



HAL
open science

Effets des rayonnements ionisants sur les Lymphocytes-T-CD4 et recherche de biomarqueurs génétiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle

Rajaa Aouache

► **To cite this version:**

Rajaa Aouache. Effets des rayonnements ionisants sur les Lymphocytes-T-CD4 et recherche de biomarqueurs génétiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL113 . tel-03584398

HAL Id: tel-03584398

<https://theses.hal.science/tel-03584398>

Submitted on 22 Feb 2022

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.

Effets des rayonnements ionisants sur les
Lymphocytes-T-CD4 et Recherche de biomarqueurs
génétiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle
*Ionizing radiations effects on T4-lymphocytes and
Research of genetic markers of individual
radiosensitivity*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, structure et dynamique des systèmes vivants SDSV

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, SGCSR,
Fontenay-aux-Roses, France.

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 20/12/21 par**

Rajaa AOUACHE

Composition du Jury

Pierre LAURENT PUIG

PR, INSERM, Université de Paris

Président du Jury

François PARIS

DR, INSERM-CNRS, Université de
Nantes

Rapporteur et Examineur

Frédérique VEGRAN

DR, INSERM, Université de Bourgogne

Rapporteuse et Examinatrice

Éric DEUTSCH

PR, INSERM, Université Paris Saclay

Examineur

Sabine LE GOUVELLO

MCU-PH, INSERM, Université Paris-Est
Créteil,

Examinatrice

Direction de la thèse

Jean-François DELEUZE

DR, CEA-CNRGH, Université Paris
Saclay

Co-Directeur de thèse

Annette SCHMITZ

CR, CEA-IRCM, Université Paris Saclay

Co-Directrice de thèse

Remerciements :

C'est en affrontant des étapes difficiles durant cette thèse que j'ai été confrontée à cette question : pourquoi avez-vous fait cette thèse ? Qu'est-ce qui a motivé votre choix ? Cette question au fond m'a poussée à me remettre dans mes pensées d'il y a plus de trois ans, me remémorant ainsi, mon attrait pour la science et surtout pour la compréhension du vivant. J'aime me poser des questions, raisonner, apprendre, et décortiquer les choses qui nous entourent. C'est l'une des raisons pour laquelle j'ai adoré tout mon cursus de biologie à l'université Paris Diderot. Et c'est au fond la raison de ma poursuite en doctorat, pour continuer à développer la connaissance du vivant. Alors, quand j'ai vu une annonce de recherche de candidat sur un sujet mêlant immunologie, radiobiologie et génétique, je me suis lancée en étant persuadée que tout s'apprend et qu'il faut être patient et assidu. Pendant cette thèse, j'ai pris conscience que le scientifique apprend, raisonne, analyse et comprend, mais il est aussi surtout acteur central, il crée les éléments de compréhension. Le scientifique est à la base de la production de résultats, qui peuvent être la source de satisfaction, de joie, de fierté, mais aussi source de mécontentement, de frustration, de gêne, de colère, d'envie et d'échec. L'équilibre entre ces deux états tient à peu de choses, et c'est pourtant, c'est ce qui est le moteur des journées des scientifiques, faisant osciller l'humeur des journées tantôt en noir, tantôt en rose. Durant cette thèse, je me suis plongée au cœur des domaines scientifiques du sujet, et j'ai aussi découvert le système dur, sur lequel repose l'élaboration de la science et qui crée des inégalités à tous les niveaux, ce sera ma première désillusion. Hélas, je n'ai que quelques lignes et il en faudrait cent fois plus, pour parler de l'expérience de la thèse, sur ce que j'ai appris (les points positifs, négatifs et les désillusions), sur les compétences apportées, sur le travail en laboratoire ou à propos du fonctionnement de la recherche. Je me contenterais de dire que lors de cette expérience, j'ai appris, des connaissances scientifiques fondamentales et expérimentales, mais aussi sur le monde du travail, sur l'Homme et sur moi. Aujourd'hui, cette expérience s'achève et au cours de mon parcours de thèse, mais surtout de vie, je souhaite remercier profondément l'ensemble des personnes qui ont contribué à cette expérience.

Je commence par remercier les membres du jury de thèse, dont Dr François Paris et Dr Frédérique Vegrin, qui me font l'honneur d'évaluer mon travail. Je remercie Pr Pierre Laurent Puig, Pr Eric Detusch et Dr Sabine Le Gouvello pour leur contribution à l'évaluation de ma thèse. Je remercie tous particulièrement Pr Pierre Laurent Puig et Pr Eric Deutsch de leur participation et de leurs conseils lors des comités de suivi individuel de thèse.

