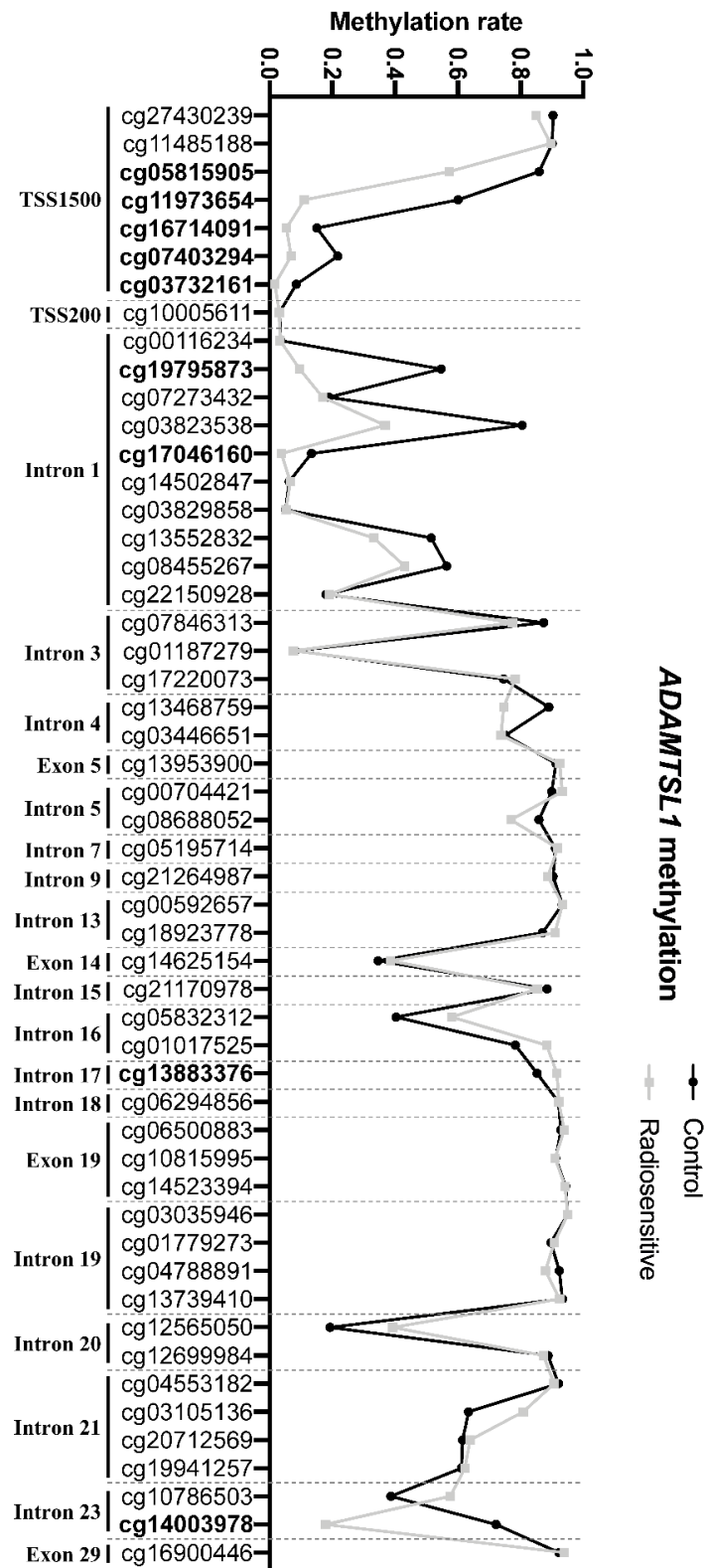


Figure 40 : Méthylation du gène *ADAMTSL1*.

Les sites CpGs écrits en gras sont différentiellement méthylés entre les fibroblastes des patients radiosensibles et les contrôles.

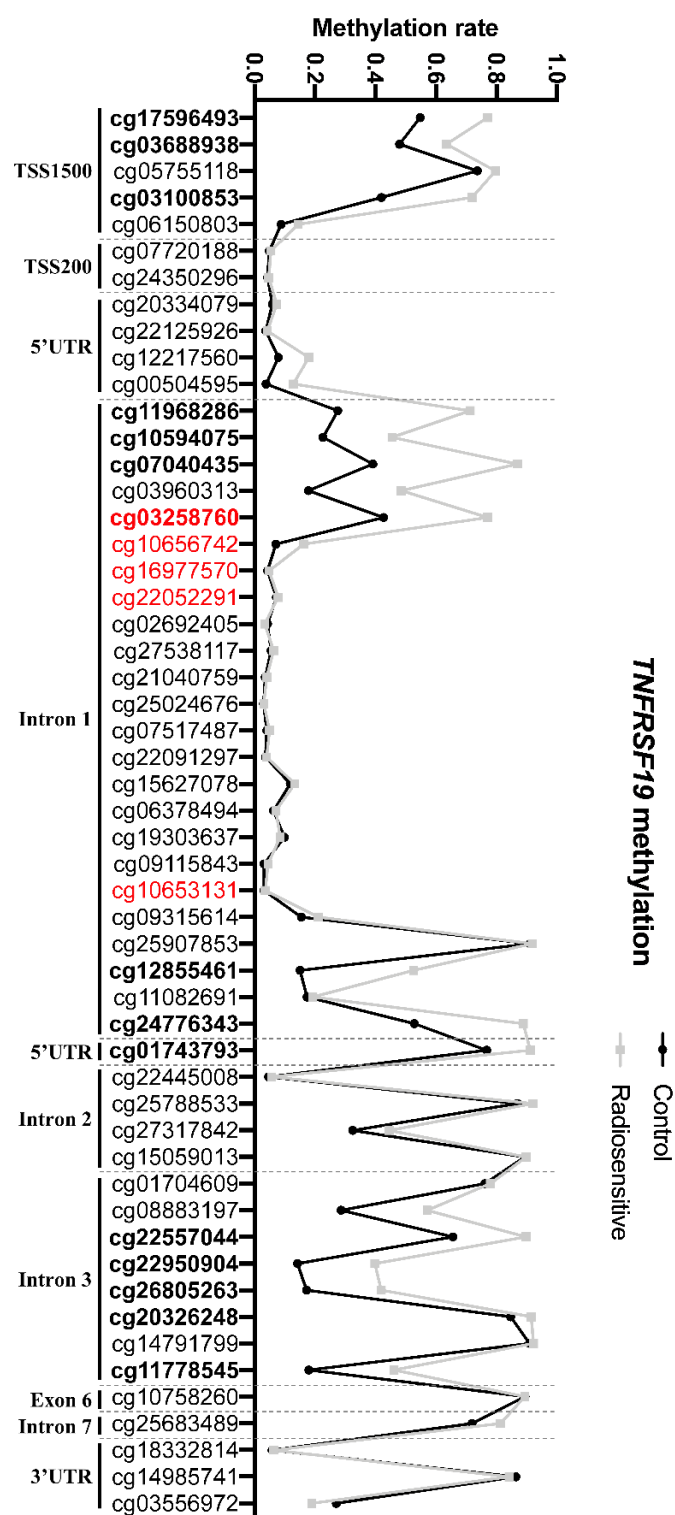


Figure 41 : Méthylation des gènes *TNFRSF19*.

Les sites CpGs écrits en gras sont différentiellement méthylés entre les fibroblastes des patients radiosensibles et les contrôles et les CpGs écrits en rouge appartiennent à une région associée au promoteur selon le consortium ENCODE.

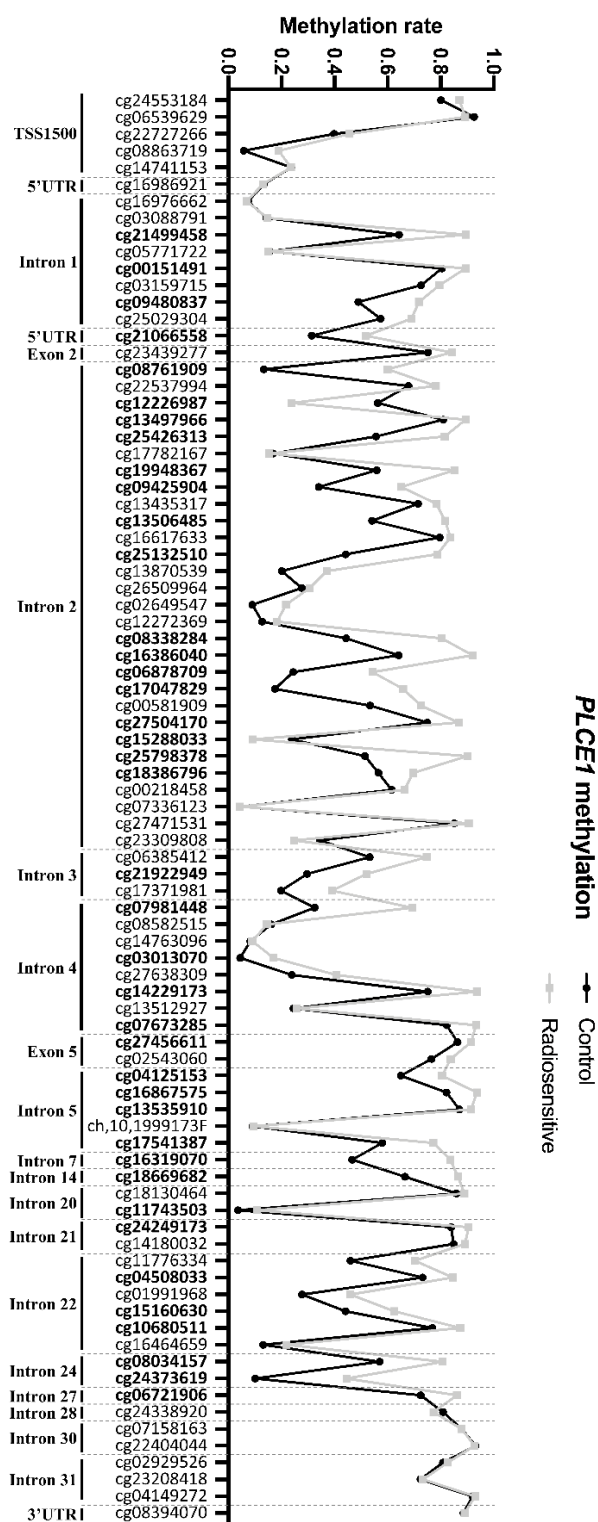


Figure 42 : Méthylation du gène *PLCE1*.

Les sites CpGs écrits en gras sont différentiellement méthylés entre les fibroblastes des patients radiosensibles.

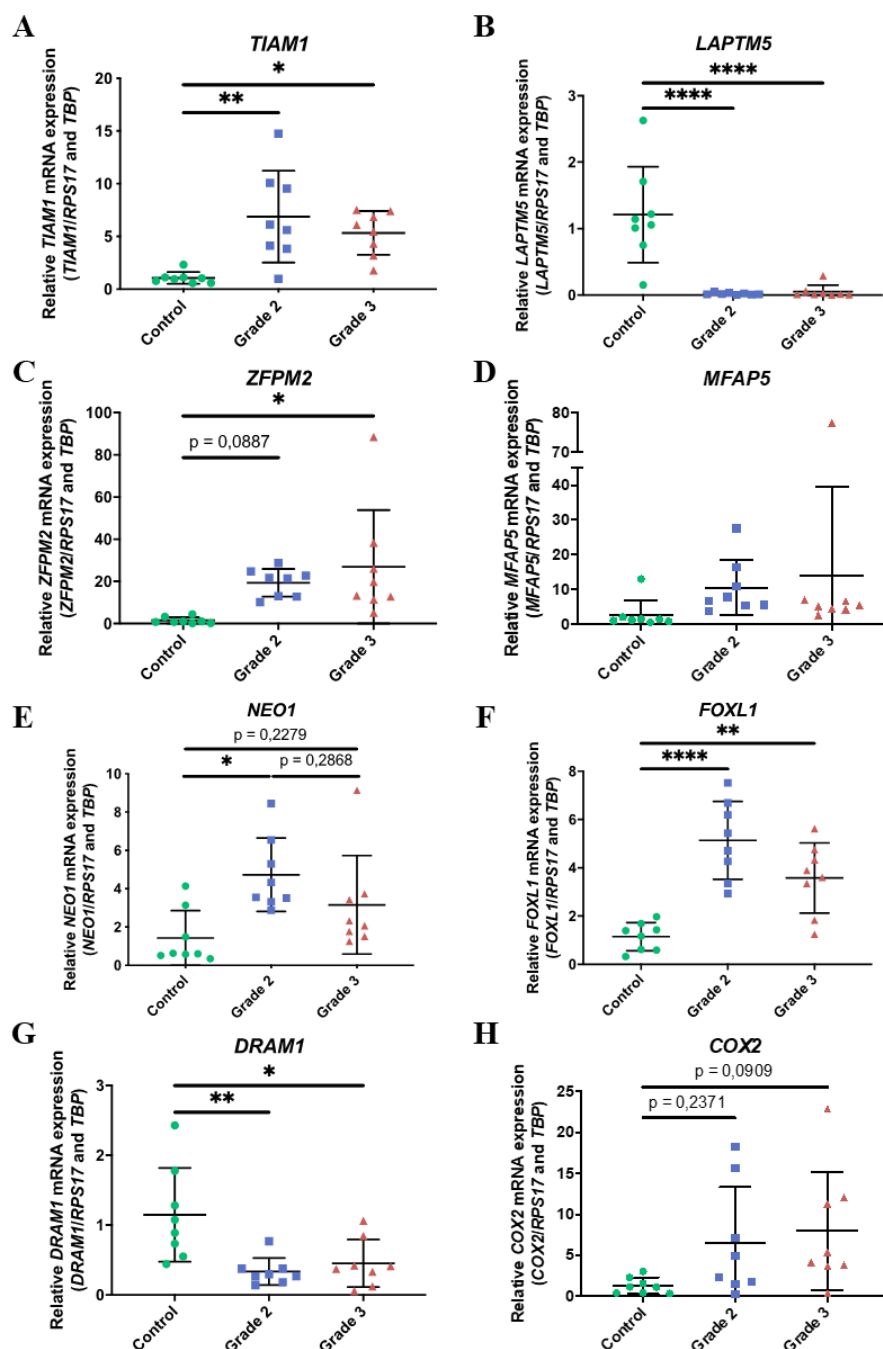


Figure 43 : Analyse d'expression des gènes identifiés comme différentiellement exprimés chez les patients d'après le RNA seq.

Les niveaux d'expression de *TIAM1* (A), *LAPT5* (B), *ZFPM2* (C), *MFAP5* (D), *NEO1* (E), *FOXL1* (F), *DRAM1* (G) et *COX2* (H) ont été déterminés par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SD. ANOVA. N = 8 contrôles, 8 grade 2 et 8 grade 3. Significatif à * P < 0,05, ** P < 0,01, **** P < 0,0001.

Ces résultats suggèrent que la méthylation de l'ADN pourrait jouer un rôle dans la mise en place d'un profil d'expression génique lié à un risque élevé de développer des effets secondaires sévères de radiothérapie.

e. Etude de l'expression de gènes dans les fibroblastes de patients radiosensibles

Le séquençage ARN nous a permis d'identifier 540 gènes différentiellement exprimés dans les cellules des patients radiosensibles par rapport aux cellules contrôles. Nous avons vérifié par RT-qPCR l'expression de certains d'entre eux. Nous avons ainsi pu confirmer la surexpression dans les fibroblastes de patients radiosensibles de *TIAM1* (Figure 43 A), *ZFPM2* (Figure 43 C), *FOXLI* (Figure 43 F) et la sous-expression de *LPTM5* (Figure 43 B) et *DRAM1* (Figure 43 G). Pour *NEO1*, nous avons pu confirmer sa surexpression dans les cellules des patients radiosensibles de grade 2 seulement (Figure 43 E). En revanche, nous avons détecté une surexpression de *MFAP5* (Figure 43 D) et *COX2* (Figure 43 H) par RT-qPCR, comme dans le séquençage ARN, mais la différence n'était pas significative due à un fort taux de variabilité interindividuelle.

Nous nous sommes également intéressés à leur profil d'expression en réponse à l'irradiation. Pour cela nous avons cultivé les fibroblastes de patients et des contrôles jusqu'à confluence, puis nous les avons irradiées avec 2 Gy de rayons X et nous avons extraits les ARN totaux 1h, 3h, 6h, 24h, 48h et 72h post-irradiation. Ainsi, nous n'avons pas détecté de changement dans l'expression de *TIAM1* (Figure 44 A), *LPTM5* (Figure 44 B), *ZFPM2* (Figure 44 C), *MFAP5* (Figure 44 D) et *NEO1* (Figure 44 E) après l'irradiation. En revanche, nous avons détecté une surexpression de *FOXLI* (Figure 44 F), *DRAM1* (Figure 44 G) et *COX2* (Figure 44 H) en réponse à l'irradiation avec respectivement un pic à 3h, 72h et 3h post-irradiation suggérant que ces gènes pourraient participer à la réponse à l'irradiation.

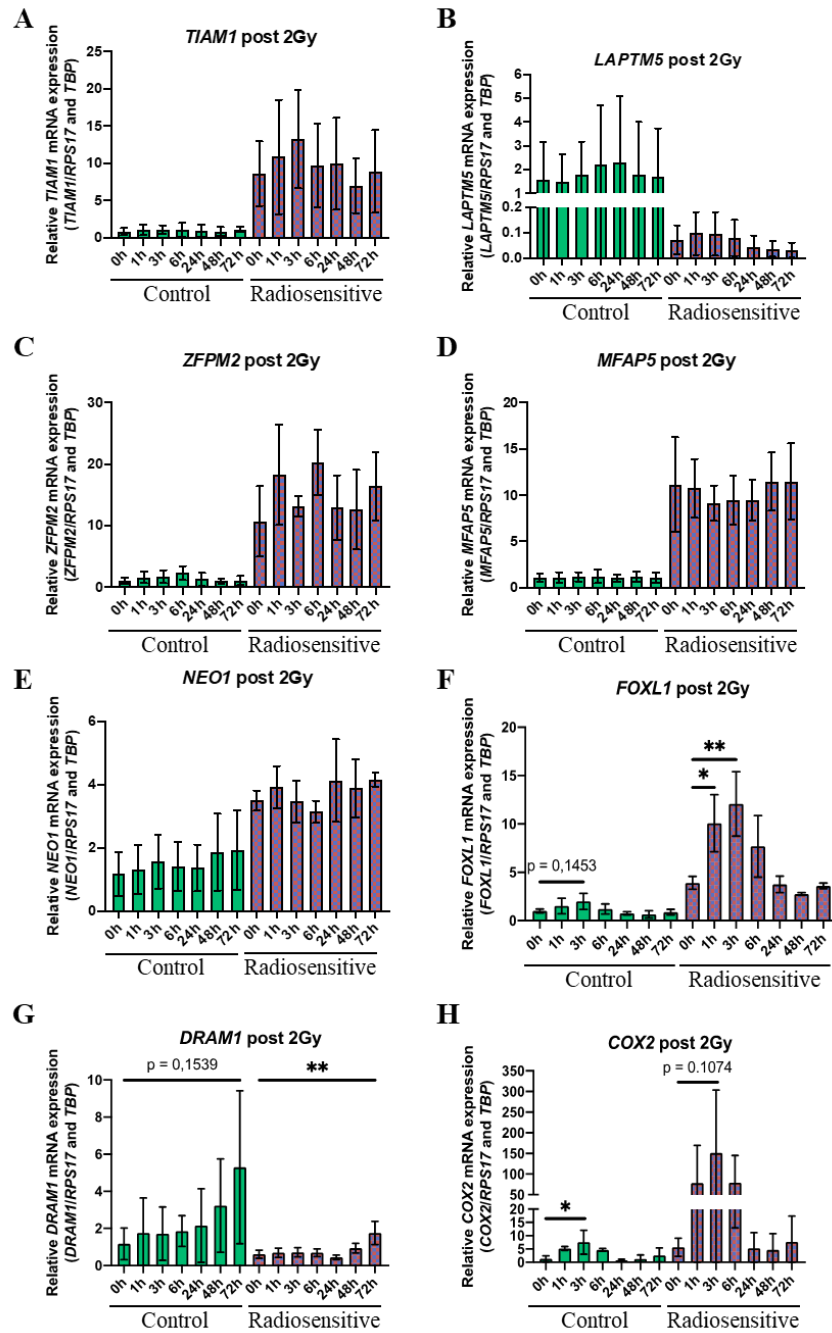


Figure 44 : Expression après irradiation des gènes différenciellement exprimés entre les contrôles et les patients radiosensibles.

Les niveaux d'expression de *TIAM1* (A), *LAPTM5* (B), *ZFPM2* (C), *MFAP5* (D), *NEO1* (E), *FOXL1* (F), *DRAM1* (G) et *COX2* (H) ont été déterminés par RT-qPCR aux temps indiqués après une irradiation de 2 Gy de rayons X. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD. N = 3 contrôles et 3 radiosensibles. ANOVA. Significatif à * P < 0,05, ** P < 0,01.

Nous avons également étudié l'expression en réponse à l'irradiation des 5 gènes signatures permettant d'identifier les patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie (Article 1). Nous avons pu observer une surexpression de *NFATC2* en réponse à l'irradiation avec 2 Gy de rayons X avec un pic 3h post-irradiation (Article 2 Figure 4 E). De plus, nous avons détecté une diminution de l'expression de *TNFRSF19* 6h après l'irradiation suivi d'un retour à l'expression basale (Figure 45 A) et une diminution de l'expression de *LINC01615* de 1h à 6h après l'irradiation, suivi d'un pic à 24h et d'un retour à l'expression basale 48h après l'irradiation (Figure 45 B). En revanche, aucune modification de l'expression de *PLCE1* et *ADAMTSL1* n'a été détectée en réponse à l'irradiation (Figure 45 C et D).

Ces résultats confirment que les gènes identifiés par l'approche RNA seq sont bien différentiellement exprimés dans les fibroblastes dermiques de patients radiosensibles à l'état basal, mais ne permettent pas discriminer pour autant les patients grade 2 des patients grade 3. De plus, certains d'entre eux (*NFATC2*, *TNFRSF19*, *LINC01615*, *FOXLI*, *DRAM1* et *COX2*) répondent transcriptionnellement aux radiations ionisantes, ce qui suggère une implication dans les voies cellulaires de réponse au stress.

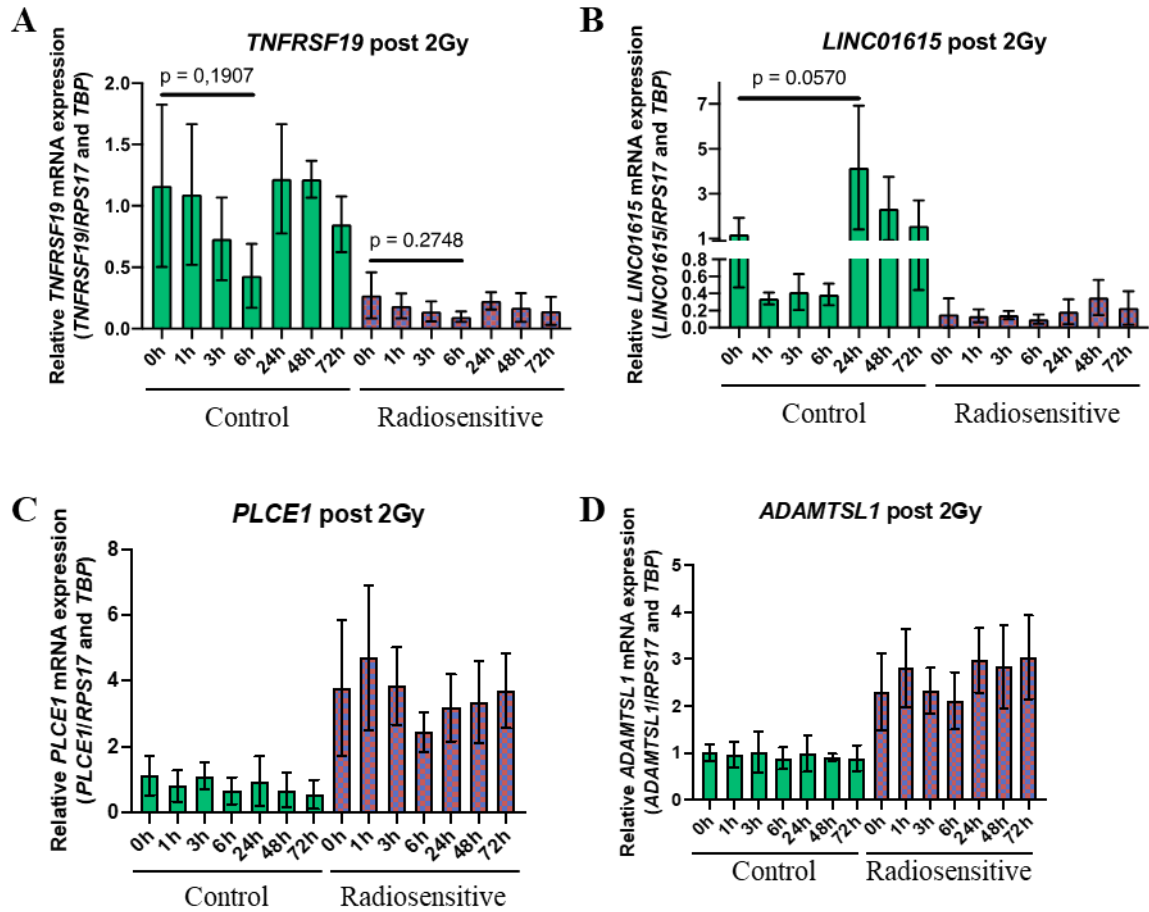


Figure 45 : Expression après irradiation des gènes de la signature des patients radiosensibles.

Les niveaux d'expression de *TNFRSF19* (A), *LINC01615* (B), *PLCE1* (C) et *ADAMTSL1* (D) ont été déterminés par RT-qPCR aux temps indiqués après une irradiation de 2 Gy de rayons X. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD. ANOVA. N = 3 contrôles et 3 radiosensibles.

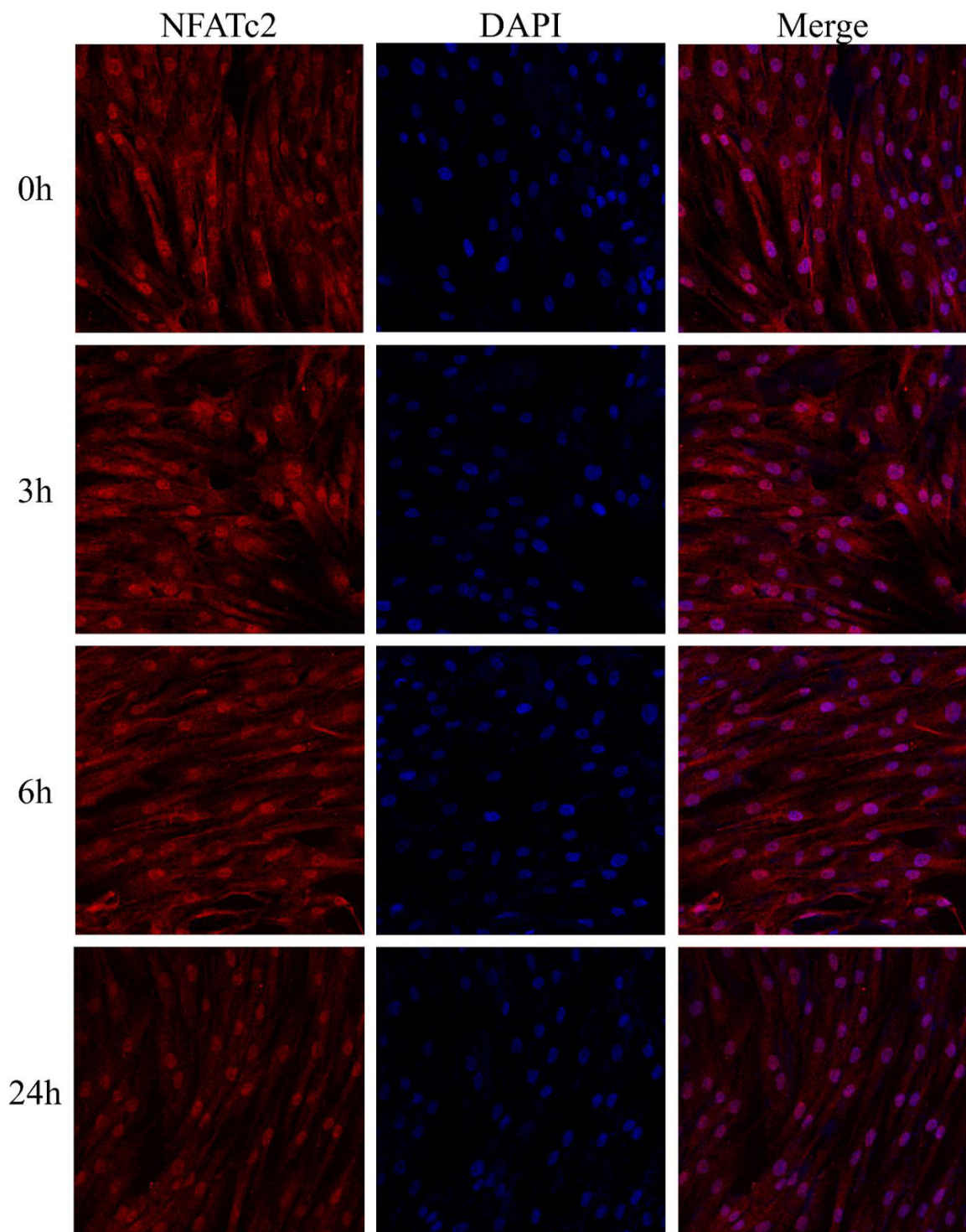


Figure 46 : Localisation de NFATC2 dans des fibroblastes dermiques.

Les cellules ont été irradiées à confluence avec 2 Gy de rayons X puis fixées 3h, 6h et 24h post-irradiation. NFATC2 est immunomarké par la fluorescence rouge et les noyaux sont colorés au DAPI et apparaissent en bleu. Images obtenues à l'aide d'un microscope Confocal spectral Leica SP5.

2. NFATC2 et radiation ionisante

a. Localisation de NFATC2

Comme décrit dans l'introduction bibliographique, NFATC2 est sous forme inactive dans le cytoplasme, alors qu'activé, il est transloqué dans le noyau. Ainsi, nous avons voulu étudier la localisation basale de NFATC2 dans les fibroblastes cutanés en culture et si une irradiation pouvait agir sur cette localisation et donc sur l'activité de la protéine. A l'état basal, le marquage de NFATC2 est cytoplasmique et nucléaire et reste le même 3h, 6h et 24h après une irradiation avec 2 Gy de rayons X (Figure 46). Ce résultat est concordant avec les travaux d'Al-Daraji et al., qui ont montré que dans des fibroblastes dermiques, NFATC2 est cytoplasmique et nucléaire même sous l'action de cyclosporine A, une drogue qui inhibe la calcineurine et donc peut empêcher le transfert de NFATC2 dans le noyau, ou sous l'action de TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) et d'ionomycine qui sont 2 chélateurs de calcium qui peuvent induire le transfert de NFATC2 dans le noyau (Al-Daraji et al. 2002). Au contraire, Senavirathna et al. ont observé une localisation de NFATC2 dans le cytoplasme de fibroblastes pulmonaires et ont montré qu'un traitement à l'ionomycine pouvait induire sa translocation dans le noyau (Senavirathna et al. 2018). Ces derniers résultats ont été obtenus à partir de fibroblastes pulmonaires mais également en présence de 2% de sérum dans le milieu de culture alors que nous utilisons 10% de sérum, comme Al-Daraji et al.. Or, le sérum contient une forte concentration de calcium qui pourrait agir sur le contrôle de l'activité de NFATC2. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la localisation de NFATC2 dans des fibroblastes dermiques cultivés avec 2% de sérum et l'effet de radiations ionisantes sur sa localisation.

b. NFATC2 et réparation de l'ADN

Nous avons montré dans le deuxième article (Voir Article 2) que la sous-expression de NFATC2 augmentait la radiosensibilité cellulaire et entraînait un défaut de réparation des cassures doubles brins de l'ADN.

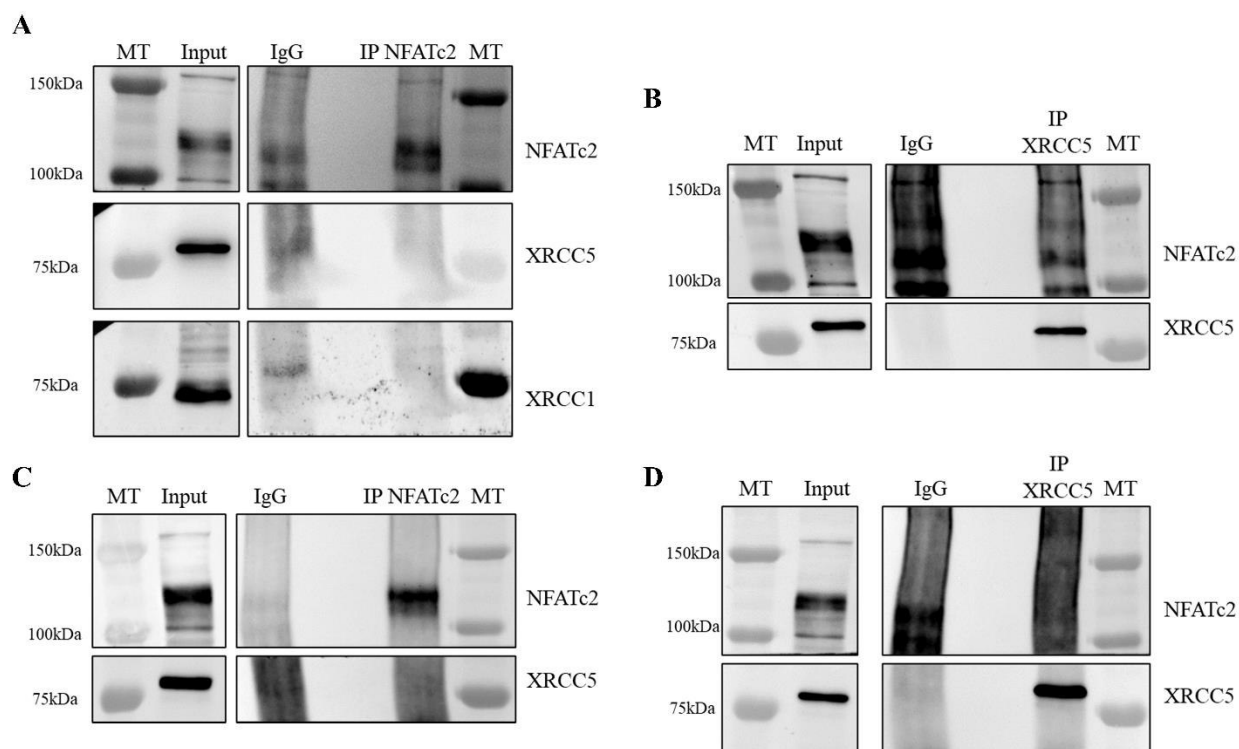


Figure 47 : Immunoprécipitation de NFATC2 et XRCC5.

Immunoprécipitation de NFATC2 sans irradiation (A) et 3h post-2 Gy de rayons X (C).

Immunoprécipitation de XRCC5 sans irradiation (C) et 3h post-2 Gy de rayon X (D). MT :

Marqueur de taille.

Les mécanismes reliant NFATC2 à la réparation de l'ADN sont encore inconnus. Il a été montré par 2 études que l'inhibition de la calcineurine par un traitement à la cyclosporine A empêchait la réparation de dimères de pyrimidines induits par des rayons UV (Yarosh et al. 2005; Canning et al. 2006). Mais l'inhibition de la calcineurine n'agit pas seulement sur NFATC2 ou même sur les NFATs mais également sur d'autres voies de signalisation (H. Li et al. 2011).

Gabriel et al. se sont intéressés aux partenaires de NFATC2 et ont montré qu'une isoforme de NFATC2 (NFATC2-C) interagissait avec plusieurs protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN dans une lignée cellulaire de lymphocytes immortalisés, notamment XRCC1, XRCC5 et d'autres acteurs de la réparation de l'ADN comme LIG3, PRKDC ou encore PARP1 (Gabriel et al. 2016). Ainsi, nous avons étudié si NFATC2 pouvait interagir avec XRCC1, qui participe à la réparation par excision de base, et XRCC5 (autre nom de Ku80) qui participe à la réparation des cassures double brin de l'ADN par jonction d'extrémités non homologues. Nous avons immunoprécipité NFATC2 puis interrogé la présence de XRCC1 et XRCC5 par western-blot, mais également l'inverse, immunoprécipité XRCC5 et interrogé la présence de NFATC2 par western-blot dans des fibroblastes dermiques à confluence à l'état basal ou 3h après une irradiation de 2 Gy de rayons X. Nous n'avons pas détecté de co-immunoprécipitation de NFATC2 et XRCC1 ou XRCC5 dans nos conditions expérimentales (Figure 47).

Ce résultat peut s'expliquer de 3 façons : NFATC2, XRCC1 et XRCC5 n'interagissent pas ensemble, ou ces protéines peuvent interagir mais pas dans les conditions de culture que nous avons utilisées, ou le tampon de lyse des cellules utilisé n'est pas optimal. De plus amples études seront nécessaires pour approfondir ce résultat.

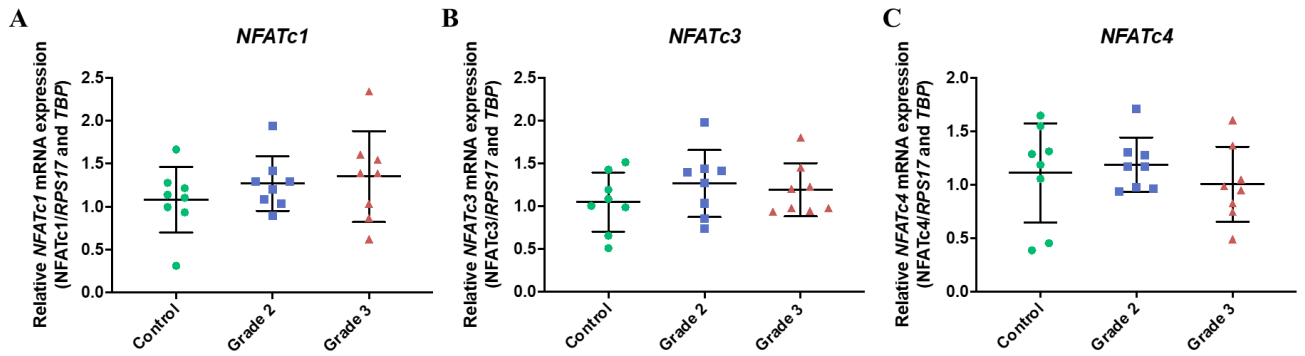


Figure 48 : Expression de *NFATC1*, *NFATC3* et *NFATC4* dans des fibroblastes dermiques.

Les niveaux d'expression de *NFATC1* (A), *NFATC3* (B) et *NFATC4* (C) ont été déterminés par RT-qPCR dans les cellules des individus contrôles et des patients radiosensibles grade 2 et grade 3. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD. N = 8 contrôles, 8 grade 2 et 8 grade 3.

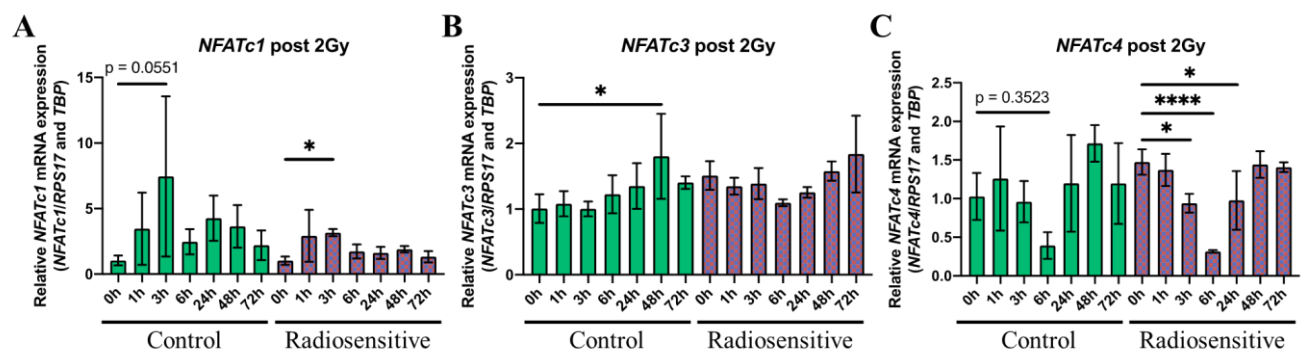


Figure 49 : Expression de *NFATC1*, *NFATC3* et *NFATC4* dans des fibroblastes dermiques après irradiation.

Les niveaux d'expression de *NFATC1* (A), *NFATC3* (B) et *NFATC4* (C) ont été déterminés par RT-qPCR aux temps indiqués après une irradiation de 2 Gy de rayons X. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SD. ANOVA. N = 3 contrôles et 3 radiosensibles. Significatif à * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$.

c. Les autres membres de la famille NFAT

Comme nous l'avons discuté dans l'introduction bibliographique, NFATC2 fait partie de la famille NFAT dont les membres NFAT1 à NFAT4 sont des facteurs de transcription régulés par le calcium intracellulaire. Bien que ces 4 facteurs de transcription reconnaissent le même domaine de fixation de l'ADN laissant à supposer des fonctions redondantes, chacun possède son propre rôle.

Nous avons observé que *NFATC2* était sous-exprimé dans les fibroblastes de patients radiosensibles, nous nous sommes donc demandé si les autres NFATs étaient différentiellement exprimés chez ces patients. Nous n'avons pas détecté de différence d'expression de *NFATC1* (Figure 48 A), *NFATC3* (Figure 48 B) et *NFATC4* (Figure 48 C) à l'état basal entre les fibroblastes dermiques des individus sains et ceux des patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie.

De même, nous avons montré que *NFATC2* était surexprimé en réponse aux radiations ionisantes et nous avons donc examiné l'expression des autres membres de la famille NFAT après irradiation des cellules. Nous avons détecté une surexpression de *NFATC1* dans les fibroblastes dermiques des individus contrôles et des patients radiosensibles avec un pic de surexpression à 3h post-2 Gy puis un retour à l'état basal d'expression (Figure 49 A). Nous avons décelé une légère surexpression de *NFATC3* dans les fibroblastes dermiques des individus contrôles 48h post-2 Gy mais pas dans les cellules des patients radiosensibles (Figure 49 B). Enfin, nous avons détecté une sous-expression de *NFATC4* dans les fibroblastes dermiques des individus contrôles et des patients radiosensibles avec l'expression la plus faible à 6h post-irradiation, puis un retour à l'expression basale (Figure 49 C).

NFATC1, NFATC2, NFATC3 et NFATC4 pourraient donc participer à la réponse à l'irradiation. Il serait intéressant de confirmer ces résultats en étudiant l'expression protéique

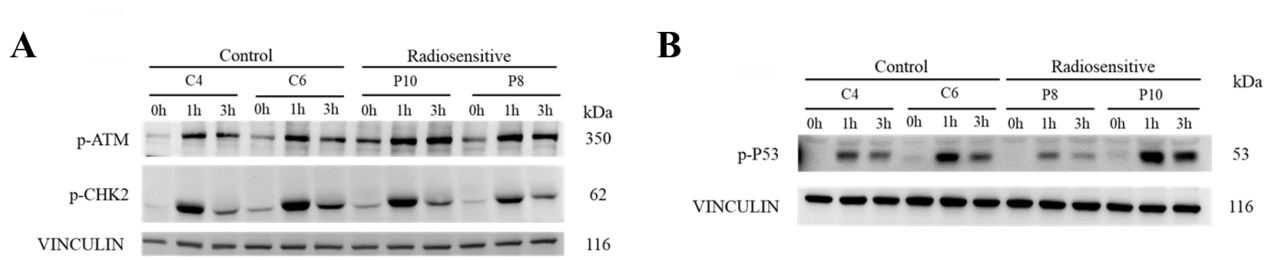


Figure 50 : Réponse aux dommages à l'ADN.

Pas de différence de phosphorylation du résidu serine 1981 d'ATM, du résidu thréonine 68 de CHK2 (A) et du résidu serine 15 de p53 (B) après une irradiation de 2 Gy de rayons X entre les fibroblastes des individus contrôles et ceux des individus radiosensibles. Les phosphorylations ont été détectées par western-blot aux temps indiqués après irradiation. La vinculine a été utilisée comme témoin de charge protéique. N = 2 contrôles et 2 radiosensibles.

de NFATC1, NFATC3 et NFATC4 et également en identifiant les cibles de ces 4 facteurs de transcription.

3. Réponse aux dommages de l'ADN

Les dommages à l'ADN induits par les rayons ionisants enclenchent une réponse cellulaire ayant pour but d'arrêter le cycle cellulaire, de réparer ces lésions et d'induire l'apoptose le cas échéant.

Nous avons montré que les fibroblastes dermiques des patients radiosensibles présentaient un défaut de réparation de l'ADN (Voir Article 2). Ainsi, nous avons étudié la voie de signalisation ATM/CHK2/P53 qui participe à l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux radiations ionisantes. L'activité de ces 3 protéines est régulée par leur état de phosphorylation. Nous avons examiné la phosphorylation des résidus serine 1981 d'ATM, thréonine 68 de CHK2 et serine 15 de p53 en réponse à l'irradiation des cellules. Nous n'avons pas détecté de différence majeure dans la cinétique de phosphorylation d'ATM, de CHK2 et de p53 entre les fibroblastes de patients radiosensibles et ceux des individus contrôles (Figure 50 A et B).

Nous avons également étudié le nombre de cassures double brin de l'ADN et leur réparation 0h, 15min, 2h, 6h et 24h après une irradiation de 2 Gy de rayons X par immunofluorescence contre γ H2AX et 53BP1. Nous avons détecté autant de foci γ H2AX et 53BP1 dans les fibroblastes dermiques des patients radiosensibles et des individus contrôles 15 min post-2 Gy, indiquant qu'il y a autant de cassures double brin induites par l'irradiation (Article 2 Figure 2). En revanche, à 6h et 24h post-2 Gy, nous avons détecté plus de foci γ H2AX et 53BP1 dans les cellules des patients radiosensibles (Article 2 Figure 2).

Ainsi, le défaut des capacités de réparation des dommages de l'ADN identifié dans les cellules des patients radiosensibles dans le deuxième article ne semble pas se situer au niveau de

l'activation de la réponse des dommages de l'ADN, mais plutôt dans la réparation des lésions.

Deux hypothèses sont envisagées : les cassures double brins prennent plus de temps à être réparées dans les fibroblastes des patients radiosensibles, ou il y a plus de cassures doubles brins non réparées dans ces cellules.

4. Etude de l'autophagie radio-induite

Nous avons discuté dans l'introduction bibliographique de l'autophagie comme mécanisme de survie ou de mort en réponse aux radiations ionisantes.

Parmi les gènes identifiés comme différentiellement exprimés, *DRAM1*, qui est sous-exprimé dans les cellules des patients radiosensibles, est un régulateur positif de l'autophagie (Nagata et al. 2018 ; Lu et al. 2019), alors que *PLCE1* qui a été décrit comme un régulateur négatif de l'autophagie est surexprimé (Chen et al. 2019). *COX2* semble avoir une fonction duale dans l'autophagie, il a été décrit comme inducteur de l'autophagie via l'inhibition de la voie Akt/mTOR dans un contexte d'infection bactérienne (Xiong et al. 2018) mais également comme un régulateur négatif via un mécanisme encore inconnu (son inhibition induisant l'autophagie) (Niranjan et al. 2018).

Nous nous sommes ainsi demandé quelles étaient les capacités autophagiques des cellules en réponse aux radiations ionisantes. Pour cela, nous avons irradié une souche de fibroblastes dermiques d'un patient radiosensible et une souche de cellules contrôles et nous avons traité les cellules avec de la chloroquine 1h avant de récupérer les protéines. La chloroquine est un inhibiteur du flux autophagique qui empêche la fusion des autophagosomes et des lysosomes, ainsi les autophagosomes s'accumulent dans la cellule, les acteurs de l'autophagie également, ce qui facilite l'observation du flux autophagique. Nous avons étudié le flux autophagique par western-blot contre les protéines LC3 et p62. En absence de chloroquine, plus le flux autophagique est fort, moins il y a de protéine p62 qui est dégradée dans l'autophagolysosome

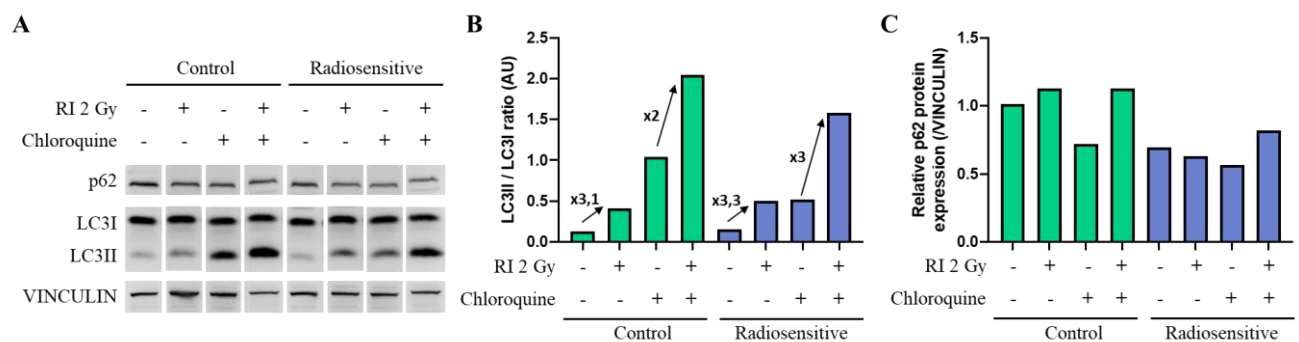


Figure 51 : Autophagie en réponse à l'irradiation.

La quantité de p62 et le ratio d'activité LC3II/LC3I ont été examinés par western-blot (A) puis quantifiés (B) et (C), avec ou sans chloroquine et 24h après une irradiation de 2 Gy ou à l'état basal. N = 1 contrôle et 1 radiosensible.

et plus le ratio LC3II (forme active) / LC3I (forme inactive) est élevé. En présence de chloroquine, plus le flux autophagique est fort, plus il y a accumulation de p62 qui ne peut être lysé, et plus le ratio LC3II / LC3I est grand. Ainsi, nous avons détecté un plus fort ratio LC3II/LC3I en réponse à l'irradiation avec et sans chloroquine dans les fibroblastes du patient radiosensible et dans les fibroblastes de l'individu contrôle (Figure 51 A et B). Nous avons observé une expression similaire de p62 en réponse à l'irradiation lorsque le flux autophagique n'est pas bloqué (sans chloroquine) dans les cellules du patient radiosensible et de l'individu contrôle (Figure 51 A et C). En revanche, lorsque le flux autophagique est inhibé, nous avons détecté une plus forte expression de p62 en réponse aux radiations ionisantes dans les cellules du patient radiosensible et de l'individu contrôle (Figure 51 A et C).

Il semblerait qu'une irradiation de 2 Gy de rayons X entraîne l'activation de l'autophagie dans les fibroblastes dermiques, mais nous n'avons pas détecté de différence entre les cellules du patient radiosensible et celle de l'individu contrôle. De plus, il n'est pas possible d'arriver à une conclusion en comparant seulement les cellules de 2 individus. Ces expériences sont donc à répéter sur un plus grand nombre d'échantillons.

En outre, il est conseillé par la communauté scientifique d'évaluer le taux d'autophagie à l'aide de plusieurs techniques complémentaires (Klionsky et al. 2016). Ainsi, nous pourrions envisager d'utiliser un plasmide rapporteur codant pour la protéine LC3 couplée à un tag dont la détection est proportionnelle à l'activité autophagique.

5. Etude de la sensibilité des fibroblastes au TNF α

Le TNF α est un élément important de la réponse inflammatoire suite à une exposition aux radiations ionisantes, de l'activation précoce des cellules immunitaires résidentes jusqu'à la mise en place d'une fibrose radio-induite (Sprung et al. 2015; Di Maggio et al. 2015). Ainsi,

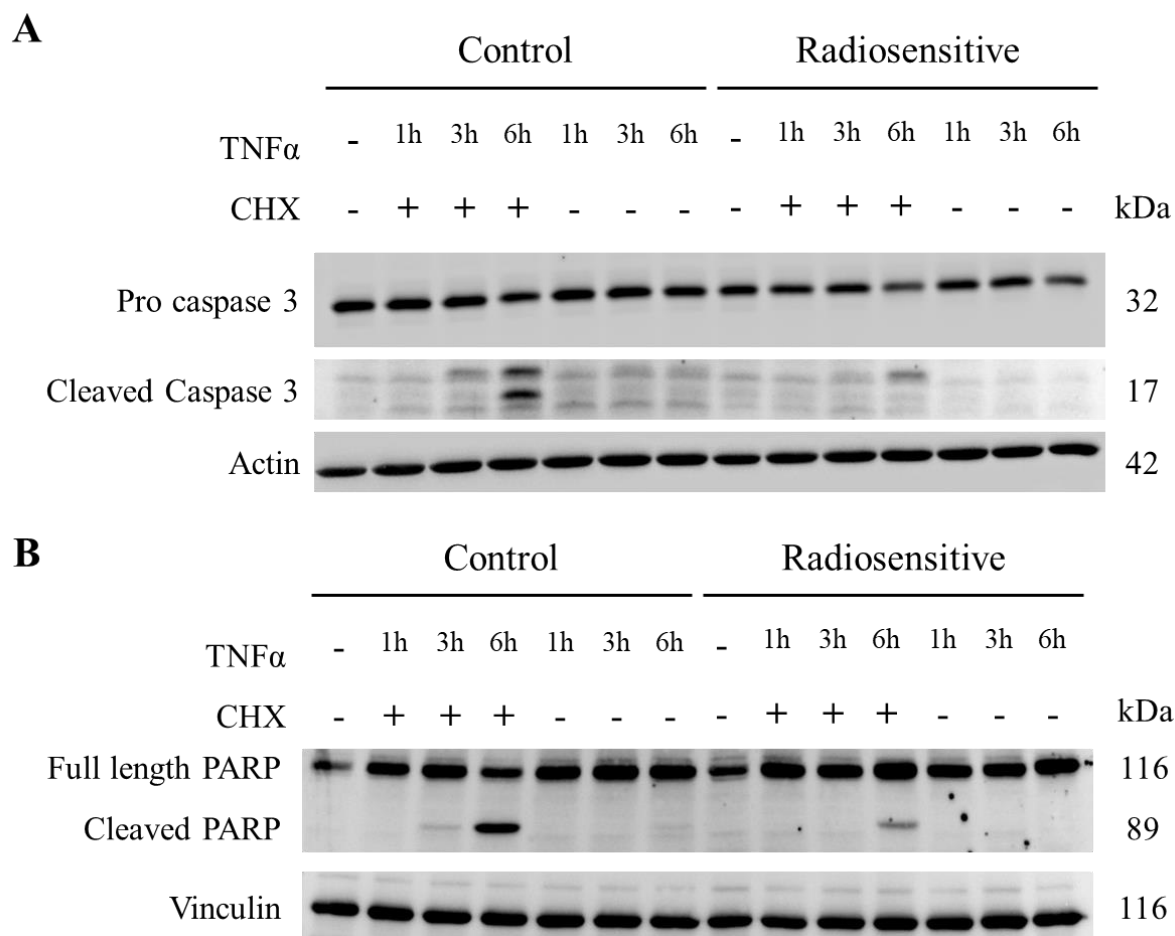


Figure 52 : Activation de la caspase 3 et de PARP en réponse au TNF α .

Les formes totales inactives et clivées actives la caspase 3 (A) et de PARP (B) ont été détectées par western-blot après différents traitements au TNF α (20 ng/mL) et à la CHX (40 μ g/mL).

CHX = CycloHeXimide. N = 2 contrôles et 2 radiosensibles.

nous avons décidé d'étudier l'effet du $\text{TNF}\alpha$ sur les fibroblastes dermiques des patients radiosensibles et des contrôles. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la caspase 3 et à PARP, qui sont 2 protéines impliquées dans l'apoptose induite par la voie extrinsèque (voir Introduction section II. 6. a.). Nous avons étudié leur activation par clivage en réponse à un traitement au $\text{TNF}\alpha$ seul, ou en réponse à un traitement $\text{TNF}\alpha$ + CHX (CycloHeXimide) qui est un inhibiteur de la synthèse protéique, qui bloque ainsi la voie de survie lors d'un traitement au $\text{TNF}\alpha$ (Wang et al. 2008). Le traitement au $\text{TNF}\alpha$ seul ne suffit pas à activer la caspase 3 et PARP dans les cellules des patients radiosensibles et les contrôles (Figure 52). En revanche, le traitement $\text{TNF}\alpha$ + CHX induit un clivage de la caspase 3 et de PARP dès 3h de traitement dans les fibroblastes des contrôles et seulement à 6h dans les fibroblastes des patients radiosensibles et plus faiblement (Figure 52). Ainsi, les cellules des individus contrôles semblent plus sensibles à l'activation de la voie apoptotique en réponse à un traitement au $\text{TNF}\alpha$ + CHX, mais il faudrait mesurer l'apoptose, par exemple par cytométrie en flux ou par test TUNEL, pour pouvoir confirmer ce résultat.

De plus, $\text{TNF}\alpha$ pourrait induire l'apoptose indépendamment de la caspase 3 via la voie NFAT et l'expression de FasL (Álvarez et al. 2011). Ainsi, dans les fibroblastes des patients radiosensibles où l'expression de NFATC2 est plus faible que dans les contrôles, il pourrait y avoir également un défaut d'entrée en apoptose caspase 3 indépendante. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier les caractéristiques cellulaires de l'apoptose (fragmentation de l'ADN, exposition de la phosphatidylsérine sur la face externe de la membrane plasmique) et non seulement la voie de signalisation (clivage de caspase 3 et de PARP) en réponse au $\text{TNF}\alpha$.

La sensibilité au $\text{TNF}\alpha$ semblant être différente entre les fibroblastes des patients radiosensibles et des contrôles, il serait intéressant d'étudier les autres voies activées en réponse au $\text{TNF}\alpha$, notamment l'inflammation avec la production de CCL2 et d'IL-1, 2 acteurs de la réponse

inflammatoire activée par les radiations ionisantes et dont l'expression peut être médiée par $\text{TNF}\alpha$ (Bauer et al. 2019).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Approches haut débit pour étudier la radiosensibilité individuelle

1. Etude du méthylome et du transcriptome de patients radiosensibles

Nous avons observé que les fibroblastes dermiques des patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie présentaient un profil transcriptomique et un profil de méthylation différents de ceux des fibroblastes dermiques d'individus sains de la population générale. L'utilisation comme contrôle de fibroblastes dermiques d'individus de la population générale n'est pas la plus pertinente mais s'explique par la difficulté d'obtenir des cellules de patients ayant souffert d'un cancer et ayant subi une radiothérapie sans développer d'effets secondaires sévères aigus et/ou tardifs. Les effets secondaires tardifs pouvant apparaître plusieurs années après le traitement par radiothérapie, l'identification des patients sans effets secondaires peut s'avérer ardue, tout comme l'obtention de biopsie chez des patients soignés de leur cancer, n'ayant pas présentés d'effets secondaires et n'ayant plus de suivi par leur radiothérapeute.

Ainsi nous avons essayé de surmonter ce défaut en mesurant la radiosensibilité cellulaire des individus car il a été montré par plusieurs groupes de recherche que la radiosensibilité cellulaire des fibroblastes dermiques peut être corrélée avec le risque de développer des effets secondaires sévères de radiothérapie (Smith et al. 1980; Woods et al. 1988; Loeffler et al. 1990; Plowman et al. 1990; Burnet et al. 1992; Geara et al. 1993; Brock et al. 1995). A l'aide de tests de clonogénicité, nous avons mis en évidence une radiosensibilité plus forte des fibroblastes des patients radiosensibles comparés aux fibroblastes des individus contrôles. En revanche, Russel et al. et Peacock et al. n'ont pas mis à jour de corrélation entre la radiosensibilité cellulaire et le risque d'effets secondaires sévères de radiothérapie mais ceci pourrait s'expliquer par les différences de protocoles de test de clonogénicité et notamment avec

l'utilisation de « feeder » de culture alors que les études ayant observé une différence n'en utilisaient pas, ou encore des différences dans la mise en place des cohortes de patients (Russell et al. 1998; Peacock et al. 2000). De plus, dans une autre étude, les auteurs ont mis à jour une radiosensibilité cellulaire plus forte en moyenne dans des fibroblastes dermiques d'individus de la population générale comparés à des fibroblastes de patients n'ayant pas souffert d'effets secondaires sévères aigus de radiothérapie (Djuzenova et al. 2004). En revanche les auteurs ne se sont pas intéressés aux effets secondaires tardifs et il est possible que les patients ayant eu un cancer sans effets secondaires sévères aigus de radiothérapie aient développé par la suite des effets tardifs, notamment parmi ceux avec la radiosensibilité cellulaire la plus faible.

Nous avons étudié les capacités de réparation des CDB de l'ADN dans les fibroblastes des patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie car plusieurs études ont mis en avant la présence en plus grand nombre de CDB non réparées 24h après irradiation dans les cellules de patients ayant soufferts d'effets secondaires sévères de radiothérapie (Bourton et al. 2011; Li et al. 2013; COPERNIC project investigators et al. 2016). Dans notre étude, nous avons montré qu'il y avait un défaut de réparation des CDB dans les fibroblastes des patients radiosensibles comparés aux contrôles, avec un plus grand nombre de foci γ H2AX et 53BP1 détectés par immunofluorescence 24h après une irradiation de 2 Gy. Néanmoins, d'autres études n'ont pas mis à jour de corrélation entre les cassures double brin résiduelles de l'ADN et la radiosensibilité individuelle (Olive et al. 2008; Werbrouck et al. 2010; Vasireddy et al. 2010), ce qui pourrait être due, encore une fois, aux différents protocoles utilisés ainsi qu'à la sélection des patients composant la cohorte. En revanche, dans une étude sur la réparation des CDB dans des cellules mononucléées du sang périphériques, les auteurs n'ont pas identifié de différence entre le nombre de cassures résiduelles dans les cellules de patients sans effets secondaires aigus de radiothérapie et des cellules d'individus de la

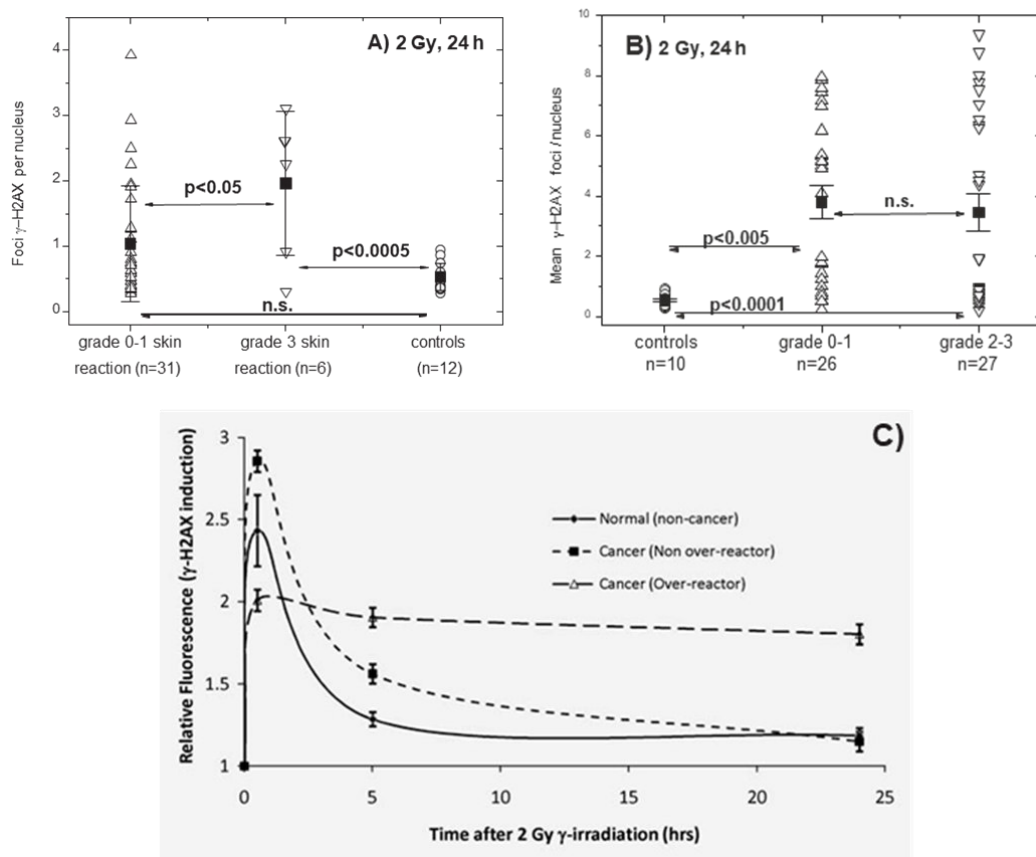


Figure 53 : Cassures double brin de l'ADN dans les cellules de patients ayant souffert ou non d'effets secondaires sévères de radiothérapie et d'individus sains.

A) et B) Nombre de foci γ H2AX dans des cellules mononuclées du sang périphérique chez des individus sains (controls) et des individus ayant souffert d'effets secondaires sévères aigus (grade 3 skin reaction) ou non (grade 0 – 1 skin reaction) des suites de radiothérapie. C) Fluorescence relative de γ H2AX détectée par cytométrie en flux dans les lymphocytes circulants issus d'individus sains (Normal non-cancer) et des individus ayant souffert d'effets secondaires sévères aigus et/ou tardifs (cancer over-reactor) ou non (cancer non-over-reactor) des suites de radiothérapie. Adaptée de (Djuzenova et al. 2013; Djuzenova et al. 2015; Bourton et al. 2011).

population générale mais ils ont détecté plus de cassures résiduelles dans les cellules des patients ayant souffert d'effets secondaires aigus sévères de radiothérapie (Figure 53 A) (Djuzenova et al. 2013). Les mêmes auteurs ont montré des résultats inverses dans une 2^{ème} étude 2 ans après (Figure 53 B), c'est-à-dire une différence dans le nombre de cassures doubles brins résiduelles dans les cellules des patients n'ayant pas soufferts d'effets secondaires sévères aigus de radiothérapie comparés aux individus sains (Djuzenova et al. 2015).

Le fait qu'il y ait 2 populations différentes au niveau des CDBs résiduelles dans le groupe des patients n'ayant pas soufferts d'effets secondaires aigus de radiothérapie dans l'article de 2015 (Figure 53 B) (une sous-population avec beaucoup de CDB et une autre avec peu) pourrait suggérer que ceux présentant plus de CDB risquent de souffrir d'effets tardifs, ce qu'il faudrait vérifier plusieurs mois après le traitement. En outre, Mumbreakar et al. n'ont pas trouvé de différence entre le nombre de CDB dans des lymphocytes de patients sans effet secondaire sévère aigu de radiothérapie comparés aux individus sains, ce qui est concordant avec la première étude de 2013 de Djuzenova et al. (Mumbreakar et al. 2014; Djuzenova et al. 2013). Enfin, Bourton et al., qui se sont intéressés aux CDB résiduelles dans les lymphocytes circulants, ont montré qu'il y avait autant de ces cassures dans les cellules de patients sans effet secondaire sévère aigu et/ou tardif et dans les cellules des individus sains 24h après irradiation, mais qu'il y en avait plus dans les cellules des patients radiosensibles (Figure 53 C) (Bourton et al. 2011).

La différence des profils de transcriptome et de méthylation de l'ADN que nous avons observé est corrélée avec la radiosensibilité cellulaire et un défaut de réparation des cassures double brin de l'ADN, caractéristiques observées dans les cellules des patients souffrant d'effets secondaires sévères de radiothérapie. Cependant la confirmation de nos résultats en utilisant comme contrôles des fibroblastes dermiques de patients ayant souffert d'un cancer sans avoir présenté d'effet secondaire sévère de radiothérapie reste nécessaire et nous espérons pouvoir travailler sur ces cellules le plus rapidement possible. Des contacts ont été établis avec plusieurs radiothérapeutes pour pouvoir obtenir des cellules de tels patients, dits grade 0. Néanmoins, les démarches administratives nécessaires à la constitution d'une telle cohorte sont longues et complexes.

En outre, les analyses du transcriptome et du méthylome ne nous ont pas permis de différencier les patients radiosensibles de grade 2 et de grade 3. Cela pourrait être due à la difficulté de différencier les patients de ces 2 grades ou encore au trop faible nombre d'échantillons dans nos analyses. Il serait intéressant de pouvoir étudier des patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie de grade 4 pour voir s'il est possible de séparer les patients sur une plus forte gamme de grade clinique en analysant leur transcriptome et leur méthylome.

2. La signature moléculaire des patients radiosensibles

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu identifier une signature moléculaire composée de 5 gènes dont l'expression nous a permis de déterminer le statut de radiosensibilité de nouveaux individus issus d'une cohorte de validation avec une exactitude de 100% (voir l'Article 1).

Ces dernières années, plusieurs études ont exploré le transcriptome de patients radiosensibles afin d'identifier des gènes signatures dont l'expression serait corrélée aux risques d'effets secondaires sévères de radiothérapie. Bien que plusieurs articles aient décrit des différences de profil d'expression génique en réponse à une irradiation *in vitro* entre les individus ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie et les contrôles, aucune signature issue de ces études n'ont été validée dans une 2^{ème} cohorte indépendante (Svensson et al. 2006; Mayer et al. 2011; Finnon et al. 2012).

Rodningen et al. ont identifié une signature du risque de fibrose cutanée radio-induite composée de 18 gènes dont la validation dans une seconde cohorte s'est avérée plus limitée : seul 34% des patients identifiés radiosensibles ont développé une fibrose cutanée mais aucun des individus identifiés comme radio-résistant n'a développé de fibrose radio-induite (Rødningen et al. 2008; Andreassen et al. 2013).

De plus, seule une étude a permis de différencier les patients radiosensibles en fonction de leur grade clinique d'effets secondaires mais dans une petite cohorte de 12 patients et sans avoir été par la suite répliquée dans une 2^{ème} étude indépendante (Henríquez Hernández et al. 2009). Les auteurs ont réussi à séparer les patients en étudiant le transcriptome des lymphocytes du sang circulant des patients avec ou sans irradiation *in vitro*. Ainsi, pour la classification des patients en fonction de la sévérité des effets secondaires sévères aigus de radiothérapie, l'expression de 20 gènes sont nécessaires quand les cellules ne sont pas irradiées et 29 gènes lorsque les cellules le sont. Les gènes identifiés à l'état basal sont impliqués notamment dans l'export de protéine, la régulation de l'autophagie, la voie de signalisation des phosphatidylinositol, l'adhésion focale et dans la régulation du cytosquelette d'actine, alors que lorsque les cellules ont été irradiées, les gènes permettant la classification sont impliqués dans la voie de signalisation des phosphatidylinositol, la régulation du cytosquelette d'actine, le cycle cellulaire et la voie du

TGF β . Il est intéressant de noter qu'aucun des gènes permettant de classer les patients en fonction de la sévérité de leurs effets secondaires aigus identifiés après irradiation n'est le même qu'à l'état basal, même si 2 mécanismes cellulaires enrichis dans ces listes de gènes sont communs. Pour la classification des patients en fonction de la sévérité de leurs effets secondaires tardifs, les auteurs ont observé qu'il était possible de les classer qu'à partir du transcriptome des lymphocytes non-irradiés et les gènes identifiés sont impliqués notamment dans la régulation du cytosquelette d'actine, la voie des MAPK, la voie Erb B, la cytotoxicité médiée par les cellules tueuses naturelles (Natural Killer), l'adhésion focale ainsi que la signalisation des récepteurs des lymphocytes T. Aucun des gènes qu'ils ont identifiés pour classer les patients n'a été détecté comme différentiellement exprimé dans notre étude, ce qui peut s'expliquer par la différence des cellules étudiées (lymphocytes du sang circulant et fibroblastes dermiques).

En outre, ces études ont toutes été réalisées à l'aide de puce à ADNc qui ne mesurent pas l'expression de l'ensemble des gènes du génome, limitant ainsi la puissance de ces analyses.

Notre étude du transcriptome par séquençage ARN, plus exhaustive et sans doute plus quantitative que les approches utilisant les puces ADNc, associée à une identification des gènes les plus discriminants par machine learning, nous a permis de déterminer une signature de 5 gènes. L'expression de ces 5 gènes nous a permis d'identifier les patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie dans une cohorte de validation de 30 individus, comprenant des patients et des contrôles analysés en aveugle.

Nous voulons tout d'abord valider cette signature en utilisant des échantillons de patients grade 0 (voir discussion du point 1), mais également augmenter le nombre de patients grade 2 et grade 3 et ajouter des échantillons de patients grade 4 pour essayer d'identifier une signature permettant de classer les patients selon leur grade clinique.

3. Méthylome dans la radiosensibilité individuelle

Lors de ce travail de thèse, nous avons montré que les fibroblastes dermiques des patients radiosensibles présentaient un profil d'expression génique et de méthylation de l'ADN spécifique par rapport aux fibroblastes contrôles.

Nous avons observé que 18,7% des gènes différentiellement exprimés à l'état basal entre les fibroblastes des patients radiosensibles et les fibroblastes contrôles possédaient une région différentiellement méthylée dans leur promoteur pouvant participer à la régulation de leur expression. Parmi ces 101 gènes, 68 présentaient le schéma classique du taux de méthylation inversement proportionnel à l'expression du gène. De plus, parmi les 5 gènes signature de la radiosensibilité, *NFATC2* et *TNFRSF19* sont hyper-méthylés dans des régions promotrices et *ADAMTSL1* a une région hypo-méthylée dans son promoteur dans les fibroblastes de patients radiosensibles, ce qui est concordant avec leur expression. En revanche, *PLCE1* et *LINC01615* n'ont pas de région différentiellement méthylée dans des régions promotrices.

Ces résultats suggèrent un rôle de la méthylation de l'ADN dans la mise en place d'un profil d'expression génique associé au risque élevé de développer des effets secondaires sévères de radiothérapie.

La mise en place de la méthylation de l'ADN se fait majoritairement durant l'embryogenèse, mais le méthylome évolue au cours du temps, notamment en réponse aux facteurs environnementaux (Garg et al. 2018; Ciccarone et al. 2018). A notre connaissance, il n'y a pas d'étude sur le méthylome des patients radiosensibles et l'impact de l'environnement sur celui-ci. De plus, les mécanismes moléculaires responsables du contrôle de la méthylation de l'ADN ne sont pas encore totalement élucidés.

De manière intéressante, il a été montré que *PLCE1*, que nous avons identifié comme surexprimé dans les fibroblastes des patients radiosensibles, participe à la méthylation du promoteur de *PTEN* (Phosphatase and TENSin homolog) dans des cellules de cancer du poumon non à petites cellules sans qu'aucun mécanisme moléculaire ne soit proposé. Nous n'avons pas identifié de différence de méthylation dans le promoteur de *PTEN*, mais il serait intéressant d'étudier si *PLCE1* participe à la méthylation des gènes que nous avons identifiés comme différentiellement méthylés et d'élucider par quels mécanismes il agit.

A notre connaissance, dans la littérature, une seule étude s'est intéressée au lien entre la méthylation de l'ADN et le risque de développer des effets secondaires sévères de radiothérapie (Weigel et al. 2015). Les auteurs ont étudié la méthylation de l'ADN à l'aide d'une puce à ADN dans des fibroblastes dermiques de patientes avec un cancer du sein et ayant souffert de fibrose cutanée radio-induite. Ils ont ainsi identifié le gène *DGKA* (DiacylGlycerol Kina Alpha) comme possédant une région amplificatrice (« enhancer region ») contenant 2 sites CpGs hypométhylés dans les cellules des patientes radiosensibles et permettant ainsi une surexpression plus importante en réponse à une irradiation (Weigel et al. 2015). Cette étude met pour la première fois en évidence l'importance de la méthylation de l'ADN dans la radiosensibilité et dans la réponse à l'irradiation.

Nous avons analysé le taux de méthylation de ces 2 CpGs dans nos échantillons et ils ne sont pas différentiellement méthylés entre les cellules des patients radiosensibles et les contrôles. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les auteurs ne s'intéressent qu'aux fibroses radio-induites alors que notre cohorte comprend divers types d'effets secondaires de radiothérapie.

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié les promoteurs des gènes différentiellement méthylés entre les fibroblastes des patients radiosensibles et les contrôles et les régions associées au promoteur.

Il serait intéressant d'étudier également les régions différentiellement méthylées dans tous les domaines régulateurs (promoteurs mais également régions amplificatrices) et de déterminer l'expression de ces gènes en réponse à l'irradiation même si celle-ci n'est pas différente à l'état basal entre les cellules des individus radiosensibles et des contrôles.

Il serait également intéressant d'identifier, avec une approche de machine learning similaire à celle que nous avons employée pour le transcriptome, une signature des patients radiosensibles composée de sites CpGs différentiellement méthylés. Pour être validée par une méthode simple, dans les cellules de nombreux patients, il faudrait que la différence de méthylation des sites CpGs composant cette signature soit importante car les méthodes d'investigation de la méthylation par PCR telles que la MSP (Methylation-Specific Polymerase chain reaction) ou encore la HRM PCR (High Resolution Melting Polymerase Chain Reaction) sont des techniques qualitatives (CpG méthylé ou non) mais peu quantitatives.

4. Vers une signature de la radiosensibilité individuelle ?

La prochaine étape de notre étude sera de confirmer la signature dans des fibroblastes de patients n'ayant pas souffert d'effets secondaires de radiothérapie.

Il sera également intéressant d'étudier le transcriptome de patients par séquençage ARN sur un nombre plus important d'individus pour voir s'il est possible de différencier la sévérité et aussi le type d'effets secondaires de radiothérapie.

L'identification d'une signature de la radiosensibilité individuelle par séquençage ARN semble prometteuse et il serait à envisager d'étudier une telle signature dans d'autres types cellulaires plus accessibles tels que les kératinocytes, ou dans les fibroblastes présents dans la papille dermique au niveau du bulbe du follicule pileux, ou encore les cellules mononucléées du sang circulant. Le séquençage ARN de ce dernier type cellulaire est un des axes du projet européen

REQUIRE qui a pour but d'identifier une signature de la radiosensibilité individuelle à partir d'une cohorte de plus de 5000 patients traités par radiothérapie pour un cancer du sein, du poumon ou de la prostate et recrutés dans toute l'Europe.

II. Les mécanismes responsables de la radiosensibilité individuelle

Le 2^{ème} axe de ce travail de thèse consistait à mieux comprendre les mécanismes de la radiosensibilité des patients de la cohorte COPENIC, notamment au niveau cellulaire.

1. Identification des mécanismes cellulaires impliqués dans la radiosensibilité individuelle

Nous avons montré que les fibroblastes des patients ayant souffert d'effets secondaires de radiothérapie présentaient une survie plus faible après irradiation que ceux des individus contrôles et ainsi qu'un défaut de réparation de l'ADN. Pour identifier les liens entre la radiosensibilité cellulaire et les gènes différentiellement exprimés entre les cellules des patients et des contrôles, il serait possible d'effectuer un criblage par ARN interférence de ces gènes candidats, d'irradier les cellules, de mesurer leur survie afin de déterminer quels sont les gènes dont le silencing impacte la radiosensibilité cellulaire. On pourra ensuite analyser plus précisément leur rôle, dans la réparation de l'ADN, l'apoptose ou encore l'autophagie.

Nous avons également montré que certains des gènes que nous avons identifiés comme différentiellement exprimés entre les fibroblastes de patients radiosensibles et les contrôles étaient modulés en réponse à l'irradiation et pourraient participer à la réponse cellulaire aux radiations ionisantes.

Nous avons ainsi identifié le facteur de transcription *FOXLI* (Forkhead boX L1) comme étant surexprimé dans les cellules des patients radiosensibles et induit entre 3h et 6h après l'irradiation. *FOXLI* a été décrit comme une cible du facteur de transcription GLI2 dans la voie

SonicHedgeHog. FOXL1 joue un rôle de rétrocontrôle négatif en inhibant l'expression de *SHH* (SonicHedgeHog) (Nakada et al. 2006). La voie SHH est une voie de signalisation majeure dans les cellules et il a été montré que la sévérité de la mutation du gène *PTCH1* codant pour le récepteur dans la voie SHH était directement corrélée à la radiosensibilité cellulaire (Vulin et al. 2018). De plus, il a été montré que FOXL1 peut induire l'expression de *TRAIL* (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) dans des cellules pancréatiques cancéreuses, ce qui en fait un acteur pro-apoptotique (G. Zhang et al. 2013). FOXL1 peut également induire l'expression de 2 protéoglycanes transmembranaires (le perlecan et le syndecan), dont le rôle est de favoriser l'interaction du ligand Wnt avec son récepteur Fz (Frizzled) dans la voie Wnt (Perreault et al. 2001). La voie Wnt implique le facteur de transcription β -catenin qui lui a un rôle d'activateur de la prolifération et de survie cellulaire en réponse à l'irradiation, ce qui fait de FOXL1 un acteur anti-apoptotique, qui active également la production de collagène de type I ce qui suggère un rôle de FOXL1 dans la fibrose radio-induite (M. S. Chen et al. 2007; Gurung et al. 2009).

FOXL1 étant surexprimé dans les cellules des patients radiosensibles, il serait intéressant d'étudier si son inhibition par interférence ARN pourrait agir sur la radiosensibilité cellulaire et par quels mécanismes cellulaires. De plus, il serait intéressant de déterminer par ChIPseq (Chromatin ImmunoPrecipitation sequencing) quelles sont les cibles de FOXL1 dans les cellules à l'état basal, mais également en réponse à l'irradiation.

Dans ce travail de thèse, nous avons également identifié *LINC01615* et *TNFRSF19* comme étant sous-exprimés dans les fibroblastes des patients radiosensibles et répondant à l'irradiation ionisante au niveau transcriptionnel. *LINC01615* est un ARN long non-codant étudié seulement par méta-analyse mais qui pourrait jouer un rôle dans l'organisation de la matrice extracellulaire (Ji et al. 2019) mais également être impliqué dans la régulation de la voie TNF α , la voie Akt, la voie VEGF ainsi que la voie Wnt (Ramilowski et al. 2019). *TNFRSF19* a lui été décrit comme

étant un acteur pro-survie en activant les voies NFκB et Akt en réponse à une exposition aux radiations ionisantes (Loftus et al. 2013), mais sa surexpression a également été décrite comme entraînant la mort cellulaire indépendamment des caspases (Eby et al. 2000) ce qui suggère que son action est dépendante du contexte (type de cellule, type de stimuli etc.). En outre, il a été montré que *TNFRSF19* était une cible de la voie Wnt (Qiu et al. 2010; Schön et al. 2014). *TNFRSF19* a été décrit comme étant un régulateur négatif du récepteur TGFβR1 (Tumor Growth Factor β Receptor 1) pouvant ainsi entraîner la tumorigenèse (Deng et al. 2018), il serait ainsi intéressant d'étudier si *TNFRSF19* peut inhiber la voie du TGFβ dans la réponse à l'irradiation, une voie majeure impliquée dans les effets secondaires de radiothérapie (Martin et al. 2000; Martin et al. 2016). De plus, une étude a montré que la surexpression de *TNFRSF19* dans une lignée de cellules cancéreuses du poumon pouvait améliorer les capacités de réparation des CDB de l'ADN. Il serait intéressant de déterminer la fonction de *TNFRSF19* dans la réponse au TGFβ et l'organisation de la matrice extracellulaire mais également dans la réparation de l'ADN.

Nous avons également montré que *COX2* et *DRAM1* sont surexprimés dans les fibroblastes dermiques en réponse à l'irradiation. Il a été montré que *COX2*, qui est surexprimé dans les cellules des patients radiosensibles par rapport aux contrôles, pouvait être un régulateur négatif de l'autophagie par un mécanisme encore inconnu (Niranjan et al. 2018) mais également un régulateur positif via l'inhibition de la voie Akt/mTOR (Xiong et al. 2018) et que *DRAM1*, qui est sous-exprimé, pouvait être induit par p53 en réponse aux dommages de l'ADN et réguler positivement l'autophagie en inhibant la voie Akt/mTOR (Nagata et al. 2018; T. Lu et al. 2019). De plus, *PLCE1*, que nous avons identifié comme étant surexprimé dans les cellules des patients radiosensibles, a été décrit comme régulateur négatif de l'autophagie en favorisant la déstabilisation de p53 par MDM2 (Y. Chen et al. 2020). Ces 3 informations

allant dans le sens d'une implication de l'autophagie dans le phénotype des cellules radiosensibles, nous nous sommes intéressés aux capacités autophagiques des cellules en réponse aux radiations ionisantes. Nous n'avons pas pu mettre à jour dans nos expériences préliminaires de différence significative dans les capacités autophagiques des fibroblastes des patients radiosensibles et des contrôles en réponse à l'irradiation, mais l'autophagie étant un mécanisme majeur de survie ou de mort cellulaire en réponse aux radiations ionisantes, de plus amples investigations sont nécessaires (Palumbo et al. 2013). Il serait intéressant de moduler l'expression de ces 3 gènes dans des fibroblastes et d'étudier le flux autophagique en mesurant le rapport LC3II/LC3I et la quantité de p62 par western blot en réponse à une irradiation ou en réponse à un traitement chimique induisant l'autophagie comme la chloroquine par exemple. Néanmoins, l'utilisation d'une seule technique n'étant pas suffisante pour étudier l'autophagie, l'utilisation d'un plasmide rapporteur codant pour la protéine LC3 couplée à un tag dont la détection est proportionnelle à l'activité autophagique serait à envisager.

De plus, ces gènes ont également été décrits comme impliqués dans l'apoptose (Choi et al. 2005; Crighton et al. 2006; Yue et al. 2019), ce qui n'est pas surprenant du fait de l'interaction entre la voie autophagique et l'apoptose notamment via p53 (Maiuri et al. 2007). Ainsi, il serait également intéressant d'étudier l'apoptose en parallèle à l'autophagie par cytométrie en flux ou par immunodétection des caspases activées dans les cellules des patients radiosensibles en réponse à l'irradiation.

2. Le rôle de NFATC2 dans la radiosensibilité individuelle

Dans ce travail de thèse, nous avons identifié *NFATC2* comme étant hyperméthylé dans sa région promotrice et sous-exprimé dans les fibroblastes dermiques des patients radiosensibles. Nous avons également observé que *NFATC2* répondait aux radiations ionisantes par une

Gène qui peut être régulé par NFATC2	Action dans la réponse inflammatoire radio-induite	Référence
<i>IL6</i>	Activation des cellules immunitaires résidentes	(Weigmann et al. 2008)
<i>TNF</i>	Activation des cellules immunitaires résidentes Vasodilatation Inhibition de la voie TGFβ	(Sprung et al. 2015; Leask et al. 2004; Mancini et al. 2014)
<i>IFNG</i>	Pro- et anti-fibrotique	(Gurujeyalakshmi et al. 1995; E. S. Chen et al. 2001)
<i>CXCL10</i>	Recrutement des cellules immunitaires circulantes au site d'irradiation	(Rauschenberger et al. 2019)
<i>CCL2</i>	Recrutement des cellules immunitaires circulantes au site d'irradiation	(Rauschenberger et al. 2019; Bauer et al. 2019)
<i>IL1A</i>	Activation des cellules immunitaires résidentes Recrutement des cellules immunitaires circulantes au site d'irradiation	(Bauer et al. 2019)
<i>IL2</i>	Prolifération et différenciation des cellules immunitaires	(Sprung et al. 2015)
<i>IL4</i>	Prolifération et différenciation des cellules immunitaires	(Sprung et al. 2015; Wynn et al. 2012)
<i>IL13</i>	Pro-fibrotique	(Klein et al. 2006)

Tableau 5 : Rôle des gènes pouvant être régulés par NFATC2 dans la réponse inflammatoire radio-induite.

surexpression précoce au niveau génique et protéique. Enfin nous avons montré que son silencing par interference ARN menait à une radiosensibilité cellulaire accrue et un défaut de réparation des CDB de l'ADN.

La diminution d'expression de *NFATC2* dans les fibroblastes dermiques contrôles par interférence ARN a entraîné une baisse de survie d'environ 20%, alors que la diminution de la survie des cellules des patients radiosensibles est d'environ 43% par rapport aux contrôles, ce qui suggère, ce qui n'a rien d'étonnant, que d'autres gènes que *NFATC2* participent à la radiosensibilité cellulaire des fibroblastes de patients ayant souffert d'effets secondaires de radiothérapie.

L'activation de l'inflammation dans le tissu en réponse à l'irradiation est instantanée avec la production de cytokines pro-inflammatoires permettant l'activation des cellules immunitaires résidentes du tissu irradié (lymphocytes et macrophages), qui produisent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires, mais également des chémokines attractantes pour recruter les cellules immunitaires circulantes (Sprung et al. 2015). Or, *NFATC2* a été décrit comme pouvant réguler l'expression de plusieurs de ces acteurs de la réponse inflammatoire.

En effet, il a été montré que *NFATC2* peut induire la production de l'IL-6 qui est un facteur pro-inflammatoire permettant l'activation des cellules immunitaires résidentes en réponse à l'irradiation (Tableau 5) (Weigmann et al. 2008; Sprung et al. 2015). *NFATC2* peut également contrôler la production de $\text{TNF}\alpha$ qui joue un rôle pro-inflammatoire dans la réponse aux radiations en activant les cellules immunitaires résidentes et en participant à la vasodilatation des vaisseaux pour permettre le recrutement des cellules immunitaires circulantes au site d'irradiation (Oum et al. 2002; Robbs et al. 2013; Sprung et al. 2015), mais $\text{TNF}\alpha$ est également un acteur anti-fibrotique en inhibant l'action du $\text{TGF}\beta$ dans les myofibroblastes activés (Tableau 5) (Leask et al. 2004; Mancini et al. 2014).

NFATC2 contrôle également l'expression de l'IFN γ qui a été décrit comme ayant des propriétés pro- et anti-fibrotiques (Gurujeyalakshmi et al. 1995; E. S. Chen et al. 2001; Kiani et al. 2001) et qui contrôle l'expression de CXCL10, chémokine permettant de recruter les cellules immunitaires circulantes au niveau du site d'irradiation (Tableau 5) (Sprung et al. 2015; Rauschenberger et al. 2019). Il est à noter que le TNF α , dont l'expression peut être contrôlée par NFATC2, peut réguler à son tour l'expression de CCL2 et d'IL-1 qui participent au recrutement des cellules immunitaires circulantes (Tableau 5) (Rauschenberger et al. 2019; Bauer et al. 2019). NFATC2 peut induire l'expression de l'IL-2 et de l'IL-4 qui participent à la prolifération et à la différenciation des cellules immunitaires et notamment dans l'activation des macrophages M2 qui ont un rôle anti-fibrotique (Tableau 5) (Rengarajan et al. 2002; Wynn et al. 2012; Walters et al. 2013; Sprung et al. 2015). NFATC2 peut également réguler l'expression de l'IL-13 qui participe à l'activation de la voie du TGF β (Tableau 5) (C. G. Lee et al. 2001; Klein et al. 2006).