Je souhaite remercier le Dr Daniel Vaiman, qui a vu un potentiel de scientifique chez moi alors que j'étais une étudiante en master 1 ordinaire et peu confiante, et qui m'a permis de réaliser mes premiers pas de scientifiques dans son laboratoire. Je remercie ma directrice de thèse Dr Annette Schmitz qui

m'a accordé sa confiance pour ce projet de thèse, hélas qui ne durera qu'un court temps. Je remercie grandement mon directeur de thèse Jean-François Deleuze, pour son accompagnement sur la partie génétique du projet, qui au vu de mon niveau représente un sacré challenge. Mais je le remercie (vraiment, vivement, véritablement) de son accompagnement et de sa patience en fin de thèse. Je remercie Dr Paul-Henri Roméo, d'une part pour l'accueil au sein de l'IRCM et d'autre part pour son accompagnement et sa patience dans l'analyse, l'interprétation, la valorisation des résultats du projet de thèse, les conseils sur la réalisation des figures. Merci, j'ai beaucoup appris. Je remercie Pr Reiner Veitia, du temps qu'il m'a accordé, de sa compréhension et enfin de son aide qui était nécessaire à la finalisation de ce manuscrit de thèse.

Je remercie sincèrement tous les membres de la direction de l'école doctorale SDSV de Paris Saclay : Florence Gonnet, Jean-Luc Pernodet et particulièrement Pierre Capy, sans eux, je pense que l'issue de cette thèse aurait été bien différente. Je vous remercie pour votre écoute, votre compréhension, votre pédagogie, vos conseils et votre recherche de solutions, lorsque j'ai parlé de difficultés vécues pendant cette expérience de thèse. Je remercie Jan Baijer pour la transmission des compétences en cytométrie en flux, de son aide et de ses conseils en cytométrie et lors des expérimentations (tri-cellulaires, q-PCR, analyses des résultats). Je remercie l'ensemble de l'équipe du LRTS qui m'a un peu adopté, j'ai beaucoup appris de vous tous lors de nos échanges, et lors des réunions d'équipe. Un remerciement plus spécifique à Daniel Lewandowski et Germain Rousselet de leurs écoutes et leurs conseils, lors de mes présentations en réunions en demi-groupe, lors de la période Covid.

Je remercie aussi les collaborateurs des plateformes d'irradiation, de cytométrie et de microscopie, et principalement Véronique Ménard, Lamya Ibrah, Jan Baijer et Nathalie Deschamps pour leurs aides.

Je remercie vivement Dr Claire Dandine Roulland et Dr Edith Le Floch qui nous ont accompagnées tout le long du projet d'analyse d'association pangénomique. Leurs contributions aux analyses et principalement en statistiques ont été essentielles. Et surtout, je vous remercie vraiment pour tout ce que j'ai appris grâce à vous deux et à votre patience lors de nos réunions. J'ai appris beaucoup de vous. Merci !!!

Les remerciements suivants sont moins formels et concernent des personnes avec qui j'ai été au quotidien, et à qui je veux témoigner ma gratitude et ma sympathie profonde. Je remercie les joyeuses Claire Torres, et Véronique Neuville pour ces bons moments lors du déjeuner et de votre soutien. Je remercie tous les étudiants passés à l'IRCM et la SLF. Je félicite encore ceux qui ont soutenu Florian, Cynthia, Elia et Paola et je souhaite bon courage à tous ceux qui sont encore dans la course ! Encouragement spécial à Anne-Sophie, Charly, Merick, Pauline, Corentin et Clémentine.

Très franchement, Anais, Caroline, Honorine, Marion et Vilma, je manque cruellement d'espace pour vous REMERCIER (avec tous les qualificatifs qui intensifient le remerciement) pour tellement de choses, pour votre soutien quasi quotidien, pour votre gentillesse, pour le réconfort et enfin pour les RIRES ! Merci ! Vous êtes des personnes extraordinaires et c'est en partie grâce à vous que j'écris ces remerciements et que je n'ai pas fui cette thèse en courant. Pendant que j'y suis, je m'excuse pour toutes les fois, où j'ai été triste, fatiguée et à bout de nerfs. Dr Marion, encore félicitations, Anais et Honorine, je vous remercie pour les pauses chocolat chaud à 17 h, Honorine, promis, je te rembourserais les chocolats chauds. Caroline merci pour ta bienveillance quotidienne. Vilma merci de m'avoir adopté dans ton bureau et pour les bonbons ! Anais, la fin de thèse nous a beaucoup rapprochées et je sais que cela se prolongera bien après la thèse.

Je n'aurais pas pu terminer cette expérience sans le soutien de mes fidèles amis : Elise, Eva, Alexandre, Christ-Kheurvy qui connaissent déjà la tendresse et la gratitude que je leur porte. Je vous remercie pour les apéros, les verres, les pique-niques, et de m'avoir soutenu encouragé et compris et enfin supporté ! Si vous lisez ce paragraphe, c'est que la thèse touche à la fin et que je n'aurais plus d'excuses pour râler, être chiant ou ennuyeuse (ceci est de l'humour) et que je serais disponible pour faire plein de choses !

Plus pudiquement, je remercie du fond de mon cœur ma famille, et mes parents qui m'ont appris que dans tous les aspects de la vie, il faut aller au bout des choses, et que c'est lorsque l'on a fait tout son possible, on ne regrette rien. Je remercie évidemment, ma sœur Hayat, qui pourrait presque dire qu'elle a fait cette thèse, tant nous sommes proches. Tu as toujours trouvé une façon de m'apaiser et de m'encourager.

Je remercie deux personnes qui me sont chers Serge et Dominique, merci de votre générosité sur tellement d'aspects, de m'avoir fait découvrir tant de choses, tant de culture. Nos échanges sont pour moi une richesse.

Je remercie aussi Mathilde Alexandre et Anais qui m'ont aidés pour la relecture et la chasse au fautes d'orthographe

And last but not least, les constellations à l'origine du rayonnement, de la lumière et de la chaleur durant ces trois années, aussi connu sous le nom de Théo. Merci du plus profond de mon cœur pour tellement de choses, dont l'énumération ne tiendra pas sur la demi-page.

LISTE DES FIGURES	9
ABREVIATIONS	11
AVANT-PROPOS, RESUME	14
INTRODUCTION : ETAT DE L'ART	16
I. CHAPITRE 1 : PRINCIPE DE LA RADIOTHERAPIE ET MORTS CELLULAIRES INDUITES PAR LES RAYONNEMENTS IONISANTS	16
1. <i>Les rayonnements ionisants</i>	16
a) Type de rayonnements ionisants	16
b) Sources de rayonnements ionisants	17
(1) Sources naturelles	17
(2) Sources non-naturelles.....	18
2. <i>Base de la radiothérapie</i>	18
a) Principe de la radiothérapie	18
b) Les différentes techniques de radiothérapie	19
c) Nouveaux protocoles de radiothérapie et thérapies combinées	21
d) Effets secondaires radiotoxiques	23
(1) Effets déterministes vs stochastiques	24
(2) Effets aigus (précoces) induits par la radiothérapie	25
(3) Effets tardifs (chroniques) induits par la radiothérapie	26
(4) La lymphopénie	28
3. <i>Dérégulations du cycle cellulaire, sénescence et morts cellulaires induites par les rayonnements ionisants</i>	29
a) Dérégulations du cycle cellulaire induites par les rayonnements ionisants	29
b) Sénescence induite par les rayonnements ionisants	32
c) Catastrophe mitotique induite par les rayonnements ionisants	35
d) Apoptose induite par les rayonnements ionisants	35
(1) Signalisation intrinsèque (mitochondriale)	36
(2) Signalisation extrinsèque	36
(3) Signalisation des céramides	37
(4) Signalisation des caspases exécutives et élimination des cellules apoptotiques	37
(5) Externalisation des phosphatidylsérines et élimination par phagocytose	38
e) Nécrose induite par les rayonnements ionisants	40
f) Autophagie induite par les rayonnements ionisants	40
II. CHAPITRE 2 : RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE : TESTS CELLULAIRES ET GENETIQUES PERMETTANT DE LA MESURER	42
1. <i>Définir et évaluer la radiosensibilité individuelle par des tests cellulaires</i>	42
a) Historique et définition de la notion de radiosensibilité individuelle	42
b) Test clonogénique sur des fibroblastes.....	44
c) Quantification d'aberrations cytogénétiques dans les fibroblastes	44
d) Cassures ADN double-brin dans les fibroblastes	45
e) Quantification de la translocation d'ATM phosphorylée dans les fibroblastes	46
2. <i>Caractéristiques biologiques radio-induite discriminant les différences individuelle et tests cellulaires évaluant la radiosensibilité individuelle, impliquant les lymphocytes-T- CD4 et les lymphocytes CD8+</i>	49