Même si la régulation de ces acteurs de l'inflammation par NFATC2 n'a pas été décrite dans la réponse aux radiations ionisantes, il serait intéressant de les étudier dans ce contexte. Il pourrait être ainsi envisagé de moduler positivement l'expression de *NFATC2* dans des fibroblastes dermiques via un plasmide de surexpression, ou négativement via un mécanisme d'ARN interférence comme celui utilisé dans ce travail de thèse, et de mesurer en réponse à l'irradiation, l'expression génique et protéique des acteurs de l'inflammation dont NFATC2 a été décrit comme régulateur dans d'autres contextes. Il serait également intéressant d'établir un modèle de souris sous-exprimant *NFATC2* seulement dans les fibroblastes dermiques afin d'étudier l'effet sur l'inflammation cutanée radio-induite. Pour cela, il faudrait pouvoir créer un modèle de souris avec une séquence codant pour un ARN interférent ciblant *NFATC2* sous le contrôle d'un promoteur CMV répondant à la tétracycline avec une cassette interruptrice

flanquée de sites LoxP de part et d'autre et de pouvoir les croiser avec une souche de souris exprimant la recombinaise Cre spécifiquement dans le derme (sous le contrôle du promoteur de *COL1A2* par exemple). Ainsi, dans les fibroblastes dermiques des souris issues du croisement et seulement dans ces cellules, l'ARN interférent serait exprimé après induction à la tétracycline et diminuerait l'expression de *NFATC2*. Il serait ensuite possible d'étudier l'apparition de radiodermes chez ces souris sous-exprimant *NFATC2* dans leur fibroblastes dermiques après une irradiation, ou encore la réponse inflammatoire au niveau cutané en réponse à une irradiation. Dans les fibroblastes dermiques des patients radiosensibles, une faible expression de *NFATC2* est détectée, ce qui incite à utiliser un modèle de souris sous-exprimant *NFATC2* dans les fibroblastes dermiques (knockdown) plutôt qu'un modèle n'exprimant pas du tout *NFATC2* (knockout).

En plus de son rôle dans l'inflammation, $\text{TNF}\alpha$ induit par *NFATC2* peut activer l'apoptose ou au contraire l'inhiber (McCaffrey et al. 1994; Park et al. 1996; Oum et al. 2002). *NFATC2* contrôle également l'expression d'autres acteurs de l'apoptose tels que *FASLG*, *BCL2A1* ou encore *MDM2* (Latinis et al. 1997; Ullerås et al. 2008; X. Zhang et al. 2012). Ainsi, il serait intéressant d'étudier les capacités apoptotiques des cellules des patients radiosensibles en réponse à l'irradiation notamment par cytométrie en flux et de déterminer le rôle de *NFATC2* dans ces mécanismes en modulant son expression (sur- ou sous-expression) dans des fibroblastes normaux et en étudiant l'impact sur l'apoptose radio-induite.

Nous avons montré dans ce travail de thèse que les fibroblastes des patients radiosensibles présentent un défaut de réparation des CDB de l'ADN, mais également des 8-oxoGuanines, des sites abasiques et des bases endommagées par des glycols (Voir Article 2). De plus, nous avons observé que la sous-expression de *NFATC2* menait à un défaut de réparation des CDB de l'ADN, mais son effet sur la prise en charge des autres lésions de l'ADN est encore à

déterminer. En outre, les mécanismes potentiels liant NFATC2 à la réparation de l'ADN sont encore inconnues. Il a été montré que l'inhibition de la calcineurine (et donc des NFATs calcium-dépendants) entraînait un défaut de réparation des dimères de pyrimidines induites par une exposition aux UV sans pour autant que les mécanismes moléculaires soient révélés (Yarosh et al. 2005; Canning et al. 2006). Une étude s'intéressant aux partenaires de NFATC1 et NFATC2 a mis à jour l'interaction de ce dernier avec plusieurs acteurs de la réparation de l'ADN dont XRCC1, XRCC5 (Ku80), PRKDC (la sous-unité catalytique du complexe DNA-PK) ou encore PARP1, ce qui mettrait en avant une fonction de NFATC2 dans la réparation de l'ADN qui n'a encore jamais été décrite jusqu'à maintenant ainsi qu'un rôle de NFATC2 autre que celui de facteur de transcription (Gabriel et al. 2016). Nous n'avons pas mis en évidence d'interaction de NFATC2 avec XRCC1 ou XRCC5 dans les fibroblastes dermiques à l'état basal ou 3h après une irradiation de 2 Gy, mais de futures expériences seront menées à ce sujet, notamment en changeant le tampon de lyse cellulaire, en immunoprécipitant seulement NFATC2 nucléaire, en marquant NFATC2 à l'aide d'un tag pour permettre une immunoprécipitation plus efficace, ou encore en étudiant différents temps après l'irradiation.

NFATC2 semble ainsi être un acteur de la réponse à l'irradiation ionisante et jouer un rôle dans la mise en place de la radiosensibilité cellulaire. Son rôle de facteur de transcription étant fortement dépendant de ses partenaires, il serait intéressant de les identifier dans la réponse à l'irradiation. De plus, il semblerait que NFATC2 puisse avoir une fonction autre que son rôle de facteur de transcription, notamment dans la réparation de l'ADN. Ainsi, pour préciser son action dans la réponse aux radiations et dans la radiosensibilité, il serait intéressant d'identifier ses partenaires, à l'état basal et après une irradiation, par spectrométrie de masse après immunoprécipitation de NFATC2, mais également d'étudier ses gènes cibles en réponse à

l'irradiation, lorsqu'il agit en tant que facteur de transcription par une approche de ChIP seq (Chromatin ImmunoPrecipitation sequencing), ou encore par une approche de séquençage ARN en modulant son expression par ARN interférence.

CONCLUSION

Les approches d'analyse génomique globales employées durant ce projet ont permis d'identifier des acteurs potentiels de la radiosensibilité individuelle et de la réponse aux radiations ionisantes. Si je devais recommencer ce projet, j'utiliserais de nouveau les analyses haut débit, mais j'essayerais d'obtenir des fibroblastes dermiques de patients ayant souffert d'un cancer et ayant été traités par radiothérapie sans présenter d'effets secondaires sévères. C'est en effet un contrôle important pour valider définitivement la signature moléculaire que nous avons identifiée. De plus, je me concentrerais sur le croisement des données du RNA seq et du méthylome, notamment en étudiant plus précisément l'expression après irradiation des gènes différentiellement méthylés dans leur région régulatrice, que ce soit dans des cellules contrôles ou dans les cellules des patients radiosensibles.

Bien qu'ayant beaucoup appris sur l'analyse des données générées par les approches globales, notamment l'analyse RNA seq, je dois encore progresser dans les techniques d'analyse bio-informatiques et bio-statistiques, notamment pour les analyses fonctionnelles multi-échelles, la visualisation des données et les approches de clusterisation.

Au niveau de la mécanistique de la radiosensibilité individuelle, j'aurais beaucoup apprécié d'avoir plus de temps pour étudier par quels mécanismes cellulaires NFATC2 agit sur la radiosensibilité cellulaire et quel est son rôle dans la réponse aux radiations ionisantes. J'espère que ces travaux seront poursuivis dans le laboratoire ou chez nos collaborateurs.

En plus des connaissances et des compétences en biologie, mais aussi en gestion de projet et en travail d'équipe, que j'ai acquises au cours de ma thèse, ces 3 années m'ont permis de conforter mon envie de poursuivre ma carrière dans le monde de la recherche et notamment dans la recherche académique qui est pour moi une source de savoir et de curiosité sans limite.

MATERIELS ET METHODES

I. Techniques de biologie cellulaire

1. Culture cellulaire

a. Cellules utilisées

Les fibroblastes dermiques humains provenant de patients ayant souffert d'effets secondaires sévères des suites de radiothérapie utilisés dans cette étude sont issus de la collection COPENIC, mise en place par Nicolas Foray (INSERM, Lyon) (COPENIC project investigators et al. 2016).

Chaque patient de la collection COPENIC a été classé en grade clinique selon la classification CTCAE version 4.03 (« Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) », s. d.) par 2 radiothérapeutes indépendants en fonction de la sévérité de ses effets secondaires. Les effets secondaires aigus et tardifs ont été considérés et gradés de 2 à 4.

Les cellules ont été isolées à partir de biopsies par punch de patients radiosensibles dans des zones non photo-exposées et les souches de cellules ont été déclarées au Ministère Français de la Recherche sous les identifiants DC2008-585 et DC2011-1437 et protégées sous la référence IDDN.FR.001.510017.000.D.P.2014.000.10300.

Les fibroblastes dermiques isolés à partir de biopsies mammaires, abdominales ou fémorales de patients sains et obtenues grâce à une collaboration avec la biobanque Dermobiotec (Hospices Civiles de Lyon) ont été utilisées comme contrôles.

Pour établir une signature moléculaire des patients présentant des effets secondaires sévères causés par la radiothérapie, nous nous sommes concentrés sur l'étude des fibroblastes dermiques de femmes ayant été traitées pour un cancer du sein et classifiées grade 2 ou grade 3 selon le CTCAE que nous avons comparés aux contrôles. Les données cliniques de ces patientes sont référencées dans le Tableau 6.

Echantillon	Grade clinique	Complications
P1	Grade 2	Hypothyroïdie, Cardiomyopathie, Epidermite aigue grade 1
P2	Grade 2	Dermite tardive grade 1, Fibrose profonde grade 1 et douleurs
P3	Grade 2	Dermite tardive grade 2, Fibrose profonde grade 2
P4	Grade 2	Mastodynies
P5	Grade 2	Complications précoces et tardives peau
P6	Grade 2	Epidermite précoce grade 3, Dysphagie grade 2, Epidermite tardive grade 2, Mastite grade 2
P7	Grade 2	Plexite tardive grade 2
P8	Grade 2	Fibrose tardive profonde grade 2
P9	Grade 3	Fibromyalgie, Epidermite aigue grade 3, Mastite aigue grade 2, Mastite tardive grade 2, Fibrose cutanée grade 2
P10	Grade 3	Fibrose, Ulcération
P11	Grade 3	Epidermite aigue grade 2, Mastite tardive grade 3, Fibrose grade 3
P12	Grade 3	Fibrose grade 3, Epidermite grade 3
P13	Grade 3	Toxicité cutanée grade 1, Fibrose grade 3
P14	Grade 3	Epidermite précoce grade 3, Mastite grade 2
P15	Grade 3	Grade 3 précoce
P16	Grade 3	Epidermite aigue grade 3

Tableau 6 : Données cliniques des patientes ayant souffert d'un cancer du sein et présenté des effets secondaires sévères des suites d'une radiothérapie.

Puis nous avons vérifié cette signature dans des fibroblastes dermiques d'autres donneurs sains (hommes et femmes) mais également d'autres patients ayant souffert d'effets secondaires sévères des suites d'une radiothérapie, hommes et femmes, indépendamment de leur type de cancer et classés grade 2, grade 3 ou grade 4 selon le CTCAE (Tableau 7).

Echantillon	Statut	Grade clinique
X1	Sain	-
X2	Sain	-
X3	Sain	-
X4	Sain	-
X5	Sain	-
X6	Sain	-
X7	Sain	-
X8	Sain	-
X9	Cancer prostate	Grade 2
X10	Caner prostate	Grade 2
X11	Cancer sein	Grade 2
X12	Cancer os	Grade 3
X13	Cancer ORL	Grade 3
X14	Cancer ORL	Grade 3
X15	Cancer prostate	Grade 3
X16	Lymphome	Grade 3
X17	Cancer ORL	Grade 3
X18	Cancer prostate	Grade 3
X19	Cancer rectum	Grade 3

X20	Lymphome	Grade 3
X21	Lymphome	Grade 3
X22	Cancer ORL	Grade 3
X23	NA	Grade 3
X24	Cancer sein	Grade 3
X25	Cancer sein	Grade 4
X26	Cancer sein	Grade 4
X27	Cancer SNP	Grade 4
X28	Cancer ORL	Grade 4
X29	Cancer prostate	Grade 4
X30	NA	Grade 4

Tableau 7 : Informations des patients dont les fibroblastes dermiques ont permis la vérification de la signature moléculaire de radiosensibilité.

ORL : Oro-Rhino-Laringé. SNP : Système Nerveux Périphérique.

b. Isolement des fibroblastes

Les fibroblastes dermiques ont été isolés par migration à partir d'explants de derme en culture ou par digestion enzymatique.

L'isolement des fibroblastes dermiques par migration à partir d'explants est réalisé selon le protocole suivant :

- Transférer la biopsie dans un tube Falcon 50 mL
- Ajouter de la Bétadine pour recouvrir la biopsie et incuber 15 minutes à température ambiante en retournant le tube de temps en temps
- Préparer le mélange suivant durant l'incubation :

- 2,4 mL de dispase à 20 U/mL (Dispase II ; Roche Diagnostics)
- 5 mL de Pénicilline (10 000 U/mL) / Streptomycine (10 000 µg/mL) (P/S, Thermo Fisher Scientific)
- 5 mL de trypsine 0,02 mg/mL (Thermo Fisher Scientific)
- 7,6 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific)
- Transférer la biopsie dans une boîte de Pétri et la rincer avec du Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Merck)
- Découper des morceaux d'environ 0,5 cm x 0,8 cm à l'aide d'une pince, de ciseaux et d'un scalpel préalablement stérilisés
- Mettre les morceaux épiderme vers le bas et enlever le maximum de tissu adipeux à l'aide du scalpel et des ciseaux
- Mettre les morceaux de biopsies dans une nouvelle boîte de Pétri, épiderme vers le haut et ajouter la solution dispase / trypsine préparée précédemment en faisant attention à ce que les morceaux de biopsies ne se retournent pas et soient bien immergés dans la solution
- Incuber sur la nuit à 4°C

Remarque : Lors de la manipulation, éviter au maximum le dessèchement de la biopsie en la rinçant avec du DPBS

- Le lendemain, enlever l'épiderme des morceaux de biopsies à l'aide d'un scalpel et d'une pince
- Rincer les dermes dans du DPBS et placer un morceau de derme imbibé dans du Sérum de Veau Fœtal (SVF) par puits d'une plaque 6 puits (derme réticulaire vers le bas)
- Placer les plaques dans un incubateur à 37°C en condition humide en présence de 5% de CO₂

- Ajouter quelques gouttes de SVF directement sur les morceaux de derme quelques heures plus tard pour qu'ils ne dessèchent pas tout en faisant attention de ne pas les décoller
- Le lendemain, ajouter 1 mL de milieu de culture classique (DMEM + 10% SVF + 1% P/S)
- Ajuster le volume à 2 mL de milieu de culture le lendemain puis changer de milieu de culture tous les 2 jours

Remarque : Des kératinocytes peuvent contaminer la culture en colonisant le puits. Mais les conditions de cultures non optimales pour eux vont les éliminer. En revanche, si les clones deviennent trop importants, rincer les puits avec une solution stérile d'EDTA 0,02 % pour les faire disparaître.

Les fibroblastes commencent à sortir des explants et coloniser le puits après 1 semaine de culture. Lorsque les fibroblastes sortis de l'explant sont nombreux, l'explant est retiré pour ne pas freiner leur croissance.

Juste avant d'atteindre la confluence, lorsque les fibroblastes sont encore en phase de croissance, il faut les repiquer de la façon suivante :

- Rincer les puits avec du DBPS
- Ajouter 1 mL de trypsine/EDTA 0,05% par puits
- Incuber 5 minutes dans l'incubateur humide à 37°C
- Neutraliser la trypsine avec 4 mL de milieu de culture complet (ratio 1 : 5)
- Centrifuger 5 minutes à 1 500 rpm
- Enlever le surnageant
- Resuspendre le culot de cellules dans 1 mL de milieu de culture complet

- Compter les cellules et les ensemercer dans un flacon de culture à environ 5 000 cellules/cm²

Pour l'isolement des fibroblastes dermiques par digestion enzymatique, les premières étapes sont les mêmes jusqu'à enlever les épidermes et nettoyer les dermes, puis la digestion enzymatique du derme se fait selon le protocole suivant :

- Incuber les morceaux de dermes 2 heures à 37°C dans une solution de dispase II (Roche, 4 mg/mL) et collagénase II (PAA, 3 mg/mL) en vortexant toutes les 20 minutes
- Arrêter la réaction en ajoutant 3 volumes de 80% DMEM/20% SVF
- Filtrer la solution de lysat dermique à l'aide d'un tamis cellulaire de 70 µm dans un tube Falcon de 50 mL
- Centrifuger 15 minutes à 1 000 rpm
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans du milieu de culture complet
- Compter les cellules à l'aide de bleu trypan (Sigma-Aldrich) et d'une cellule de Malassez et les ensemercer dans un flacon de culture à environ 1 500 cellules/cm²

Les fibroblastes sont ensuite manipulés de la même façon que ceux isolés par migration à partir d'explant.

c. Conditions de culture

Les fibroblastes dermiques sont cultivés à 37°C dans un incubateur humide avec 5% de CO₂. Hors précision, les fibroblastes dermiques sont ensemencés entre 5 000 et 7 000 cellules/cm². De plus, lorsque cela est possible, les cellules sont utilisées à passage comparable.

2. Irradiation des cellules

Pour les différentes expériences, les cellules sont irradiées 24h post-confluence avec 2 Gy de rayons X à l'aide d'un irradiateur à rayons X X-RAD320 (Precision X-Ray) à un débit dose de 0,8 Gy/min et remises en culture pour les temps indiqués.

3. Test de clonogénicité

Pour mesurer la radiosensibilité cellulaire des fibroblastes, des tests de clonogénicité sont réalisés selon le protocole suivant :

- Pour une lignée, ensemercer 2 flacons de culture de 25 cm²
- 24h post-confluence, irradier un des 2 flacons avec 2 Gy de rayons X

Remarque : Prendre également les cellules non irradiées avec soit à l'incubateur mais ne pas les irradier

- 24h post-irradiation, compter les cellules 3 fois par condition
- Préparer une « solution d'ensemencement » de 800 µL à la bonne concentration cellulaire. Par exemple, pour ensemercer un flacon de culture F75 avec 400 cellules contenues dans 100 µL de solution, faire une solution d'ensemencement de 3200 cellules dans 800 µL final de milieu de culture.

Remarque : Le nombre de cellules ensemencées dans un flacon F75 est déterminé par les capacités prolifératives de chaque lignée. Si une lignée prolifère beaucoup, alors il faut ensemercer à faible concentration et inversement si la lignée prolifère peu.

- Pour la condition irradiée, mettre 2 fois plus de cellules que la condition non irradiée
- Pipeter 6 x 100 µL de la solution d'ensemencement dans 6 flacons de culture F75 pour chaque condition
- Changer le milieu de culture 1 semaine exactement après l'ensemencement
- 2 semaines après l'ensemencement, enlever le milieu de culture, faire 2 lavages au DPBS et fixer les cellules 15 minutes dans de l'éthanol 96 – 100%
- Le lendemain, colorer les colonies 15 minutes avec de l'éosine et 15 minutes avec du bleu d'hématoxyline
- Rincer avec de l'eau

- Compter les colonies à la loupe binoculaire lorsque les flacons sont secs

La radiosensibilité cellulaire est mesurée en calculant la fraction survivante à 2 Gy (SF2) avec le calcul suivant :

$$SF2 (\%) = \frac{(\text{Nombre de colonies dans la condition irradiée} \mid 2)}{\text{Nombre de colonies dans la condition non irradiée}} \times 100$$

4. Infection des fibroblastes dermiques

Les fibroblastes dermiques sontensemencés à faible densité (1500 cellules/cm²) dans des flacons de culture de 25 cm². Deux jours après, le milieu est changé pour du DMEM + 10% SVF décomplémenté + 1% P/S. Le lendemain, lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance, elles sont infectées à une MOI (Multiplicity Of Infection) de 10 avec les particules virales pGFP-C-shLenti-SCR ou pGFP-C-shLenti-NFATC2 (voir partie « Biologie moléculaire » pour la description de ces vecteurs) dans 2 mL de DMEM + 10% SVF décomplémenté + Polybrène 4 µg/mL. Le jour suivant, les fibroblastes sont rincés avec du DPBS puis remis en culture avec du milieu classique DMEM + FBS 10% + P/S 1%.

Lorsque la confluence est atteinte, les cellules sont trypsinées puisensemencées dans un flacon de culture de 75cm². Le lendemain, les cellules transduites sont sélectionnées à l'aide d'un traitement à 0,7µg/mL de puromycine pour une durée d'une semaine avec changement du milieu de sélection tous les deux jours. Un flacon de culture de cellules non transduites mais qui ont subi toutes les étapes de l'infection (sans particule virale) sert comme témoin de sélection. La concentration de puromycine a été sélectionnée en traitant des cellules non transduites avec différentes concentrations d'antibiotique afin d'identifier la dose de puromycine la plus faible mais permettant néanmoins la sélection des cellules transduites.

5. Analyse des capacités de réparation des dommages l'ADN

Pour étudier les capacités de réparations par excision et synthèse des dommages à l'ADN, la technologie LXRepair a été utilisée.

L'analyse a été effectuée sur les cellules de 4 patients contrôles et 4 patients radiosensibles (3 Grade 2 et 1 Grade 3).

3 à 5 millions de fibroblastes dermiques sont comptés puis rincés 2 fois dans du DPBS à 4°C. Ils sont ensuite congelés à -80°C dans un milieu de congélation (10% DiMéthylSulfOxyde, 90% SVF). Les échantillons congelés ont été envoyés à la société LXRepair (Grenoble, France) qui a utilisé la puce ExSy-SPOT (LXRepair) pour quantifier leur capacité de réparation par excision de base (BER), de réparation par excision de nucléotides (NER) et de réparation de la réticulation inter-brins (ICLR).

Les puces ExSy-SPOT contiennent des plasmides porteurs de lésions à l'ADN (8-oxoGuanine, site apurinique/apyrimidique, éthéno adduit, thymine glycol, dimère de pyrimidine et adduit de cisplatine). Les cellules sont lysées et les extraits protéiques sont mis en contact des puces en présence de désoryboNucléosides TriPhosphates (dNTPs) fluorescents. Après incubation et lavages, la fluorescence est mesurée. Ainsi, la fluorescence incorporée dans les plasmides est proportionnelle aux capacités de réparation des échantillons aux différents dommages à l'ADN.

6. Traitements chimiques

Les fibroblastes sont traités 1h avant la lyse des cellules avec 50µM de chloroquine (Clinisciences) afin de bloquer le flux autophagique.

Pour étudier les effets du TNFα sur les fibroblastes, les cellules sont traitées avec 20 ng/mL de TNFα (Sigma Aldrich) avec ou sans cycloheximide (Sigma Aldrich) à 40 µg/mL afin de bloquer la synthèse protéique.

II. Techniques de biologie moléculaire

1. Analyse d'expression génique

a. Extractions des ARNs

Les ARNs des fibroblastes dermiques ont été extraits à l'aide du kit NucleoSpin RNA Plus (Macherey Nagel) selon le protocole suivant :

- Rincer les cellules avec du DPBS
- Lysér les cellules avec 350 µL du tampon LBP, gratter le fond des puits/flacons de culture à l'aide d'un grattoir et récupérer le lysat cellulaire dans un tube eppendorf 1,5 mL
- Placer une colonne NucleoSpin gDNA Removal Column sur un tube de collection, transférer le lysat cellulaire dans la colonne et centrifuger 30 secondes à 11 000 g
- Ajouter 100 µL de solution de fixation BS à l'éluat et mixer par vortex ou pipetage
- Transférer toute la solution dans une colonne NucleoSpin RNA Plus Column, centrifuger 15 secondes à 11 000 g et jeter l'éluat
- Rincer la colonne avec 200 µL de tampon de lavage WB1 et jeter l'éluat
- Placer la colonne sur un nouveau tube de collection
- Ajouter 600 µl de solution de lavage WB2 (préalablement complétée avec de l'éthanol 96 – 100 %) dans la colonne, centrifuger 15 secondes à 11 000 g et jeter l'éluat
- Remplacer la colonne dans le tube de collection
- Ajouter 250 µL de solution de lavage WB2 (préalablement complétée avec de l'éthanol 96 – 100 %) dans la colonne et centrifuger 2 minutes à 11 000 g pour sécher complètement la membrane

- Placer la colonne sur un nouveau tube de collection, ajouter 30 µL d'eau sans RNase directement sur la membrane de la colonne et centrifuger 1 minute à 11 000 g
- Ajouter à nouveau 30 µL d'eau sans RNase directement sur la membrane de la colonne et centrifuger 1 minute à 11 000 g

La concentration ainsi que la pureté des ARNs sont déterminées par spectrophotométrie grâce à un NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). Le calcul de ratio d'absorbance à 260 et 280 nm permet d'évaluer la potentielle contamination par des protéines et le ratio d'absorbance à 260 et 230 nm celle par des molécules organiques.

Pour les analyses de séquençage ARN, la pureté est déterminée à l'aide d'un NanoDrop ND-2200 et la qualité des ARNs est évaluée grâce à un Agilent TapeStation 2200 (Agilent) afin d'évaluer le profil des ARNs 18S/28S et de calculer le nombre d'intégrité de l'ARN (RIN). La concentration des échantillons d'ARN est mesurée par fluorométrie grâce à un Qubit Fluorometer (Thermo Scientific) et du kit Qubit RNA BR (Thermo Scientific).

b. RTqPCR des ARNs messagers

i. Transcription inverse

Afin d'obtenir des ADNc, 500 ng d'ARN totaux sont rétrotranscrits grâce au kit PrimeScript RT Reagent (TaKaRa) selon le protocole suivant :

- Mix pour un échantillon

<i>Réactif</i>	<i>Volume</i>	<i>Final concentration</i>
<i>5X PrimeScript Buffer (for Real Time)</i>	2 μ L	1X
<i>PrimeScript RT Enzyme Mix I</i>	0,5 μ L	
<i>Oligo dT Primers (50μM)</i>	0,5 μ L	25 pmol
<i>Random 6 mers (100μM)</i>	0,5 μ L	50 pmol
<i>Total RNA</i>		500 ng
<i>Eau sans RNase</i>	qsp 10 μ L	

- Programme du cycle de rétrotranscription du thermocycleur (Biorad)

<i>Durée</i>	<i>Température</i>
<i>15 minutes</i>	37°C
<i>5 secondes</i>	85°C
<i>Hold</i>	4°C

ii. Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qPCR)

Les ADNc obtenus par transcription inverse sont dilués dans de l'eau sans RNase à une concentration finale de 5 ng/ μ L. Les gènes *RPS17* et *TBP* sont utilisés comme normalisateur dans cette étude. De plus, une gamme de dilution de facteur 5 à partir des ADNc est utilisée afin de mesurer l'efficacité des amorces lors des réactions de qPCR. La liste des amorces utilisées pour ce projet est détaillée dans le Tableau 8.

Gène	Gène ID	Amorce	Séquence de l'amorce
<i>ADAMTSL1</i>	92949	Sens	5' GGCTTCCTGTGTCTAATGACC 3'
		Antisens	5' TTAGGTGCTAGTTCAACAACCAG 3'
<i>APEX1</i>	328	Sens	5' GCTGCCTGGACTCTCTCATC 3'
		Antisens	5' GCTGTTACCAGCACAAACGA 3'
<i>DRAM1</i>	55332	Sens	5' CGTCAGCCGCCTTCATTATCT 3'
		Antisens	5' TCCAAGCACTAAAGACACCAAG 3'
<i>FOXL1</i>	2300	Sens	5' TCCGACAAGTCCAAGAGCTT 3'
		Antisens	5' GCATCAGGGAAGCGTTGAAA 3'
<i>LAPTM5</i>	7805	Sens	5' AAGTGCCACCTATCTCAACT 3'
		Antisens	5' TGGTTATGAGGCATATCCTCCTG 3'
<i>LINC01615</i>	101929484	Sens	5' ACTGTCTCTGGTAAAGGGGC 3'
		Antisens	5' GGTGCCCATTAAGAGTTTGCA 3'
<i>MFAP5</i>	8076	Sens	5' CGAGGAGACGATGTGACTCAAG 3'
		Antisens	5' AGCGGGATCATTACCAGAT 3'
<i>MUTYH</i>	4595	Sens	5' CCAGAGAGTGGAGCAGGAAC 3'
		Antisens	5' TTTCTGGGGAAGTTGACCAC 3'
<i>NEO1</i>	4756	Sens	5' GGAGCCGGTGGATACACTCT 3'
		Antisens	5' TGGCGTCGATCATCTGATACTA 3'
<i>NFATC1</i>	4772	Sens	5' GGACATCGGGAGGAAGAACA 3'
		Antisens	5' ACAGGACCATCTTCTTCCCG 3'
<i>NFATC2</i>	4773	Sens	5' TTGGAAGAAAGAACACGCGG 3'
		Antisens	5' GAGCACTCGATGGGGTTAGA 3'
<i>NFATC3</i>	4775	Sens	5' TACCTCCACTAGACTGGCCT 3'
		Antisens	5' GATGCTTTTACTGCCCCTCG 3'
<i>NFATC4</i>	4776	Sens	5' ATTGAGCTTCGGAAGGGTGA 3'
		Antisens	5' GCCAGTCAGTACCAGTTCCT 3'
<i>OGG1</i>	4968	Sens	5' TGGAAGAACAGGGCGGGCTA 3'
		Antisens	5' ATGGACATCCACGGGCACAG 3'
<i>PLCE1</i>	51196	Sens	5' GCTTCTTAACACGGGACTTGG 3'
		Antisens	5' CTTCAAGGGCATTGTGCTCTC 3'
<i>COX2</i>	5743	Sens	5' CAGCACTTCACGCATCAGTT 3'

		Antisens	5' CGCAGTTTACGCTGTCTAGC 3'
<i>RPS17</i>	6218	Sens	5' CTCTTTTACCAAGGACCCGCC 3'
		Antisens	5' AGGTTGGACAGACTGCCGAAG 3'
<i>SOD1</i>	6647	Sens	5' GGTGGGCCAAAGGATGAAGAG 3'
		Antisens	5' CCACAAGCCAAACGACTTCC 3'
<i>SOD2</i>	6648	Sens	5' GCTCCGGTTTTGGGGTATCTG 3'
		Antisens	5' GCGTTGATGTGAGGTTCCAG 3'
<i>SOD3</i>	6649	Sens	5' ATGCTGGCGCTACTGTGTTC 3'
		Antisens	5' CTCCGCCGAGTCAGAGTTG 3'
<i>TBP</i>	6908	Sens	5' TCAAACCCAGAATTGTTCTCCTTAT 3'
		Antisens	5' CCTGAATCCCTTTAGAATAGGGTAGA 3'
<i>TIAM1</i>	7074	Sens	5' GATCCACAGGAAGTCCGAAGT 3'
		Antisens	5' GCTCCCGAAGTCTTCTAGGGT 3'
<i>TNFRSF19</i>	55504	Sens	5' CCAGCAAGGTCAACCTCGT 3'
		Antisens	5' CAGAGCCGTTGTACTGAATGT 3'
<i>ZFPM2</i>	23414	Sens	5' AGTTGAGACAGACGACTGGGA 3'
		Antisens	5' CTCCTTGCCAAGTCACATCCA 3'

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées en RTqPCR.

La réaction de qPCR est réalisée à l'aide du kit SYBR Premix ExTaqII (Takara) selon le protocole suivant :

- Diluer des échantillons d'ADNc au 1/10
- Faire la gamme de dilution au 1/5^e à partir d'un tube « ADNc total » qui contient le même volume de chacun des échantillons rétrotranscrits. 5 points sont utilisés pour faire la gamme en plus d'un contrôle négatif constitué d'eau
- Préparer le mix de qPCR suivant :

<i>Réactif</i>	<i>Volume</i>
<i>Amorces sens (3 µM)</i>	0,5 µL
<i>Amorces antisens (3µM)</i>	0,5 µL
<i>SYBR Premix Ex Taq II</i>	5 µL
<i>ADNc dilués au 1/10</i>	1 à 4 µL
<i>Eau</i>	qsp 10 µL

- Déposer les échantillons d'ADNc en duplicatas ainsi que la gamme étalon sur une plaque 96 puits (Eurogentec)
- Programme du cycle de qPCR effectué à l'aide d'une machine AriaMx (Agilent)

	Temps	Température	Nombre de cycle
Dénaturation	30 secondes	95°C	1
Amplification	5 secondes	95°C	40
	30 secondes	60 ou 62 °C*	
	30 secondes	72°C	
Courbe de fusion	1 minute	95°C	1
	30 secondes	60°C	
	30 secondes	95°C	

* en fonction du couple d'amorces utilisé

iii. Interprétation des résultats

L'amplicon polymérisé durant la phase d'amplification est systématiquement vérifié en contrôlant la présence d'un seul pic de dissociation des produits doubles brins détecté lors de la phase de courbe de fusion qui permet de repérer d'éventuels amplifications non spécifiques ou

encore des dimères d'amorces. L'absence de contamination est vérifiée grâce au contrôle négatif pour lequel aucune amplification parasite ne doit être observée.

Dans cette étude, les résultats de qPCR sont interprétés par quantification relative. La normalisation est effectuée à l'aide de deux gènes de références, appelés également gènes de ménage, *RPS17* et *TBP*. Les résultats sont représentés par le rapport « Expression du gène cible dans un échantillon/Expression du gène cible dans les échantillons de références » pour chaque échantillon puis normalisés par le rapport « Expression du gène cible/Expression des gènes de ménages ». Cette normalisation permet ainsi de s'affranchir des erreurs de pipetage car l'expression des gènes de ménage *RPS17* et *TBP* est considérée comme constante dans nos conditions de culture et permet ainsi de comparer le niveau d'expression relative du gène cible dans les différents échantillons.

L'efficacité théorique de la réaction de PCR est d'un doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle (Efficacité de 100%). En pratique, l'efficacité est vérifiée pour chaque couple d'amorces grâce à la gamme étalon. En effet, chaque points de la gamme va permettre de tracer la droite $Ct=f(\log \text{ concentration})$, où Ct est le nombre de cycle nécessaire pour obtenir un signal fluorescent supérieur au bruit de fond pour chacune des concentrations de la gamme. Ensuite, l'efficacité E d'un couple d'amorces est calculée par la formule $E = 10^{(-1/\text{pente})}$.

La méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al. 2001) est utilisée pour calculer l'expression des gènes cibles. Par exemple, l'expression d'un gène cible d'un échantillon donné par rapport à l'échantillon de référence et pour une efficacité de 100% est $2^{(-Ct \text{ gène cible échantillon donné} - Ct \text{ gène cible échantillon de référence}) - (Ct \text{ gène de ménage échantillon donné} - Ct \text{ gène de ménage échantillon de référence})}$.

2. ARN interférence

Pour moduler l'expression de *NFATC2*, 4 plasmides lentiviraux contenant une séquence codante pour un petit ARN en épingle à cheveux (shRNA) dirigé contre *NFATC2* sont utilisés

(NFAT1 (NFATC2) Human shRNA Plasmid Kit (Locus ID 4773), OriGene) et un shRNA non effectif « scrambled » (sh-SCR) est utilisé comme contrôle.

L'ADN plasmidique est amplifié en transformant des bactéries *Escherichia Coli* compétentes DH5 α (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole suivant :

- Ajouter 10 ng d'ADN plasmidique à 50 μ L de bactéries compétentes
- Incuber 10 minutes dans de la glace
- Effectuer un choc thermique de 30 secondes à 42°C
- Remettre les bactéries dans la glace pendant 2 minutes
- Ajouter 600 μ L de milieu SOC (Thermo Fisher Scientific) et incuber les bactéries à 37°C sous agitation
- Etaler 100 μ L de la suspension bactérienne sur un milieu sélectif LB-Agar (Formedium) + 34 μ g/mL chloramphénicol et incuber une nuit à 37°C
- Mettre en pré-culture plusieurs clones dans 5 mL de milieu LB + 34 μ g/mL chloramphénicol une nuit à 37°C sous agitation
- La suspension bactérienne est centrifugée et culotée puis l'ADN plasmidique est extrait à l'aide d'un kit d'extraction et de purification rapide (Qiagen) selon les instructions du fournisseurs
- Analyser les clones recombinants grâce à une digestion par des enzymes de restriction
- Mettre en culture les clones validés dans 2 L de milieu LB + 34 μ g/mL chloramphénicol une nuit à 37°C sous agitation
- La suspension bactérienne est centrifugée et culotée puis l'ADN plasmidique est extrait à l'aide d'un kit d'extraction NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseurs

Les particules virales sont ensuite produites par le Plateau de Vectorologie de l'ENS de Lyon.

3. Analyse de la méthylation de l'ADN génomique

a. Extraction de l'ADN génomique

L'ADNg des fibroblastes dermiques ont été extraits à l'aide du kit QIAamp DNA Mini (Qiagen) selon le protocole suivant :

- Rincer les cellules avec du DPBS et les trypsiner
- Centrifuger les cellules 5 minutes à 1 500 rpm et les resuspendre dans 1 mL de DPBS
- Centrifuger à nouveau les fibroblastes 5 minutes à 1 500 rpm afin de les culotter et enlever le surnageant
- Resuspendre le culot cellulaire dans 200 µL de DPBS
- Ajouter 20 µL de protéinase K (Qiagen) et vortexer 15 secondes
- Ajouter 40 µL de RNase A (Qiagen) et vortexer 15 secondes
- Ajouter 200 µL de tampon AL, vortexer 15 secondes et incuber 10 minutes à 56°C
- Ajouter 200 µL d'éthanol 96 – 100 % et vortexer 15 secondes
- Transférer le lysat cellulaire dans une colonne QIAamp Mini spin, centrifuger 1 minute à 6 000 g et placer la colonne sur un nouveau tube de collection
- Rincer la colonne avec 500 µL de tampon AW1 (préalablement complété avec de l'éthanol 96 – 100%), centrifuger 1 minute à 6 000 g et jeter placer la colonne dans un nouveau tube de collection
- Rincer la colonne avec 500 µL de tampon AW2 (préalablement complété avec de l'éthanol 96 – 100%), centrifuger 3 minutes à 20 000 g
- Placer la colonne dans un nouveau tube de collection et centrifuger 1 min à 20 000 g
- Ajouter 100 µL d'eau DEPC (DiEthyl PyroCarbonate) directement sur la membrane de la colonne, incuber 5 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 6 000 g
- Retransférer l'éluat directement sur la membrane de la colonne, incuber de nouveau 5 minutes à température ambiante et centrifuger 1 minute à 6 000 g

La pureté des ADNg est déterminée par spectrophotométrie grâce à un NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). Le calcul de ratio d'absorbance à 260 et 280 nm permet d'évaluer la potentielle contamination par des protéines et le ratio d'absorbance à 260 et 230 nm celle par des molécules organiques.

La concentration des ADNg est déterminée par fluorométrie grâce à un Qubit Fluorometer (Thermo Scientific) et du kit Qubit dsDNA BR (Thermo Scientific).

b. Conversion au bisulfite

Pour l'analyse de l'état de méthylation d'une Cytosine – phosphate – Guanine (CpG), l'ADNg subit dans un premier temps une conversion au bisulfite lors de laquelle les cytosines non méthylées sont converties en uraciles (Figure 54).

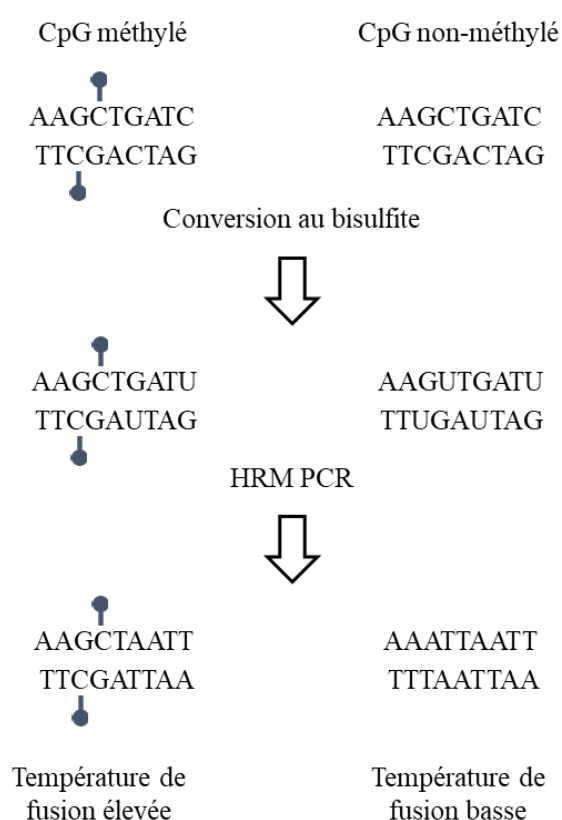


Figure 54 : Schéma illustrant la conversion au bisulfite d'ADNg et la HRM PCR

Puis lors de la HRM PCR, ces uraciles sont reconnus comme des thymines entraînant une diminution de la température de fusion de l'amplicon. Les cytosines méthylées ne sont pas converties et la température de fusion de l'amplicon est plus élevée (Figure 54).

L'ADNg est converti au bisulfite à l'aide d'un kit EpiTect Bisulfite (Qiagen) selon le protocole suivant :

- Préparer le mix suivant pour la conversion au bisulfite d'un échantillon :

<i>Réactifs</i>	<i>Volume</i>
<i>ADN (1 ng à 2 µg)</i>	Variable* (maximum 20 µL)
<i>Eau</i>	Variable*
<i>Mix bisulfite</i>	85 µL
<i>DNA Protect buffer</i>	35 µL

* Le volume total d'ADN et d'eau doit être de 20 µL

- Programme de température pour la conversion au bisulfite sur le thermocycleur :

<i>Etape</i>	<i>Durée</i>	<i>Température optimale</i>
<i>Dénaturation</i>	5 minutes	95°C
<i>Incubation</i>	25 minutes	60°C
<i>Dénaturation</i>	5 minutes	95°C
<i>Incubation</i>	85 minutes	60°C
<i>Dénaturation</i>	5 minutes	95°C
<i>Incubation</i>	175 minutes	60°C
<i>Hold</i>	Indéfini	20°C

L'ADN converti est ensuite lavé selon le protocole suivant :

- Centrifuger brièvement les tubes contenant les réactions à 650 g
- Ajouter 560 µL de tampon BL contenant 10 µg/mL de carrier RNA resuspendu préalablement dans de l'eau sans RNase dans chaque échantillon
- Placer chaque échantillon dans une colonne EpiTect spin, centrifuger 1 minute à 15 000 g, jeter l'éluat et remplacer la colonne dans le tube de collection
- Ajouter 500 µL de tampon BW préalablement supplémenté d'éthanol 96 – 100%, centrifuger 1 minute à 15 000 g, jeter l'éluat et remplacer la colonne dans le tube de collection
- Ajouter 500 µL de tampon BD préalablement supplémenté d'éthanol 96 – 100% et incubé 1 minutes à température ambiante
- Centrifuger 1 minute à 15 000 g, jeter l'éluat et remplacer la colonne dans le tube de collection
- Ajouter 500 µL de tampon BW préalablement supplémenté d'éthanol 96 – 100%, centrifuger 1 minute à 15 000 g, jeter l'éluat et remplacer la colonne dans le tube de collection
- Répéter l'étape précédente
- Placer la colonne dans un nouveau tube de collection et centrifuger 1 minute à 15 000 g
- Placer la colonne dans tube eppendorf de 1,5 mL et incubé 5 minutes à 56°C
- Placer la colonne dans nouveau tube eppendorf de 1,5 mL, ajouter 20 µL de tampon d'élution EB directement sur la membrane de la colonne et centrifuger 1 minute à 15 000 g

L'ADNg converti au bisulfite et lavé est ensuite dosé par fluorométrie à l'aide d'un Qubit Fluorometer et du kit Qubit ssDNA assay (Thermo Scientific).

c. Analyse des courbes de fusion à haute résolution (HRM PCR)

La HRM PCR est ensuite effectuée à l'aide d'un kit EpiTect HRM PCR (Qiagen) selon le protocole suivant :

- Préparer le mix suivant pour un échantillon

Réactif	Volume	Concentration finale
2x EpiTect HRM PCR Master Mix	5 µL	1X
Mix d'amorces sens et antisens (10 µM chacune)	0,75 µL	0,75 µM d'amorce sens 0,75 µM d'amorce antisens
Eau sans RNase	Variable*	
ADN converti au bisulfite	Variable*	10 ng/réaction

* Le volume total d'ADN et d'eau doit être de 4,25 µL

- Programme d'amplification pour la HRM PCR réalisée à l'aide de la machine AriaMx (Agilent)

Etape	Durée	Température	Commentaires
Activation	5 minutes	95°C	Activation de la polymérase HotStarTaq
Dénaturation	10 secondes	95°C	
Hybridation	30 secondes	55°C	45 cycles
Extension	10 secondes	72°C	
Analyse HRM	2 secondes	65 à 95°C Augmentation de 0,2°C	Mesure de la fluorescence tous les 0,2°C

Lors de chaque réaction de HRM PCR, les contrôles ADN converti au bisulfite 100% méthylé, ADN converti au bisulfite 100% non méthylé et ADN non converti provenant du kit EpiTect PCR Control DNA Set (Qiagen) sont utilisés. Un contrôle négatif avec de l'eau sans RNase est également effectué.

Les amorces de HRM PCR sont élaborées à l'aide du logiciel Methyl Primer Express v1.0 afin d'étudier l'état de méthylation d'1 ou 2 CpGs par amplicon et en faisant attention à ne pas avoir de CpG dans les séquences cibles des amorces. La listes des amorces utilisées pour ce projet figure dans le Tableau 9.

Gène	Gène ID	CpG	Amorce	Séquence de l'amorce
<i>FOXLI</i>	2300	cg17095797	Sens	5' TAAATAAATGAAGGAATAGTTTTTAAAA 3'
		cg19249420	Antisens	5' ATAAACAATCCTTATATTCTCAACC 3'
<i>MFAP5</i>	8076	cg18574995	Sens	5' GTTTGGGTGATAGGAGTAAAATT 3'
		cg04506282	Antisens	5' TCCCCTTTATTCCTTAAATTCT 3'
<i>NFATC2</i>	4773	cg00498368	Sens	5' TTTAGATGAATAGTGTTTTGGG 3'
			Antisens	5' ATTATCATTTTCCTTCCTCTACTTC 3'

Tableau 9 : Séquence des amorces utilisées en HRM PCR.

Les données acquises lors de la HRM PCR sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Agilent Aria Mx v1.5 (Agilent). La pureté de l'amplicon est vérifiée en contrôlant l'absence du pic de dissociation des produits doubles brins pour l'eau et l'ADN non converti au bisulfite et la présence d'un seul pic pour le contrôle ADN converti au bisulfite 100% méthylé et d'un seul pic pour le contrôle ADN converti au bisulfite 100% non méthylé. La température de fusion de l'amplicon du contrôle ADN converti au bisulfite 100% méthylé doit également être supérieure

à celle de l'amplicon du contrôle ADN converti au bisulfite 100% non méthylé. La température de fusion de l'amplicon de notre échantillon indique si le CpG étudié est méthylé (même température de fusion que le contrôle ADN converti au bisulfite 100% méthylé) ou non méthylé (même température de fusion que le contrôle ADN converti au bisulfite 100% non méthylé).

III. Techniques de bioinformatique

Le profil transcriptomique et le profil méthylomique des fibroblastes dermiques des 8 contrôles et des 16 femmes ayant soufferts d'un cancer du sein et d'effets secondaires sévères des suites d'une radiothérapie (8 Grade 2 et 8 Grade 3) ont été étudiés pour identifier une signature moléculaire de la radiosensibilité et de mieux comprendre les mécanismes responsables.

1. Analyse d'expression par séquençage de l'ARN

a. Séquençage en paire (« paired-end »)

L'analyse du transcriptome a été effectuée sur les ARNs de fibroblastes dermiques en culture. Les ARNs totaux ont été extraits des cellules entre les passages 8 à 10 et préparés en librairies à l'aide du kit TruSeq RNA Library Prep v2 (Illumina). Puis, un séquençage en paire a été effectué au Laboratoire de Génomique et Radiobiologie de la Kératopoïèse (LGRK, Evry, France) à l'aide d'un séquenceur HiSeq4000 (Illumina) avec des tailles d'inserts (reads) de 100 paires de bases.

b. Traitement des données brutes et alignement des séquences

Le contrôle de la qualité du séquençage a été effectué au LGRK à l'aide de l'outil FastQC 0.11.7 avant et après avoir enlevé les adaptateurs avec Cutadapt 1.13. Les reads ont ensuite été alignés sur le génome humain (version GRCh37/hg19) à l'aide du programme HISAT2 2.0.5. Pour chaque gène, les séquences ont été alignées sur tous les exons connus de tous les isoformes. Les fichiers BAM ont ensuite été extraits à l'aide de l'outil SAMtools 1.3.1 et les reads ont été comptés avec la fonction HtSeq-count de HtSeq 0.6.1.

c. Analyse des données de séquençage ARN

Pour l'analyse des reads, le logiciel R est utilisé avec différentes librairies. La librairie DESeq2 est utilisée notamment pour identifier les gènes différentiellement exprimés entre les différents groupes et pour les analyses en composantes principales (ACP). La librairie pheatmap est utilisée pour classer les échantillons par regroupement hiérarchiques et la librairie org.Hs.eg.db est utilisée pour l'annotation des gènes. Les librairies ggplot2 et RColorBrewer sont utilisés pour éditer les différentes figures.

2. Analyse de la méthylation de l'ADNg

Pour analyser la méthylation de l'ADNg, les puces Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina) ont été utilisées par la société Integrigen (Evry, France) pour étudier l'état de méthylation de plus de 850 000 CpGs dans l'ensemble du génome. Les données brutes générées ont ensuite été traitées par la société AltraBio (Lyon, France).

IV. Techniques de biochimie

1. Extraction des protéines

Les protéines sont extraites depuis les cellules en culture selon le protocole suivant :

- Enlever le milieu de culture et rincer les cellules avec du DPBS
- Lyser les cellules avec du tampon RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay) (50mM Tris-HCl pH = 8, 150 mM NaCl, 1,5 mM KCl, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% Triton X-100, 1 mM EDTA) supplémenté extemporanément avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete (Roche Diagnostics) et d'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (5 mM NaF, 50 mM β -glycérophosphate et 5 mM orthovanadate)
- Gratter le tapis cellulaire à l'aide d'un grattoir

- Transférer le lysat dans un tube eppendorf de 1,5 mL et laisser incuber sur glace 30 minutes en vortexant toutes les 10 minutes
- Centrifuger 15 minutes à 4 °C à 14 000 g
- Récupérer le surnageant et le conserver dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 mL à -80°C

2. Dosage des protéines

La concentration des protéines est réalisée à l'aide du kit BCA Protein Assay (Pierce Technologies) selon le protocole suivant :

- Faire une gamme étalon avec un facteur de dilution 2 à partir de l'albumine de sérum bovin (BSA) fournie dans le kit. Faire des dilutions à partir de la BSA fournie est à une concentration de 2 mg/mL jusqu'à une dilution à 0,125 mg/mL
- Si besoin, diluer les échantillons dans du RIPA pour que l'absorbance mesurée soit dans la gamme
- Déposer 25 µL de la gamme et des échantillons en duplicatas dans une plaque 96 puits adaptée au spectrophotomètre. Déposer également 25 µL de tampon RIPA pour faire le blanc
- Préparer le mix réactionnel en mélangeant les solutions A et B du kit en sachant que la solution B doit être diluée au 1/50 dans la solution A
- Distribuer 200 µL du mix réactionnel dans chaque puits de la plaque et sceller la plaque à l'aide d'un film
- Incuber 30 minutes à 37°C
- Enlever le film et éclater les bulles à l'aide d'une aiguille
- Lire la plaque dans un spectrophotomètre à 562 nm

Pour calculer les concentrations en protéines de chaque échantillon, l'absorbance du blanc est soustraite à l'absorbance de chaque échantillon. Les points de la gamme représentent une droite linéaire dont l'équation est $\text{Absorbance} = a \times \text{Concentration de protéines}$, a étant le coefficient directeur de la droite.

Pour chaque échantillon d'intérêt, la moyenne des duplicatas est calculée et la concentration de protéines est déterminée à l'aide de l'équation de droite : $\text{Concentration de protéines de l'échantillon d'intérêt} = (\text{Moyenne de l'absorbance de l'échantillon d'intérêt} / a) \times \text{Facteur de dilution}$.

3. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

Les protéines sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) permettant de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire et leurs propriétés physico-chimiques en condition dénaturante selon le protocole suivant :

- Préparer 20 µg de protéines dans du tampon Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, Bleu de Bromophénol 0,01%, Glycérol 10%, SDS 2%, DTT 50 mM) et dénaturer 5 minutes à 95°C
- Déposer les protéines dans un gel de polyacrylamide disposé dans un système Mini Protean III (Biorad) avec du tampon de migration TG-SDS (Euromedex) (Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%). Le gel de polyacrylamide est composé d'une première partie appelée gel de concentration (Acrylamide/bisacrylamide (37,5/2) 4%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%, Persulfate d'ammonium (APS) 0,05%, N,N,N',N'-TetraMéthylEthyleneDiamine (TEMED) 0,1%) permettant la concentration des protéines et d'une deuxième partie appelée gel de séparation (Acrylamide/bisacrylamide

(37,5/2) 8 à 15%, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,05%, TEMED 0,1%)
permettant la séparation des protéines

4. Transfert et immuno-détection des protéines

Lorsque les protéines sont séparées par le gel SDS-PAGE, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose dont la taille des pores est de 0,2 µm (Biorad) selon le protocole suivant :

- Imbiber la membrane de nitrocellulose quelques secondes dans le tampon de transfert TG-Ethanol 20% (25 mM Tris-HCl pH 8, Glycine 192 mM, Ethanol 20%)
- Réaliser le montage suivant dans une cassette de montage (côté noire de la cassette : cathode) :



- Plonger le montage dans une cuve (système Mini Trans-Blot, Biorad) contenant le tampon de transfert et un bloc froid
- Lancer le transfert 2h30 à 4°C à 220 mA (ampérage constant)
- Vérifier le transfert sur la membrane avec une coloration rouge ponceau et rincer la membrane avec de l'eau distillée
- Saturer la membrane pendant 1h à température ambiante avec une solution de blocage contenant 5% de BSA diluée dans du TBS supplémenté de 0,1% Tween-20
- Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de TBS-T 0,1% + BSA 5% sous agitation douce pendant une nuit à 4°C
- Rincer la membrane 3 fois 5 minutes avec du TBS-T 0,1%

- Incuber la membrane avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin ou de souris couplé à la peroxydase pendant 1h à température ambiante sous agitation douce
- Rincer la membrane 3 fois 5 minutes avec du TBS-T 0,1%
- Incuber la membrane 5 minutes avec le réactif d'électrochimiluminescence SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)
- Détecter le signal à l'aide de la caméra Fusion Fx system (Vilber Lourmat)
- Quantifier le signal à l'aide du logiciel GelAnalyzer

Protéine	Fournisseur	Référence
Actine	Abcam	ab8227
Caspase 3	CST	#9662
LC3	Sigma Aldrich	L7543
NFATC2	CST	4389
p62	Gene Tex	GTX629890
PARP	CST	#9542
p-ATM (Ser 1981)	CST	#5883
p-Chk2 (Thr 68)	CST	#2197
p-p53 (Ser 15)	CST	#9284
Vinculin	Sigma Aldrich	v9131
XRCC1	Invitrogen	MA512071
XRCC5	Invitrogen	PA517454
Anti-IgG souris	Biorad	#1706516
Anti-IgG lapin	Biorad	#1706515
IgG lapin	Diagenode	C15410206

Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés pour détecter les protéines en western blot.

5. Co-Immunoprécipitation

Pour immunoprécipiter une protéine d'intérêt et étudier ses partenaires, le protocole suivant est utilisé :

- Lysér les cellules d'un flacon 175 cm² avec 500 µL de tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM DTT) supplémenté extemporanément avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases cOmplete (Roche Diagnostics) et d'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (5 mM NaF, 50 mM β -glycérophosphate et 5 mM orthovanadate)
- Transférer le lysat dans un tube eppendorf de 1,5 mL et laisser incuber sur glace 30 minutes en vortexant toutes les 10 minutes
- Centrifuger 15 minutes à 4 °C à 14 000 g
- Récupérer le surnageant et le conserver dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 mL
- Doser la concentration en protéines comme décrit précédemment
- Laver 1 mg de billes magnétiques couplées à la protéine A Protein A SureBeads (Biorads) par condition (3 conditions par échantillon : pré-clearing, contrôle négatif IgG et anticorps contre la protéine à immunoprécipiter) 3 fois avec 1 mL de PBS-N (PBS 1X, 1% NP-40)
- Resuspendre 1 mg de billes magnétiques avec 2 x 500 µg de protéines dosées précédemment et agiter doucement pendant 3 heures à 4°C (pré-clearing)
- Resuspendre 1 mg de billes magnétiques lavées dans 250 µL de PBS-N, ajouter 5 µL d'anticorps dirigée contre la protéine à immunoprécipiter ou d'IgG contrôle de la même espèce que l'anticorps d'intérêt et mettre sous agitation douce 2 heures à 4°C (conjugation)
- Laver les billes magnétiques conjuguées (avec IgG contrôle ou anticorps d'intérêt) 3 fois avec du PBS-N et les resuspendre avec 500 µg de protéines

- Mettre les billes magnétiques sous agitation douce pendant une nuit à 4°C
- Laver doucement les billes magnétiques 5 fois avec du PBS-N, les resuspendre dans 50 µL de tampon Laemmli et les dénaturer 5 minutes à 95°C
- Centrifuger les échantillons et magnétiser les billes pour ne pas les pipeter

Les étapes de migration dans un gel SDS-PAGE, de transfert et d'immuno-détection des protéines sont identiques à celles décrites précédemment.

V. Techniques de microscopie

1. Microscopie en fluorescence

L'immunofluorescence (IF) est une technique d'immunomarquage permettant de mettre en évidence localisation et l'intensité d'expression de certaines protéines dans des cellules. Les IF réalisées dans ce projet sont effectuées selon le protocole suivant :

- Rincer 2 fois les fibroblastes cultivés sur lamelle dans une plaque 12 puits avec du PBS (Euromedex)
- Fixer les cellules 10 minutes dans du paraformaldéhyde 4%
- Rincer les lamelles avec les cellules fixées 3 fois 5 minutes avec du PBS sous agitation douce
- Incuber 10 minutes avec une solution de perméabilisation (0,1% Triton, 0,1 M Glycine, PBS 1X)
- Rincer 3 fois 5 minutes avec du PBS sous agitation douce
- Bloquer les lamelles 1h dans le tampon de blocage à température ambiante (5% Goat serum, 2% BSA, 0,05% Tween-20, 0,1% Triton, PBS 1X)
- Incuber les cellules avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage sur la nuit à 4°C

- Rincer 3 fois 5 minutes avec du PBS sous agitation douce
- Incuber les cellules avec l'anticorps secondaire et le DAPI (1 µg/mL) 1h à température ambiante
- Rincer 3 fois 5 minutes avec du PBS sous agitation douce
- Faire le montage lame et lamelle avec le milieu de montage Lab Vision Permafluor Aqueous Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific)
- Conserver les lames à 4°C à l'abri de la lumière

Les anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence sont listés dans le Tableau 11. Pour révéler les protéines marquées, les cellules sont incubées avec des anticorps secondaires anti-IgG souris couplés à la sonde Alexa Fluor 488 ou 546 ou des anticorps secondaires anti-IgG lapin couplés à la sonde Alexa Fluor 488 ou 546 (Invitrogen).

Protéine	Fournisseur	Référence
53BP1	ThermoFisher Scientific	PA1-46147
NFATC2	Sigma Aldrich	HPA008789
γH2AX	Merck Milipore	05-636
Anti-souris AF488	ThermoFisher Scientific	A-11029
Anti-souris AF546	ThermoFisher Scientific	A-11030
Anti-lapin AF488	ThermoFisher Scientific	A-11034
Anti-lapin AF546	ThermoFisher Scientific	A-11035

Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés pour détecter les protéines en immunofluorescence.

2. Observations microscopiques

Les observations microscopiques sont ensuite effectuées sur un microscope inversé Nikon Eclipse Ti (Nikon) ou sur un microscope confocal Spectral SP5 (Leica).

Pour l'analyse des cassures doubles brins de l'ADN, les foci de 100 noyaux minimums par condition sont comptés.

Les images sont traitées à l'aide du logiciel Fiji ImageJ2.

VI. Analyses statistiques

Les données de ce travail de thèse sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type ou médiane $\pm$ minimum-maximum comme indiqué dans les légendes des figures). Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism v8.0 (GraphPad) et du logiciel R. Les différences à la moyenne sont considérées comme significatives lorsque la valeur $p < 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,000$

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Al-Daraji, Wael I., Karen R. Grant, Kerri Ryan, Angela Saxton, et Nick J. Reynolds. 2002. « Localization of Calcineurin/NFAT in Human Skin and Psoriasis and Inhibition of Calcineurin/NFAT Activation in Human Keratinocytes by Cyclosporin A ». *Journal of Investigative Dermatology* 118 (5): 779-88. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01709.x>.
- Alexander, Angela, Sheng-Li Cai, Jinhee Kim, Adrian Nanez, Mustafa Sahin, Kirsteen H. MacLean, Ken Inoki, et al. 2010. « ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (9): 4153-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913860107>.
- Álvarez, Susana, Almudena Blanco, Manuel Fresno, et Ma Ángeles Muñoz-Fernández. 2011. « TNF- α Contributes to Caspase-3 Independent Apoptosis in Neuroblastoma Cells: Role of NFAT ». *PLOS ONE* 6 (1): e16100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016100>.
- Andreassen, Christian Nicolaj, Jan Alsner, Marie Overgaard, et Jens Overgaard. 2003. « Prediction of Normal Tissue Radiosensitivity from Polymorphisms in Candidate Genes ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 69 (2): 127-35. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2003.09.010>.
- Andreassen, Christian Nicolaj, Jens Overgaard, et Jan Alsner. 2013. « Independent Prospective Validation of a Predictive Test for Risk of Radiation Induced Fibrosis Based on the Gene Expression Pattern in Fibroblasts Irradiated in Vitro ». *Radiotherapy and Oncology* 108 (3): 469-72. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.08.029>.
- Anscher, Mitchell S, Feng-Ming Kong, Katrina Andrews, Robert Clough, Lawrence B Marks, Gunilla Bentel, et Randy L Jirtle. 1998. « Plasma Transforming Growth Factor B1 as a Predictor of Radiation Pneumonitis ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 41 (5): 1029-35. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(98\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(98)00154-0).
- Arpin, Dominique, David Perol, Jean-Yves Blay, Lionel Falchero, Line Claude, Sylvie Vuillermoz-Blas, Isabelle Martel-Lafay, et al. 2005. « Early Variations of Circulating Interleukin-6 and Interleukin-10 Levels during Thoracic Radiotherapy Are Predictive for Radiation Pneumonitis ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (34): 8748-56. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.7145>.
- Azria, David, Olivier Riou, Florence Castan, Tan Dat Nguyen, Karine Peignaux, Claire Lemanski, Jean-Léon Lagrange, 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 (12): 1965-73. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.024>.
- Azzam, Edouard I., Jean-Paul Jay-Gerin, et Debkumar Pain. 2012. « Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury ». *Cancer letters* 327 (0): 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>.
- Badie, C., S. Dziwura, C. Raffy, T. Tsigani, G. Alsbeih, J. Moody, P. Finnon, E. Levine, D. Scott, et S. Bouffler. 2008. « Aberrant CDKN1A Transcriptional Response Associates with Abnormal Sensitivity to Radiation Treatment ». *British Journal of Cancer* 98 (11): 1845-51. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604381>.
- Baksh, Shairaz, Hans R. Widlund, Ashley A. Frazer-Abel, Jinyan Du, Susan Fosmire, David E. Fisher, James A. DeCaprio, Jaime F. Modiano, et Steven J. Burakoff. 2002. « NFATC2-Mediated Repression of Cyclin-Dependent Kinase 4 Expression ». *Molecular Cell* 10 (5): 1071-81. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00701-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00701-3).

- Banno, Tomohiro, Alix Gazel, et Miroslav Blumenberg. 2004. « Effects of Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) in Epidermal Keratinocytes Revealed Using Global Transcriptional Profiling ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (31): 32633-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400642200>.
- Barber, James B. P., Wayne Burrill, Anne R. Spreadborough, Ed Levine, Coleen Warren, Anne E. Kiltie, Steve A. Roberts, et David Scott. 2000. « Relationship between in Vitro Chromosomal Radiosensitivity of Peripheral Blood Lymphocytes and the Expression of Normal Tissue Damage Following Radiotherapy for Breast Cancer ». *Radiotherapy and Oncology* 55 (2): 179-86. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(99\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(99)00158-9).
- Barnett, Gillian C, Charlotte E Coles, Rebecca M Elliott, Caroline Baynes, Craig Luccarini, Don Conroy, Jennifer S Wilkinson, et al. 2012. « Independent Validation of Genes and Polymorphisms Reported to Be Associated with Radiation Toxicity: A Prospective Analysis Study ». *The Lancet Oncology* 13 (1): 65-77. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70302-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70302-3).
- Barnett, Gillian C., Deborah Thompson, Laura Fachal, Sarah Kerns, Chris Talbot, Rebecca M. Elliott, Leila Dorling, et al. 2014. « A Genome Wide Association Study (GWAS) Providing Evidence of an Association between Common Genetic Variants and Late Radiotherapy Toxicity ». *Radiotherapy and Oncology* 111 (2): 178-85. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.02.012>.
- Bauer, DAVID, ELIZABETH Mazzio, et KARAM F.A. Soliman. 2019. « Whole Transcriptomic Analysis of Apigenin on TNF α Immuno-activated MDA-MB-231 Breast Cancer Cells ». *Cancer Genomics & Proteomics* 16 (6): 421-32. <https://doi.org/10.21873/cgp.20146>.
- Baumgart, Nai-ming Chen, Jin-San Zhang, Daniel D. Billadeau, Irina Gaisina, Alan P. Kozikowski, Shiv Singh, et al. 2016. « GSK-3 β governs inflammation-induced NFATC2 signaling hubs to promote pancreatic cancer progression ». *Molecular cancer therapeutics* 15 (3): 491-502. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0309>.
- Baumgart, ELIZABETH GLESEL, GARIMA SINGH, NAI-MING CHEN, KRISTINA REUTLINGER, JINSAN ZHANG, DANIEL D. BILLADEAU, et al. 2012. « Restricted Heterochromatin Formation Links NFATC2 Repressor Activity With Growth Promotion in Pancreatic Cancer ». *Gastroenterology* 142 (2): 388-98.e1-7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.11.001>.
- B'chir, Wafa, Anne-Catherine Maurin, Valérie Carraro, Julien Averous, Céline Jousse, Yuki Muranishi, Laurent Parry, Georges Stepien, Pierre Fafournoux, et Alain Bruhat. 2013. « The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression ». *Nucleic Acids Research* 41 (16): 7683-99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt563>.
- Becquerel. 1896. « Sur les radiations invisibles émises par les corps phosphorescents ». Académie des Sciences de Paris. https://www.academie-sciences.fr/pdf/dossiers/Becquerel/Becquerel_pdf/CR1896_p501.pdf.
- Bercovich, Eyal, et Marcia C. Javitt. 2018. « Medical Imaging: From Roentgen to the Digital Revolution, and Beyond ». *Rambam Maimonides Medical Journal* 9 (4). <https://doi.org/10.5041/RMMJ.10355>.
- Berkey, Franklin J. 2010. « Managing the Adverse Effects of Radiation Therapy ». *American Family Physician* 82 (4): 381-88.
- Berven, Elis. 1962. « The Development and Organization of Therapeutic Radiology in Sweden ». *Radiology* 79 (5): 829-41. <https://doi.org/10.1148/79.5.829>.
- Bionda, Clara, Elie Hadchity, Gersende Alphonse, Olivier Chapet, Robert Rousson, Claire Rodriguez-Lafrasse, et Dominique Ardail. 2007. « Radioresistance of Human Carcinoma Cells Is Correlated to a Defect in Raft Membrane Clustering ». *Free Radical*

- Biology and Medicine* 43 (5): 681-94.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.031>.
- Bodgi, Larry, et Nicolas Foray. 2016. « The Nucleo-Shuttling of the ATM Protein as a Basis for a Novel Theory of Radiation Response: Resolution of the Linear-Quadratic Model ». *International Journal of Radiation Biology* 92 (3): 117-31.
<https://doi.org/10.3109/09553002.2016.1135260>.
- Bodgi, Larry, Adeline Granzotto, Clément Devic, Guillaume Vogin, Annick Lesne, Jean-François Bottollier-Depois, Jean-Marc Victor, Mira Maalouf, Georges Fares, et Nicolas Foray. 2013. « A Single Formula to Describe Radiation-Induced Protein Relocalization: Towards a Mathematical Definition of Individual Radiosensitivity ». *Journal of Theoretical Biology* 333 (septembre): 135-45.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.05.020>.
- Bollinger, Claudia R., Volker Teichgräber, et Erich Gulbins. 2005. « Ceramide-Enriched Membrane Domains ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells, 1746 (3): 284-94.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.09.001>.
- Bordón, Elisa, Luis Alberto Henríquez Hernández, Pedro C. Lara, Beatriz Pinar, Fausto Fontes, Carlos Rodríguez Gallego, et Marta Lloret. 2009. « Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs) ». *Radiation Oncology* 4 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-58>.
- Bordón, Elisa, Luis Alberto Henríquez-Hernández, Pedro C. Lara, Ana Ruíz, Beatriz Pinar, Carlos Rodríguez-Gallego, et Marta Lloret. 2010. « Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs) ». *Radiation Oncology* 5 (1): 4.
<https://doi.org/10.1186/1748-717X-5-4>.
- Bordón, Elisa, Luis Alberto Henríquez-Hernández, Pedro Carlos Lara, Beatriz Pinar, Carlos Rodríguez-Gallego, et Marta Lloret. 2011. « Role of CD4 and CD8 T-Lymphocytes, B-Lymphocytes and Natural Killer Cells in the Prediction of Radiation-Induced Late Toxicity in Cervical Cancer Patients ». *International Journal of Radiation Biology* 87 (4): 424-31. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.537433>.
- Bourton, Emma C, Piers N Plowman, Daniel Smith, Colin F Arlett, et Christopher N Parris. 2011. « Prolonged expression of the γ -H2AX DNA repair biomarker correlates with excess acute and chronic toxicity from radiotherapy treatment ». *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer* 129 (12): 2928-34.
<https://doi.org/10.1002/ijc.25953>.
- Brock, William A., Susan L. Tucker, Fady B. Geara, Ingela Turesson, Jennifer Wike, Jan Nyman, et Lester J. Peters. 1995. « Fibroblast Radiosensitivity versus Acute and Late Normal Skin Responses in Patients Treated for Breast Cancer ». *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 32 (5): 1371-79.
[https://doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)00068-A](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)00068-A).
- Brookes, Paul S., Yisang Yoon, James L. Robotham, M. W. Anders, et Shey-Shing Sheu. 2004. « Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287 (4): C817-33.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>.
- Budanov, Andrei V., et Michael Karin. 2008. « The p53-regulated Sestrin gene products inhibit mTOR signaling ». *Cell* 134 (3): 451-60. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.028>.
- Burger, Kaspar, Ruth F. Ketley, et Monika Gullerova. 2019. « Beyond the Trinity of ATM, ATR, and DNA-PK: Multiple Kinases Shape the DNA Damage Response in Concert

- With RNA Metabolism ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 6. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00061>.
- Burnet, N. G., R. Wurm, J. R. Yarnold, J. H. Peacock, J. Nyman, et I. Turesson. 1992. « Prediction of Normal-Tissue Tolerance to Radiotherapy from in-Vitro Cellular Radiation Sensitivity ». *The Lancet* 339 (8809): 1570-71. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91833-T](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91833-T).
- Burt, Lindsay M., Jian Ying, Matthew M. Poppe, Gita Suneja, et David K. Gaffney. 2017. « Risk of Secondary Malignancies after Radiation Therapy for Breast Cancer: Comprehensive Results ». *Breast (Edinburgh, Scotland)* 35 (octobre): 122-29. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2017.07.004>.
- Cadet, Jean, Sophie Bellon, Thierry Douki, Sandrine Frelon, Didier Gasparutto, Evelyne Muller, Jean-Pierre Pouget, Jean-Luc Ravanat, Anthony Romieu, et Sylvie Sauvaigo. 2004. « Radiation-Induced DNA Damage: Formation, Measurement, and Biochemical Features ». *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer* 23 (1): 33-43. <https://doi.org/10.1615/jenvpathtoxoncol.v23.i1.30>.
- Cadet, Jean, Thierry Douki, Didier Gasparutto, et Jean-Luc Ravanat. 2003. « Oxidative Damage to DNA: Formation, Measurement and Biochemical Features ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Oxidative DNA Damage and its Repair Base Excision Repair, 531 (1): 5-23. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.09.001>.
- CADET, JEAN, STEFFEN LOFT, RYSZARD OLINSKI, MARK D. EVANS, KAROL BIALKOWSKI, J. RICHARD WAGNER, PETER C. DEDON, PETER MØLLER, MARC M. GREENBERG, et MARCUS S. COOKE. 2012. « Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids ». *Free radical research* 46 (4). <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.659248>.
- Cai, Xu-Wei, Kerby A. Shedden, Shang-Hu Yuan, Mary A. Davis, Lu-Ying Xu, Cong-Ying Xie, Xiao-Long Fu, Theodore S. Lawrence, David M. Lubman, et Feng-Ming (Spring) Kong. 2011. « Baseline Plasma Proteomic Analysis to Identify Biomarkers That Predict Radiation-Induced Lung Toxicity in Patients Receiving Radiation for Non-Small Cell Lung Cancer ». *Journal of Thoracic Oncology* 6 (6): 1073-78. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182152ba6>.
- Cai, Xu-Wei, Kerby Shedden, Xiaoping Ao, Mary Davis, Xiao-Long Fu, Theodore S. Lawrence, David M. Lubman, et Feng-Ming (Spring) Kong. 2010. « Plasma Proteomic Analysis May Identify New Markers for Radiation-Induced Lung Toxicity in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 77 (3): 867-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.01.038>.
- Caldecott, Keith W. 2008. « Single-Strand Break Repair and Genetic Disease ». *Nature Reviews Genetics* 9 (8): 619-31. <https://doi.org/10.1038/nrg2380>.
- Cannan, Wendy J., et David S. Pederson. 2016. « Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin ». *Journal of cellular physiology* 231 (1): 3-14. <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>.
- Canning, Matthew T., Stephanie L. Nay, Arely V. Peña, et Daniel B. Yarosh. 2006. « Calcineurin Inhibitors Reduce Nuclear Localization of Transcription Factor NFAT in UV-Irradiated Keratinocytes and Reduce DNA Repair ». *Journal of Molecular Histology* 37 (5-7): 285-91. <https://doi.org/10.1007/s10735-006-9034-9>.
- Carvalho, Lilian D. S., Leonardo K. Teixeira, Nina Carrossini, Anita T. N. Caldeira, K. Mark Ansel, Anjana Rao, et João P. B. Viola. 2007. « The NFAT1 Transcription Factor Is a

- Repressor of Cyclin A2 Gene Expression ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (14): 1789-95. <https://doi.org/10.4161/cc.6.14.4473>.
- Castedo, Maria, Jean-Luc Perfettini, Thomas Roumier, Karine Andreau, Rene Medema, et Guido Kroemer. 2004. « Cell Death by Mitotic Catastrophe: A Molecular Definition ». *Oncogene* 23 (16): 2825-37. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207528>.
- Cecarini, Valentina, Jillian Gee, Evandro Fioretti, Manila Amici, Mauro Angeletti, Anna Maria Eleuteri, et Jeffrey N. Keller. 2007. « Protein Oxidation and Cellular Homeostasis: Emphasis on Metabolism ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773 (2): 93-104. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.039>.
- Chang, Hyo Won, Jong-Lyel Roh, Eun-Jeong Jeong, Sang-wook Lee, Seung-Whan Kim, Seung-Ho Choi, Sung-Kyung Park, et Sang Yoon Kim. 2008. « Wnt Signaling Controls Radiosensitivity via Cyclooxygenase-2-Mediated Ku Expression in Head and Neck Cancer ». *International Journal of Cancer* 122 (1): 100-107. <https://doi.org/10.1002/ijc.23069>.
- Chaurasia, Madhuri, Anant Narayan Bhatt, Asmita Das, Bilikere S. Dwarakanath, et Kulbhushan Sharma. 2016. « Radiation-Induced Autophagy: Mechanisms and Consequences ». *Free Radical Research* 50 (3): 273-90. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1129534>.
- Chaurasia, Madhuri, Swapnil Gupta, Asmita Das, B.S. Dwarakanath, Anne Simonsen, et Kulbhushan Sharma. 2019. « Radiation induces EIF2AK3/PERK and ERN1/IRE1 mediated pro-survival autophagy ». *Autophagy* 15 (8): 1391-1406. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1582973>.
- Cheema, Amrita K., Scott Grindrod, Xiaogang Zhong, Shreyans Jain, Smrithi S. Menon, Khyati Y. Mehta, Simeng Suy, et al. 2019. « Discovery of Metabolic Biomarkers Predicting Radiation Therapy Late Effects in Prostate Cancer Patients ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1164: 141-50. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22254-3_11.
- Chen, E. S., B. M. Greenlee, M. Wills-Karp, et D. R. Moller. 2001. « Attenuation of Lung Inflammation and Fibrosis in Interferon-Gamma-Deficient Mice after Intratracheal Bleomycin ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 24 (5): 545-55. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.24.5.4064>.
- Chen, Mercy S., Wendy A. Woodward, Fariba Behbod, Sirisha Peddibhotla, Maria P. Alfaro, Thomas A. Buchholz, et Jeffrey M. Rosen. 2007. « Wnt/Beta-Catenin Mediates Radiation Resistance of Sca1+ Progenitors in an Immortalized Mammary Gland Cell Line ». *Journal of Cell Science* 120 (Pt 3): 468-77. <https://doi.org/10.1242/jcs.03348>.
- Chen, Min, et Kathleen L. O'Connor. 2005. « Integrin Alpha6beta4 Promotes Expression of Autotaxin/ENPP2 Autocrine Motility Factor in Breast Carcinoma Cells ». *Oncogene* 24 (32): 5125-30. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208729>.
- Chen, Xiaoyan, Ping Wang, Fei Guo, Xiangdong Wang, Juan Wang, Jinping Xu, Dexiao Yuan, Jianghong Zhang, et Chunlin Shao. 2017. « Autophagy Enhanced the Radioresistance of Non-Small Cell Lung Cancer by Regulating ROS Level under Hypoxia Condition ». *International Journal of Radiation Biology* 93 (8): 764-70. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1325025>.
- Chen, Yuhchyan, Ollivier Hyrien, Jacqueline Williams, Paul Okunieff, Therese Smudzin, et Philip Rubin. 2005. « Interleukin (IL)-1A and IL-6: Applications to the Predictive Diagnostic Testing of Radiation Pneumonitis ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 62 (1): 260-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.01.041>.
- Chen, Yunzhao, Dandan Wang, Hao Peng, Xi Chen, Xueping Han, Jie Yu, Wenjie Wang, et al. 2019. « Epigenetically Upregulated Oncoprotein PLCE1 Drives Esophageal Carcinoma Angiogenesis and Proliferation via Activating the PI-PLC ϵ -NF-KB Signaling Pathway

- and VEGF-C/ Bcl-2 Expression ». *Molecular Cancer* 18 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0930-x>.
- Chen, Yunzhao, Huahua Xin, Hao Peng, Qi Shi, Menglu Li, Jie Yu, Yanxia Tian, et al. 2020. « Hypomethylation-Linked Activation of PLCE1 Impedes Autophagy and Promotes Tumorigenesis through MDM2-Mediated Ubiquitination and Destabilization of P53 ». *Cancer Research*, février. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1912>.
- Choi, Eun-Mi, Jee-In Heo, Jin-Young Oh, Young-Myeong Kim, Kwon-Soo Ha, Jong-Il Kim, et Jeong A. Han. 2005. « COX-2 Regulates P53 Activity and Inhibits DNA Damage-Induced Apoptosis ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (4): 1107-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.072>.
- Ciccarone, Fabio, Stefano Tagliatesta, Paola Caiafa, et Michele Zampieri. 2018. « DNA Methylation Dynamics in Aging: How Far Are We from Understanding the Mechanisms? » *Mechanisms of Ageing and Development*, Epigenetics in Ageing and Development, 174 (septembre): 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.12.002>.
- Classen, Fabian, Philip Kranz, Helena Riffkin, Mosche Pumpsch, Alexandra Wolf, Kirsten Göpelt, Melanie Baumann, Jennifer Baumann, Ulf Brockmeier, et Eric Metzen. 2019. « Autophagy Induced by Ionizing Radiation Promotes Cell Death over Survival in Human Colorectal Cancer Cells ». *Experimental Cell Research* 374 (1): 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.11.004>.
- Cohen, David E., et Randie H. Kim. 2017. « The Legacy of the Radium Girls ». *JAMA Dermatology* 153 (8): 801-801. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2017.2576>.
- Colis, Laureen C., Paromita Raychaudhury, et Ashis K. Basu. 2008. « Mutational Specificity of γ -Radiation-Induced Guanine–Thymine and Thymine–Guanine Intrastrand Cross-Links in Mammalian Cells and Translesion Synthesis Past the Guanine–Thymine Lesion by Human DNA Polymerase η ». *Biochemistry* 47 (31): 8070-79. <https://doi.org/10.1021/bi800529f>.
- « Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) ». s. d., 80.
- Connell, Philip P., et Samuel Hellman. 2009. « Advances in Radiotherapy and Implications for the Next Century: A Historical Perspective ». *Cancer Research* 69 (2): 383-92. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6871>.
- COPERNIC project investigators, Adeline Granzotto, Mohamed Amine Benadjaoud, Guillaume Vogin, Clément Devic, Mélanie L. Ferlazzo, Larry Bodgi, 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 ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 94 (3): 450-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.11.013>.
- Cordes, N., M. A. Blaese, L. Plasswilm, H. P. Rodemann, et D. Van Beuningen. 2003. « Fibronectin and Laminin Increase Resistance to Ionizing Radiation and the Cytotoxic Drug Ukrain in Human Tumour and Normal Cells in Vitro ». *International Journal of Radiation Biology* 79 (9): 709-20. <https://doi.org/10.1080/095533000310001610240>.
- Corre, Isabelle, Colin Niaudet, et Francois Paris. 2010. « Plasma Membrane Signaling Induced by Ionizing Radiation ». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, ESF-EMBO Conference: Spatio-Temporal Radiation Biology: Transdisciplinary Advances for Biomedical Applications, 704 (1): 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2010.01.014>.
- Cosset, J. -M. 2010. « Effets secondaires des rayonnements sur les tissus sains et organes à risque ». *Cancer/Radiothérapie*, Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains, 14 (4): 228-31. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2010.04.004>.
- Crichton, Diane, Simon Wilkinson, Jim O'Prey, Nelofer Syed, Paul Smith, Paul R. Harrison, Milena Gasco, Ornella Garrone, Tim Crook, et Kevin M. Ryan. 2006. « DRAM, a P53-

- Induced Modulator of Autophagy, Is Critical for Apoptosis ». *Cell* 126 (1): 121-34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.034>.
- Cunliffe, P. N., J. R. Mann, A. H. Cameron, K. D. Roberts, et H. W. C. Ward. 1975. « Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia ». *The British Journal of Radiology* 48 (569): 374-76. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-48-569-374>.
- Cuperus, Edwin, Roos Leguit, Miriam Albrechts, et Johan Toonstra. 2013. « Post Radiation Skin Tumors: Basal Cell Carcinomas, Squamous Cell Carcinomas and Angiosarcomas. A Review of This Late Effect of Radiotherapy ». *European Journal of Dermatology: EJD* 23 (6): 749-57. <https://doi.org/10.1684/ejd.2013.2106>.
- Curie, et Becquerel. 1901. « Action physiologique des rayons du radium ». Académie des Sciences de Paris. https://www.academie-sciences.fr/pdf/dossiers/Curie/Curie_pdf/CR1901_p1289_1291.pdf.
- Czarny, Piotr, Elzbieta Pawlowska, Jolanta Bialkowska-Warzecha, Kai Kaarniranta, et Janusz Blasiak. 2015. « Autophagy in DNA Damage Response ». *International Journal of Molecular Sciences* 16 (2): 2641-62. <https://doi.org/10.3390/ijms16022641>.
- D. W. Voerhinger, R. G. O'Neil, M. D. Story, et R. E. Meyn. 1997. « Modulating Ca² in radiation-induced apoptosis suppresses DNA fragmentation but does not enhance clonogenic survival ». *International Journal of Radiation Biology* 71 (3): 237-43. <https://doi.org/10.1080/095530097144102>.
- Daino, Kazuhiro, Sachiko Ichimura, et Mitsuru Neno. 2003. « Comprehensive Search for X-Ray-Responsive Elements and Binding Factors in the Regulatory Region of the GADD45a Gene ». *Journal of Radiation Research* 44 (4): 311-18. <https://doi.org/10.1269/jrr.44.311>.
- Danlos, et Bloch. 1901. « Note sur le traitement du lupus érythémateux par des applications du radium ». 1901. https://scholar-google-com.docelec.univ-lyon1.fr/scholar_lookup?journal=Ann+Dermatol+Syphilog&title=Note+sur+le+traitement+du+lupus+%C3%A9ryth%C3%A9mateux+par+des+applications+du+radium&volume=2&publication_year=1901&pages=986-8&.
- D'Arcy, Mark S. 2019. « Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy ». *Cell Biology International* 43 (6): 582-92. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- Decuypere, Jean-Paul, Geert Bultynck, et Jan B. Parys. 2011. « A Dual Role for Ca²⁺ in Autophagy Regulation ». *Cell Calcium*, Special issue on Ca²⁺ signaling mechanisms of cell survival and cell death, 50 (3): 242-50. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.04.001>.
- Deng, Chengcheng, Yu-Xin Lin, Xue-Kang Qi, Gui-Ping He, Yuchen Zhang, Hao-Jiong Zhang, Miao Xu, et al. 2018. « TNFRSF19 Inhibits TGFβ Signaling through Interaction with TGFβ Receptor Type I to Promote Tumorigenesis ». *Cancer Research* 78 (13): 3469-83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3205>.
- Dextraze, Marie-Eve, Tsvetan Gantchev, Sonia Girouard, et Darel Hunting. 2010. « DNA Interstrand Cross-Links Induced by Ionizing Radiation: An Unsung Lesion ». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, ESF-EMBO Conference: Spatio-Temporal Radiation Biology: Transdisciplinary Advances for Biomedical Applications, 704 (1): 101-7. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.12.007>.
- Di Maggio, Federica Maria, Luigi Minafra, Giusi Irma Forte, Francesco Paolo Cammarata, Domenico Lio, Cristina Messa, Maria Carla Gilardi, et Valentina Bravatà. 2015. « Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment ». *Journal of Inflammation (London, England)* 12 (février). <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0058-3>.

- Dikic, Ivan, et Zvulun Elazar. 2018. « Mechanism and Medical Implications of Mammalian Autophagy ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (6): 349-64. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>.
- Djuzenova, C., B. Mühl, R. Schakowski, U. Oppitz, et M. Flentje. 2004. « Normal Expression of DNA Repair Proteins, HMre11, Rad50 and Rad51 but Protracted Formation of Rad50 Containing Foci in X-Irradiated Skin Fibroblasts from Radiosensitive Cancer Patients ». *British Journal of Cancer* 90 (12): 2356-63. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601878>.
- Djuzenova, C. S., B. Mühl, M. Fehn, U. Oppitz, B. Müller, et M. Flentje. 2006. « Radiosensitivity in Breast Cancer Assessed by the Comet and Micronucleus Assays ». *British Journal of Cancer* 94 (8): 1194-1203. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603005>.
- Djuzenova, Cholpon S., Ines Elsner, Astrid Katzer, Eike Worschech, Luitpold V Distel, Michael Flentje, et Bülent Polat. 2013. « Radiosensitivity in breast cancer assessed by the histone γ -H2AX and 53BP1 foci ». *Radiation Oncology (London, England)* 8 (avril): 98. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-98>.
- Djuzenova, Cholpon S., Marcus Zimmermann, Astrid Katzer, Vanessa Fiedler, Luitpold V. Distel, Martin Gasser, Anna-Maria Waaga-Gasser, Michael Flentje, et Bülent Polat. 2015. « A prospective study on histone γ -H2AX and 53BP1 foci expression in rectal carcinoma patients: correlation with radiation therapy-induced outcome ». *BMC Cancer* 15 (novembre). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1890-9>.
- Dodson, Helen, Sally P. Wheatley, et Ciaran G. Morrison. 2007. « Involvement of Centrosome Amplification in Radiation-Induced Mitotic Catastrophe ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (3): 364-70. <https://doi.org/10.4161/cc.6.3.3834>.
- Dombrowsky, Annique C., Jannis Schauer, Matthias Sammer, Andreas Blutke, Dietrich W. M. Walsh, Benjamin Schwarz, Stefan Bartzsch, et al. 2019. « Acute Skin Damage and Late Radiation-Induced Fibrosis and Inflammation in Murine Ears after High-Dose Irradiation ». *Cancers* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/cancers11050727>.
- Dunlop, Rachael A., Ulf T. Brunk, et Kenneth J. Rodgers. 2009. « Oxidized Proteins: Mechanisms of Removal and Consequences of Accumulation ». *IUBMB Life* 61 (5): 522-27. <https://doi.org/10.1002/iub.189>.
- Eby, Michael T., Alan Jasmin, Arvind Kumar, Kiran Sharma, et Preet M. Chaudhary. 2000. « TAJ, a Novel Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Family, Activates the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway and Mediates Caspase-Independent Cell Death ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (20): 15336-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.15336>.
- Edimecheva, I. P., M. A. Kisel, O. I. Shadyro, A. P. Vlasov, et I. L. Yurkova. 1997. « The Damage to Phospholipids Caused by Free Radical Attack on Glycerol and Sphingosine Backbone ». *International Journal of Radiation Biology* 71 (5): 555-60. <https://doi.org/10.1080/095530097143888>.
- El Naqa, Issam, Sarah L. Kerns, James Coates, Yi Luo, Corey Speers, Catharine M.L. West, Barry S. Rosenstein, et Randall K. Ten Haken. 2017. « Radiogenomics and Radiotherapy Response Modeling ». *Physics in medicine and biology* 62 (16): R179-206. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/aa7c55>.
- ENCODE consortium. 2012. « An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome ». *Nature* 489 (7414): 57-74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>.
- Evans, Elizabeth S., Zafer Kocak, Su-Min Zhou, Daniel A. Kahn, Hong Huang, Donna R. Hollis, Kim L. Light, Mitchell S. Anscher, et Lawrence B. Marks. 2006. « Does Transforming Growth Factor-B1 Predict for Radiation-Induced Pneumonitis in Patients Treated for Lung Cancer? » *Cytokine* 35 (3): 186-92. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.07.021>.

- Fachal, Laura, Antonio Gómez-Caamaño, Gillian C. Barnett, Paula Peleteiro, Ana M. Carballo, Patricia Calvo-Crespo, Sarah L. Kerns, et al. 2014. « A Three-Stage Genome-Wide Association Study Identifies a Susceptibility Locus for Late Radiotherapy Toxicity at 2q24.1 ». *Nature Genetics* 46 (8): 891-94. <https://doi.org/10.1038/ng.3020>.
- Falck, J., N. Mailand, R. G. Syljuåsen, J. Bartek, et J. Lukas. 2001. « The ATM-Chk2-Cdc25A Checkpoint Pathway Guards against Radioresistant DNA Synthesis ». *Nature* 410 (6830): 842-47. <https://doi.org/10.1038/35071124>.
- Filomeni, G., D. De Zio, et F. Cecconi. 2015. « Oxidative Stress and Autophagy: The Clash between Damage and Metabolic Needs ». *Cell Death & Differentiation* 22 (3): 377-88. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>.
- Finnon, Paul, Sylwia Kabacik, Alan MacKay, Claudine Raffy, Roger A'Hern, Roger Owen, Christophe Badie, John Yarnold, et Simon Bouffler. 2012. « Correlation of in Vitro Lymphocyte Radiosensitivity and Gene Expression with Late Normal Tissue Reactions Following Curative Radiotherapy for Breast Cancer ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 105 (3): 329-36. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2012.10.007>.
- Flockhart, R. J., B. L. Diffey, P. M. Farr, J. Lloyd, et N. J. Reynolds. 2008. « NFAT regulates induction of COX-2 and apoptosis of keratinocytes in response to ultraviolet radiation exposure ». *The FASEB Journal* 22 (12): 4218-27. <https://doi.org/10.1096/fj.08-113076>.
- Foffa, Ilenia, Monica Cresci, et Maria Grazia Andreassi. 2009. « Health Risk and Biological Effects of Cardiac Ionising Imaging: From Epidemiology to Genes ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6 (6): 1882-93. <https://doi.org/10.3390/ijerph6061882>.
- Foray, N. 2013. « Victor Despeignes (1866–1937) : comment un hygiéniste devint le premier radiothérapeute de l'Histoire ». *Cancer/Radiothérapie* 17 (3): 244-54. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2013.01.012>.
- Foray, Nicolas, Catherine Colin, et Michel Bourguignon. 2012. « 100 Years of Individual Radiosensitivity: How We Have Forgotten the Evidence ». *Radiology* 264 (3): 627-31. <https://doi.org/10.1148/radiol.12112560>.
- Foray. 2013. « Radiosensibilité - L'évidence d'un facteur individuel ». *médecine/sciences* 29 (4): 397-403. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013294013>.
- Foro, Palmira, Manuel Algara, Joan Lozano, Nuria Rodriguez, Xavier Sanz, Erica Torres, Joan Carles, et al. 2014. « Relationship Between Radiation-Induced Apoptosis of T Lymphocytes and Chronic Toxicity in Patients With Prostate Cancer Treated by Radiation Therapy: A Prospective Study ». *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 88 (5): 1057-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.01.002>.
- Freund, Leopold, G. H. Lancashire, et Clarence A. Wright. 1904. *Elements of General Radio-Therapy for Practitioners*. New York : Rebman. <http://archive.org/details/elementsofgenera00freu>.
- Fuentes-Raspall, María J., Isabel Caragol, Carmen Alonso, Teresa Ramón y Cajal, David Fisas, Alejandro Seoane, Nerea Carvajal, Sandra Bonache, Orland Díez, et Sara Gutiérrez-Enríquez. 2015. « Apoptosis for Prediction of Radiotherapy Late Toxicity: Lymphocyte Subset Sensitivity and Potential Effect of TP53 Arg72Pro Polymorphism ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 20 (3): 371-82. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1056-2>.
- Fulda, Simone. 2013. « The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells ». *Cancer Biology & Therapy* 14 (11): 999-1004. <https://doi.org/10.4161/cbt.26428>.