a)	Apoptose tardive des lymphocytes-T-CD8 : le test RILA	49
b)	Quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires pour discriminer les différences individuelles	50
c)	Autres tests de radiosensibilité individuelle effectués sur les cellules mononuclées du sang périphérique ou les lymphocytes-T	53
3.	<i>Polymorphismes génétiques de type SNV prédictifs de la radiosensibilité individuelle</i>	54
a)	Syndromes génétiques associés à la radiosensibilité individuelle.....	54
b)	Association de polymorphismes génétiques de type SNV sur un ou plusieurs gènes candidats	55
(1)	Association de polymorphismes génétiques SNV aux effets secondaires de la radiothérapie	55
(2)	Association de polymorphismes génétiques SNV à des caractéristiques cellulaires radio-induite après irradiation <i>in vitro</i>	59
c)	Analyse d'association pangénomique (GWAS).....	62
(1)	Analyse d'association pangénomique (GWAS) aux effets secondaires de la radiothérapie.....	62
(2)	Analyse d'association pangénomique (GWAS) à une caractéristique cellulaire observée après irradiation <i>in vitro</i>	63
III.	CHAPITRE 3 : PHYSIOLOGIE DES LYMPHOCYTES-T-CD4 ET EFFETS DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR LES LYMPHOCYTES-T-CD4	65
1.	<i>Physiologie et identification des lymphocytes-T-CD4 circulants</i>	65
a)	Généralités sur le système immunitaire.....	65
b)	Lymphopoïèse aboutissant à la différenciation des lymphocytes-T-CD4.....	66
c)	Maturation des lymphocytes-T-CD4 dans les organes lymphoïdes primaires	67
d)	Activation et différenciation des lymphocytes-T-CD4 naifs en effecteur T-helper différencié (Th).....	68
(1)	Activation des lymphocytes-T-CD4 naifs	69
(2)	Différenciation, fonctions et identification des Th1	71
(3)	Différenciation, fonctions et identification des Th2	72
(4)	Différenciation, fonctions et identification des Th17	73
(5)	Différenciation, fonctions et identification des Th9	74
(6)	Différenciation, fonctions et identification des Th22	75
(7)	Différenciation, fonctions et identification des Treg.....	76
(8)	Différenciation, fonctions et identification des lymphocytes-T-CD4 à activité cytotoxique (CTL)	79
(9)	Différenciation, fonction et identification des Tfh	80
e)	Fonctions des effecteurs différenciés T-helper de lymphocytes-T-CD4 dans le microenvironnement tumoral	81
f)	Ontogénie et caractéristiques des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires	83
(1)	Caractéristiques et fonctions des lymphocytes-T-CD4 mémoires	84
(2)	Ontogénie des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires et centrales mémoires	84
(3)	Caractérisation des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires et centrales mémoires.....	87
g)	Métabolisme et épigénétique associés à la quiescence des lymphocytes-T-CD4	89
h)	Maintien et survie des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires	89
i)	La fonction et la régulation des molécules de surface CD62L, CD127 et CCR6 exprimées à la surface des lymphocytes-T-CD4.....	89

2. Principe de cytométrie en flux et du tri cellulaire permettant l'identification des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 dans le projet de thèse	91
3. Effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-CD4 et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 circulants.....	92
a) Effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4 quiescents <i>in vitro</i>	93
b) Effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4 stimulés <i>in vitro</i>	94
c) Effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4 différenciés (Th) circulants <i>in vitro</i>	95
d) Effets de la radiothérapie sur les lymphocytes-T-CD4	95
OBJECTIFS DU PROJET DE THESE.....	98
I. L'ETUDE DES EFFETS DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR LES LYMPHOCYTES-T-CD4, LES LYMPHOCYTES-T-CD4 EFFECTEURS MEMOIRES ET LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES-T-CD4 EFFECTEURS DIFFERENCIES T-HELPER CIRCULANTS	98
II. LA RECHERCHE DE POLYMORPHISMES GENETIQUES DE TYPE SNV ASSOCIES A LA QUANTIFICATION DE L'APOPTOSE RADIO-INDUITE DES LYMPHOCYTES-T-CD4 EFFECTEURS MEMOIRES, QUI REFLENT LES DIFFERENCES DE RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE	98
RESULTATS DU PROJET DE THESE	99
I. INTRODUCTION.....	99
II. MATERIEL ET METHODE	101
III. RESULTAT DE L'AXE D'ETUDE DES EFFETS DES RAYONNEMENTS IONISANTS SUR LES LYMPHOCYTES-T-CD4 ET LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES-T-CD4 CIRCULANTES QUIESCENTES ET APRES ACTIVATION <i>IN VITRO</i>	106
1. Étude des effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4 et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4.....	106
2. Étude de la prolifération et de l'apoptose radio-induite dans les lymphocytes-T-CD4 et dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 après activation et irradiation <i>in vitro</i>	127
3. Conclusion des résultats de l'axe 1	139
IV. RESULTATS DE L'AXE SUR LA RECHERCHE DE POLYMORPHISMES GENETIQUES DE TYPE SNV ASSOCIES A LA RADIOSENSIBILITE INDIVIDUELLE RELETEE PAR L'APOPTOSE RADIO-INDUITE DES LYMPHOCYTES-T-CD4 EFFECTEURS MEMOIRES.....	141
1. Association du SNV rs1131532 du gène TRAIL (TNFSF10) à la quantification de l'apoptose des lymphocytes-T-CD4-effecteur mémoire et des effecteurs différenciés T-helper (Th)	141
2. Analyse d'association des SNVs sur le gène TRAIL (TNFSF10) à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires	148
a) Rationnel soutenant le choix du gène candidat TRAIL (TNFSF10)	148
b) Génération et contrôles qualité des données de la cohorte	149
c) Carte des SNVs du gène TRAIL (TNFSF10) et sélection des SNVs étudiés.....	150
d) Analyse des résultats d'association des SNVs sur le gène TRAIL (TNFSF10) par l'outil FBAT prenant en compte les liens familiaux.....	151
3. Analyse d'association pangénomique (GWAS) à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires	152
a) Analyse des résultats obtenus par analyse d'association pangénomique GWAS par le modèle FBAT	152
4. Conclusion des résultats de l'axe 2	154

CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	156
I. CONCLUSION ET DISCUSSION DES ELEMENTS DE RESULTATS DU PREMIER AXE DU PROJET DE THESE.....	156
1. <i>Conclusion de l'étude d'apoptose radio-induite des sous-populations de LT-CD4.....</i>	<i>156</i>
2. <i>Discussion et analyses des résultats sur l'apoptose radio-induite des populations de LT-CD4.....</i>	<i>158</i>
a) Le choix du modèle d'irradiation <i>in vitro</i>	158
b) L'irradiation de PBMCs de donneurs sains vs issus de patients traités par radiothérapie	158
c) Identification des sous-populations de LT-CD4	159
d) Limites liées à l'irradiation de PBMCs totaux	159
e) Qu'apportent les résultats du projet sur la réponse CD4 suite à une irradiation clinique (radiothérapie) ?	160
3. <i>Perspectives du projet de thèse radiosensibilités des sous-populations de LT-CD4.....</i>	<i>160</i>
a) Étude du transcriptome et sénescence dans les populations de LT-CD4.....	160
b) Dans quels contextes est décrite la baisse d'expression de récepteurs ?	161
c) Comment corrélér l'apoptose et la baisse d'expression des récepteurs de surface ?	161
d) Caractérisation des effets de l'irradiation dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 quiescents et stimulés dans un contexte tumoral	162
II. CONCLUSION ET DISCUSSION DES ELEMENTS DE RESULTATS DU SECOND AXE DU PROJET DE THESE.....	163
1. <i>Conclusion de l'analyse d'association GWAS à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM.....</i>	<i>163</i>
2. <i>Discussion et perspectives de l'étude de polymorphismes génétiques prédictifs de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM</i>	<i>165</i>
a) Limites dues à la diversité de tests cellulaires et génétiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle ...	165
b) Association du SNVs rs1131532 à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-effecteur mémoire ou des effecteurs différenciés Th ?	166
c) Les limites dans l'analyse pangénomique (GWAS) du projet de thèse	166
3. <i>Les perspectives de l'axe d'étude sur la recherche de polymorphismes génétiques associés à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM</i>	<i>167</i>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	169