- Gabriel, Christian H., Fridolin Gross, Martin Karl, Heike Stephanowitz, Anna Floriane Hennig, Melanie Weber, Stefanie Gryzik, et al. 2016. « Identification of Novel Nuclear Factor of Activated T Cell (NFAT)-associated Proteins in T Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (46): 24172-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.739326>.
- Galluzzi, Lorenzo, Ilio Vitale, Stuart A. Aaronson, John M. Abrams, Dieter Adam, Patrizia Agostinis, Emad S. Alnemri, et al. 2018. « Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 ». *Cell Death & Differentiation* 25 (3): 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- García-Lepe, Ulises Omar, et Rosa Ma Bermúdez-Cruz. 2019. « Mitochondrial Genome Maintenance: Damage and Repair Pathways ». *DNA Repair- An Update*, mars. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84627>.
- Garg, Paras, Ricky S. Joshi, Corey Watson, et Andrew J. Sharp. 2018. « A Survey of Inter-Individual Variation in DNA Methylation Identifies Environmentally Responsive Co-Regulated Networks of Epigenetic Variation in the Human Genome ». *PLOS Genetics* 14 (10): e1007707. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007707>.
- Geara, F. B., L. J. Peters, K. K. Ang, J. L. Wike, et W. A. Brock. 1993. « Prospective Comparison of in Vitro Normal Cell Radiosensitivity and Normal Tissue Reactions in Radiotherapy Patients ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 27 (5): 1173-79. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(93\)90540-c](https://doi.org/10.1016/0360-3016(93)90540-c).
- Gewirtz, David A., Molly L. Hilliker, et Eden N. Wilson. 2009. « Promotion of Autophagy as a Mechanism for Radiation Sensitization of Breast Tumor Cells ». *Radiotherapy and Oncology*, Special Issue on Molecular and Experimental Radiobiology Including papers from the 11th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, 92 (3): 323-28. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.05.022>.
- Gire, Véronique, et Vjekoslav Dulić. 2015. « Senescence from G2 arrest, revisited ». *Cell Cycle* 14 (3): 297-304. <https://doi.org/10.1080/15384101.2014.1000134>.
- Glick, Danielle, Sandra Barth, et Kay F. Macleod. 2010. « Autophagy: cellular and molecular mechanisms ». *The Journal of pathology* 221 (1): 3-12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>.
- Glover, D., J. B. Little, M. F. Lavin, et N. Gueven. 2003. « Low Dose Ionizing Radiation-Induced Activation of Connexin 43 Expression ». *International Journal of Radiation Biology* 79 (12): 955-64. <https://doi.org/10.1080/09553000310001632895>.
- Goto, Koichi, Tetsuro Kodama, Ikuo Sekine, Ryutaro Kakinuma, Kaoru Kubota, Fumihiko Hojo, Taketoshi Matsumoto, et al. 2001. « Serum Levels of KL-6 Are Useful Biomarkers for Severe Radiation Pneumonitis ». *Lung Cancer* 34 (1): 141-48. [https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(01\)00215-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(01)00215-X).
- Gotoff, Samuel P., Ebrahim Amirmokri, et Edwin J. Liebner. 1967. « Ataxia Telangiectasia: Neoplasia, Untoward Response to X-Irradiation, and Tuberous Sclerosis ». *American Journal of Diseases of Children* 114 (6): 617-25. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1967.02090270073006>.
- Grantzau, Trine, et Jens Overgaard. 2016. « Risk of Second Non-Breast Cancer among Patients Treated with and without Postoperative Radiotherapy for Primary Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Population-Based Studies Including 522,739 Patients ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 121 (3): 402-13. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.08.017>.
- Gurujeyalakshmi, G., et S. N. Giri. 1995. « Molecular Mechanisms of Antifibrotic Effect of Interferon Gamma in Bleomycin-Mouse Model of Lung Fibrosis: Downregulation of TGF-Beta and Procollagen I and III Gene Expression ». *Experimental Lung Research* 21 (5): 791-808. <https://doi.org/10.3109/01902149509050842>.

- Gurung, Ananta, Faisal Uddin, Richard P. Hill, Peter C. Ferguson, et Benjamin A. Alman. 2009. « β -Catenin Is a Mediator of the Response of Fibroblasts to Irradiation ». *The American Journal of Pathology* 174 (1): 248-55. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080576>.
- Hall, Eric J., et Amato J. Giaccia. 2006. *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hammel, Michal, Yaping Yu, Shujuan Fang, Susan P. Lees-Miller, et John A. Tainer. 2010. « XLF Regulates Filament Architecture of the XRCC4-Ligase IV Complex ». *Structure* 18 (11): 1431-42. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.09.009>.
- Hart, Justin P., Gloria Broadwater, Zahid Rabbani, Benjamin J. Moeller, Robert Clough, Dale Huang, Gregory A. Sempowski, et al. 2005. « Cytokine Profiling for Prediction of Symptomatic Radiation-Induced Lung Injury ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 63 (5): 1448-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.05.032>.
- Haubner, Frank, Elisabeth Ohmann, Fabian Pohl, Jürgen Strutz, et Holger G Gassner. 2012. « Wound healing after radiation therapy: Review of the literature ». *Radiation Oncology (London, England)* 7 (septembre): 162. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-7-162>.
- He, Qing, Jing Li, Feng Dong, Chuanshu Cai, et Xi Zou. 2017. « LKB1 promotes radioresistance in esophageal cancer cells exposed to radiation, by suppression of apoptosis and activation of autophagy via the AMPK pathway ». *Molecular Medicine Reports* 16 (2): 2205-10. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6852>.
- Hegedus, Fanni, Laju M. Mathew, et Robert A. Schwartz. 2017. « Radiation Dermatitis: An Overview ». *International Journal of Dermatology* 56 (9): 909-14. <https://doi.org/10.1111/ijd.13371>.
- Henríquez Hernández, Luis Alberto, Pedro Carlos Lara, Beatriz Pinar, Elisa Bordón, Carlos Rodríguez Gallego, Cristina Bilbao, Leandro Fernández Pérez, et Amílcar Flores Morales. 2009. « Constitutive gene expression profile segregates toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy ». *Radiation Oncology (London, England)* 4 (juin): 17. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-17>.
- Hernández, Gabriela L., Olga V. Volpert, Miguel A. Íñiguez, Elisa Lorenzo, Sara Martínez-Martínez, Raquel Grau, Manuel Fresno, et Juan Miguel Redondo. 2001. « Selective Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Angiogenesis by Cyclosporin a ». *The Journal of Experimental Medicine* 193 (5): 607-20.
- Herren, Thomas, Philipp A. Gerber, et Firat Duru. 2009. « Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: A Not so Rare “Disease of the Desmosome” with Multiple Clinical Presentations ». *Clinical Research in Cardiology: Official Journal of the German Cardiac Society* 98 (3): 141-58. <https://doi.org/10.1007/s00392-009-0751-4>.
- Hildebrandt, Michelle A. T., Ritsuko Komaki, Zhongxing Liao, Jian Gu, Joe Y. Chang, Yuanqing Ye, Charles Lu, et al. 2010. « Genetic Variants in Inflammation-Related Genes Are Associated with Radiation-Induced Toxicity Following Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer ». *PLoS ONE* 5 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012402>.
- Hirao, A., Y. Y. Kong, S. Matsuoka, A. Wakeham, J. Ruland, H. Yoshida, D. Liu, S. J. Elledge, et T. W. Mak. 2000. « DNA Damage-Induced Activation of P53 by the Checkpoint Kinase Chk2 ». *Science (New York, N.Y.)* 287 (5459): 1824-27. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1824>.
- Ho, I. C., J. H. Kim, J. W. Rooney, B. M. Spiegelman, et L. H. Glimcher. 1998. « A Potential Role for the Nuclear Factor of Activated T Cells Family of Transcriptional Regulatory Proteins in Adipogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15537-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15537>.

- Hoeijmakers, Jan H. J. 2001. « Genome Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer ». *Nature* 411 (6835): 366-74. <https://doi.org/10.1038/35077232>.
- Hogan, Patrick G., Lin Chen, Julie Nardone, et Anjana Rao. 2003. « Transcriptional Regulation by Calcium, Calcineurin, and NFAT ». *Genes & Development* 17 (18): 2205-32. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>.
- Holtz-Heppelmann, Carrie J., Alicia Algeciras, Andrew D. Badley, et Carlos V. Paya. 1998. « Transcriptional Regulation of the Human FasL Promoter-Enhancer Region ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (8): 4416-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4416>.
- Høyer-Hansen, Maria, Lone Bastholm, Piotr Szyniarowski, Michelangelo Campanella, György Szabadkai, Thomas Farkas, Katuscia Bianchi, et al. 2007. « Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2 ». *Molecular Cell* 25 (2): 193-205. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.009>.
- Hu, Lelin, Hao Wang, Li Huang, Yong Zhao, et Junjie Wang. 2016. « The Protective Roles of ROS-Mediated Mitophagy on 125I Seeds Radiation Induced Cell Death in HCT116 Cells ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9460462>.
- Huang, Chuanshu, Peter Mattjus, Wei-ya Ma, Mercedes Rincon, Nan-yue Chen, Rhoderick E. Brown, et Zigang Dong. 2000. « Involvement of Nuclear Factor of Activated T Cells Activation in UV Response ». *The Journal of biological chemistry* 275 (13): 9143-49.
- Huber, Stephan M., Lena Butz, Benjamin Stegen, Lukas Klumpp, Dominik Klumpp, et Franziska Eckert. 2015. « Role of Ion Channels in Ionizing Radiation-Induced Cell Death ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Membrane Channels and Transporters in Cancers*, 1848 (10, Part B): 2657-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.11.004>.
- Hubner, Nina C., Luan N. Nguyen, Nadine C. Hornig, et Hendrik G. Stunnenberg. 2015. « A Quantitative Proteomics Tool To Identify DNA-Protein Interactions in Primary Cells or Blood ». *Journal of Proteome Research* 14 (2): 1315-29. <https://doi.org/10.1021/pr5009515>.
- Hustedt, Nicole, et Daniel Durocher. 2017. « The Control of DNA Repair by the Cell Cycle ». *Nature Cell Biology* 19 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncb3452>.
- Ichim, Gabriel, et Stephen W. G. Tait. 2016. « A Fate Worse than Death: Apoptosis as an Oncogenic Process ». *Nature Reviews Cancer* 16 (8): 539-48. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>.
- Ide, Hiroshi, Toshiaki Nakano, Mahmoud I. Shoulkamy, et Amir M. H. Salem. 2015. « Formation, Repair, and Biological Effects of DNA-Protein Cross-Link Damage ». *Advances in DNA Repair*, novembre. <https://doi.org/10.5772/59683>.
- Janson, David G., Gaëlle Saintigny, Adam van Adrichem, Christian Mahé, et Abdoelwaheb El Ghalbzouri. 2012. « Different Gene Expression Patterns in Human Papillary and Reticular Fibroblasts ». *Journal of Investigative Dermatology* 132 (11): 2565-72. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.192>.
- Jauliac, Sebastien, Cristina López-Rodríguez, Leslie M. Shaw, Lawrence F. Brown, Anjana Rao, et Alex Toker. 2002. « The Role of NFAT Transcription Factors in Integrin-Mediated Carcinoma Invasion ». *Nature Cell Biology* 4 (7): 540-44. <https://doi.org/10.1038/ncb816>.
- Jette, Nicholas, et Susan P. Lees-Miller. 2015. « The DNA-Dependent Protein Kinase: A Multifunctional Protein Kinase with Roles in DNA Double Strand Break Repair and Mitosis ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 117 (2): 194-205. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.12.003>.
- Ji, Dong, Guo-Feng Chen, Xiaoliu Liu, Jing Zhu, Jin-Yu Sun, Xiao-Yu Zhang, et Xiao-Jie Lu. 2019. « Identification of LINC01615 as Potential Metastasis-Related Long Noncoding

- RNA in Hepatocellular Carcinoma ». *Journal of Cellular Physiology* 234 (8): 12964-70. <https://doi.org/10.1002/jcp.27963>.
- Jiang, Wenxia, Jennifer L. Crowe, Xiangyu Liu, Satoshi Nakajima, Yunyue Wang, Chen Li, Brian J. Lee, et al. 2015. « Differential Phosphorylation of DNA-PKcs Regulates the Interplay between End-Processing and End-Ligation during Nonhomologous End-Joining ». *Molecular Cell* 58 (1): 172-85. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.024>.
- Jinnin, Masatoshi, Damian Medici, Lucy Park, Nisha Limaye, Yanqiu Liu, Elisa Boscolo, Joyce Bischoff, Miikka Vikkula, Eileen Boye, et Bjorn R. Olsen. 2008. « Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma ». *Nature medicine* 14 (11): 1236-46. <https://doi.org/10.1038/nm.1877>.
- Jonah, C. D. 1995. « A Short History of the Radiation Chemistry of Water ». *Radiation Research* 144 (2): 141-47.
- Jonathan Leventhal, M. D. 2017. « Radiation Dermatitis: Recognition, Prevention, and Management ». Cancer Network. 15 décembre 2017. <https://www.cancernetwork.com/article/radiation-dermatitis-recognition-prevention-and-management>.
- Kadigamuwa, Chamila, Swati Choksi, Qing Xu, Christophe Cataisson, Steven S. Greenbaum, Stuart H. Yuspa, et Zheng-gang Liu. 2019. « Role of Retinoic Acid Receptor- γ in DNA Damage-Induced Necroptosis ». *iScience* 17 (juin): 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.06.019>.
- Kalinski, Pawel. 2012. « Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E2 ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (1): 21-28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>.
- Kam, Winnie Wai-Ying, et Richard B. Banati. 2013. « Effects of Ionizing Radiation on Mitochondria ». *Free Radical Biology and Medicine* 65 (décembre): 607-19. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.024>.
- Kaminuma, Osamu, Fujiko Kitamura, Noriko Kitamura, Takachika Hiroi, Hiroyuki Miyoshi, Atsushi Miyawaki, et Shoichiro Miyatake. 2008. « Differential Contribution of NFATC2 and NFATC1 to TNF- α Gene Expression in T Cells ». *The Journal of Immunology* 180 (1): 319-26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.319>.
- Karanam, Ketki, Ran Kafri, Alexander Loewer, et Galit Lahav. 2012. « Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase ». *Molecular Cell* 47 (2): 320-29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.052>.
- Karimaian, Ansar, Maryam Majidinia, Hossein Bannazadeh Baghi, et Bahman Yousefi. 2017. « The Crosstalk between Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway with DNA Damage Response and Oxidative Stress: Implications in Cancer Therapy ». *DNA Repair* 51: 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.01.003>.
- Kerns, Sarah L, Catharine M L West, C Nicolaj Andreassen, Gillian C Barnett, Søren M Bentzen, Neil G Burnet, Andre Dekker, et al. 2014. « Radiogenomics: the search for genetic predictors of radiotherapy response ». *Future Oncology* 10 (15): 2391-2406. <https://doi.org/10.2217/fon.14.173>.
- Kerns, Sarah L., Harry Ostrer, Richard Stock, William Li, Julian Moore, Alexander Pearlman, Christopher Campbell, et al. 2010. « Genome Wide Association Study to Identify Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Associated with the Development of Erectile Dysfunction in African-American Men Following Radiotherapy for Prostate Cancer ». *International journal of radiation oncology, biology, physics* 78 (5): 1292-1300. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.07.036>.
- Kerns, Sarah L., Richard Stock, Nelson N. Stone, Seth R. Blacksburn, Lynda Rath, Ana Vega, Laura Fachal, et al. 2013. « Genome-wide association study identifies a region on

- chromosome 11q14.3 associated with late rectal bleeding following radiation therapy for prostate cancer ». *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 107 (3): 372-76. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2013.05.001>.
- Kevin A. Camphausen, M. D. 2009. « Principles of Radiation Therapy ». Cancer Network. 9 avril 2009. <https://www.cancernetwork.com/brachytherapy/principles-radiation-therapy>.
- Kiani, A., F. J. García-Cózar, I. Habermann, S. Laforsch, T. Aebischer, G. Ehninger, et A. Rao. 2001. « Regulation of Interferon-Gamma Gene Expression by Nuclear Factor of Activated T Cells ». *Blood* 98 (5): 1480-88. <https://doi.org/10.1182/blood.v98.5.1480>.
- Kim, Eun Ju, Yoon-Jin Lee, Seongman Kang, et Young-Bin Lim. 2014. « Ionizing Radiation Activates PERK/EIF2 α /ATF4 Signaling via ER Stress-Independent Pathway in Human Vascular Endothelial Cells ». *International Journal of Radiation Biology* 90 (4): 306-12. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.886793>.
- Kim, K. W., L. Moretti, L. R. Mitchell, D. K. Jung, et B. Lu. 2010. « Endoplasmic Reticulum Stress Mediates Radiation-Induced Autophagy by Perk-EIF2 α in Caspase-3/7-Deficient Cells ». *Oncogene* 29 (22): 3241-51. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.74>.
- Kim, Kwang Woon, Robert W. Mutter, Carolyn Cao, Jeffrey M. Albert, Michael Freeman, Dennis E. Hallahan, et Bo Lu. 2006. « Autophagy for Cancer Therapy through Inhibition of Pro-Apoptotic Proteins and Mammalian Target of Rapamycin Signaling ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (48): 36883-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607094200>.
- Kim, Wanyeon, Sungmin Lee, Danbi Seo, Dain Kim, Kyeongmin Kim, EunGi Kim, JiHoon Kang, Ki Moon Seong, HyeSook Youn, et BuHyun Youn. 2019. « Cellular Stress Responses in Radiotherapy ». *Cells* 8 (9). <https://doi.org/10.3390/cells8091105>.
- Kim, Wanyeon, Beomseok Son, Sungmin Lee, Hyunhee Do, et BuHyun Youn. 2018. « Targeting the Enzymes Involved in Arachidonic Acid Metabolism to Improve Radiotherapy ». *Cancer Metastasis Reviews* 37 (2-3): 213-25. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9742-0>.
- Klein, Matthias, Stefan Klein-Hessling, Alois Palmethofer, Edgar Serfling, Christine Tertilt, Tobias Bopp, Valeska Heib, et al. 2006. « Specific and Redundant Roles for NFAT Transcription Factors in the Expression of Mast Cell-Derived Cytokines ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (10): 6667-74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6667>.
- Klionsky, Daniel J., Kotb Abdelmohsen, Akihisa Abe, Md Joynal Abedin, Hagai Abeliovich, Abraham Acevedo Arozana, Hiroaki Adachi, et al. 2016. « Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (3rd Edition) ». *Autophagy* 12 (1): 1-222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>.
- Ko, A, A Kanehisa, I Martins, L Senovilla, C Chargari, D Dugue, G Mariño, et al. 2014. « Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling ». *Cell Death and Differentiation* 21 (1): 92-99. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.124>.
- Kobaisi, F., N. Fayyad, H. R. Rezvani, M. Fayyad-Kazan, E. Sulpice, B. Badran, H. Fayyad-Kazan, X. Gidrol, et W. Rachidi. 2019. « Signaling Pathways, Chemical and Biological Modulators of Nucleotide Excision Repair: The Faithful Shield against UV Genotoxicity ». Review Article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4654206>.
- Krokan, Hans E., et Magnar Bjørås. 2013. « Base Excision Repair ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012583>.

- Kuribayashi, Kageaki, et Wafik S. El-Deiry. 2008. « Regulation of Programmed Cell Death by the P53 Pathway ». In *Programmed Cell Death in Cancer Progression and Therapy*, édité par Roya Khosravi-Far et Eileen White, 201-21. Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5_10.
- Lacombe, Jérôme, Muriel Brengues, Alain Mangé, Céline Bourgier, Sophie Gourgou, André Pèlerin, Mahmut Ozsahin, Jérôme Solassol, et David Azria. 2019. « Quantitative proteomic analysis reveals AK2 as potential biomarker for late normal tissue radiotoxicity ». *Radiation Oncology (London, England)* 14 (août). <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1351-8>.
- Latinis, K. M., L. L. Carr, E. J. Peterson, L. A. Norian, S. L. Eliason, et G. A. Koretzky. 1997. « Regulation of CD95 (Fas) Ligand Expression by TCR-Mediated Signaling Events. » *The Journal of Immunology* 158 (10): 4602-11.
- Le Caër, Sophie. 2011. « Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation ». *Water* 3 (1): 235-53. <https://doi.org/10.3390/w3010235>.
- Leask, Andrew, et David J. Abraham. 2004. « TGF- β Signaling and the Fibrotic Response ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (7): 816-27. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1273rev>.
- Lebre, Maria C., Angelic M. G. van der Aar, Lisa van Baarsen, Toni M. M. van Capel, Joost H. N. Schuitemaker, Martien L. Kapsenberg, et Esther C. de Jong. 2007. « Human Keratinocytes Express Functional Toll-Like Receptor 3, 4, 5, and 9 ». *Journal of Investigative Dermatology* 127 (2): 331-41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700530>.
- Lee, Chun Geun, Robert J. Homer, Zhou Zhu, Sophie Lanone, Xiaoman Wang, Victor Koteliensky, J. Michael Shipley, et al. 2001. « Interleukin-13 Induces Tissue Fibrosis by Selectively Stimulating and Activating Transforming Growth Factor β 1 ». *The Journal of Experimental Medicine* 194 (6): 809-22.
- Lee, Jae-Ung, Li-Kyung Kim, et Je-Min Choi. 2018. « Revisiting the Concept of Targeting NFAT to Control T Cell Immunity and Autoimmune Diseases ». *Frontiers in Immunology* 9 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02747>.
- Lehoczky, Peter, Peter J. McHugh, et Miroslav Chovanec. 2007. « DNA Interstrand Cross-Link Repair in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *FEMS Microbiology Reviews* 31 (2): 109-33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00046.x>.
- Li, D.-D., L.-L. Wang, R. Deng, J. Tang, Y. Shen, J.-F. Guo, Y. Wang, et al. 2009. « The Pivotal Role of C-Jun NH₂-Terminal Kinase-Mediated Beclin 1 Expression during Anticancer Agents-Induced Autophagy in Cancer Cells ». *Oncogene* 28 (6): 886-98. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.441>.
- Li, Huiming, Anjana Rao, et Patrick G. Hogan. 2011. « Interaction of Calcineurin with Substrates and Targeting Proteins ». *Trends in Cell Biology* 21 (2): 91-103. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.011>.
- Li, Mengqian, Liting You, Jianxin Xue, et You Lu. 2018. « Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review ». *Frontiers in Pharmacology* 9 (mai). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00522>.
- Li, Ping, Cheng-run Du, Wen-cai Xu, Ze-liang Shi, Qing Zhang, Zhao-bin Li, et Shen Fu. 2013. « Correlation of dynamic changes in γ -H2AX expression in peripheral blood lymphocytes from head and neck cancer patients with radiation-induced oral mucositis ». *Radiation Oncology (London, England)* 8 (juin): 155. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-155>.
- Lin, Meng-Han, Jui-Hung Yen, Ching-Yi Weng, Lisu Wang, Choi-Lan Ha, et Ming-Jiuan Wu. 2014. « Lipid Peroxidation End Product 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal Triggers

- Unfolded Protein Response and Heme Oxygenase-1 Expression in PC12 Cells: Roles of ROS and MAPK Pathways ». *Toxicology* 315 (janvier): 24-37. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.11.007>.
- Liu, Jia, Min Jiang, Zhiyong Ma, Kirsten K. Dietze, Gennadiy Zelinskyy, Dongliang Yang, Ulf Dittmer, Joerg F. Schlaak, Michael Roggendorf, et Mengji Lu. 2013. « TLR1/2 Ligand-Stimulated Mouse Liver Endothelial Cells Secrete IL-12 and Trigger CD8+ T Cell Immunity in Vitro ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 191 (12): 6178-90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301262>.
- Livak, K. J., et T. D. Schmittgen. 2001. « Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method ». *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lodish, Harvey, Arnold Berk, S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, et James Darnell. 2000. « Morphology and Functional Elements of Eukaryotic Chromosomes ». *Molecular Cell Biology*. 4th Edition. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21576/>.
- Loeffler, J. S., J. R. Harris, W. K. Dahlberg, et J. B. Little. 1990. « In Vitro Radiosensitivity of Human Diploid Fibroblasts Derived from Women with Unusually Sensitive Clinical Responses to Definitive Radiation Therapy for Breast Cancer ». *Radiation Research* 121 (2): 227-31.
- Loftus, Joseph C., Harshil Dhruv, Serdar Tuncali, Jean Kloss, Zhongbo Yang, Cassie A. Schumacher, Brian Cao, et al. 2013. « TROY (TNFRSF19) Promotes Glioblastoma Survival Signaling and Therapeutic Resistance ». *Molecular Cancer Research: MCR* 11 (8): 865-74. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0008>.
- Lomonaco, Stephanie L., Susan Finnis, Cunli Xiang, Ana DeCarvalho, Felix Umansky, Steven N. Kalkanis, Tom Mikkelsen, et Chaya Brodie. 2009. « The Induction of Autophagy by γ -Radiation Contributes to the Radioresistance of Glioma Stem Cells ». *International Journal of Cancer* 125 (3): 717-22. <https://doi.org/10.1002/ijc.24402>.
- Lu, Ting, Zhou Zhu, Junchao Wu, Hua She, Rong Han, Haidong Xu, et Zheng-Hong Qin. 2019. « DRAM1 regulates autophagy and cell proliferation via inhibition of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mTOR-ribosomal protein S6 pathway ». *Cell Communication and Signaling* 17 (1): 28. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0341-7>.
- Lu, Xiaomin, Jibin Han, Xiuping Xu, Jingyuan Xu, Ling Liu, Yingzi Huang, Yi Yang, et Haibo Qiu. 2017. « PGE2 Promotes the Migration of Mesenchymal Stem Cells through the Activation of FAK and ERK1/2 Pathway ». *Stem Cells International* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8178643>.
- Lu-Hesselmann, J., G. Messer, D. van Beuningen, P. Kind, et R. U. Peter. 1997. « Transcriptional Regulation of the Human IL5 Gene by Ionizing Radiation in Jurkat T Cells: Evidence for Repression by an NF-AT-like Element ». *Radiation Research* 148 (6): 531-42.
- Macian, Fernando. 2005. « NFAT Proteins: Key Regulators of T-Cell Development and Function ». *Nature Reviews Immunology* 5 (6): 472-84. <https://doi.org/10.1038/nri1632>.
- Macián, Fernando, Francisco García-Cózar, Sin-Hyeog Im, Heidi F. Horton, Michael C. Byrne, et Anjana Rao. 2002. « Transcriptional Mechanisms Underlying Lymphocyte Tolerance ». *Cell* 109 (6): 719-31. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00767-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00767-5).
- Macián, Fernando, Cristina López-Rodríguez, et Anjana Rao. 2001. « Partners in Transcription: NFAT and AP-1 ». *Oncogene* 20 (19): 2476-89. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204386>.
- Maier, Patrick, Linda Hartmann, Frederik Wenz, et Carsten Herskind. 2016. « Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor

- Radiosensitization ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1). <https://doi.org/10.3390/ijms17010102>.
- Maiuri, M. Chiara, Einat Zalcckvar, Adi Kimchi, et Guido Kroemer. 2007. « Self-Eating and Self-Killing: Crosstalk between Autophagy and Apoptosis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (9): 741-52. <https://doi.org/10.1038/nrm2239>.
- Mancini, Maria L., et Stephen T. Sonis. 2014. « Mechanisms of cellular fibrosis associated with cancer regimen-related toxicities ». *Frontiers in Pharmacology* 5 (mars). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00051>.
- Mari, Pierre-Olivier, Bogdan I. Florea, Stephan P. Persengiev, Nicole S. Verkaik, Hennie T. Brüggewirth, Mauro Modesti, Giuseppina Giglia-Mari, et al. 2006. « Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (49): 18597-602. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609061103>.
- Martin, M., J. Lefaix, et S. Delanian. 2000. « TGF-Beta1 and Radiation Fibrosis: A Master Switch and a Specific Therapeutic Target? » *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 47 (2): 277-90. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)00435-1](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)00435-1).
- Martin, Michèle T., Adeline Vulin, et Jolyon H. Hendry. 2016. « Human Epidermal Stem Cells: Role in Adverse Skin Reactions and Carcinogenesis from Radiation ». *Mutation Research* 770 (Pt B): 349-68. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.08.004>.
- Martinez, Gustavo J., Renata M. Pereira, Tarmo Äijö, Edward Y. Kim, Francesco Marangoni, Matthew E. Pipkin, Susan Togher, et al. 2015. « The Transcription Factor NFAT Promotes Exhaustion of Activated CD8⁺ T Cells ». *Immunity* 42 (2): 265-78. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.006>.
- Matsuoka, S., M. Huang, et S. J. Elledge. 1998. « Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5395): 1893-97. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1893>.
- Mavragani, Ifigeneia V., Danae A. Laskaratou, Benjamin Frey, Serge M. Candéas, Udo S. Gaipf, Katalin Lumniczky, et Alexandros G. Georgakilas. 2015. « Key mechanisms involved in ionizing radiation-induced systemic effects. A current review ». *Toxicology Research* 5 (1): 12-33. <https://doi.org/10.1039/c5tx00222b>.
- Mayer, Claudia, Odilia Popanda, Burkhard Greve, Eberhard Fritz, Thomas Illig, Friederike Eckardt-Schupp, Maria Gomolka, Axel Benner, et Peter Schmezer. 2011. « A Radiation-Induced Gene Expression Signature as a Tool to Predict Acute Radiotherapy-Induced Adverse Side Effects ». *Cancer Letters* 302 (1): 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.12.006>.
- Mazière, Cécile, Patrice Morlière, Christophe Louandre, Marie-Alix Conte, Cathy Gomilla, René Santus, Franck Antonicelli, William Hornebeck, et Jean-Claude Mazière. 2005. « Low UVA Doses Activate the Transcription Factor NFAT in Human Fibroblasts by a Calcium-Calcineurin Pathway ». *Free Radical Biology & Medicine* 39 (12): 1629-37. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.003>.
- McCaffrey, P. G., A. E. Goldfeld, et A. Rao. 1994. « The Role of NFATp in Cyclosporin A-Sensitive Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Transcription. » *Journal of Biological Chemistry* 269 (48): 30445-50.
- McCaffrey, P. G., C. Luo, T. K. Kerppola, J. Jain, T. M. Badalian, A. M. Ho, E. Burgeon, W. S. Lane, J. N. Lambert, et T. Curran. 1993. « Isolation of the Cyclosporin-Sensitive T Cell Transcription Factor NFATp ». *Science (New York, N.Y.)* 262 (5134): 750-54. <https://doi.org/10.1126/science.8235597>.
- McDonald, J. Tyson, Kwanghee Kim, Andrew Norris, Erina Vlashi, Tiffany M. Phillips, Chann Lagadec, Lorenza Della Donna, et al. 2010. « Ionizing radiation activates the Nrf2

- antioxidant response ». *Cancer research* 70 (21): 8886-95. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0171>.
- McQuestion, Maurene. 2011. « Evidence-Based Skin Care Management in Radiation Therapy: Clinical Update ». *Seminars in Oncology Nursing* 27 (2): e1-17. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2011.02.009>.
- McVey, Mitch, Varandt Y. Khodaverdian, Damon Meyer, Paula Gonçalves Cerqueira, et Wolf-Dietrich Heyer. 2016. « Eukaryotic DNA Polymerases in Homologous Recombination ». *Annual review of genetics* 50 (novembre): 393-421. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035243>.
- Mognol, Patricia S. de Araujo-Souza, Bruno K. Robbs, Leonardo K. Teixeira, et Joao P. B. Viola. 2012. « Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements ». *Cell Cycle* 11 (5): 1014-28. <https://doi.org/10.4161/cc.11.5.19518>.
- Mognol, G P, F R G Carneiro, B K Robbs, D V Faget, et J P B Viola. 2016. « Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player ». *Cell Death & Disease* 7 (4): e2199. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.97>.
- Moretti, Luigi, Yong I. Cha, Kenneth John Niermann, et Bo Lu. 2007. « Switch between Apoptosis and Autophagy: Radiation-Induced Endoplasmic Reticulum Stress? » *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (7): 793-98. <https://doi.org/10.4161/cc.6.7.4036>.
- Mould, R.F. 2007. « Priority for radium therapy of benign conditions and cancer ». *Current Oncology* 14 (3): 118-22.
- Mumbreakar, Kamalesh Dattaram, Donald Jerard Fernandes, Hassan Venkatesh Goutham, Krishna Sharan, Bejadi Manjunath Vadhiraaja, Kapaettu Satyamoorthy, et Satish Rao Bola Sadashiva. 2014. « Influence of Double-Strand Break Repair on Radiation Therapy-Induced Acute Skin Reactions in Breast Cancer Patients ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 88 (3): 671-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.11.218>.
- Muñoz-Gámez, José Antonio, José Manuel Rodríguez-Vargas, Rosa Quiles-Pérez, Rocío Aguilar-Quesada, David Martín-Oliva, Gilbert de Murcia, Josiane Menissier de Murcia, Antonio Almendros, Mariano Ruiz de Almodóvar, et F. Javier Oliver. 2009. « PARP-1 Is Involved in Autophagy Induced by DNA Damage ». *Autophagy* 5 (1): 61-74. <https://doi.org/10.4161/auto.5.1.7272>.
- Nachtrab, U., U. Oppitz, M. Flentje, et H. Stopper. 1998. « Radiation-Induced Micronucleus Formation in Human Skin Fibroblasts of Patients Showing Severe and Normal Tissue Damage after Radiotherapy ». *International Journal of Radiation Biology* 73 (3): 279-87. <https://doi.org/10.1080/095530098142374>.
- Nagata, Meruna, Satoko Arakawa, Hirofumi Yamaguchi, Satoru Torii, Hazuki Endo, Masatsune Tsujioka, Shinya Honda, Yuya Nishida, Akimitsu Konishi, et Shigeomi Shimizu. 2018. « Dram1 Regulates DNA Damage-Induced Alternative Autophagy ». *Cell Stress*, juillet, 55-65. <https://doi.org/10.15698/cst2018.03.127>.
- Nakada, Chisako, Shinya Satoh, Yoko Tabata, Ken-ichi Arai, et Sumiko Watanabe. 2006. « Transcriptional Repressor foxl1 Regulates Central Nervous System Development by Suppressing shh Expression in Zebra Fish ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (19): 7246-57. <https://doi.org/10.1128/MCB.00429-06>.
- Nayak, Arnab, Judith Glöckner-Pagel, Martin Vaeth, Julia E. Schumann, Mathias Buttmann, Tobias Bopp, Edgar Schmitt, Edgar Serfling, et Friederike Berberich-Siebelt. 2009. « Sumoylation of the Transcription Factor NFATC1 Leads to Its Subnuclear Relocalization and Interleukin-2 Repression by Histone Deacetylase ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (16): 10935-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900465200>.

- Nehs, Matthew A., Chi-Iou Lin, David E. Kozono, Edward E. Whang, Nancy L. Cho, Kaya Zhu, Jacob Moalem, Francis D. Moore, et Daniel T. Ruan. 2011. « Necroptosis Is a Novel Mechanism of Radiation-Induced Cell Death in Anaplastic Thyroid and Adrenocortical Cancers ». *Surgery* 150 (6): 1032-39. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.09.012>.
- Nguyen, Hoang Quy, Nhu Hanh To, Patricia Zadigue, Stéphane Kerbrat, Alexandre De La Taille, Sabine Le Gouvello, et Yazid Belkacemi. 2018. « Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence Promotes Tissue Fibrosis after Radiotherapy. A Review ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 129 (septembre): 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.06.012>.
- Nguyen, Tuan, et Simone Di Giovanni. 2008. « NFAT signaling in neural development and axon growth ». *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 26 (2): 141-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.10.004>.
- Nick McElhinny, S. A., C. M. Snowden, J. McCarville, et D. A. Ramsden. 2000. « Ku Recruits the XRCC4-Ligase IV Complex to DNA Ends ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (9): 2996-3003. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.9.2996-3003.2000>.
- Nimonkar, Amitabh V., Jochen Genschel, Eri Kinoshita, Piotr Polaczek, Judith L. Campbell, Claire Wyman, Paul Modrich, et Stephen C. Kowalczykowski. 2011. « BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair ». *Genes & Development* 25 (4): 350-62. <https://doi.org/10.1101/gad.2003811>.
- Niranjan, Rituraj, Kaushal Prasad Mishra, et Ashwani Kumar Thakur. 2018. « Inhibition of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Initiates Autophagy and Potentiates MPTP-Induced Autophagic Cell Death of Human Neuroblastoma Cells, SH-SY5Y: An Inside in the Pathology of Parkinson's Disease ». *Molecular Neurobiology* 55 (10): 8038-50. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0950-y>.
- Ogata, Maiko, Shin-ichiro Hino, Atsushi Saito, Keisuke Morikawa, Shinichi Kondo, Soshi Kanemoto, Tomohiko Murakami, et al. 2006. « Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (24): 9220-31. <https://doi.org/10.1128/MCB.01453-06>.
- Ogura, Aki, Shigeru Oowada, Yasuhiro Kon, Aki Hirayama, Hironobu Yasui, Shunsuke Meike, Saori Kobayashi, Mikinori Kuwabara, et Osamu Inanami. 2009. « Redox Regulation in Radiation-Induced Cytochrome c Release from Mitochondria of Human Lung Carcinoma A549 Cells ». *Cancer Letters* 277 (1): 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.11.021>.
- Oh, Jung Hun, Jeffrey M. Craft, Reid Townsend, Joseph O. Deasy, Jeffrey D. Bradley, et Issam El Naqa. 2011. « A Bioinformatics Approach for Biomarker Identification in Radiation-Induced Lung Inflammation from Limited Proteomics Data ». *Journal of proteome research* 10 (3): 1406-15. <https://doi.org/10.1021/pr101226q>.
- Okita, T. 1975. « Review of Thirty Years Study of Hiroshima and Nagasaki Atomic Bomb Survivors. II. Biological Effects. A. Acute Effects ». *Journal of Radiation Research* 16 Suppl (septembre): 49-66. https://doi.org/10.1269/jrr.16.supplement_49.
- Olive, Peggy L., Judit P. Banáth, et Mira Keyes. 2008. « Residual γ H2AX after Irradiation of Human Lymphocytes and Monocytes in Vitro and Its Relation to Late Effects after Prostate Brachytherapy ». *Radiotherapy and Oncology*, Special Issue: Clinical related radiobiology, 86 (3): 336-46. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2007.09.002>.
- Orjalo, Arturo V., Dipa Bhaumik, Bridget K. Gengler, Gary K. Scott, et Judith Campisi. 2009. « Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America* 106 (40): 17031-36.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0905299106>.
- Oum, Ji-Hyun, Juhyun Han, Heejoon Myung, Marija Hleb, Surendra Sharma, et Jungchan Park. 2002. « Molecular Mechanism of NFAT Family Proteins for Differential Regulation of the IL-2 and TNF- α Promoters ». *Molecules and Cells* 13 (1): 77-84.
- Ozcan, Ayla, et Metin Ogun. 2015. « Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species ». *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, novembre.
<https://doi.org/10.5772/61193>.
- Ozsahin, Mahmut, Nigel E. A. Crompton, Sophie Gourgou, Andrew Kramar, Ling Li, YuQuan Shi, Wendy Jeanneret Sozzi, Abderrahim Zouhair, René O. Mirimanoff, et David Azria. 2005. « CD4 and CD8 T-Lymphocyte Apoptosis Can Predict Radiation-Induced Late Toxicity: A Prospective Study in 399 Patients ». *Clinical Cancer Research* 11 (20): 7426-33. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2634>.
- Palumbo, Silvia, et Sergio Comincini. 2013. « Autophagy and Ionizing Radiation in Tumors: The “Survive or Not Survive” Dilemma ». *Journal of Cellular Physiology* 228 (1): 1-8.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24118>.
- Palumbo, Silvia, Luigi Pirtoli, Paolo Tini, Gabriele Cevenini, Francesco Calderaro, Marzia Toscano, Clelia Miracco, et Sergio Comincini. 2012. « Different Involvement of Autophagy in Human Malignant Glioma Cell Lines Undergoing Irradiation and Temozolomide Combined Treatments ». *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (7): 2308-18. <https://doi.org/10.1002/jcb.24102>.
- Panganiban, Ronald-Allan M., Andrew L. Snow, et Regina M. Day. 2013. « Mechanisms of Radiation Toxicity in Transformed and Non-Transformed Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (8): 15931-58.
<https://doi.org/10.3390/ijms140815931>.
- Park, Jungchan, Atsuko Takeuchi, et Surendra Sharma. 1996. « Characterization of a New Isoform of the NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells) Gene Family Member NFATC ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20914-21.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20914>.
- Partl, Richard, Peter Regitnig, Gerlinde Tauber, Michaela Pötscher, Vesna Bjelic-Radisic, et Karin S. Kapp. 2018. « Radiation-induced morphea—a rare but severe late effect of adjuvant breast irradiation ». *Strahlentherapie Und Onkologie* 194 (11): 1060-65.
<https://doi.org/10.1007/s00066-018-1336-9>.
- Pastina, Barbara, et Jay A. LaVerne. 2001. « Effect of Molecular Hydrogen on Hydrogen Peroxide in Water Radiolysis ». *The Journal of Physical Chemistry A* 105 (40): 9316-22. <https://doi.org/10.1021/jp012245j>.
- Peacock, John, Anita Ashton, Judith Bliss, Cyd Bush, John Eady, Caroline Jackson, Roger Owen, Jane Regan, et John Yarnold. 2000. « Cellular Radiosensitivity and Complication Risk after Curative Radiotherapy ». *Radiotherapy and Oncology* 55 (2): 173-78. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(00\)00173-0](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(00)00173-0).
- Peiffert, D., J. -M. Simon, et F. Eschwege. 2007. « L'accident d'Épinal: passé, présent, avenir ». *Cancer/Radiothérapie*, 18ème Congrès national de la Société Française de Radiothérapie Oncologique, 11 (6): 309-12.
<https://doi.org/10.1016/j.canrad.2007.09.004>.
- Peng, Stanford L, Andrea J Gerth, Ann M Ranger, et Laurie H Glimcher. 2001. « NFATC1 and NFATC2 Together Control Both T and B Cell Activation and Differentiation ». *Immunity* 14 (1): 13-20. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00085-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00085-1).
- Pereira, Sandrine, Larry Bodgi, Mirlande Duclos, Aurélien Canet, Mélanie L. Ferlazzo, Clément Devic, Adeline Granzotto, Sophie Deneuve, Guillaume Vogin, et Nicolas Foray. 2018. « Fast and Binary Assay for Predicting Radiosensitivity Based on the

- Theory of ATM Nucleo-Shuttling: Development, Validation, and Performance ». *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 100 (2): 353-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.10.029>.
- Perotti, V., P. Baldassari, A. Molla, C. Vegetti, I. Bersani, A. Maurichi, M. Santinami, A. Anichini, et R. Mortarini. 2016. « NFATC2 Is an Intrinsic Regulator of Melanoma Dedifferentiation ». *Oncogene* 35 (22): 2862-72. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.355>.
- Perreault, Nathalie, Jonathan P. Katz, Sara Dutton Sackett, et Klaus H. Kaestner. 2001. « Fox11 Controls the Wnt/ β -Catenin Pathway by Modulating the Expression of Proteoglycans in the Gut ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (46): 43328-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104366200>.
- Peters, Christopher A., Richard G. Stock, Jamie A. Cesaretti, David P. Atencio, Sheila Peters, Ryan J. Burri, Nelson N. Stone, Harry Ostrer, et Barry S. Rosenstein. 2008. « TGFB1 Single Nucleotide Polymorphisms Are Associated with Adverse Quality of Life in Prostate Cancer Patients Treated with Radiotherapy ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 70 (3): 752-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.05.023>.
- Plowman, P. N., B. A. Bridges, C. F. Arlett, A. Hinney, et J. E. Kingston. 1990. « An Instance of Clinical Radiation Morbidity and Cellular Radiosensitivity, Not Associated with Ataxia-Telangiectasia ». *The British Journal of Radiology* 63 (752): 624-28. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-63-752-624>.
- Podhorecka, Monika, Andrzej Skladanowski, et Przemyslaw Bozko. 2010. « H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy ». *Journal of Nucleic Acids* 2010 (août). <https://doi.org/10.4061/2010/920161>.
- Pollard, Julianne M., et Richard A. Gatti. 2009. « Clinical Radiation Sensitivity with DNA Repair Disorders: An Overview ». *International journal of radiation oncology, biology, physics* 74 (5): 1323-31. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.02.057>.
- Pompa, J. L. de la, L. A. Timmerman, H. Takimoto, H. Yoshida, A. J. Elia, E. Samper, J. Potter, et al. 1998. « Role of the NF-ATc Transcription Factor in Morphogenesis of Cardiac Valves and Septum ». *Nature* 392 (6672): 182-86. <https://doi.org/10.1038/32419>.
- Poon, Ivan K. H., Christopher D. Lucas, Adriano G. Rossi, et Kodi S. Ravichandran. 2014. « Apoptotic Cell Clearance: Basic Biology and Therapeutic Potential ». *Nature Reviews Immunology* 14 (3): 166-80. <https://doi.org/10.1038/nri3607>.
- Qin, Jiang-Jiang, Subhasree Nag, Wei Wang, Jianwei Zhou, Wei-Dong Zhang, Hui Wang, et Ruiwen Zhang. 2014. « NFAT as cancer target: Mission possible? » *Biochimica et biophysica acta* 1846 (2): 297-311. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.07.009>.
- Qing-Li. 1999. « Mitochondrial and intracellular free-calcium regulation of radiation-induced apoptosis in human leukemic cells ». *International Journal of Radiation Biology* 75 (4): 493-504. <https://doi.org/10.1080/095530099140429>.
- Qiu, Weimin, Yuhui Hu, Tom E. Andersen, Abbas Jafari, Na Li, Wei Chen, et Moustapha Kassem. 2010. « Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 19 (TNFRSF19) Regulates Differentiation Fate of Human Mesenchymal (Stromal) Stem Cells through Canonical Wnt Signaling and C/EBP ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (19): 14438-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052001>.
- Rached, E., R. Schindler, K. T. Beer, D. Vetterli, et R. H. Greiner. 1998. « No Predictive Value of the Micronucleus Assay for Patients with Severe Acute Reaction of Normal Tissue after Radiotherapy ». *European Journal of Cancer* 34 (3): 378-83. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00373-0](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00373-0).
- Radford, I. R. 1985. « The Level of Induced DNA Double-Strand Breakage Correlates with Cell Killing after X-Irradiation ». *International Journal of Radiation Biology and*

- Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* 48 (1): 45-54.
<https://doi.org/10.1080/09553008514551051>.
- « Radiation Therapy Side Effects ». s. d. Consulté le 13 avril 2020.
<https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/radiation/effects-on-different-parts-of-body.html>.
- Ramilowski, Jordan, Chi Wai Yip, Saumya Agrawal, Jen-Chien Chang, Yari Ciani, Ivan V. Kulakovskiy, Mickael Mendez, et al. 2019. « Functional Annotation of Human Long Non-Coding RNAs via Molecular Phenotyping ». *BioRxiv*, juillet, 700864.
<https://doi.org/10.1101/700864>.
- Ranger, A. M., L. C. Gerstenfeld, J. Wang, T. Kon, H. Bae, E. M. Gravallesse, M. J. Glimcher, et L. H. Glimcher. 2000. « The Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT) Transcription Factor NFATp (NFATC2) Is a Repressor of Chondrogenesis ». *The Journal of Experimental Medicine* 191 (1): 9-22. <https://doi.org/10.1084/jem.191.1.9>.
- Rao, A., C. Luo, et P. G. Hogan. 1997. « Transcription Factors of the NFAT Family: Regulation and Function ». *Annual Review of Immunology* 15: 707-47.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.707>.
- Rauschenberger, Tabea, Viola Schmitt, Muhammad Azeem, Stefan Klein-Hessling, Krisna Murti, Franziska Grän, Matthias Goebeler, et al. 2019. « T Cells Control Chemokine Secretion by Keratinocytes ». *Frontiers in Immunology* 10 (août).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01917>.
- Ravanat, et Thierry Douki. 2016. « UV and Ionizing Radiations Induced DNA Damage, Differences and Similarities ». *Radiation Physics and Chemistry, Radiation Physics and Chemistry of Biomolecules. Recent developments*, 128 (novembre): 92-102.
<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.07.007>.
- Ravanat, J.-L. 2018. « Endogenous Natural and Radiation-Induced DNA Lesions: Differences and Similarities and Possible Implications for Human Health and Radiological Protection ». *Radioprotection* 53 (4): 241-48.
<https://doi.org/10.1051/radiopro/2018039>.
- Ray Chaudhuri, Arnab, et André Nussenzweig. 2017. « The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (10): 610-21. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>.
- Rayess, Hani, Marilene B. Wang, et Eri S. Srivatsan. 2012. « Cellular Senescence and Tumor Suppressor Gene P16 ». *International Journal of Cancer* 130 (8): 1715-25.
<https://doi.org/10.1002/ijc.27316>.
- Regaud, Cl. 1930. « Sur Les Principes Radiophysiologiques De La Radiothérapie Des Cancers ». *Acta Radiologica* 11 (5): 455-86.
<https://doi.org/10.3109/00016923009138858>.
- Reisz, Julie A., Nidhi Bansal, Jiang Qian, Weiling Zhao, et Cristina M. Furdui. 2014. « Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection ». *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (2): 260-92.
<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5489>.
- Rengarajan, Jyothi, Kerri A. Mowen, Kathryn D. McBride, Erica D. Smith, Harinder Singh, et Laurie H. Glimcher. 2002. « Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) Interacts with NFATC2 to Modulate Interleukin 4 Gene Expression ». *The Journal of Experimental Medicine* 195 (8): 1003-12. <https://doi.org/10.1084/jem.20011128>.
- Reynolds, Pamela, Jennifer A. Anderson, Jane V. Harper, Mark A. Hill, Stanley W. Botchway, Anthony W. Parker, et Peter O'Neill. 2012. « The dynamics of Ku70/80 and DNA-PKcs at DSBs induced by ionizing radiation is dependent on the complexity of damage ». *Nucleic Acids Research* 40 (21): 10821-31. <https://doi.org/10.1093/nar/gks879>.