Liste des figures

Figure 1 : Principaux types de rayonnements ionisants et leur niveau de pénétrance dans différentes matières

Figure 2 : Principales actions des inhibiteurs de points de contrôles immunologiques (PD1, PD-L1 et CTLA-4) sur les cellules du microenvironnement tumoral

Figure 3 : Définition, exemple et modélisations des effets déterministes et stochastiques induits par les rayonnements ionisants

Figure 4a et 4b : Principales signalisations cellulaires à l'origine des arrêts du cycle cellulaire lors des points de contrôle G1/S et G2/M, induites par les rayonnements ionisants

Figure 5 : Principales signalisations cellulaires induites par les rayonnements ionisants aboutissant à la sénescence

Figure 6 : Trois signalisations principales (intrinsèque, extrinsèque et céramides) induites par les rayonnements ionisants aboutissant à la mort cellulaire par apoptose

Figure 7 : Principaux tests cellulaires prédictifs de la radiosensibilité individuelle, réalisés sur des fibroblastes primaires humains

Figure 8 : Quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 pour discriminer des différences individuelles de sensibilité à l'irradiation et tests RILA mesuré sur les lymphocytes-T-CD8 prédictif des effets radiotoxiques induits par la radiothérapie

Figure 9 : Association de polymorphismes de type SNV sur gène TRAIL (TNFSF10) à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4-effecteur mémoire

Figure 10: Représentation simplifiée de l'hématopoïèse humaine de l'adulte à partir d'une cellule souche hématopoïétique

Figure 11 : Principales interactions entre le lymphocytes-T-CD4 et une cellule présentatrice de l'antigène aboutissant à l'activation des lymphocytes-T-CD4, par la stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28

Figure 12 : Différenciation des principaux effecteurs T-helper différenciés (Th) de lymphocytes-T-CD4 circulants

Figure 13 : Principaux rôles des effecteurs différenciés Th1, Th2, Th17, Th9, CTL et Treg au sein du microenvironnement tumoral

Figure 14 : Principaux modèles de différenciation des lymphocytes-T-CD4 en effecteur mémoire (EM) et centrale mémoire (CM), après une première activation

Figure 15 : Caractérisation phénotypique des lymphocytes-T-CD4 naïf et mémoires : effecteur mémoire (EM) et central mémoire (CM)

Figure 16 : Résumé des effets biologiques induits par les rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4

Figure 17 : L'irradiation induit l'apoptose uniquement au sein de la sous-population de lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires.

Figure 18 : La population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteur mémoire est hétérogène pour la sensibilité à l'apoptose radio-induite. Elle présente d'une part une population CCR6+CD127+ résistante à l'apoptose radio-induite et d'autre part et une population CCR6- sensible à l'apoptose radio-induite. La résistance des CCR6+CD127+ est indépendante de la signalisation pro-apoptotique médiée par TRAIL (TNFSF10).

Figure 19 : L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels une diminution de l'expression du récepteur de surface CD62L (L-Selectin).

Figure 20 : L'irradiation induit une diminution de l'expression du récepteur CD62L spécifiquement à la surface de la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnel CCR6-, mais pas dans la population CCR6+CD127+.

Figure 21 : L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteurs mémoires une diminution de l'expression du récepteur de surface CCR6

Figure 22 : L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteurs mémoires une baisse de l'expression du récepteur de surface CD127 spécifiquement dans la population CCR6- effecteur mémoire.

Figure 23 : Schéma bilan de la caractérisation de l'hétérogénéité de radiosensibilité à l'apoptose dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels et de la baisse d'expression radio-induite dans les lymphocytes-T-CD4 des récepteurs de surface CD62L, CCR6 et CD127.

Figure 24 : La stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28 lors de l'irradiation protège les lymphocytes -T-CD4 et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire de l'apoptose radio-induite.

Figure 25 : Une dose d'irradiation à 2 Gy n'interfère pas avec la prolifération des lymphocytes-T-CD4 et des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires ; CCR6+CD127+, CCR6-CD127+ et CCR6-CD127-.