- Rhee, Sue Goo, Kap-Seok Yang, Sang Won Kang, Hyun Ae Woo, et Tong-Shin Chang. 2005. « Controlled Elimination of Intracellular H₂O₂: Regulation of Peroxiredoxin, Catalase, and Glutathione Peroxidase via Post-translational Modification ». *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (5-6): 619-26. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.619>.
- Richter, C., et G. E. Kass. 1991. « Oxidative Stress in Mitochondria: Its Relationship to Cellular Ca²⁺ Homeostasis, Cell Death, Proliferation, and Differentiation ». *Chemico-Biological Interactions* 77 (1): 1-23. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(91\)90002-o](https://doi.org/10.1016/0009-2797(91)90002-o).
- Rieux, Charlotte. 2017. « Etude des ADN glycosylases de la superfamille structurale Fpg/Nei par modélisation moléculaire, de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans les stratégies anti-cancer ». Phdthesis, Université d'Orléans. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01820636>.
- Robbs, Bruno K., Andre L. S. Cruz, Miriam B. F. Werneck, Giuliana P. Mognol, et João P. B. Viola. 2008. « Dual Roles for NFAT Transcription Factor Genes as Oncogenes and Tumor Suppressors ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (23): 7168-81. <https://doi.org/10.1128/MCB.00256-08>.
- Robbs, Bruno K., Pedro I. Lucena, et João P. B. Viola. 2013. « The Transcription Factor NFAT1 Induces Apoptosis through Cooperation with Ras/Raf/MEK/ERK Pathway and Upregulation of TNF- α Expression ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (8): 2016-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.003>.
- Rodemann, H. Peter, et Marcel A. Blaese. 2007. « Responses of Normal Cells to Ionizing Radiation ». *Seminars in Radiation Oncology, Late Normal Tissue Injury*, 17 (2): 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2006.11.005>.
- Rødningen, Olaug Kristin, Anne-Lise Børresen-Dale, Jan Alsner, Trevor Hastie, et Jens Overgaard. 2008. « Radiation-Induced Gene Expression in Human Subcutaneous Fibroblasts Is Predictive of Radiation-Induced Fibrosis ». *Radiotherapy and Oncology, Special Issue: Clinical related radiobiology*, 86 (3): 314-20. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2007.09.013>.
- Rodríguez-Vargas, José Manuel, María José Ruiz-Magaña, Carmen Ruiz-Ruiz, Jara Majuelos-Melguizo, Andreína Peralta-Leal, María Isabel Rodríguez, José Antonio Muñoz-Gómez, et al. 2012. « ROS-Induced DNA Damage and PARP-1 Are Required for Optimal Induction of Starvation-Induced Autophagy ». *Cell Research* 22 (7): 1181-98. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.70>.
- Ron, David, et Peter Walter. 2007. « Signal Integration in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (7): 519-29. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>.
- Röntgen, W. K. 1896. « A New Form of Radiation ». *Science* 3 (72): 726-29. <https://doi.org/10.1126/science.3.72.726>.
- Rosenstein, Barry S. 2011. « Identification of SNPs associated with susceptibility for development of adverse reactions to radiotherapy ». *Pharmacogenomics* 12 (2): 267-75. <https://doi.org/10.2217/pgs.10.186>.
- Rosenstein, Barry S. 2017. « Radiogenomics: Identification of Genomic Predictors for Radiation Toxicity ». *Seminars in radiation oncology* 27 (4): 300-309. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2017.04.005>.
- Russell, N. S., A. GRUMMELS, A. A. M. HART, I. J. H. SMOLDERS, J. BORGER, H. BART^{TEL}INK, et A. C. BEGG. 1998. « Low predictive value of intrinsic fibroblast radiosensitivity for fibrosis development following radiotherapy for breast cancer ». *International Journal of Radiation Biology* 73 (6): 661-70. <https://doi.org/10.1080/095530098141915>.
- Ryan, Julie L. 2012. « Ionizing Radiation: The Good, the Bad, and the Ugly ». *The Journal of investigative dermatology* 132 (3 0 2): 985-93. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.411>.

- Sano, Renata, et John C. Reed. 2013. « ER Stress-Induced Cell Death Mechanisms ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (12): 3460-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>.
- Santini, Maria Paola, Claudio Talora, Toshihiko Seki, Loretta Bolgan, et G. Paolo Dotto. 2001. « Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21WAF1/CIP1 expression in keratinocyte differentiation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9575-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.161299698>.
- Santos-Sánchez, Norma Francenia, Raúl Salas-Coronado, Claudia Villanueva-Cañongo, et Beatriz Hernández-Carlos. 2019. « Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism ». *Antioxidants*, mars. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>.
- Schack, Line M. H., Stine E. Petersen, Steffen Nielsen, Lilly Lundby, Morten Høyer, Lise Bentzen, Jens Overgaard, Christian N. Andreassen, et Jan Alsner. 2017. « Validation of Genetic Predictors of Late Radiation-Induced Morbidity in Prostate Cancer Patients ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 56 (11): 1514-21. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1348626>.
- Schärer, Orlando D. 2013. « Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012609>.
- Schermerhorn, Kelly M., et Sarah Delaney. 2014. « A Chemical and Kinetic Perspective on Base Excision Repair of DNA ». *Accounts of Chemical Research* 47 (4): 1238-46. <https://doi.org/10.1021/ar400275a>.
- Schmidt-Ullrich, R. K., R. B. Mikkelsen, P. Dent, D. G. Todd, K. Valerie, B. D. Kavanagh, J. N. Contessa, W. K. Rorrer, et P. B. Chen. 1997. « Radiation-Induced Proliferation of the Human A431 Squamous Carcinoma Cells Is Dependent on EGFR Tyrosine Phosphorylation ». *Oncogene* 15 (10): 1191-97. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201275>.
- Schnarr, Kara, Douglas Boreham, Jinka Sathya, Jim Julian, et Ian S. Dayes. 2009. « Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis to Predict Radiation Therapy Late Toxicity in Prostate Cancer Patients ». *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 74 (5): 1424-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.10.039>.
- Schön, Simon, Isabelle Flierman, Andrea Ofner, Anika Stahringer, Lesca Miriam Holdt, Frank T. Kolligs, et Andreas Herbst. 2014. « β -Catenin Regulates NF-KB Activity via TNFRSF19 in Colorectal Cancer Cells ». *International Journal of Cancer* 135 (8): 1800-1811. <https://doi.org/10.1002/ijc.28839>.
- Seibold, Petra, Sabine Behrens, Peter Schmezer, Irmgard Helmbold, Gillian Barnett, Charlotte Coles, John Yarnold, et al. 2015. « XRCC1 Polymorphism Associated With Late Toxicity After Radiation Therapy in Breast Cancer Patients ». *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 92 (5): 1084-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.04.011>.
- Senavirathna, Lakmini Kumari, Chaoqun Huang, Xiaoyun Yang, Maria Cristina Munteanu, Roshini Sathiaselan, Dao Xu, Craig A. Henke, et Lin Liu. 2018. « Hypoxia induces pulmonary fibroblast proliferation through NFAT signaling ». *Scientific Reports* 8 (février). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21073-x>.
- Sharma, Khushboo, Ngoc Le, Moureq Alotaibi, et David A. Gewirtz. 2014. « Cytotoxic Autophagy in Cancer Therapy ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (6): 10034-51. <https://doi.org/10.3390/ijms150610034>.
- Sheard, Michael A. 2001. « Ionizing Radiation as a Response-Enhancing Agent for CD95-Mediated Apoptosis ». *International Journal of Cancer* 96 (4): 213-20. <https://doi.org/10.1002/ijc.1020>.

- Shibata, Atsushi. 2017. « Regulation of Repair Pathway Choice at Two-Ended DNA Double-Strand Breaks ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 803-805 (octobre): 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.011>.
- Shoshan, Einav, Russell R. Braeuer, Takafumi Kamiya, Aaron K. Mobley, Li Huang, Mayra E. Vasquez, Guermarie Velazquez-Torres, et al. 2016. « NFAT1 directly regulates IL-8 and MMP-3 to promote melanoma tumor growth and metastasis ». *Cancer research* 76 (11): 3145-55. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2511>.
- Singh, Ajit, et Harwant Singh. 1982. « Time-Scale and Nature of Radiation-Biological Damage: Approaches to Radiation Protection and Post-Irradiation Therapy ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 39 (janvier): 69-107. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(83\)90014-7](https://doi.org/10.1016/0079-6107(83)90014-7).
- Singh, Manni, Afsaneh Alavi, Rebecca Wong, et Sadanori Akita. 2016. « Radiodermatitis: A Review of Our Current Understanding ». *American Journal of Clinical Dermatology* 17 (3): 277-92. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0186-4>.
- Singh, Shiv K., Sandra Baumgart, Garima Singh, Alexander O. König, Kristina Reutlinger, Lorenz C. Hofbauer, Peter Barth, et al. 2011. « Disruption of a Nuclear NFATC2 Protein Stabilization Loop Confers Breast and Pancreatic Cancer Growth Suppression by Zoledronic Acid ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (33): 28761-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197533>.
- Sivan, Virginie, Marie-Catherine Vozenin-Brotons, Yves Tricaud, Jean-Louis Lefaix, Jean-Marc Cosset, Bernard Dubray, et Michèle T. Martin. 2002. « Altered Proliferation and Differentiation of Human Epidermis in Cases of Skin Fibrosis after Radiotherapy ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 53 (2): 385-93. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(01\)02732-8](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(01)02732-8).
- Skiöld, Sara, Omid Azimzadeh, Julianne Merl-Pham, Ingemar Naslund, Peter Wersall, Elisabet Lidbrink, Soile Tapio, Mats Harms-Ringdahl, et Siamak Haghdoust. 2015. « Unique Proteomic Signature for Radiation Sensitive Patients; a Comparative Study between Normo-Sensitive and Radiation Sensitive Breast Cancer Patients ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, DNA damage in chronic diseases and aging, 776 (juin): 128-35. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.12.002>.
- Smith, K. C., G. M. Hahn, R. T. Hoppe, et J. D. Earle. 1980. « Radiosensitivity in Vitro of Human Fibroblasts Derived from Patients with a Severe Skin Reaction to Radiation Therapy ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 6 (11): 1573-75. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(80\)90017-6](https://doi.org/10.1016/0360-3016(80)90017-6).
- Someya, Masanori, Hiroyuki Yamamoto, Masanori Nojima, Masakazu Hori, Kunihiro Tateoka, Kensei Nakata, Masaru Takagi, et al. 2015. « Relation between Ku80 and MicroRNA-99a Expression and Late Rectal Bleeding after Radiotherapy for Prostate Cancer ». *Radiotherapy and Oncology* 115 (2): 235-39. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.04.008>.
- Sorrell, J. Michael, et Arnold I. Caplan. 2004. « Fibroblast Heterogeneity: More than Skin Deep ». *Journal of Cell Science* 117 (5): 667-75. <https://doi.org/10.1242/jcs.01005>.
- Spivak, Graciela. 2015. « Nucleotide Excision Repair in Humans ». *DNA Repair*, DNA Repair in Chromatin: a Tribute to Michael Smerdon, 36 (décembre): 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.003>.
- Sprung, Carl N., Helen B. Forrester, Shankar Siva, et Olga A. Martin. 2015. « Immunological Markers That Predict Radiation Toxicity ». *Cancer Letters*, SI: Radiation and Immunity, 368 (2): 191-97. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.045>.

- Sriram, Gopu, Paul Lorenz Bigliardi, et Mei Bigliardi-Qi. 2015. « Fibroblast Heterogeneity and Its Implications for Engineering Organotypic Skin Models in Vitro ». *European Journal of Cell Biology* 94 (11): 483-512. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.08.001>.
- Stenerlöv, Bo, Karin H. Karlsson, Brian Cooper, et Björn Rydberg. 2003. « Measurement of Prompt DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells without Including Heat-Labile Sites: Results for Cells Deficient in Nonhomologous End Joining ». *Radiation Research* 159 (4): 502-10. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0502:MOPDDS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0502:MOPDDS]2.0.CO;2).
- Stiff, Tom, Mark O'Driscoll, Nicole Rief, Kuniyoshi Iwabuchi, Markus Löbrich, et Penny A. Jeggo. 2004. « ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation ». *Cancer Research* 64 (7): 2390-96. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3207>.
- Stracke, M. L., H. C. Krutzsch, E. J. Unsworth, A. Arestad, V. Cioce, E. Schiffmann, et L. A. Liotta. 1992. « Identification, Purification, and Partial Sequence Analysis of Autotaxin, a Novel Motility-Stimulating Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (4): 2524-29.
- Straub, Jeffrey M., Jacob New, Chase D. Hamilton, Chris Lominska, Yelizaveta Shnayder, et Sufi M. Thomas. 2015. « Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy ». *Journal of cancer research and clinical oncology* 141 (11): 1985-94. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-1974-6>.
- Stunova, Anna, et Lucie Vistejnova. 2018. « Dermal Fibroblasts—A Heterogeneous Population with Regulatory Function in Wound Healing ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 39 (février): 137-50. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.01.003>.
- Su, Z, Z Yang, L Xie, J P DeWitt, et Y Chen. 2016. « Cancer therapy in the necroptosis era ». *Cell Death and Differentiation* 23 (5): 748-56. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.8>.
- Sung, Patrick, et Hannah Klein. 2006. « Mechanism of Homologous Recombination: Mediators and Helicases Take on Regulatory Functions ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (10): 739-50. <https://doi.org/10.1038/nrm2008>.
- Svensson, J. Peter, Lukas J. A. Stalpers, Rebecca E. E. Esveltdt-van Lange, Nicolaas A. P. Franken, Jaap Haveman, Binie Klein, Ingela Turesson, Harry Vrieling, et Micheline Giphart-Gassler. 2006. « Analysis of Gene Expression Using Gene Sets Discriminates Cancer Patients with and without Late Radiation Toxicity ». *PLoS Medicine* 3 (10): e422. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030422>.
- Szumiel, I., B. Sochanowicz, et I. Buraczewska. 1990. « Ca²⁺ Mobilization Is Related to the Lethal Effect of X-Irradiation in L5178Y Cells ». *International Journal of Radiation Biology* 58 (1): 125-31. <https://doi.org/10.1080/09553009014551481>.
- Talbot, C J, G A Tanteles, G C Barnett, N G Burnet, J Chang-Claude, C E Coles, S Davidson, et al. 2012. « A replicated association between polymorphisms near TNF α and risk for adverse reactions to radiotherapy ». *British Journal of Cancer* 107 (4): 748-53. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.290>.
- Talbot, Christopher J., Marlon R. Veldwijk, David Azria, Chiara Batini, Miriam Bierbaum, Muriel Brengues, Jenny Chang-Claude, et al. 2019. « Multi-Centre Technical Evaluation of the Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis Assay as a Predictive Test for Radiotherapy Toxicity ». *Clinical and Translational Radiation Oncology* 18 (septembre): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.06.001>.
- Tandberg, Daniel J., Tracy Holt, et Chris R. Kelsey. 2017. « Plasma Metabolites and Risk of Radiation-Induced Esophagitis: A Secondary Analysis from a Prospective Study ». *Anticancer Research* 37 (2): 719-25.

- Tang, Juanjuan, Jiehui Di, Huan Cao, Jin Bai, et Junnian Zheng. 2015. « P53-Mediated Autophagic Regulation: A Prospective Strategy for Cancer Therapy ». *Cancer Letters* 363 (2): 101-7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.014>.
- Terui, Yasuhito, Natalie Saad, Shidong Jia, Frank McKeon, et Junying Yuan. 2004. « Dual Role of Sumoylation in the Nuclear Localization and Transcriptional Activation of NFAT1 ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (27): 28257-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403153200>.
- Tintelen, J. Peter van, Robert Mw Hofstra, Ans Cp Wiesfeld, Maarten P. van den Berg, Richard Nw Hauer, et Jan Dh Jongbloed. 2007. « Molecular Genetics of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Emerging Horizon? » *Current Opinion in Cardiology* 22 (3): 185-92. <https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e3280d942c4>.
- Tonelli, Claudia, Iok In Christine Chio, et David A. Tuveson. 2017. « Transcriptional Regulation by Nrf2 ». *Antioxidants & Redox Signaling* 29 (17): 1727-45. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>.
- Trachootham, Dunyaporn, Weiqin Lu, Marcia A. Ogasawara, Nilsa Rivera-Del Valle, et Peng Huang. 2008. « Redox Regulation of Cell Survival ». *Antioxidants & Redox Signaling* 10 (8): 1343-74. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1957>.
- Ueffing, Nana, Marc Schuster, Eric Keil, Klaus Schulze-Osthoff, et Ingo Schmitz. 2008. « Up-Regulation of c-FLIPshort by NFAT Contributes to Apoptosis Resistance of Short-Term Activated T Cells ». *Blood* 112 (3): 690-98. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-141382>.
- Ullerås, Erik, Mats Karlberg, Christine Möller Westerberg, Jessica Alfredsson, Steve Gerondakis, Andreas Strasser, et Gunnar Nilsson. 2008. « NFAT but not NF-κB is critical for transcriptional induction of the prosurvival gene A1 after IgE receptor activation in mast cells ». *Blood* 111 (6): 3081-89. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-053371>.
- Urano, Fumihiko, XiaoZhong Wang, Anne Bertolotti, Yuhong Zhang, Peter Chung, Heather P. Harding, et David Ron. 2000. « Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1 ». *Science* 287 (5453): 664-66. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>.
- Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, et B. Zhivotovsky. 2008. « Death through a Tragedy: Mitotic Catastrophe ». *Cell Death & Differentiation* 15 (7): 1153-62. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.47>.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, et M. Mazur. 2006. « Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer ». *Chemico-Biological Interactions* 160 (1): 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>.
- Vasireddy, R. S., C. N. Sprung, N. L. Cempaka, M. Chao, et M. J. McKay. 2010. « H2AX Phosphorylation Screen of Cells from Radiosensitive Cancer Patients Reveals a Novel DNA Double-Strand Break Repair Cellular Phenotype ». *British Journal of Cancer* 102 (10): 1511-18. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605666>.
- Verheij, Marcel, Gerald A Ruiter, Shuraila F Zerp, Wim J van Blitterswijk, Zvi Fuks, Adriana Haimovitz-Friedman, et Harry Bartelink. 1998. « The Role of the Stress-Activated Protein Kinase (SAPK/JNK) Signaling Pathway in Radiation-Induced Apoptosis ». *Radiotherapy and Oncology* 47 (3): 225-32. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(98\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(98)00007-3).
- Verma, Priyanka, et Roger A. Greenberg. 2016. « Noncanonical views of homology-directed DNA repair ». *Genes & Development* 30 (10): 1138-54. <https://doi.org/10.1101/gad.280545.116>.

- Vihma, Hanna, Priit Pruunsild, et Tõnis Timmusk. 2008. « Alternative splicing and expression of human and mouse NFAT genes ». *Genomics* 92 (5): 279-91. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.06.011>.
- Vitale, Ilio, Lorenzo Galluzzi, Maria Castedo, et Guido Kroemer. 2011. « Mitotic Catastrophe: A Mechanism for Avoiding Genomic Instability ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (6): 385-92. <https://doi.org/10.1038/nrm3115>.
- Vulin, Adeline, Melissa Sedkaoui, Sandra Moratille, Nicolas Sevenet, Pascal Soularue, Odile Rigaud, Laure Guibbal, et al. 2018. « Severe PATCHED1 Deficiency in Cancer-Prone Gorlin Patient Cells Results in Intrinsic Radiosensitivity ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 102 (2): 417-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>.
- Wagemaker, G., A. K. Guskova, V. G. Bebesko, N. M. Griffiths, et N. A. Krishenko. 1996. « Clinically Observed Effects in Individuals Exposed to Radiation as a Result of the Chernobyl Accident ». *One Decade after Chernobyl. Summing up the Consequences of the Accident. Proceedings of an International Conference*. http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:28027847.
- Walsh, David, et J. E. Greenhill. 1897. *The Röntgen Rays in Medical Work*. London : Baillière, Tindall and Cox. <http://archive.org/details/b2150071x>.
- Walters, Ryan D., Linda F. Drullinger, Jennifer F. Kugel, et James A. Goodrich. 2013. « NFATC2 recruits cJun homodimers to an NFAT site to synergistically activate interleukin-2 transcription ». *Molecular immunology* 56 (0): 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.03.022>.
- Wang, Lai, Fenghe Du, et Xiaodong Wang. 2008. « TNF-Alpha Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways ». *Cell* 133 (4): 693-703. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.036>.
- Wang, Lili, Li He, Guoqiang Bao, Xin He, Saijun Fan, et Haichao Wang. 2016. « Ionizing Radiation Induces HMGB1 Cytoplasmic Translocation and Extracellular Release ». *Guo ji fang she yi xue he yi xue za zhi = International journal of radiation medicine and nuclear medicine* 40 (2): 91-99.
- Wang, Yingying, Marjan Boerma, et Daohong Zhou. 2016. « Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases ». *Radiation Research* 186 (2): 153-61. <https://doi.org/10.1667/RR14445.1>.
- Ward, H. Snowden. 1898. *Practical Radiography, Ed.2*. <http://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.514150>.
- Weigel, C., P. Schmezer, C. Plass, et O. Popanda. 2015. « Epigenetics in Radiation-Induced Fibrosis ». *Oncogene* 34 (17): 2145-55. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.145>.
- Weigel, Christoph, Marlon R. Veldwijk, Christopher C. Oakes, Petra Seibold, Alla Slynko, David B. Liesenfeld, Mariona Rabionet, et al. 2016. « Epigenetic Regulation of Diacylglycerol Kinase Alpha Promotes Radiation-Induced Fibrosis ». *Nature Communications* 7 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/ncomms10893>.
- Weigmann, Benno, Hans A. Lehr, George Yancopoulos, David Valenzuela, Andrew Murphy, Sean Stevens, Jan Schmidt, Peter R. Galle, Stefan Rose-John, et Markus F. Neurath. 2008. « The transcription factor NFATC2 controls IL-6-dependent T cell activation in experimental colitis ». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (9): 2099-2110. <https://doi.org/10.1084/jem.20072484>.
- Werbrouck, Joke, Kim De Ruyck, Laurence Beels, Anne Vral, Marc Van Eijkeren, Wilfried De Neve, et Hubert Thierens. 2010. « Prediction of late normal tissue complications in RT treated gynaecological cancer patients: Potential of the γ -H2AX foci assay and association with chromosomal radiosensitivity ». *Oncology Reports* 23 (2): 571-78. https://doi.org/10.3892/or_00000671.

- Werbrouck, Joke, Frédéric Duprez, Wilfried De Neve, et Hubert Thierens. 2011. « Lack of a Correlation between γ H2AX Foci Kinetics in Lymphocytes and the Severity of Acute Normal Tissue Reactions during IMRT Treatment for Head and Neck Cancer ». *International Journal of Radiation Biology* 87 (1): 46-56. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.518213>.
- West, C., D. Azria, J. Chang-Claude, S. Davidson, P. Lambin, B. Rosenstein, D. De Ruyscher, et al. 2014. « The REQUITE Project: Validating Predictive Models and Biomarkers of Radiotherapy Toxicity to Reduce Side-Effects and Improve Quality of Life in Cancer Survivors ». *Clinical Oncology* 26 (12): 739-42. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2014.09.008>.
- West, C. M. 1995. « Invited Review: Intrinsic Radiosensitivity as a Predictor of Patient Response to Radiotherapy ». *The British Journal of Radiology* 68 (812): 827-37. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-68-812-827>.
- Widel, Maria, Sylwia Jedrus, Beata Lukaszczyk, Katarzyna Raczek-Zwierzycka, et Andrzej Swierniak. 2003. « Radiation-Induced Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes is Correlated with Normal Tissue Damage in Patients with Cervical Carcinoma Undergoing Radiotherapy ». *Radiation Research* 159 (6): 713-21. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0713:RMFIPB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0713:RMFIPB]2.0.CO;2).
- Woloshyn, Tania Anne, éd. 2017. *Soaking Up the Rays: Light Therapy and Visual Culture in Britain, c. 1890–1940*. Wellcome Trust–Funded Monographs and Book Chapters. Manchester (UK): Manchester University Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK476356/>.
- Woods, W. G., T. D. Byrne, et T. H. Kim. 1988. « Sensitivity of Cultured Cells to Gamma Radiation in a Patient Exhibiting Marked in Vivo Radiation Sensitivity ». *Cancer* 62 (11): 2341-45. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19881201\)62:11<2341::aid-cnrcr2820621114>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19881201)62:11<2341::aid-cnrcr2820621114>3.0.co;2-w).
- Wu, Qiao, Su Liu, Xiao-feng Ye, Zhi-wei Huang, et Wen-jin Su. 2002. « Dual Roles of Nur77 in Selective Regulation of Apoptosis and Cell Cycle by TPA and ATRA in Gastric Cancer Cells ». *Carcinogenesis* 23 (10): 1583-92. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.10.1583>.
- Wynn, Thomas A, et Thirumalai R Ramalingam. 2012. « Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease ». *Nature Medicine* 18 (7): 1028-40. <https://doi.org/10.1038/nm.2807>.
- Xiong, Wenjing, Qian Wen, Xialin Du, Jinli Wang, Wenting He, Ruining Wang, Shengfeng Hu, et al. 2018. « Novel Function of Cyclooxygenase-2: Suppressing Mycobacteria by Promoting Autophagy via the Protein Kinase B/Mammalian Target of Rapamycin Pathway ». *The Journal of Infectious Diseases* 217 (8): 1267-79. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy033>.
- Yamamori, Tohru, Shunsuke Meike, Masaki Nagane, Hironobu Yasui, et Osamu Inanami. 2013. « ER Stress Suppresses DNA Double-Strand Break Repair and Sensitizes Tumor Cells to Ionizing Radiation by Stimulating Proteasomal Degradation of Rad51 ». *FEBS Letters* 587 (20): 3348-53. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.030>.
- Yamamori, Tohru, Hironobu Yasui, Masayuki Yamazumi, Yusuke Wada, Yoshinari Nakamura, Hideo Nakamura, et Osamu Inanami. 2012. « Ionizing Radiation Induces Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production Accompanied by Upregulation of Mitochondrial Electron Transport Chain Function and Mitochondrial Content under Control of the Cell Cycle Checkpoint ». *Free Radical Biology & Medicine* 53 (2): 260-70. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033>.

- Yan, J., K. K. Khanna, et M. F. Lavin. 2000. « Defective Radiation Signal Transduction in Ataxia-Telangiectasia Cells ». *International Journal of Radiation Biology* 76 (8): 1025-35. <https://doi.org/10.1080/09553000050111497>.
- Yang, Yan, Yuehua Yang, Xi Yang, Hongcheng Zhu, Qing Guo, Xiaochen Chen, Hao Zhang, Hongyan Cheng, et Xinchun Sun. 2015. « Autophagy and Its Function in Radiosensitivity ». *Tumor Biology* 36 (6): 4079-87. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3496-x>.
- Yano, Ken-ichi, et David J. Chen. 2008. « Live cell imaging of XLF and XRCC4 reveals a novel view of protein assembly in the non-homologous end-joining pathway ». *Cell Cycle* 7 (10): 1321-25. <https://doi.org/10.4161/cc.7.10.5898>.
- Yarosh, Daniel B., Arely V. Pena, Stephanie L. Nay, Matthew T. Canning, et David A. Brown. 2005. « Calcineurin Inhibitors Decrease DNA Repair and Apoptosis in Human Keratinocytes Following Ultraviolet B Irradiation ». *The Journal of Investigative Dermatology* 125 (5): 1020-25. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23858.x>.
- Yiu, Gary K., et Alex Toker. 2006. « NFAT Induces Breast Cancer Cell Invasion by Promoting the Induction of Cyclooxygenase-2 ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (18): 12210-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600184200>.
- Yoeli-Lerner, Merav, Y. Rebecca Chin, Christopher K. Hansen, et Alex Toker. 2009. « THE AKT/PKB AND GSK-3 β SIGNALING PATHWAY REGULATES CELL MIGRATION THROUGH THE NFAT1 TRANSCRIPTION FACTOR ». *Molecular cancer research : MCR* 7 (3): 425-32. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0342>.
- Yoeli-Lerner, Merav, Gary K. Yiu, Isaac Rabinovitz, Peter Erhardt, Sebastien Jauliac, et Alex Toker. 2005. « Akt Blocks Breast Cancer Cell Motility and Invasion through the Transcription Factor NFAT ». *Molecular Cell* 20 (4): 539-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.033>.
- You, Zhongsheng, Linda Z. Shi, Quan Zhu, Peng Wu, You-Wei Zhang, Andrew Basilio, Nina Tonnu, Inder M. Verma, Michael W. Berns, et Tony Hunter. 2009. « CtIP Links DNA Double-Strand Break Sensing to Resection ». *Molecular Cell* 36 (6): 954-69. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.002>.
- Youle, Richard J., et Derek P. Narendra. 2011. « Mechanisms of mitophagy ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (1): 9-14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>.
- Youn, Hong-Duk, Talal A. Chatila, et Jun O. Liu. 2000. « Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis ». *The EMBO Journal* 19 (16): 4323-31. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4323>.
- Yu, Li, Yang Chen, et Sharon A. Tooze. 2018. « Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms ». *Autophagy* 14 (2): 207-15. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838>.
- Yue, Q.-Y., W. Zhao, Y. Tan, X.-L. Deng, et Y.-H. Zhang. 2019. « PLCE1 Inhibits Apoptosis of Non-Small Cell Lung Cancer via Promoting PTEN Methylation ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 23 (14): 6211-16. https://doi.org/10.26355/eurrev_201907_18438.
- Zalckvar, Einat, Hanna Berissi, Liat Mizrachy, Yulia Idelchuk, Itay Koren, Miriam Eisenstein, Helena Sabanay, Ronit Pinkas-Kramarski, et Adi Kimchi. 2009. « DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy ». *EMBO Reports* 10 (3): 285-92. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.246>.
- Zhang, Bo, Yan Wang, Xueli Pang, Yongping Su, Guoping Ai, et Tao Wang. 2010. « ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells ». *International Journal of Radiation Biology* 86 (6): 429-35. <https://doi.org/10.3109/09553001003668014>.

- Zhang, Geng, Peijun He, Jochen Gaedcke, B. Michael Ghadimi, Thomas Ried, Harris G. Yfantis, Dong H. Lee, Nader Hanna, H. Richard Alexander, et S. Perwez Hussain. 2013. « FOXL1, a Novel Candidate Tumor Suppressor, Inhibits Tumor Aggressiveness and Predicts Outcome in Human Pancreatic Cancer ». *Cancer research* 73 (17): 5416-25. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0362>.
- Zhang, Xu, Zhuo Zhang, Jianwen Cheng, Mao Li, Wei Wang, Wenrong Xu, Hui Wang, et Ruiwen Zhang. 2012. « Transcription Factor NFAT1 Activates the mdm2 Oncogene Independent of p53 ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (36): 30468-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373738>.
- Zhawar, Vikramjit K., Raj P. Kandpal, et Raghbir S. Athwal. 2019. « Isoforms of Ionotropic Glutamate Receptor GRIK2 Induce Senescence of Carcinoma Cells ». *Cancer Genomics - Proteomics* 16 (1): 59-64. <https://doi.org/10.21873/cgp.20111>.
- Zou, Bingwen, Julius Philipp Schuster, Kerun Niu, Qianyi Huang, Alexander Rühle, et Peter Ernst Huber. 2019. « Radiotherapy-Induced Heart Disease: A Review of the Literature ». *Precision Clinical Medicine* 2 (4): 270-82. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pbz025>.

ANNEXES

Article publié dans l'International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics

Titre : Un défaut sévère de PATCHED1 dans les cellules de patients Gorlin prédisposés au cancer provoque une radiosensibilité intrinsèque

A. Vulin, M Sedkaoui, S. Moratille, N. Sevenet, P. Soularue, O. Rigaud, L. Guibbal, **J. Dulong**, P. Jeggo, J-F. Deleuze, J. Lamartine, M.T. Martin

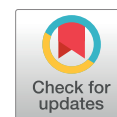
Résumé :

Le syndrome de Gorlin (ou syndrome de naevomatose basocellulaire) est une maladie génétique prédisposant au cancer pour laquelle l'hyper-susceptibilité à un second cancer et aux effets secondaires de radiothérapie est débattue, tout comme son hyper-radiosensibilité au niveau cellulaire. Le syndrome de Gorlin résulte d'une mutation hétérozygote dans le gène *PTCH1* chez 60% des patients et, par conséquent, nous avons souhaité mettre à jour les corrélations entre la radiosensibilité intrinsèque et l'expression du gène *PTCH1* dans des fibroblastes dermiques de patients adultes atteints du syndrome de Gorlin. La radiosensibilité des fibroblastes de 6 patients atteints du syndrome de Gorlin a été déterminée par des tests de survie cellulaire après une forte (0,5 – 3,5 Gy) ou une faible (50 – 250 mGy) exposition à des rayons γ . Les expressions de *PTCH1* et des acteurs de la réponse aux dommages de l'ADN ont été caractérisées par RT-qPCR et western blotting. Les dommages à l'ADN et la réparation ont été étudiés par immunofluorescence contre γ H2AX et 53BP1. L'extinction stable de *PTCH1* a été effectuée dans des cellules issues de donneurs sains par ARN interférence. Les cellules des patients Gorlin ont été génotypées par 2 méthodes de séquençage complémentaires. Seules les cellules des patients Gorlin présentant un défaut sévère de PATCHED1 au niveau protéique souffrent d'une toxicité accrue aux radiations de fortes et de faibles doses. Pour 2 souches de cellules, les mutations hétérozygotes dans l'extrémité 5' du gène *PTCH1* expliquent l'absence

de PATCHED1 au niveau protéique. Dans toutes les cellules radiosensibles, les voies de la réponse aux dommages de l'ADN (le niveau d'ATM, CHK2 et P53 et leur activation par phosphorylation) étaient dérégulées après irradiation, alors que la reconnaissance des CDB était intacte. De plus, les cellules normales sous-exprimant *PTCH1* après ARN interférence ont montré une survie réduite après irradiation, reliant directement ce gène à la radiosensibilité aux fortes et faibles doses. Dans cette étude, nous avons observé une corrélation inverse entre l'expression de *PTCH1* et la radiosensibilité cellulaire, suggérant une explication des résultats contradictoires précédemment reportés sur le syndrome de Gorlin et pouvant fournir une base pour le dépistage des patients Gorlin radiosensibles par analyse des mutations dans le gène *PTCH1*.

Biology Contribution

Severe PATCHED1 Deficiency in Cancer-Prone Gorlin Patient Cells Results in Intrinsic Radiosensitivity



Adeline Vulin, PhD,^{*} Melissa Sedkaoui, MS,^{*} Sandra Moratille,^{*} Nicolas Sevenet, PhD,[†] Pascal Soularue, PhD,^{*} Odile Rigaud, PhD,^{*} Laure Guibbal, MS,^{*} Joshua Dulong, MS,[‡] Penny Jeggo, PhD,[§] Jean-François Deleuze, PhD,^{||} Jérôme Lamartine, PhD,[‡] and Michèle T. Martin, PhD^{*}

^{*}Laboratory of Genomics and Radiobiology of Keratinopoiesis, CEA, DRF/IFJ/iRCM, INSERM/UMR967, Université Paris-Diderot, Université Paris-Saclay, Evry, France; [†]Molecular Genetics Laboratory, Institut Bergonié/INSERM U1218, Université de Bordeaux, Bordeaux cedex, France; [‡]Laboratory of Tissue Biology and Therapeutic Engineering, UMR5305 CNRS — Université Lyon I, Lyon Cedex 07, France; [§]Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex, Brighton, United Kingdom; and ^{||}CNRGH, Genome Institute, CEA, DRF/IFJ, Evry, France

Received Jan 9, 2018, and in revised form Apr 30, 2018. Accepted for publication May 20, 2018.

Summary

Gorlin syndrome is a typical case of debated hypersensitivity to radiation, although it is well-recognized as a cancer-prone disorder. The present data reveal that only Gorlin cells presenting severe deficiency in *PTCH1* gene expression exhibited significantly increased cellular radiosensitivity and

Purpose: Gorlin syndrome (or basal-cell nevus syndrome) is a cancer-prone genetic disease in which hypersusceptibility to secondary cancer and tissue reaction after radiation therapy is debated, as is increased radiosensitivity at cellular level. Gorlin syndrome results from heterozygous mutations in the *PTCH1* gene for 60% of patients, and we therefore aimed to highlight correlations between intrinsic radiosensitivity and *PTCH1* gene expression in fibroblasts from adult patients with Gorlin syndrome.

Methods and Materials: The radiosensitivity of fibroblasts from 6 patients with Gorlin syndrome was determined by cell-survival assay after high (0.5–3.5 Gy) and low (50–250 mGy) γ -ray doses. *PTCH1* and DNA damage response gene expression was characterized by real-time polymerase chain reaction and Western blotting. DNA damage and repair were investigated by γ H2AX and 53BP1 foci assay. *PTCH1*

Reprint requests to: Michèle T. Martin, PhD, Laboratory of Genomics and Radiobiology of Keratinopoiesis, 2 Rue G Crémieux, 91057, Evry, France. E-mail: michele.martin@cea.fr

This research was supported by grants from EURATOM (RISK-IR, FP7), ANR (INDIRA, RSNR), and ANSES (Lowradsensor).

Conflicts of interest: none.

Supplementary material for this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>.

Acknowledgments—The authors thank Delphine Lafon (Institut Bergonié-INSERM/U1218), and Frédéric Auvré (CEA/IFJ/LGRK-INSERM/U967) for excellent technical support. They also thank Olivier Alibert (CEA/DRF/LEFG) for his support in bio-informatics, Thierry Magnaldo (INSERM/U1081-CNRS/UMR7284-UNS) for sharing patient cells, Nicolas Fortunel (CEA/IFJ/LGRK-INSERM/U967) for his meticulous reading and scientific discussions, and Paul-Henri Roméo (CEA/iRCM-INSERM/U967) for constant support. Our thanks also go to Genopole® (Evry, France) for equipment and infrastructures.

that the PATCHED1 protein had a direct role in regulating intrinsic radiosensitivity after both high and low radiation doses. PATCHED1 level may thus provide a prognostic screen for radiosensitive patients with *PTCH1* heterozygous mutations.

knockdown was performed in cells from healthy donors by using stable RNA interference. Gorlin cells were genotyped by 2 complementary sequencing methods.

Results: Only cells from patients with Gorlin syndrome who presented severe deficiency in PATCHED1 protein exhibited a significant increase in cellular radiosensitivity, affecting cell responses to both high and low radiation doses. For 2 of the radiosensitive cell strains, heterozygous mutations in the 5' end of *PTCH1* gene explain PATCHED1 protein deficiency. In all sensitive cells, DNA damage response pathways (ATM, CHK2, and P53 levels and activation by phosphorylation) were deregulated after irradiation, whereas DSB repair recognition was unimpaired. Furthermore, normal cells with RNA interference-mediated *PTCH1* deficiency showed reduced survival after irradiation, directly linking this gene to high- and low-dose radiosensitivity.

Conclusions: In the present study, we show an inverse correlation between *PTCH1* expression level and cellular radiosensitivity, suggesting an explanation for the conflicting results previously reported for Gorlin syndrome and possibly providing a basis for prognostic screens for radiosensitive patients with Gorlin syndrome and *PTCH1* mutations. © 2018 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

At least 15 different genetic disorders are now associated with increased cellular radiosensitivity (1). Gorlin syndrome is a typical case of debated cellular hypersensitivity, although it is well-recognized as a cancer-prone disorder. Gorlin syndrome is mainly caused by heterozygous mutations in the *PTCH1* gene, which codes for the Sonic hedgehog (SHH) receptor (2, 3), because mutations in this gene have been described in around 60% of patients with a Gorlin phenotype (4, 5). We investigated the correlations between cellular radiosensitivity and *PTCH1* gene expression in fibroblasts isolated from adult patients with Gorlin syndrome.

Gorlin syndrome, or basal cell nevus syndrome (BCNS), is an autosomal dominant inherited disease with prevalence varying from 1 in 57,000 to 1 in 256,000 and is characterized by developmental abnormalities and a predisposition to skin neoplasms and medulloblastoma, as reviewed by Lo Muzio (6). Because PATCHED1 is a repressor of the SHH signaling pathway through its interaction with the smoothened protein, it has been proposed to act as a tumor suppressor. Consequently mutations of the second allele of *PTCH1* result in tumor formation (7). To study molecular events and basal cell carcinoma (BCC) appearance associated with *Ptch1* mutations, several murine models with heterozygous mutations, spontaneous or generated, have been described and are reviewed by Saran and Nitzki et al (7, 8). In addition to developmental pattern issues, individuals with *Ptch1* mutations originally showed spontaneous medulloblastomas (9) and soft-tissue tumors such as rhabdomyosarcomas, with an incidence depending on the genetic background (10). After ionizing radiation (IR), *Ptch1* heterozygous embryos exhibit a higher frequency of IR-induced developmental defects compared to their wild-type littermates (10), suggesting that *Ptch1*^{+/-} mice are more sensitive to radiation. Since then, *Ptch1* knockout mice have been useful models for molecular events involved in BCC development upon

irradiation (11), as well as for adverse tissue reaction occurrence, such as cataract (12).