Figure 26 : L'irradiation induit dans des LT-CD4 effecteurs mémoires après 6 jours de prolifération l'apoptose et la perte d'expression du récepteur de surface CD62L. Légende en page 136

Figure 27 : L'association génétique du SNV rs1131532 sur le gène TRAIL (TNFSF10) à l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 EM est précisée spécifiquement dans les effecteurs mémoires différenciés Th1, Th2, Th non polarisé, Th9 et Th17 (CXCR3+). Légende en page 143

Figure 28 : Données supplémentaires figure 27, étude de la variabilité du pourcentage de cellules apoptotique quantifiée après irradiation en fonction du génotype pour rs1131532.

Figure 29 : Contrôles qualité principaux effectués sur la cohorte d'individus génotypés

Figure 30 : Association génétique de 11 SNVs sur le gène TRAIL (TNFSF10) à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM obtenus par FBAT selon modèle additif, dominant et récessif

Figure 31 : Représentation par Manhattan plot de l'analyse d'association pangénomique GWAS à la quantification de l'apoptose des LT-CD4-EM par FBAT selon un modèle additif Tableau 1 : Résumé des effets radiotoxiques qui se manifestent chez les patients après un traitement par radiothérapie

Tableau 1 : Résumé des effets radiotoxiques qui se manifestent chez les patients après un traitement par radiothérapie

Tableau 2 : Résumé des principaux polymorphismes génétiques de type SNV issus de gènes candidats associés aux effets radiotoxiques présents chez les patients après un traitement par radiothérapie

Tableau 3 : Récapitulatif de la caractérisation des lymphocytes-T-CD4 effecteurs différenciés Th circulants

Tableau 4 : Les anticorps fluorescents utilisés pour l'immunophénotypage des sous-populations de lymphocytes-T-CD4

Tableau 5 : Les amorces Taqman utilisées en q-PCR

Abréviations

53BP1 : Tumor Protein P53 Binding Protein 1	CD40 : Cluster de Différenciation 40
ADAM : ADAM Metallopeptidase Domain	CD40-L : Cluster de Différenciation 40-ligand
ADN : Acide Désoxyribonucléique	CD45RA : Cluster de Différenciation 54RA
AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor	CD57 : Cluster de Différenciation 57
AIF : Apoptosis-Inducing Factor	CD62L (L-Selectin) : Cluster de Différenciation 62L
AnnV : Annexine V	CD69 : Cluster de Différenciation 69
APAF-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1	CD70 : Cluster de Différenciation 70
AT : Syndrome Ataxie téléangiectasie	CD8 : Cluster de Différenciation 8
ATG : AuTophagy Related Gene	CD80 : Cluster de Différenciation 80
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	CD86 : Cluster de Différenciation 86
ATP : Adénosine triphosphate	CD95 (FAS-R) : Fas Cell Surface Death Receptor
BAX : BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator	CDK : Kinase Dépendante des Cyclines
BCL11B : BAF Chromatin Remodeling Complex Subunit BCL11B	cf : Confère
BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2	CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité
BCL-XL : B-cell Lymphoma-Extra Large	CPA : Cellules Présentatrice de l’Antigène
BID : BH3 Interacting Domain Death Agonist	CSH : Cellules souche hématopoïétique
BRCA1/ BRCA2 : Breast Cancer 1/2	CTCAE : Common Terminology Criteria for Adverse Events
CAD : Carbamoyl-Phosphate Synthetase 2, Aspartate Transcarbamylase, And Dihydroorotase	CTL : Lymphocytes-T-CD4 à activité cytotoxique
CAD : Carbamoyl-Phosphate Synthetase 2, Aspartate Transcarbamylase, and Dihydroorotase	CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
Casp : Caspase	CXCL : C-X-C motif Chemokine Ligand
CCL : Chemokine (C-C motif) Ligand	CXCR3 (CD183) : CXC Chemokine Receptor 69
CCR : C-C chemokine receptor	DD : Death Domain
CCR4 (CD194) : C-C Chemokine Receptor Type 4	DDB2 : Damage Specific DNA Binding Protein 2
CCR6 (CD196) : C-C Chemokine Receptor Type 6	DED : Death Effector Domain
CD127 (IL-7R-A) : Cluster de Différenciation 127	DISC : Death-Inducing Signaling Complex
CD132 : Cluster de Différenciation 132	DR5 (TNFRSF10B) : Death Receptor 5
CD25 : Cluster de Différenciation 25	EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
CD27 : Cluster de Différenciation 27	ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
CD28 : Cluster de Différenciation 28	EOMES : Eomesodermin
CD3 : Cluster de Différenciation 3	ERBB2 : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
CD4 : Cluster de Différenciation 4	FA : Anémie de Fanconi (Fanconie anemia)
	FADD : Fas-Associated Protein with Death Domain