The first evidence that IR dramatically increases the incidence of tumors in patients with Gorlin syndrome was reported more than 40 years ago in patients with cancer (13), notably those treated for medulloblastoma, and this has since been the focus of several case reports (14-17). In particular, children with BCNS appear to be at high risk of developing multiple BCCs in irradiated areas, usually from 6 months to 3 years after radiation therapy (13, 18). Consequently, minimizing IR exposure and using nonionizing imaging modalities when possible is recommended (19). However, this susceptibility to IR-induced cancer is more controversial in adults, and several authors have reported patients who did not develop secondary BCC after multiple radiation therapy treatments (20, 21). In addition, patients with Gorlin syndrome may be prone to tissue reactions after radiation therapy, although this clinical aspect has been poorly documented. At the cellular level, data are again inconsistent, with some groups reporting decreased cell survival after radiation exposure (22-24) and others not reporting this (25-27).

In the present study, we show that only Gorlin cells presenting severe deficiency in *PTCH1* gene and protein expression exhibited a significant increase in radiosensitivity, which suggests an explanation for the conflicting results so far reported concerning the response to radiation in cells from patients with Gorlin syndrome. Furthermore, our molecular data provide evidence for a direct role of the PATCHED1 protein in the regulation of intrinsic radiosensitivity.

Methods and Materials

Cells from patients with Gorlin syndrome

Nonimmortalized dermal fibroblasts from 6 adult patients with Gorlin syndrome (GM0-; age 27 to 58 years, 3 men and 3 women; see details in Table E1; available online at

<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>) were obtained from the Coriell Institute cell repositories (Camden, NJ). Genotyping had not been performed, and clinical information in the repository was limited to classification as patients with BCNS. Primary dermal fibroblasts from 4 healthy individuals were used as control cells (human normal fibroblast [HNF] 1-4), obtained either from the Coriell Institute (1 donor) or in-house (3 different donors). Cultures were performed in Dulbecco's Modified Eagle Medium—Glutamax medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 15% fetal bovine serum (ThermoFisher), between passages 6 to 10, with plating density adapted to each cell strain (see details on proliferative capacity in Table E2; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>).

Radiation sensitivity

Cells were exposed to high (0.5–3.5 Gy; dose rate, 0.89 Gy/min) and low IR doses (50–250 mGy; dose rate, 50 mGy/min) using γ -rays from a ^{137}Cs source. For colony survival assays, cells were exposed to IR 5 hours after seeding and were cultured for 2 weeks. All colonies containing more than 50 cells were scored as survivors.

Quantitative polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from fibroblasts at 80% confluence with the RNeasy MiniKit (Qiagen, Hilden, Germany); an equal amount of RNA was used for reverse transcription (High-Capacity RNA-to-cDNA Kit, ThermoFisher). Real-time polymerase chain reactions were carried out using complementary DNA as template and were amplified using iTaq Universal probes supermix (Biorad, Hercules, CA) and specific probes to target the *PTCH1* gene (Hs00970977_m1; ThermoFisher). The 18S housekeeping gene was used as internal control (Hs99999901_s1).

Western blot analysis

Fibroblasts were harvested at 80% by trypsinization. Cell pellets were washed and resuspended in radio-immunoprecipitation assay buffer (Sigma, St. Louis, MO) for total protein extraction and sonicated for phosphorylation studies. Proteins were quantified using the Bradford method, loaded on a 4% to 12% stain-free gel (Biorad) for 40 minutes to 1 hour at a constant 200V, and transferred for 10 minutes at a constant 2.5 A in the Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad). Membranes were blocked in tris-buffered saline–tween with 5% milk or bovine serum albumin and immunoblotted overnight (L isoform PATCHED1, epitope aa 1–50, Abcam; full antibody table in Table E3; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>). Protein detection was performed using the ChemiDoc MP system (Biorad), and normalization was done with the stain-free system from Image Lab software (Biorad).

PTCH1 next-generation sequencing mutation screening

PTCH1 mutation screening was performed through 2 different next-generation sequencing procedures: exonic pyrosequencing with the Roche GS Junior System at CEA-CNRRGH (Evry, France) for transcripts NM_1083602 and NM_1083603 (*PTCH1*_M and L' isoforms) and sequencing by synthesis following coding sequence capture on an Illumina Miseq benchtop sequencer (Illumina, San Diego, CA) at the Bergonié Institute (INSERM, Bordeaux, France) for transcript NM_000264 (*PTCH1*_L isoform) (Methods E1; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>).

γH2AX and 53BP1 foci assays

For γH2AX (28), cells were irradiated with 3 Gy by using a ^{137}Cs γ -ray source (dose rate, 1.02 Gy/min⁻¹), further cultured for the indicated times, fixed with 4% formaldehyde (paraformaldehyde) and permeabilized with 0.2% Triton X-100, followed by staining with 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride and γH2AX antibody. The average number of separate γH2AX foci was assessed on at least 300 cells using the Cellomics ArrayScan VTI (ThermoFisher). For 53BP1, cells were irradiated with 3 Gy by using an x-ray source (XRAD 320; Precision X-Ray, North Branford, CT), further cultured for the indicated times, fixed on coverslips (3% paraformaldehyde, 2% sucrose phosphate-buffered saline [PBS]) and permeabilized (20 mM HEPES pH 7.4, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose and 0.5% Triton X-100). Coverslips were incubated with 5% goat serum PBS for blocking, before immunostaining with anti-53BP1 antibody in 2% goat serum PBS. Foci in 50 cells were counted using an Eclipse Ti-E inverted microscope (Nikon). (See Methods E4 for detailed foci assays; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>).

RNA interference

Fibroblasts from healthy donors were stably transduced with lentiviral vectors (Vectalys SA., Toulouse, France). Transductions of sh-*PTCH1*-GFP and sh-scramble-GFP were performed on fibroblasts at ~40% confluence. Cells were incubated for 6 hours with lentiviral particles (multiplicity of infection at 20) in the presence of hexadimethrine bromide at 4 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma). After 3 days, transduced cells (efficiency 60%–98%) were sorted by flow cytometry (MoFlo; Beckman Coulter, Brea, CA) according to green fluorescent protein fluorescence and amplified for 1 week before analysis.

Statistics

The Student test was used. Significance was assessed according to a normal distribution law, and means were considered significantly different if $Z_0 > 1$ [$Z_0 = (\text{mean } X - \text{mean } Y) / \sqrt{N} \cdot (\sqrt{\sigma^2(\text{mean } X) + \sigma^2(\text{mean } Y)})$] where

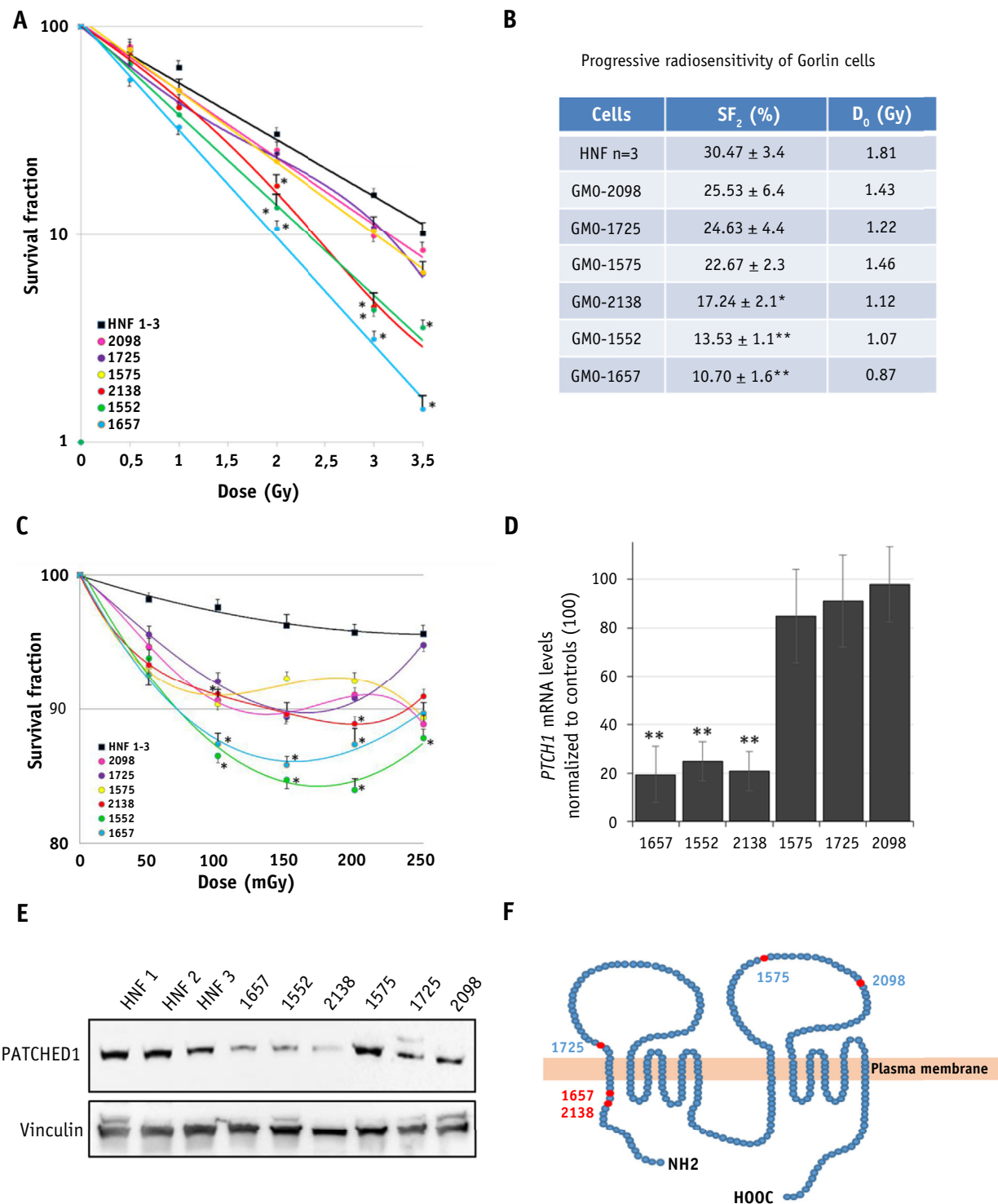


Fig. 1. A subpopulation of highly *PTCH1*-deficient Gorlin cells is radiosensitive. (A) Colony survival assays showed that GM0-1657, -1552, and -2138 cells exhibited significantly greater sensitivity to high doses than cells from 3 healthy donors (HNF 1-3 in black, averaged); 6 Gorlin cell strains (GM0-) were studied in 3 independent experiments, each with 3 to 6 replicates. (B) Parameters of the survival curves. HNF: mean for cells from 3 healthy donors. GM0-: cells from Gorlin patients. SF₂ is the survival fraction after 2 Gy. D₀ is the dose for which 37% survival was observed. (C) Colony survival assays showed hypersensitivity after low radiation doses for GM0-1657, -1552, and -2138; (dose rate, 50 mGy/min; survival values in Table E4; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>); 3 independent experiments, each with 3 to 6 replicates. (D) *PTCH1* mRNA levels (L isoform) measured in Gorlin cells by real-time quantitative polymerase chain reaction on 3 replicates and compared with the mean value for 3 normal cells, normalized to 100. (E) Representative image of

$N = 1.96$ or 2.58 for significance at the 5% or 1% level, respectively.

Results

Cells from 3 patients with Gorlin syndrome are radiosensitive

Colony survival assays showed that cells from only 3 patients with Gorlin syndrome (GM0-1657, -1552, and -2138) out of the 6 cell strains examined exhibited significantly greater sensitivity to medium and high doses (Fig. 1A and B) than cells from 3 healthy donors (HNF 1-3). Similar data were found after low doses (Fig. 1C and Table E4; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>), within a window ranging from 50 to 250 mGy, suggesting a low-dose hypersensitivity response. Although a tendency to hypersensitivity between 100 and 250 mGy was observed for all Gorlin cells, survival reduction was significant only for the 3 cell strains sensitive to high doses (patients GM0-1657, -1552, and -2138).

Marked *PTCH1* gene expression deficiency correlates with radiosensitivity

The radiosensitive cells (GM0-1657, -1552 and -2138) exhibited significantly less *PTCH1* messenger RNA (mRNA) than cells from the 3 healthy donors (19%, 25%, and 21%, respectively; $n = 6$, $P < .01$) (Fig. 1D). Similarly, in protein level, PATCHED1 expression was lower in the radiosensitive cells (22%, 25%, and 39% respectively, $n = 3$, $P < .01$) (Fig. 1E). Hedgehog signaling was also affected in these cells, notably with a reduced expression of the GLI2 transcription factor (Fig. E1; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>).

Variable severity of *PTCH1* mutations

Genetic studies (Table 1) revealed that cells from 5 patients with Gorlin syndrome exhibited at least 1 heterozygous mutation in the *PTCH1* gene, but with different types and locations (Fig. 1F). Four of these mutations were not previously reported. For GM0-1657 and GM0-2138, the insertion and deletion events in exon 2 led to a premature stop codon in exon 3, which predicts nonsense-mediated mRNA decay for the mutated transcript or a strongly truncated protein that is probably rapidly degraded. For GM0-1575, -1725, and -2098, the observed

mutations predicted more limited defects for the PATCHED1 protein. For 1 patient (GM0-1552), a variant was detected in the 5'UTR region, common to GM0-1575, 1725, and 2098, but no mutation was found in the coding regions of *PTCH1*.

Defective DNA damage response signaling in radiosensitive Gorlin cells

For the ATM/CHK2/P53 pathway, downregulations of protein expression were found at a basal level in the radiosensitive cells as compared to controls (Fig. E2; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>) and after 2 Gy irradiation (Fig. 2A). Furthermore, activation by irradiation was impaired, notably for phospho-CHK2 and phospho-P53, and this deficiency was observed in all the radiosensitive cells (Fig. 2B), which may be due both to the reduced basal level and to an activation defect. For phospho-ATM, only GM0-1657 and -1552 were affected.

To monitor DNA double-strand break formation and repair, enumeration of γ H2AX and 53BP1 foci was performed at 0, 0.25, 2, 6, 24, and 48 hours after 3 Gy irradiation and showed no difference between normal and Gorlin cells (Fig. 2C and D).

Induced PATCHED1 deficiency in normal cells results in increased radiosensitivity

PTCH1 expression was decreased in cells from healthy donors after infection with a lentiviral vector carrying a short hairpin RNA (shRNA) sequence targeting *PTCH1*, with a mean reduction of at least 60% for mRNA and around 50% for the protein (Fig. 3A, 3B, and 3F). Colony survival assays showed that cells from 3 different healthy donors transduced with sh-*PTCH1* lentivector showed a significantly smaller survival fraction at 2 Gy, whereas cells receiving a scramble sh vector did not differ from controls (Fig. 3C and Fig. E3; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>). Furthermore, irradiation between 0.5 and 3.5 Gy resulted in a survival curve close to that of the radiosensitive cells from patients with Gorlin syndrome (Fig. 3D). Moreover, induced PATCHED1 deficiency in cells from healthy donors resulted in increased sensitivity to low doses of IR (100 and 200 mGy, Fig. 3E and Fig. E4; available online at <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>). Knock-down cells also showed defects in DNA damage response (DDR) pathways and notably decreased basal expression of CHK2 and P53 (Fig. 3F).

Western blot analysis with PATCHED1 antibody (L isoform, epitope aa 1-50) on normal fibroblasts (HNF-) and Gorlin cells (GM0-), with vinculin as a loading control of total protein extracts. (F) Localization of *PTCH1* mutations on a schematic image of PATCHED1 protein, with the 2 intracellular arms and the 2 large extracellular loops required for HH binding. The NH2 terminal region is targeted in 2 radiosensitive cell strains. Red beads represent the putative amino-acid modified by the mutation found for each Gorlin cell line. Significant differences: * at $P < .05$ and ** at $P < .01$.

Table 1 Genotyping analysis by next-generation sequencing

Cell strain	Localization hg 19	Mutations and variants		References
GM0-2098	Chr9: 98221881 Intron 17	Splice site mutation (donor site +1) C>G	Exon 18 skipping and stop codon in exon 19	Unpublished
	Chr9: 98270646 5'UTR isoform L	Insertion T>TGCC	Triplet insertion	Tietze 2013 (37)
GM0-1725	Chr9: 98268700 Exon 2	Missense mutation (c383T > L128P)	Protein structure modification	Unpublished
	Chr9: 98270646 5'UTR isoform L	Insertion: T>TGCC	Triplet insertion	Tietze 2013 (37)
GM0-1575	Chr9: 98218697 Intron 18	Splice site mutation (acceptor site -2) T>G	Exon 19 skipping and stop codon in exon 20	Unpublished
	Chr9: 98270646 5'UTR isoform L	Insertion: T>TGCC	Triplet insertion	Tietze 2013 (37)
GM0-2138	Chr9: 98268800 Exon 2	Insertion (c.283 C>CT)	Frameshift and stop codon in exon 3	Boutet 2003 (38) Chidambaram 1996 (39)
GM0-1552	Chr9: 98270646 5'UTR isoform L	Insertion T>TGCC	Triplet insertion	Tietze 2013 (37)
GM0-1657	Chr9: 98268792 Exon 2	Deletion GT>G	Frameshift and stop codon in exon 3	Chidambaram 1996 (39)
	Chr9: 98211572 Exon 22	Missense mutation (T4093A > T1364S)	Protein sequence modification	Boutet 2003 (38)
	Chr9: 98209213 Exon 23	Missense mutation (C4325T > R1442Q)	Protein sequence modification	Unpublished

Five Gorlin cell strains harbor specific heterozygous mutation(s) in the *PTCH1* gene, notably 2 splice site, 3 missense, and 2 frameshift mutations. Cells from 2 Gorlin patients (GM0-1657, -2138) present nonsynonymous mutations at the 5' end of the *PTCH1* gene that predict higher protein deficiency as compared to the other cell strains. For 1 patient (GM0-1552), a variant was found in the 5'UTR region, which is common to GM0-1575, 1725, and 2098, but no mutations were detected in the coding regions of *PTCH1*. Locations are indicated using the human genome reference hg19.

Discussion

The radiosensitivity of patients affected by Gorlin syndrome is currently debated. The present study, designed to investigate correlations between cellular radiosensitivity and *PTCH1* expression in the cells of patients with Gorlin syndrome, provides a possible explanation for the discrepant reported data. We show that the degree of *PATCHED1* deficiency is variable among patient cells and that only severely decreased gene expression correlates with significantly increased radiosensitivity. Interestingly, we found that the increased sensitivity also affected cell response to low radiation doses, which had not been documented previously. Similarly to Gorlin syndrome, cell phenotypes from other radiosensitive syndromes are heterogeneous. For example, ATM genetic defects range from complete absence to some persistence of ATM kinase activity (29, 30). As a result, not all patients with A-T, including even homozygotes, are equally radiosensitive, testifying to the importance of defining target protein levels and activity for radiosensitive syndromes in each patient.

To demonstrate the link between *PATCHED1* and radiation sensitivity at a molecular level, RNA interference-mediated *PTCH1* deficiency was obtained in primary fibroblasts from different healthy donors, which systematically resulted in reduced cell survival after irradiation for both high and low radiation doses, suggesting that *PTCH1* directly regulates cellular radiosensitivity.

To assess the underlying mechanisms, the status of DDR proteins of the ATM/P53 pathways was investigated. Radiosensitive Gorlin cells showed reduced expression and activation of proteins from this pathway, varying according to cell strain but graded according to cell radiosensitivity. Moreover, genetically induced *PTCH1* downregulation in cells from healthy donors resulted in reduced basal expression of DDR proteins, close to that found in the radiosensitive Gorlin cells. It can be hypothesized that *PATCHED1* interacts directly with DDR proteins; this interaction is currently unverified and would deserve further studies. Also, a downstream member of the SHH pathway, affected by *PTCH1* deficiency, may impair the DDR. The GLI family of transcription factors, which are downstream regulators of SHH (31), are good candidates for further exploration. In fact, studies in human cancer cells have shown that inhibition of the activity of GLI factors can affect cell cycle arrest and DNA repair, as reviewed by Palle et al (32). Studies on *Ptch1* knockout mouse models also support this hypothesis; for example, mutant mouse cerebella present a defect in Chk1 activation mediated by Gli1 after irradiation, leading to a reduced survival in clonogenic assays (11). The best candidate might be GLI2; studies in the development of mouse embryos and NIH3T3 fibroblasts show that GLI2 regulation has a dominant influence on the overall SHH signaling dynamics (31). The downregulation of GLI2 that we show in the present study also strengthens this hypothesis.

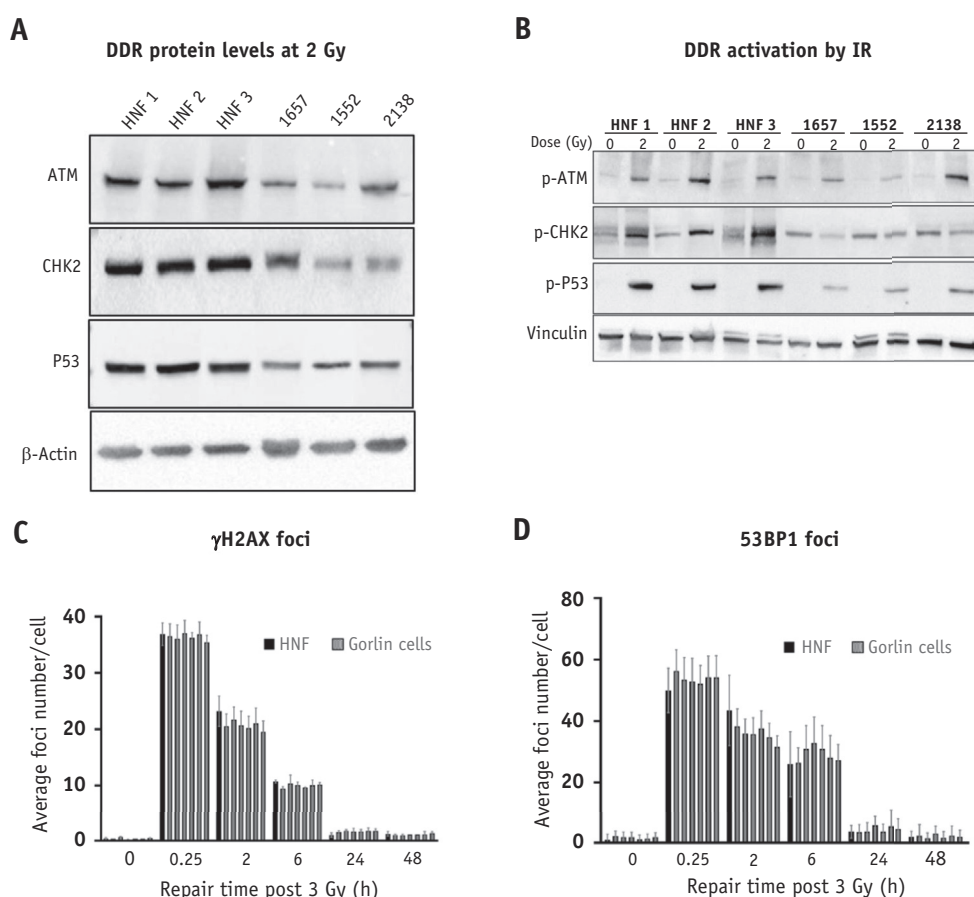


Fig. 2. Impaired DNA damage response (DDR) signaling in radiosensitive Gorlin cells. (A) Reduced expression of 3 DDR proteins after 2 Gy irradiation (total protein extracts). (B) Defective phosphorylation of ATM, CHK2, and P53 at 1 hour after 2 Gy irradiation. Representative images of Western blot analysis with phospho-ATM (Ser1981), -CHK2 (Ser19), and -P53 (Ser15) antibodies, with vinculin as a loading control of total protein extracts. (C) Comparable average numbers of separate γ H2AX foci in normal and each of 6 Gorlin cell lines, assessed at various times after irradiation on at least 300 cells per condition. (D) Comparable average numbers of 53BP1 foci in normal and each of 6 Gorlin cell lines at various times, assessed after irradiation on at least 50 cells per condition.

A surprising finding of the present work concerns DNA damage and repair: *PTCH1* defects seemed not to correlate with impaired double-strand break recognition, as revealed by the normal findings for γ H2AX and 53 BP1 foci recruitment and kinetics. Based on these data, we propose that defective cell-cycle checkpoints and replication errors may be the key impaired processes in Gorlin cells, and this hypothesis is supported by the CHK2 anomalies consistently found both in patients and after shRNA-mediated *PTCH1* downregulation.

Concerning genetic defects, for 2 radiosensitive patients with Gorlin syndrome, the mutations found in *PTCH1* exon 2 result in stop codons, which explains the observed decrease in mRNA and protein expression. For one radiosensitive patient, the decreased mRNA and protein expression could not be explained by mutations in the coding regions of the *PTCH1* gene. Several hypotheses can be suggested for this patient, notably mutations in other genes, such as those of the *GLI* family. Epigenetic mechanisms might also be involved, such as enhancer-related

downregulation recently described in a case of genodermatosis (33) or inhibition by posttranscriptional regulatory networks such as lncRNAs or miRNAs (34, 35). Databases report several enhancer elements associated with the *PTCH1* gene, including 5 within the gene, and several long noncoding RNAs, which could all regulate its expression and deserve further investigation. The fact that no correlation has yet been demonstrated at the clinical level between genotypes and phenotypes in patients with Gorlin syndrome, as mutations in the same region or an identical mutation in 2 unrelated patients can lead to different clinical outcomes, supports the likely importance of epigenetic regulation for the *PTCH1* gene.

Clinical consequences for radiation therapy and nuclear medicine can be extrapolated from the present findings. According to the Leiden Open Variation Database (36), at least 14% of patients with Gorlin syndrome with a mutation in the *PTCH1* gene carry this mutation in the first 3 exons, and thus high gene expression deficiency and radiosensitivity can be expected in these patients, for whom the risk/

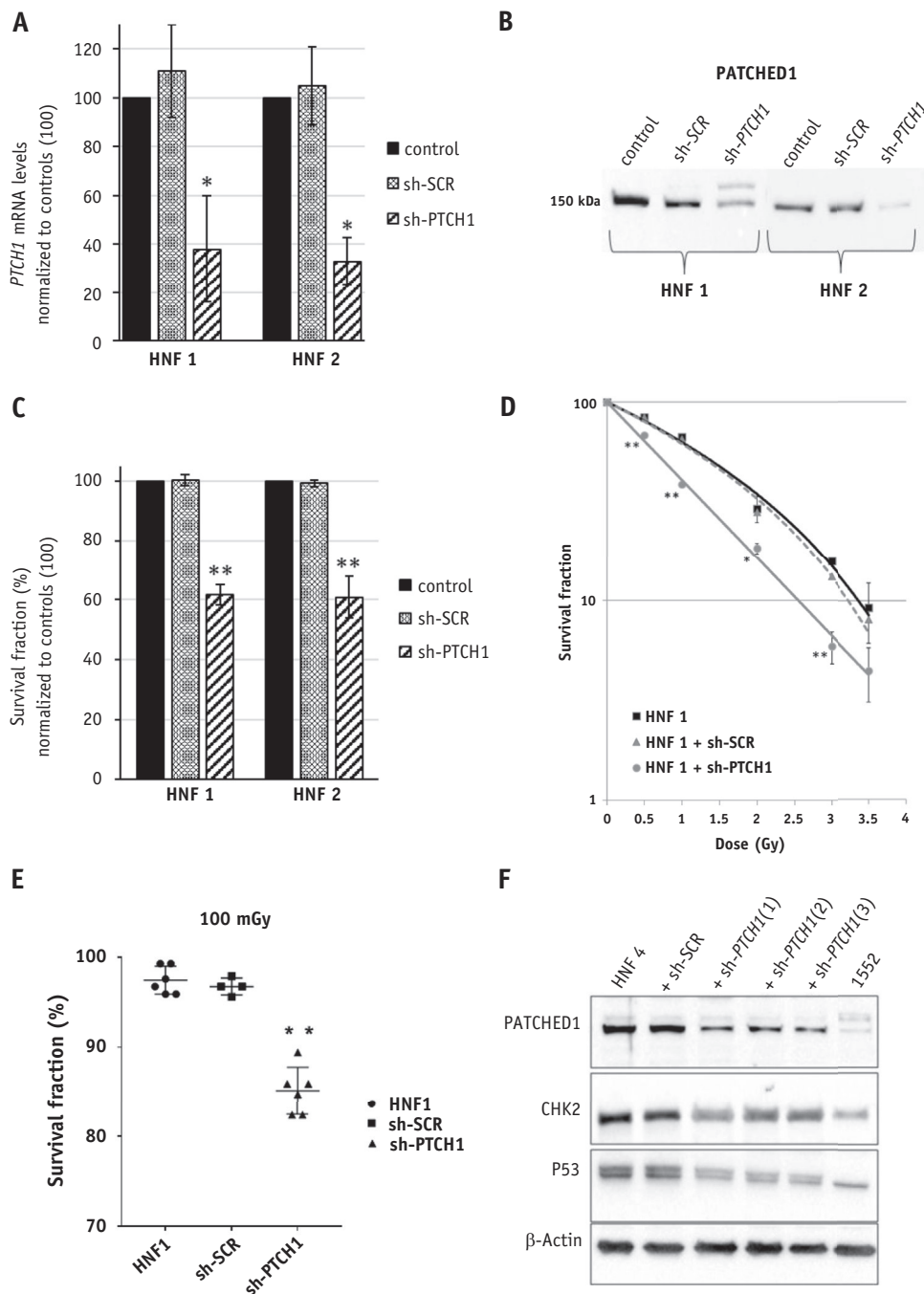


Fig. 3. PATCHED1 deficiency is directly associated with radiosensitivity. (A) *PTCH1* messenger RNA levels measured by quantitative polymerase chain reaction after 3 independent infections of normal fibroblasts (HNF1 and HNF2: 2 healthy donors) with a lentiviral vector carrying either a short hairpin RNA (shRNA)-scramble sequence or a shRNA targeting *PTCH1*. Infected cells were compared with the mean value of the noninfected cells, normalized to 100. (B) Representative image of Western blot analysis with PATCHED1 antibody (L isoform) for normal fibroblasts (HNF1 and HNF2), either in control conditions or infected with lentiviral vectors (sh-scramble or sh-*PTCH1*). (C) Mean survival after 2 Gy was lower in the shRNA-*PTCH1* condition than in the control condition (normalization to 100 vs the noninfected cells) but not in the shRNA-scramble condition; 3 independent experiments. (D) Mean survival was reduced after a range of radiation doses in sh-*PTCH1* infected cells (gray) versus noninfected cells (HNF1, black), but not in the sh-scramble infected cells (dashed line); 6 flasks per dose, $n = 1$. (E) Colony survival assays showed that cells from healthy donor 1 (HNF1) transduced with sh-*PTCH1* lentivector showed a reduced survival after low dose irradiation, whereas cells receiving control vector did not differ from controls. $P = .0022$. (F) Western blot analysis of basal levels of PATCHED1, CHK2, and P53 after *PTCH1* knockdown in normal fibroblasts (HNF4), noninfected or infected with an sh-scramble or sh-*PTCH1* vector (3 independent infections for each); a radiosensitive Gorlin cell strain (GM0-1552) was added for comparison, and actin was used as a loading control of total protein extracts. Significant at * $P < .05$ and ** $P < .01$.

benefit ratio of IR for cancer therapy should be carefully evaluated. Because we found that the increased sensitivity also affected cell responses to low radiation doses, we suggest that repeated biomedical diagnostics using x-rays should also be carefully evaluated for these patients. A genetic test of blood samples to discriminate such at-risk patients might be developed and could be included in the development of systemic next-generation sequencing in the framework of personalized cancer genomic medicine. This approach might also be used for other genetic diseases associated with *PTCH1* defects, such as microphthalmia or Hirschsprung syndrome.

In conclusion, the major finding of the present study is an inverse correlation *PATCHED1* level and cellular radiosensitivity, affecting both high and low radiation doses. Furthermore, RNA interference-mediated *PTCH1* deficiency in normal human cells resulted in reduced survival after irradiation, which directly links this gene to intrinsic radiosensitivity.

References

- AGIR. Human radiosensitivity. Report of the independent advisory group on ionising radiation. Chilton, Doc HPA 2013;RCE-21:1-152.
- Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996;85:841-851.
- Johnson RL, Rothman AL, Xie J, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996;272:1668-1671.
- Jones EA, Sajid MI, Shenton A, et al. Basal cell carcinomas in gorlin syndrome: A review of 202 patients. *J Skin Cancer* 2011;2011:217378.
- Klein RD, Dykas DJ, Bale AE. Clinical testing for the nevoid basal cell carcinoma syndrome in a DNA diagnostic laboratory. *Genet Med* 2005;7:611-619.
- Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:32.
- Saran A. Basal cell carcinoma and the carcinogenic role of aberrant hedgehog signaling. *Future Oncol* 2010;6:1003-1014.
- Nitzki F, Becker M, Frommhold A, et al. Patched knockout mouse models of basal cell carcinoma. *J Skin Cancer* 2012;2012:907543.
- Goodrich LV, Milenković L, Higgins KM, et al. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 1997;277:1109-1113.
- Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, et al. Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med* 1998;4:619-622.
- Leonard JM, Ye H, Wetmore C, et al. Sonic hedgehog signaling impairs ionizing radiation-induced checkpoint activation and induces genomic instability. *J Cell Biol* 2008;183:385-391.
- De Stefano I, Tanno B, Giardullo P, et al. The patched 1 tumor-suppressor gene protects the mouse lens from spontaneous and radiation-induced cataract. *Am J Pathol* 2015;185:85-95.
- Strong LC. Genetic etiology of cancer. *Cancer* 1977;40:438-444.
- Larsen AK, Mikkelsen DB, Hertz JM, et al. Manifestations of Gorlin-Goltz syndrome. *Dan Med J* 2014;61:A4829.
- Mitchell G, Farndon PA, Brayden P, et al. Genetic predisposition to cancer: The consequences of a delayed diagnosis of Gorlin syndrome. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2005;17:650-654.
- Walter AW, Pivnick EK, Bale AE, et al. Complications of the nevoid basal cell carcinoma syndrome: A case report. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19:258-262.
- Golitz LE, Norris DA, Luekens CA Jr., et al. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. Multiple basal cell carcinomas of the palms after radiation therapy. *Archives of dermatology* 1980;116:1159-1163.
- Kleinerman RA. Radiation-sensitive genetically susceptible pediatric sub-populations. *Pediatric Radiology* 2009;39(Suppl 1):S27-31.
- Bree AF, Shah MR. Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). *Am J Med Genet A* 2011;155A:2091-2097.
- Baker S, Joseph K, Tai P. Radiotherapy in Gorlin syndrome: Can it be safe and effective in adult patients? *J Cutan Med Surg* 2016;20:159-162.
- Caccialanza M, Percivalle S, Piccinno R. Possibility of treating basal cell carcinomas of nevoid basal cell carcinoma syndrome with superficial x-ray therapy. *Dermatology* 2004;208:60-63.
- Chan GL, Little JB. Cultured diploid fibroblasts from patients with the nevoid basal cell carcinoma syndrome are hypersensitive to killing by ionizing radiation. *Am J Pathol* 1983;111:50-55.
- Frentz G, Munch-Petersen B, Wulf HC, et al. The nevoid basal cell carcinoma syndrome: Sensitivity to ultraviolet and x-ray irradiation. *J Am Acad Dermatol* 1987;17:637-643.
- Wright AT, Magnaldo T, Sontag RL, et al. Deficient expression of aldehyde dehydrogenase 1a1 is consistent with increased sensitivity of Gorlin syndrome patients to radiation carcinogenesis. *Mol Carcinog* 2013;54:473-484.
- Featherstone T, Taylor AM, Harnden DG. Studies on the radiosensitivity of cells from patients with basal cell naevus syndrome. *Am J Hum Genet* 1983;35:58-66.
- Little JB, Nichols WW, Troilo P, et al. Radiation sensitivity of cell strains from families with genetic disorders predisposing to radiation-induced cancer. *Cancer Res* 1989;49:4705-4714.
- Newton JA, Black AK, Arlett CF, et al. Radiobiological studies in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Br J Dermatol* 1990;123:573-580.
- Woodbine L, Neal JA, Sasi NK, et al. PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J Clin Invest* 2013;123:2969-2980.
- Byrd PJ, Srinivasan V, Last JJ, et al. Severe reaction to radiotherapy for breast cancer as the presenting feature of ataxia telangiectasia. *British J Cancer* 2012;106:262-268.
- Teive HA, Moro A, Moscovich M, et al. Ataxia-telangiectasia — a historical review and a proposal for a new designation: ATM syndrome. *J Neurol Sci* 2015;355:3-6.
- Cohen M, Kicheva A, Ribeiro A, et al. *Ptch1* and *Gli* regulate *Shh* signalling dynamics via multiple mechanisms. *Nat Commun* 2015;6:6709.
- Palle K, Mani C, Tripathi K, et al. Aberrant *Gli1* activation in DNA damage response, carcinogenesis and chemoresistance. *Cancers* 2015;7:2330-2351.
- Bal E, Park HS, Belaid-Choucair Z, et al. Mutations in *ACTRT1* and its enhancer RNA elements lead to aberrant activation of hedgehog signaling in inherited and sporadic basal cell carcinomas. *Nat Med* 2017;23:1226-1233.
- Li Y, Zhang D, Chen C, et al. MicroRNA-212 displays tumor-promoting properties in non-small cell lung cancer cells and targets the hedgehog pathway receptor *PTCH1*. *Mol Biol Cell* 2012;23:1423-1434.
- Munoz JL, Rodríguez-Cruz V, Ramkissoon SH, et al. Temozolomide resistance in glioblastoma occurs by miRNA-9-targeted *PTCH1*, independent of sonic hedgehog level. *Oncotarget* 2015;6:1190-1201.
- Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, et al. LOVD v.2.0: The next generation in gene variant databases. *Hum Mutat* 2011;32:557-563.
- Tietze JK, Pfob M, Eggert M, et al. A non-coding mutation in the 5' untranslated region of patched homologue 1 predisposes to basal cell carcinoma. *Exp Dermatol* 2013;22:834-835.
- Boutet N, Bignon YJ, Drouin-Garraud V, et al. Spectrum of *PTCH1* mutations in French patients with Gorlin syndrome. *J Invest Dermatol* 2003;121:478-481.
- Chidambaram A, Goldstein AM, Gailani MR, et al. Mutations in the human homologue of the *Drosophila* patched gene in Caucasian and African-American nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Cancer Res* 1996;56:4599-4601.

Article publié dans **Frontiers in Cell and Developmental Biology**

Titre : Impact des cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines sur les fibroblastes dermiques primaires en réponse au stress inflammatoire

B. Sanchez, L. Li, **J. Dulong**, G. Aimond, J. Lamartine, G. Liu and D. Sigaudou-Roussel

Résumé :

Le but de cette étude était d'évaluer l'impact du microenvironnement produit par des cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines (HDMEC), en réponse à un stress pro-inflammatoire, dans un modèle de culture 2D avec des fibroblastes dermiques primaires humains et dans un modèle 3D de peau reconstruite composée de fibroblastes dermiques et de kératinocytes de donneurs sains. Nous avons émis l'hypothèse qu'une inflammation bas grade spécifique de l'endothélium microvasculaire pouvait induire un changement dans le phénotype des fibroblastes et être impliquée dans la modification de la matrice extracellulaire (MEC) et l'altération de la peau. Suite à un stress pro-inflammatoire induit par un traitement à l'IFN γ , au TNF α et à l'IL-1 β sur des HDMEC, nous avons observé un relargage de CCL2, d'IL-6 et d'IL-8 mais pas de VEGF-A dans le milieu conditionné (MC). L'ajout du MC endothélial pro-inflammatoire sur des fibroblastes dermiques induit une surexpression d'*IL6*, d'*IL8*, de *CCL2* mais pas de *NFKB1*. La formation de MEC résultante à ce stress était altérée avec un réseau de collagène 1 détérioré et une sous-expression génique de *COL1A1* dans les modèles 2D et 3D. L'expression protéique du collagène 1 et de pro-LOX était significativement réduite, confirmant la détérioration du réseau de collagène 1 relatif à la sécrétion de facteurs d'inflammation par les HDMEC. Pour conclure, ce travail a montré que sans aucune cellule immunitaire, la sécrétion des cellules endothéliales en réponse à un stress pro-inflammatoire peut activer les fibroblastes et maintenir un environnement pro-inflammatoire exacerbant la dégradation de la MEC dans la peau.



Impact of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells on Primary Dermal Fibroblasts in Response to Inflammatory Stress

Benjamin Sanchez^{1,2†}, Linan Li^{3†}, Joshua Dulong^{1,2}, Géraldine Aimond^{1,2}, Jérôme Lamartine^{1,2}, Guangrong Liu^{3†} and Dominique Sigaud-Roussel^{1,2*‡}

¹ CNRS UMR 5305, Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, Lyon, France, ² Claude Bernard University Lyon 1, Villeurbanne, France, ³ Infinitus Company Ltd., Guangzhou, China

OPEN ACCESS

Edited by:

Venkaiah Betapudi,
U.S. Army Medical Research Institute
of Chemical Defense, United States

Reviewed by:

Elia Ranzato,
University of Eastern Piedmont, Italy
Anshu Malhotra,
Emory University, United States
Lokesh Bhatt,
Dr. Bhanuben Nanavati College
of Pharmacy, India

*Correspondence:

Dominique Sigaud-Roussel
dominique.sigaud-roussel@
univ-lyon1.fr

[†]Co-first authors

[‡]Co-last authors

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular Biochemistry,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 04 November 2018

Accepted: 13 March 2019

Published: 03 April 2019

Citation:

Sanchez B, Li L, Dulong J,
Aimond G, Lamartine J, Liu G and
Sigaud-Roussel D (2019) Impact
of Human Dermal Microvascular
Endothelial Cells on Primary Dermal
Fibroblasts in Response
to Inflammatory Stress.
Front. Cell Dev. Biol. 7:44.
doi: 10.3389/fcell.2019.00044

The aim of the present study was to evaluate the impact of the microenvironment produced by dermal microvascular endothelial cells, secondary to a pro-inflammatory challenge, on 2D culture models using dermal fibroblasts and in 3D reconstructed skin model using dermal fibroblasts and keratinocytes from healthy donors. We hypothesized that specific microvascular endothelial low grade inflammation could change fibroblasts phenotype and be involved in extracellular matrix (ECM) modification and skin alteration. Following IFN γ , TNF α , IL-1 β pro-inflammatory stress on Human Dermal Endothelial Cells (HDMEC) we observed the increased release of Chemokine ligand 2 (CCL2), IL-6 and IL-8 but not VEGF-A in the conditioned medium (CM). The subsequent addition of this endothelial pro-inflammatory CM in dermal fibroblasts revealed an upregulation of *IL6*, *IL8* and *CCL2* but no *NF- κ B* gene expression. The resulting ECM formation was impaired with a reduction of the collagen 1 network and a decrease in *COL1A1* gene expression in 2D and 3D models. Collagen 1 and pro-LOX protein expression were significantly reduced confirming an impairment of the collagen network related to endothelial inflammation secretion. To conclude, this work showed that, without any immune cells, the endothelial secretion in response to a pro-inflammatory stress is able to activate the fibroblasts that will maintain the pro-inflammatory environment and exacerbate ECM degradation.

Keywords: fibroblasts, endothelial cells, inflammation, extracellular matrix, collagen, elastin

INTRODUCTION

Skin microcirculation is located deep in the dermis layer up to the reticular dermis close to the epidermis. Skin microcirculation plays a significant role in regulating skin homeostasis, thermoregulation, blood pressure and inflammatory response (Charkoudian, 2003; Gutterman et al., 2016). It also allows nutrients and systemic factors to reach the whole skin tissue

Abbreviations: CCL2, chemokine ligand 2; CM, conditioned medium; COL1A1, collagen 1 alpha 1; ECM, extracellular matrix; ELN, elastin; HDMEC, Human Dermal Microvascular Endothelial Cell; ICAM-1, InterCellular Adhesion Molecule 1; IFN- γ , Interferon gamma; IL-1 β , Interleukin 1 Beta; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; LOX, Lysyl Oxydase; MMP, Matrix metalloproteinase; pro-LOX, pro-Lysyl Oxydase; TNF- α , Tumor Necrosis Factor alpha; VCAM-1, Vascular cell adhesion protein 1; VEGF-A, Vascular endothelial growth factor A.

throughout the skin microvascular network from arteries to small capillaries close to the epidermis. Microvascular endothelial cells are the major components of dermal blood vessels and are clearly involved in skin inflammatory process. Endothelial cells participate to synthesize and secrete chemokine and cytokine and are implicated in recruiting immune cells in response to dysfunctions due to different factors (e.g., UV, heat, pathological and physiological processes) (Swerlick and Lawley, 1993).

Specific inflammatory mediators are described as endothelium activators like IL-1 β or TNF- α , permitting vessels hyper-permeability allowing leucocyte infiltration. These vascular modulations are involved in skin diseases linked to a chronic inflammation (McGee et al., 1995; Huggenberger and Detmar, 2011). *In vitro*, TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ may alter vascular processes and cells behaviors, inducing inflammation stress. A mix of these cytokines induces synergistic effect producing inflammatory responses, which could induce at low concentration expression of chemokine like CCL2 or RANTES implicated in vessels permeability on endothelial cells (Goebeler et al., 1997).

Thus, inflammation is a common condition that affects the vasculature, but is also a skin feature that occurs in long-term pathologies, as well as in short-term conditions at high or low-grade level (Huggenberger and Detmar, 2011). Dermal fibroblasts are the key cells to synthesize the ECM composed by many components including collagen and ELN fibers. Fibroblasts are also known to stimulate vascular inflammation through cytokines and chemokines production (Singer and Clark, 1999), leading to endothelial activation and leukocytes attraction (Buckley et al., 2001; Enzerink and Vaheri, 2011).

Interestingly, the impact of microvascular endothelial cells microenvironment on skin integrity in a low-grade inflammatory context is poorly understood. The aim of the present study was to evaluate the impact of the microenvironment produced by dermal microvascular endothelial cells, secondary to a pro-inflammatory challenge, on 2D culture models using dermal fibroblast from healthy donors. We hypothesized that specific endothelial low grade inflammation could change fibroblasts phenotype and be involved in ECM modification and skin alteration. We validated this hypothesis in 2D culture model and then confirmed these results in a 3D full-thickness reconstructed human skin.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC, Promocell Heidelberg, Germany) were cultured in Endothelial cell medium from Promocell composed by DMEM containing heparin 90 μ g/ml, hydrocortisone 1 μ g/ml supplemented with 2% Fetal Bovine Serum (FBS), 0.4% Endothelial Cell Growth Supplement (Promocell). Complete medium was supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, United States) at 37°C and 5% CO₂. Human dermal fibroblasts were kindly provided by the Cell and Tissue Bank (Hôpital Edouard-Herriot, Lyon, France). Normal abdominal

human skin tissue explants were obtained from the surgical discard of anonymous healthy patients with informed consent of adult donors in accordance with ethical guidelines (French Bioethics law of 2004) and declared to the French research ministry (Declaration no. DC-2008-162 delivered to the Cell and Tissue Bank of Hospices Civils de Lyon). Exclusion criteria were related to positive test result for hepatitis B or C, or HIV as well as obesity history. Human dermal fibroblasts were cultured in a medium consisted in a ratio 1 :1 of Dulbecco's Modified Eagle's Medium with Glutamax and F-12 medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco Life Technologies). HDMEC were used below 10 population doubling level and dermal fibroblasts below 20.

Antibodies and Reagents

The following antibodies were used: Rabbit polyclonal anti-collagen I (Novotec, Bron, France), Rabbit polyclonal anti-elastin antibody (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni), Rabbit monoclonal anti-pro-LOX antibody (D8F2K, Cell Signaling), Rabbit polyclonal anti- β -actin antibody (ab8227, Abcam Cambridge, Royaume-Uni). As secondary antibody, Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Life Technologies) was used for immunofluorescence and Goat anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody for western blot (Cell signaling). Nuclear counterstaining using DAPI was purchased from Sigma-Aldrich. rhIFN- γ (c-60724), rhTNF- α (c-63719), and IL-1 β (c-61120) were purchased from Promokine (Heidelberg, Germany).

Inflammatory Conditioned Medium From HDMEC

To produce a pro-inflammatory CM from HDMEC, cells were seeded in a 75 cm² flask (4×10^5 cells/flask) 24 h before stimulation. HDMEC were stimulated with 0 IU/mL as control, 10 IU/mL or 100 IU/mL (for 3D skin models experiments) of a mix of cytokines composed by rhIFN- γ , rhTNF- α , and rhIL-1 β during 24 h at 37°C 5% CO₂ (CM $\emptyset$, control; CM10, conditioned medium produce with 10 IU/mL cytokines mix; CM100, conditioned medium produce with 100 IU/mL cytokines mix). Conditioned media were then collected and centrifuged at 10000 $\times g$ for 10 min at 4°C. Supernatant of each stimulation experiment was then collected and stored at -80°C until used.

Effect of the Conditioned Medium on Human Dermal Fibroblasts

Human dermal fibroblasts extracted from abdominal skin biopsies from adult donors were seeded in 6 well plates (200 000 cells/well). 24 h after cell adhesion, fibroblasts medium was changed by endothelial medium during 24 h. Dermal fibroblasts were then washed twice with PBS and stimulated with the different CM obtained (CM $\emptyset$ or CM10) during 48 h at 37°C 5% CO₂. Results were obtained from 3 independent experiments from 3 donors of fibroblasts.

Effect of the Conditioned Medium on 3D Human Full Thickness Skin

Full-thickness human 3D skin models (from Lab Skin Creations, Lyon, France) were cultured in 6 well plates using an insert membrane of 0.4 μm of pore size (Millicell, Burlington, United States). Reconstructed skins were cultured in skin medium provided by Lab Skin Creations. 24 h before stimulation, skins were cultured in endothelial cells medium and then stimulated with the different CMs (CMØ or CM100). From preliminary tests it has been established on human biopsies that CM100 and 5 days of stimulation were necessary to observe modifications on skin integrity in presence of CM. 3D Skin models were then stimulated with CM100 during 5 days at 37°C under 5% of CO₂. Results were obtained from 7 independent experiments using 3D skin models.

RNA Isolation and Real-Time Quantitative PCR

Total RNA was isolated using RNeasy Kit for 2D *in vitro* models and RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit for 3D skin models (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. 500 ng of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using PrimeScript™ RT reagent kit (Takara, Shiga, Japan) and analyzed by Real-Time QPCR using SYBR® Premix Ex Taq II (Takara) on an AriaMx Realtime PCR system (Agilent Genomics, Santa Clara, CA, United States). All primer (Supplementary Table S1) were provided by Eurogentec. Results were normalized to the *GAPDH* expression level for HDMEC, and dermal fibroblast samples.

Results were obtained from 3 independent experiments and 3 donors of fibroblasts have been used for 2D experiments. Relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quantification method. The primers are listed in the Supplementary Table S1.

Western Blotting

Dermal fibroblasts were lysed in RIPA buffer from Sigma and supplemented with protease and phosphatase inhibitor at 4°C. Cells lysate was centrifuged 10 min at 10000 g and 4°C. Supernatant were collected. Proteins were denatured 5 min at 95°C, separated on 10% polyacrylamide gel according to protein size and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore, Ref. IPVH00010). Membranes were blocked with 1× tris-buffered saline (TBS) 0.1% Tween and 5% non-fat milk for 1 h and blotted at 4°C overnight with primary antibodies diluted as recommended by the manufacturers in 1× TBS, 0.1% Tween and 5% non-fat milk. Membranes were incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies diluted as recommended by the manufacturers in 1× TBS, 0.1% Tween. Then membranes were incubated 5 min with ECL (Thermo Fisher, Ref. 34080) and were revealed by chemiluminescence. Western blot results were analyzed using GelAnalyzer software.

Immunofluorescence Microscopy

For immunofluorescence, conditioned media (CMØ or CM10) were added when fibroblasts were at confluence on coverslip.

Eight-day post confluence, cells were fixed in cold methanol (−20°C) for 20 min to investigate ELN network or were fixed in PBS supplemented with 4% paraformaldehyde at room temperature for 10 min to study collagen I network. Cells were incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal anti-collagen I (Novotec, Bron, France) antibody diluted at 1:400 in PBS – goat serum 0.1% or a rabbit polyclonal anti-elastin antibody (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) diluted at 1:250 in PBS – goat serum 0.1%. This was followed by a second incubation with a goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluted in 1:1000 PBS – goat serum 0.1% (Life Technologies) at room temperature for 1 h. Nuclear counterstaining using DAPI (Sigma) was carried out with a dilution 1:500 in PBS – goat serum 0.1%. Negative controls were performed by omitting the primary antibody. Image acquisition was carried out using a Nikon microscope (Nikon TE300, Champigny-sur-Marne, France) with a coolsnap fx CCD camera (Photometrics, Tucson, AZ, United States) with MetaVue software (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, United States). Image analysis and semi-quantification were performed using ImageJ software. Results were obtained from 4 independent experiments from 3 donors of fibroblasts. Two images were acquired per condition.

Luminex Assay

The determination of the amount of multiple cytokines in CMØ and CM10 was carried out using Human Magnetic Luminex Assay from R&D Systems (Minneapolis, MN, United States) according to the manufacturer's instructions. Levels of CCL2 (MCP-1), IL-6, IL-8 (CXCL8), VEGF-A, IFN- γ , TNF- α , and IL-1 β were analyzed using Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader and Bio-Plex Manager software from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, United States).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using Prism (version 7.0, GraphPad Software Inc.). All results are expressed as mean $\pm$ SD. Statistically significant differences were calculated by one-way analysis of variance (followed by Dunnett's test post-test) or unpaired Student's *t*-test. *p* < 0.05 was considered statistically significant. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

RESULTS

HDMEC Activation and Secretion Under Low-Grade Inflammatory Stimulation

Human Dermal Endothelial Cells were treated with low-grade inflammatory mix (rhIFN- γ , rhTNF- α , and rhIL-1 β) and we observed an upregulation of *ICAM-1* and *VCAM-1* (Figure 1A) demonstrating that the low-grade inflammatory mix activated the dermal microvascular endothelial cells, as confirmed by 2.5-fold increase in *VEGF-A* gene expression (Figure 1B).

We observed a significant HDMEC transcriptional activation of the pro-inflammatory gene expression markers, *CCL2*, *IL-6*, and *IL-8* (Figure 1C) in response to the initial inflammatory cocktail that resulted of an increased in HDMEC protein

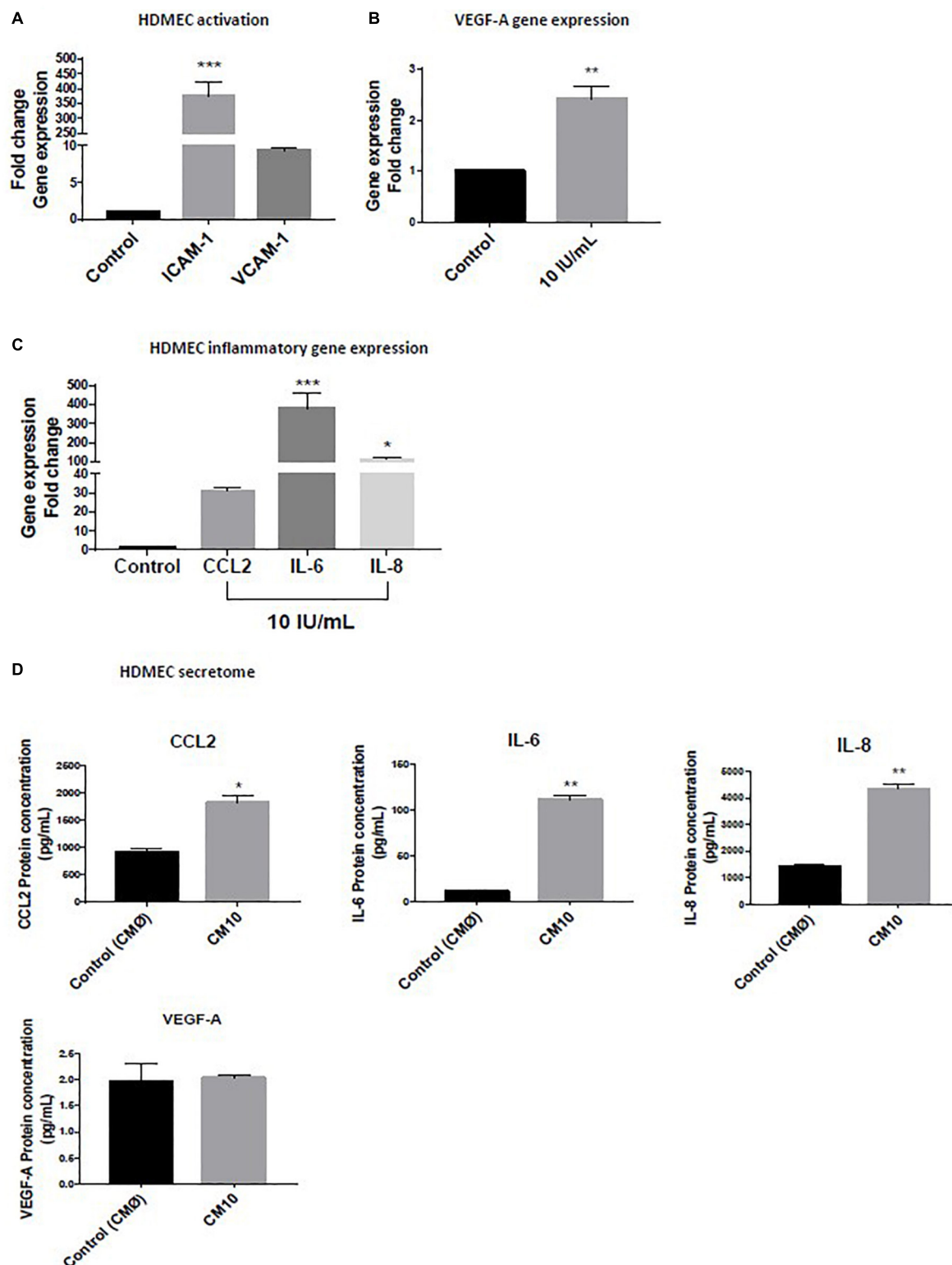


FIGURE 1 | Effect of low grade inflammatory stimulation on HDMEC Gene expression of **(A)** markers of vascular activation of **(B)** *VEGF-A* **(C)** pro-inflammatory cytokines. **(D)** Expression of proteins secreted in the conditioned medium. Luminex assay for CCL2, IL-6, and IL-8 levels and VEGF-A protein expression. Gene expression was normalized with *GAPDH*. Data are representative of at least three independent experiments. Analysis of cytokine secretion was performed in duplicate for each sample using *t*-test. For vascular inflammation results were compared and analyzed to control condition using ANOVA Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

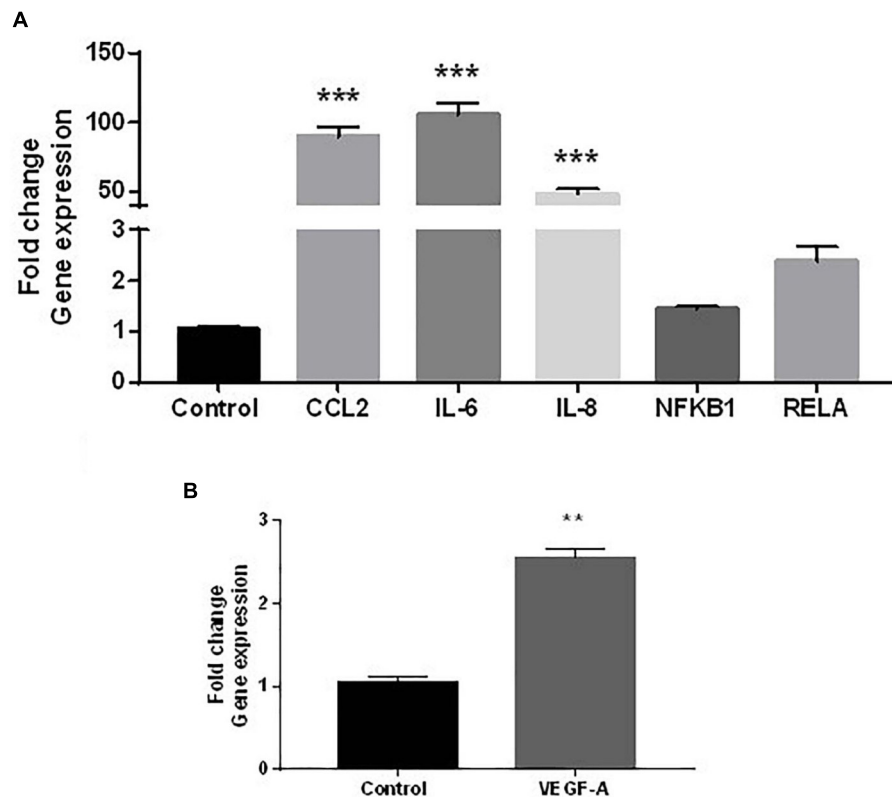


FIGURE 2 | Effect of CM10 on fibroblast gene expression. RT-qPCR expression analysis of genes coding **(A)** *CCL2*, *IL-6*, and *IL-8*, *NFkB1*, *RELA* and **(B)** *VEGF-A* following CM10 stimulation versus control CMØ. Gene expression was normalized with *GAPDH*. **(A)** Results were compared and analyzed to control conditions using ANOVA Dunnett's test, except for *VEGF-A* where gene expression data were analyzed using a *t*-test. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

secretion of CCL2, IL-6, and IL-8 in the CM10 compared to the control condition CMØ (**Figure 1D**). The protein fold increases were 1.5, 12, and 2.8, respectively (**Figure 1D**). In contrast, protein expression of TNF- α , IL-1 β , and IFN γ were not detectable in CM10, revealing absence or non-significant levels of these cytokines in HDMEC secretome. VEGF-A protein expression was not significantly different between the two groups (**Figure 1D**).

Pro-inflammatory Endothelial Conditioned Medium Stimulates Further Fibroblast Inflammatory Gene Expression

The secretion of increased inflammatory cytokines released from HDMEC under low-grade inflammation could influence dermal fibroblasts function. To investigate this possibility in a cell culture system, dermal fibroblasts were stimulated with CMØ or CM10 for 48 h. It appeared that *CCL2*, *IL-6*, and *IL-8* gene expression were significantly up-regulated in dermal fibroblasts in presence of CM10 compared to control condition CMØ (**Figure 2A**). In contrast, no significant differences were observed in pro-inflammatory NF- κ B pathway, NF- κ B sub-unit *NFkB1* and *RELA* gene expression in fibroblasts challenged by CM10 compared to CMØ.

VEGF-A gene expression was also 2.5-fold increased by dermal fibroblasts under CM10 compared to CMØ (**Figure 2B**).

Pro-inflammatory Endothelial Conditioned Medium Altered ECM

In order to investigate collagen type I and ELN ECM formation in contact with CMØ or CM10, we used immunofluorescence to analyze their production within the ECM. We confirmed that dermal fibroblasts treated with CM10, 8-day post confluence, synthesized less collagen I than cells treated with CMØ (**Figure 3A**). Collagen I network appeared to be less organized in presence of CM10 compared to CMØ. Semi-quantification of collagen I labeling was significantly decreased in presence of CM10 compared to CMØ while ELN labeling semi-quantification tended to be reduced but did not reach significant differences (**Figure 3B**).

We then analyzed the expression of genes encoding proteins involved in ECM rearrangement in fibroblasts treated with CM10 or CMØ (**Figure 4A**). *MMP1* and *MMP2* gene expression were significantly increased by CM10 while *ELN* gene expression was unchanged and *COL1A1* gene expression was significantly reduced. In addition, collagen I protein expression was reduced in presence of CM10 compared to CMØ (**Figure 4B**) confirming the reduction of the collagen I network as observed by

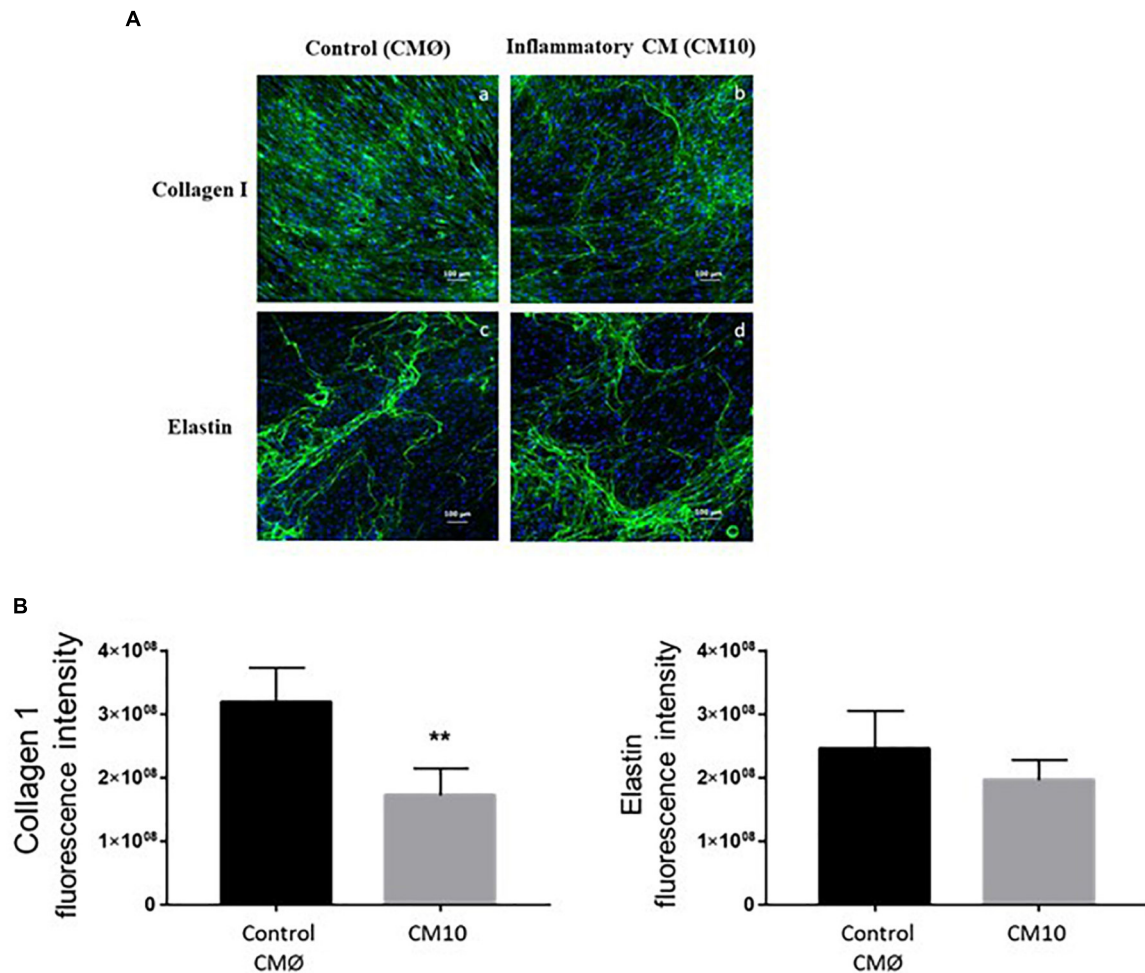


FIGURE 3 | Effect of CM10 on ECM formation. **(A)** Using immunofluorescence assay for ECM formation, collagen I (a,b) and ELN (c,d) were analyzed 8-day post confluence following CMØ or CM10 stimulation. ECM components were stained with anti-collagen1 antibody (a,b) or anti-Elastin antibody (c,d) and fluorescent signals specific to the antibodies were visualized as green. **(B)** Semi-quantification of collagen 1 and ELN positive staining in each condition. Integrated density was used to quantify immunofluorescence. Nuclei were counter-stained with DAPI (blue). Scale bars indicate 100 μ m. ** $p < 0.01$ vs control.

immunofluorescence (Figure 3A). Pro-LOX protein expression, the pro-enzyme form of LOX responsible for collagen and/or ELN cross-link, was also reduced by CM10 compared to CMØ (Figure 4B).

Effect of CM100 on 3D Human Full Thickness Skin Gene Expression

To go further into the comprehension of the effect of vascular pro-inflammatory CM on ECM, we used 3D reconstructed skin including keratinocytes and fibroblasts that were challenged with CMØ or CM100 for 5 days. Gene expression of cellular senescence marker *p16* and the stress marker *p53* were both not different between CMØ and CM100 (Figure 5A).

In 3D skin model, *COL1A1* and *ELN* gene expression were significantly downregulated in presence of CM100 (Figure 5B). Nevertheless, in this model there was no upregulation of *MMPs* in presence of CM100 compared to CMØ.

DISCUSSION

In the present study, we showed that the activated endothelial cell secretome released following pro-inflammatory stress promoted a pro-inflammatory fibroblast phenotype that could be self-sustained without any immune cells. Indeed, *CCL2*, *IL-6*, and *IL-8* released in the endothelial secretome following $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, and $\text{IL-1}\beta$ stress, are responsible for increasing *CCL2*, *IL-6*, and *IL-8* fibroblast gene expression generating a low-grade inflammatory fibroblast environment. The pro-inflammatory cocktail could thus maintain a perpetual fibroblast inflammatory phenotype that could be responsible for an exacerbation in ECM degradation with an increase in *MMP1* gene expression and unstable collagen 1 network.

Dermal microcirculation is the conduit in which the stressors will affect the surrounding environment. In homeostasis, fibroblasts and endothelial cells are both involved in the angiogenic process and in ECM formation (Slany et al., 2016).

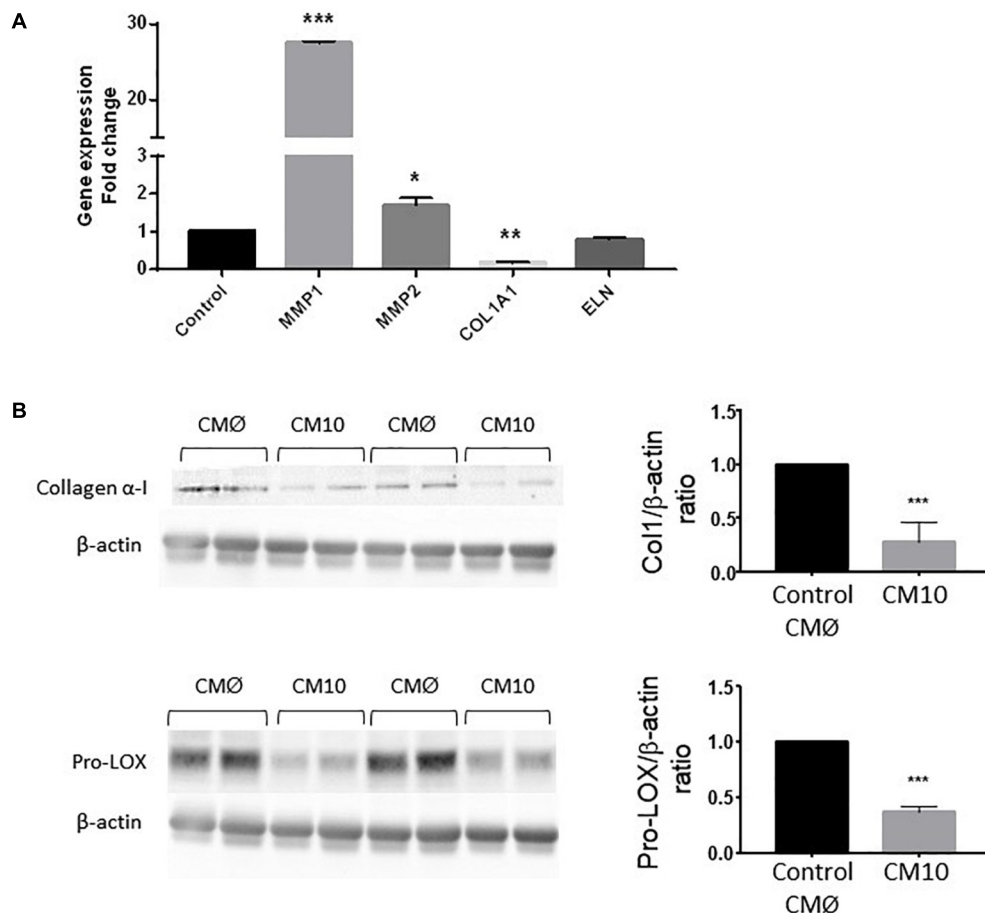


FIGURE 4 | Effect of CM10 on fibroblast ECM gene expression. **(A)** RT-qPCR expression analysis of genes encoding *MMP1*, *COL1A1*, *MMP2*, and *ELN* and **(B)** collagen 1 and pro-LOX protein expression in dermal fibroblasts ECM cultured following CM10 stimulation versus control. Gene expression was normalized with *GAPDH*. Protein expression was normalized using β -actin and quantification was performed using Gel analyzer software. Results were compared and analyzed to control conditions using ANOVA Dunnett's test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

In a pro-inflammatory microenvironment, dermal microvascular endothelial cells play an important role in homeostasis and in inflammatory responses. HDMECs synthesize and secrete chemokine and cytokines which are implicated in recruiting immune cells in response to inflammatory disorders (Qazi et al., 2011). This inside-out inflammatory response has been supplemented with an outside-in signaling involving activated pro-inflammatory fibroblasts interacting with immune cells to direct endothelial activation (Enzerink and Vaheri, 2011). In this context, fibroblasts play a critical role in modulating immune cells such as leukocytes and could be responsible for the establishment of chronic inflammation (Buckley et al., 2001).

In the present study, we focused on activated endothelial cell secretion without any immune cell interaction that could impact dermal cell behaviors such as dermal fibroblast and the ECM formation. To play their roles, endothelial cells have to be activated in order to interact with their environment. In an inflammatory context, endothelial cells release different inflammatory factors like IL-1 β and TNF- α or by an upregulation of leucocyte adhesion molecule as *ICAM-1* and *VCAM-1*, which

are two markers used to confirm the endothelial cells activation (Detmar et al., 1992; Videm and Albrigtsen, 2008). Endothelial cell activation permits the interaction with the environment, playing a key role in inflammatory development (Swerlick et al., 1992). In our models, we showed that HDMEC were activated in presence of low-grade inflammation with an upregulation of *ICAM-1* and *VCAM-1*. These activation are responsible for the loss of vascular integrity allowing secretion of cytokines and chemokines that could interact with tissues like skin structure (Adams and Shaw, 1994). HDMECs are described as critical elements for releasing proteins like VEGF-A or other growth factors. Moreover, HDMECs are also implicated in the cutaneous inflammation, secreting cytokines and chemokines that could directly interact with components of the dermis (Swerlick and Lawley, 1993). It appeared that low-grade inflammatory mix (CM10) composed of 10 IU/mL of IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ induced upregulation of cytokines and chemokines on dermal microvascular endothelial cells as CCL2, IL-6, and IL-8 which are known to be chemoattractant for T cells, dendritic cells and monocytes. The addition of the activated endothelial secretome

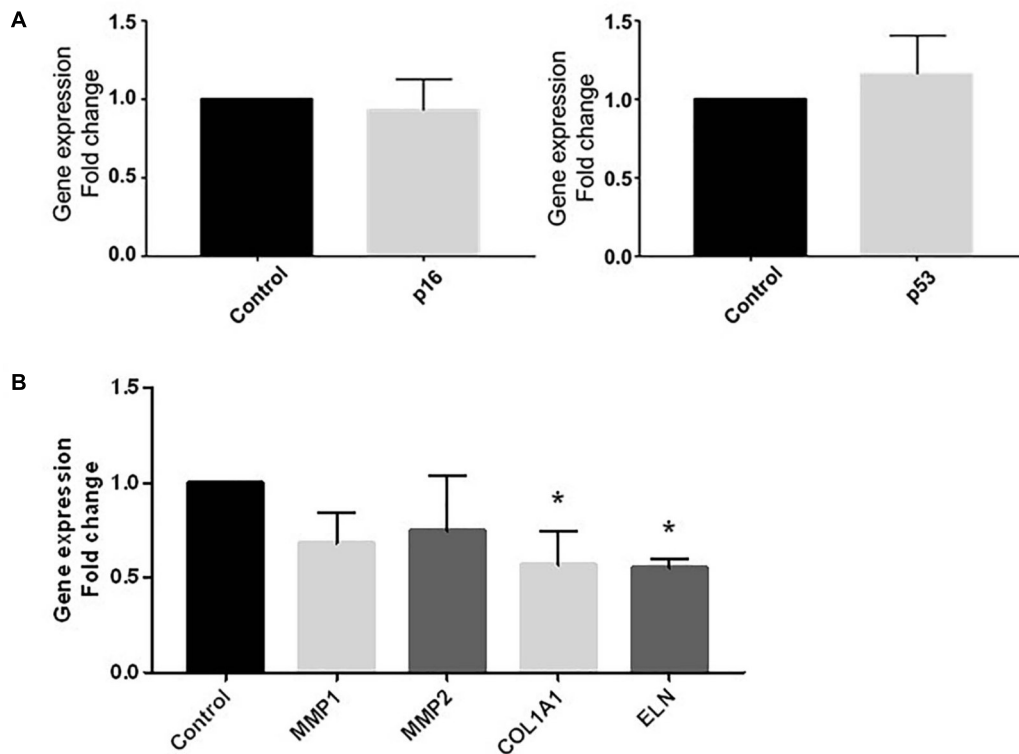


FIGURE 5 | Effect of CM100 on 3D human full-thickness reconstructed skin. RT-qPCR expression analysis of **(A)** stress markers *p16* and *p53* and **(B)** ECM gene *MMP1*, *MMP2*, *COL1A1*, and *ELN* expression after 5-day stimulation of 3D skin models with CM100 stimulation versus control CMØ. Gene expression was normalized with *GAPDH*. Results were compared and analyzed to control condition using ANOVA Dunnett's test, * $P < 0.05$.

onto dermal fibroblasts induced a switch from normal to pro-inflammatory phenotype with an upregulation of *CCL2*, *IL-6*, and *IL-8* gene expression perpetuating fibroblasts pro-inflammatory environment.

The crosstalk between endothelial cells and fibroblasts has been studied through fibroblasts influencing endothelial cells, since fibroblasts provide ECM support as well as the production of several molecules like VEGF for angiogenesis (Villaschi and Nicosia, 1994; Martin et al., 2001; Berthod et al., 2006; Stunova and Vistejnova, 2018). In addition, (Villaschi and Nicosia, 1994) suggested that endothelial cells might also affect fibroblasts since cytokines, chemokines and other molecules present in the microenvironment could affect skin integrity altering ECM components (Van Linthout et al., 2014). In skin aging, it has been shown that *IL-8* and *IL-6* are clearly linked to MMPs modulation and *COL1A1* gene and protein expression (Dasu et al., 2003; Kolar et al., 2012; Quan and Fisher, 2015). We showed that the low-grade inflammatory microenvironment produced by activated endothelial cells induced a strong up-regulation of *MMP1* in dermal fibroblasts suggesting collagen I degradation associated to a reduction in collagen I synthesis due to *COL1A1* gene downregulation. In addition, the significant decrease in Pro-LOX protein expression strengthens the reduction of collagen cross-linking. Indeed, the primary function of the LOX family is the covalent cross-linking of collagens and/or ELN into a stable, insoluble ECM, which is important for the maintenance of tensile

strength and structural integrity of most tissues (Noblesse et al., 2004). The collagenous matrix deposited during LOX reduction should be more easily degradable (Trackman, 2005). In contrast, *ELN* gene expression was not modulated by the vascular pro-inflammatory microenvironment. Only a few studies have evaluated skin ELN production in an inflammatory context apart from skin aging (Ganceviciene et al., 2012) and wound healing (Almine et al., 2013) studies. We confirmed the 2D results with a downregulation of *COL1A1* and the 3D skin model revealed a significant reduction in *ELN* gene expression, suggesting that specific inflammatory vascular environment could alter skin integrity, inducing modification of gene implicated in ECM components. These results show the significant role of skin microvessels on skin integrity, which may vary depending on inflammatory conditions.

Indeed, the loss of vascular integrity is involved in the development of skin or autoimmune diseases, inducing inflammatory processes as chronic inflammatory conditions like psoriasis or lupus (Heidenreich et al., 2009; Achtman and Werth, 2015). Endothelial cells play a significant role in inflammatory responses and link to pro angiogenic and pro-inflammatory protein secretion as described. Among these pro-inflammatory proteins, VEGF-A is described as a predominant protein implicated in immune response. In inflammatory conditions, it appeared that VEGF is not only secreted by endothelial cells but also by macrophages, T cells and fibroblasts, which are

involved in angiogenesis and inflammatory processes (Mor et al., 2004; Enzerink and Vaheri, 2011). In our study, it appeared that HDMEC up-regulated *VEGF-A* gene expression, but no differences were observed in VEGF-A protein secretion in the CM, after 24 h of stimulation with the low-grade inflammatory cytokines mix. This result is probably linked to the short biological half-life, and the rapid metabolic degradation of VEGF-A in the medium (Lee et al., 2000).

To conclude, this study showed that the secretory micro-environment related to endothelial inflammation could trigger a perpetual fibroblast inflammatory phenotype that could be responsible for an exacerbation in ECM degradation with an increase in MMP1 and unstable collagen 1 network. In contact with endothelial inflammatory secretion, and no immune cells, it appears that fibroblasts switch from normal to pro-inflammatory phenotype and are less involved in ECM synthesis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LL, GA, JL, GL, and DS-R conceived and designed the study. BS and JD acquired, analyzed, and interpreted the data. BS, LL, JD, GA, JL, GL, and DS-R critically revised the manuscript for important intellectual content. DS-R obtained funding. BS, LL, JD, GA, JL, GL, and DS-R provided the administrative, technical,

or material support. DS-R is the guarantor of this work and, as such, had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

FUNDING

This work was supported by a grant from Infinitus and bike Guangzhou (China).

ACKNOWLEDGMENTS

We are very grateful to Song Ximing and Li Jialin for their help in work management.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00044/full#supplementary-material>

TABLE S1 | Details of specific primers and targets used in real-time qPCR experiments.

REFERENCES

- Achtman, J. C., and Werth, V. P. (2015). Pathophysiology of cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 17:182. doi: 10.1186/s13075-015-0706-2
- Adams, D. H., and Shaw, S. (1994). Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 343, 831–836. doi: 10.1016/S0140-6736(94)92029-X
- Almine, J. F., Wise, S. G., Hiob, M., Singh, N. K., Tiwari, K. K., Vali, S., et al. (2013). Elastin sequences trigger transient proinflammatory responses by human dermal fibroblasts. *FASEB J.* 27, 3455–3465. doi: 10.1096/fj.13-231787
- Berthod, F., Germain, L., Tremblay, N., and Auger, F. A. (2006). Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J. Cell Physiol.* 207, 491–498. doi: 10.1002/jcp.20584
- Buckley, C. D., Pilling, D., Lord, J. M., Akbar, A. N., Scheel-Toellner, D., and Salmon, M. (2001). Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol.* 22, 199–204. doi: 10.1016/S1471-4906(01)01863-4
- Charkoudian, N. (2003). Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clin. Proc.* 78, 603–612. doi: 10.4065/78.5.603
- Dasu, M. R., Barrow, R. E., Spies, M., and Herndon, D. N. (2003). Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts. *Burns* 29, 527–531. doi: 10.1016/S0305-4179(03)00154-2
- Detmar, M., Tenorio, S., Hettmannsperger, U., Ruszczak, Z., and Orfanos, C. E. (1992). Cytokine regulation of proliferation and ICAM-1 expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 98, 147–153. doi: 10.1111/1523-1747.ep12555746
- Enzerink, A., and Vaheri, A. (2011). Fibroblast activation in vascular inflammation. *J. Thromb Haemost.* 9, 619–626. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04209.x
- Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., and Zouboulis, C. C. (2012). Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinology* 4, 308–319. doi: 10.4161/derm.22804
- Goebeler, M., Yoshimura, T., Toksoy, A., Ritter, U., Bocker, E. B., and Gillitzer, R. (1997). The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. *J. Invest. Dermatol.* 108, 445–451. doi: 10.1111/1523-1747.ep12289711
- Gutterman, D. D., Chabowski, D. S., Kadlec, A. O., Durand, M. J., Freed, J. K., Ait-Aissa, K., et al. (2016). The human microcirculation: regulation of flow and beyond. *Circ. Res.* 118, 157–172. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305364
- Heidenreich, R., Rocken, M., and Ghoreschi, K. (2009). Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.* 90, 232–248. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00669.x
- Huggenberger, R., and Detmar, M. (2011). The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 15, 24–32. doi: 10.1038/jidsymp.2011.5
- Kolar, M., Szabo, P., Dvorankova, B., Lacina, L., Gabius, H. J., Strnad, H., et al. (2012). Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol. Cell* 104, 738–751. doi: 10.1111/boc.20120018
- Lee, R. J., Springer, M. L., Blanco-Bose, W. E., Shaw, R., Ursell, P. C., and Blau, H. M. (2000). VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 102, 898–901. doi: 10.1161/01.CIR.102.8.898
- Martin, T. A., Harding, K., and Jiang, W. G. (2001). Matrix-bound fibroblasts regulate angiogenesis by modulation of VE-cadherin. *Eur. J. Clin. Invest.* 31, 931–938. doi: 10.1046/j.1365-2362.2001.00914.x
- McGee, D. W., Bamberg, T., Vitkus, S. J., and McGhee, J. R. (1995). A synergistic relationship between TNF-alpha, IL-1 beta, and TGF-beta 1 on IL-6 secretion by the IEC-6 intestinal epithelial cell line. *Immunology* 86, 6–11.
- Mor, F., Quintana, F. J., and Cohen, I. R. (2004). Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J. Immunol.* 172, 4618–4623. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.4618
- Noblesse, E., Cenizo, V., Bouez, C., Borel, A., Gleyzal, C., Peyrol, S., et al. (2004). Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J. Invest. Dermatol.* 122, 621–630. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.22330.x
- Qazi, B. S., Tang, K., and Qazi, A. (2011). Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated

- inflammation and angiogenesis. *Int. J. Inflam.* 2011:908468. doi: 10.4061/2011/908468
- Quan, T., and Fisher, G. J. (2015). Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: a mini-review. *Gerontology* 61, 427–434. doi: 10.1159/000371708
- Singer, A. J., and Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* 341, 738–746. doi: 10.1056/NEJM199909023411006
- Slany, A., Bileck, A., Kreutz, D., Mayer, R. L., Muqaku, B., and Gerner, C. (2016). Contribution of human fibroblasts and endothelial cells to the hallmarks of inflammation as determined by proteome profiling. *Mol. Cell Proteomics* 15, 1982–1997. doi: 10.1074/mcp.M116.058099
- Stunova, A., and Vistejnova, L. (2018). Dermal fibroblasts-A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev.* 39, 137–150. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.01.003
- Swerlick, R. A., and Lawley, T. J. (1993). Role of microvascular endothelial cells in inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 100, 111S–115S. doi: 10.1038/jid.1993.33
- Swerlick, R. A., Lee, K. H., Li, L. J., Sepp, N. T., Caughman, S. W., and Lawley, T. J. (1992). Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 149, 698–705.
- Trackman, P. C. (2005). Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J. Cell Biochem.* 96, 927–937. doi: 10.1002/jcb.20605
- Van Linthout, S., Miteva, K., and Tschöpe, C. (2014). Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc. Res.* 102, 258–269. doi: 10.1093/cvr/cvu062
- Videm, V., and Albrigtsen, M. (2008). Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. *Scand. J. Immunol.* 67, 523–531. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02029.x
- Villaschi, S., and Nicosia, R. F. (1994). Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model. Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. *Lab. Invest.* 71, 291–299.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Sanchez, Li, Dulong, Aimond, Lamartine, Liu and Sigaudou-Roussel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

TITLE

Identification of a molecular and epigenetic signature of skin radiosensitivity

ABSTRACT

Radiotherapy is a major treatment against cancer, which concerns more than 50% of the cancer patients and can lead to total remission by itself. Although technological advances considerably decreased side-effects, 5 to 15% of radiotherapy patients suffer from severe side-effects in healthy tissues, thus limiting its application. These side-effects are heterogeneous in their features (desquamation, necrosis, fibrosis etc.), in their intensity (might lead to hospitalization) and in the time they take to appear (from few days following radiotherapy to several years after). The occurrence of these severe side-effects while radiotherapy protocols are standardized highlights the existence of a radiosensitivity specific to each patient named individual radiosensitivity. Unfortunately, to date, there is no consensus clinical test, applicable in routine, allowing to measure individual radiosensitivity of cancer patients in order to individualize protocol of radiotherapy. Moreover, the molecular basis responsible for these side-effects are still poorly known. Therefore, we decided to study the transcriptome and the methylome of dermal fibroblast from patients who suffered severe side-effects of radiotherapy to identify a molecular signature of individual radiosensitivity and also to better understand molecular basis beyond it. Thus, we observed in a 1st cohort that skin fibroblasts from radiosensitive patients exhibited a specific transcriptomic and methylomic pattern. Using a machine learning approach, we developed a 5-gene signature allowing the identification of patients who suffered severe side-effects in a 2nd independent cohort. Moreover, we have shown that dermal fibroblast from patients who suffered severe radiotherapy side-effects exhibited a DNA repair defect and a higher death rate after irradiation. Finally, we identified the transcription factor NFATC2 as an actor of cellular response to ionizing radiations whose deficiency could lead to DNA repair defect and increased cellular radiosensitivity. Finally, this thesis work allowed the identification of a molecular signature of cells from patients who suffered severe side-effects of radiotherapy, a first step toward the development of a new clinical test, and paves the way to better understand the mechanisms of individual radiosensitivity.

TITRE :

Identification d'une signature moléculaire et épigénétique de la sensibilité cutanée aux radiations ionisantes

RESUME :

La radiothérapie est un traitement majeur dans la lutte contre le cancer, avec plus de 50% des patients atteints d'un cancer qui en bénéficie, et pouvant à elle seule conduire à une rémission complète. Bien que les avancées technologiques aient diminuées considérablement les effets secondaires, 5 à 15 % des patients traités par radiothérapie souffrent d'effets secondaires sévères au niveau des tissus sains, limitant ainsi l'application de ce traitement. Ces effets secondaires sévères sont variés dans leur forme (desquamation, nécrose, fibrose), dans leur intensité (certains peuvent conduire à une nouvelle hospitalisation) ainsi que dans leur temps d'apparition (de quelques jours à plusieurs années après la radiothérapie). L'apparition de ces effets secondaires sévères chez certains patients de radiothérapie alors que les protocoles sont standardisés met à jour l'existence d'une radiosensibilité propre à chacun : la radiosensibilité individuelle. Malheureusement, à ce jour, il n'existe pas de test clinique applicable en routine qui fasse consensus, permettant de mesurer la radiosensibilité individuelle des patients atteints d'un cancer afin d'individualiser les protocoles de radiothérapie. D'autre part, les mécanismes moléculaires conduisant à ces effets secondaires restent encore mal connus. Nous avons donc étudié le transcriptome et le méthylome de fibroblastes dermiques de patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie afin d'identifier une signature de la radiosensibilité individuelle et également de mieux comprendre les bases moléculaires sous-jacentes. Nous avons ainsi observé dans une 1^{ère} cohorte que les fibroblastes cutanés des patients radiosensibles présentaient un profil transcriptomique et méthylomique spécifique. A l'aide d'une approche de machine learning, nous avons pu mettre à jour, une signature composée de 5 gènes dont l'expression nous a permis d'identifier les patients ayant souffert d'effets secondaires de radiothérapie dans une 2^{ème} cohorte indépendante. De plus, nous avons observé que les fibroblastes des patients ayant souffert d'effets secondaires de radiothérapie présentaient un défaut de réparation de l'ADN ainsi qu'une toxicité accrue après irradiation. Finalement, nous avons identifié le facteur de transcription NFATC2 comme un acteur de la réponse aux radiations ionisantes dont la déficience peut entraîner un défaut de réparation de l'ADN et augmenter la radiosensibilité cellulaire. Ce travail de thèse a donc permis de révéler une signature moléculaire des cellules de patients ayant souffert d'effets secondaires sévères de radiothérapie, une première étape vers la mise au point d'un nouveau test clinique, et ouvre la voie à une meilleure compréhension des mécanismes de la radiosensibilité individuelle.