FAS (CD95L) (CD178) : Fas Cell Surface Death ligand
FBAT : Family-Based Association Test
FDA : Food and Drug Administration
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
FOXO1 : Forkhead Box O1
FOXO3A : Forkhead Box O3-A
FOXP3 : Forkhead Box P3
FSHR : Follicle Stimulating Hormone Receptor
GADD45 : Growth Arrest And DNA Damage Inducible-alpha
GATA3 : GATA Binding Protein 3
GFI-1 : Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor
GSTP1 : Glutathione S-Transferase Pi 1
Gy : Gray
H2AX : Histone Famille des Histones H2A, Membre X
IFN : Interferon
IGRT : Radiothérapie guidée par l'image
IL : Interleukine
IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4
IRM : Imagerie par résonance magnétique
JNK : c-Jun N-Terminal Kinases
LAG-3 : Lymphocyte Activation Gene-3
LAMP1/ LAMP2 : Lysosomal Associated Membrane Protein 1/2
LB : Lymphocyte-B
LIG4 : Ligase IV
LT : Lymphocyte-T
LT-CD4 : Lymphocyte-T-CD4
LT-CD4-CM : Lymphocyte-T-CD4 central mémoire
LT-CD4-EM : Lymphocyte-T-CD4 effecteur mémoire
LT-CD4-RM : Lymphocyte-T-CD4 résident mémoire
LT-CD8 : Lymphocyte-T-CD8
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MEKK : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
meV, keV, Ev : mega, kilo électron volt
miRNA : micro-RNA
MMP : Métalloprotéinase Matricielle
MTOR : Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase
NBS : Syndrome de Nimègue (Nijmegen)
NBS1 : NIBRIN
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-Kb : Nuclear Factor-Kappa B
NK : Lymphocyte Natural Killer
NKG2A (KLRC1) /NKG2D (KLRK1) : Killer Cell Lectin Like Receptor C/K
NOXA : Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
NuMa : The Nuclear Mitotic Apparatus Protein
OCA-B (POU2AF1) : POU Class 2 Homeobox Associating Factor 1
ORL : Oto-Rhino-Laryngologiste
OX40 (CD134) (TNFRSF4) : TNF Receptor Superfamily Member 4
PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PATCH1 : PATCHED 1
PBMC : Cellules Mononuclées du Sang Périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PCC : Premature Chromosome Condensation
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : Amplification en chaîne par polymérase
PD-1 : Programmed Cell Death 1
PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1
PHA : Phytohaemagglutinin
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PIKKs : Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinases
PLM : Progéniteur Lympho-Myeloïdes
PLMD : Progéniteur Lympho-Mono-Dendritic
PLP : Progéniteurs Lymphoïdes Précoces

PMD : Précurseurs Monocytaires et Dendritiques appelés

PRDM1 : PR/SET Domain 1

PROX1 : Prospero Homeobox

PS : Phosphatidylsérine

PU-1 (SPI1) : Spi-1 Proto-Oncogene

PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

pvaleur : Est la probabilité, pour un modèle statistique donné sous l'hypothèse nulle, d'obtenir la même valeur ou une valeur encore plus extrême que celle observée

q-PCR : Amplification en chaîne par polymérase quantitative

RAC1 : Rac Family Small GTPase 1

RAD21 : RAD21 Cohesin Complex Component

Rb : Retinoblastoma Protein

RILA : Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis

RMCI : Radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité

RNS : Espèce Réactive de l'Azote

ROR- γ -t : RAR Related Orphan Receptor-gamma-t

ROS : Espèce Réactive de l'Oxygène

RUNX1 : Runt-Related Transcription Factor 1

RUNX3 : RUNX Family Transcription Factor 3

SASP : Facteurs Sécrétés Associés à la Sénescence

SA- β -Gal : Senescence-Associated beta-Galactosidase

SF2 : Survival Fraction

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SNV : Single Nucleotide Variant

SOCS-1 : Suppressor Of Cytokine Signaling 1

SOD2 : Superoxide Dismutase 2

STAT : Signal Transducer And Activator Of Transcription

TANC1 : Tetratricopeptide Repeat, Ankyrin Repeat And Coiled-Coil Containing 1

T-BET : T-box Expressed in T cells

TCR : T Cell Receptor

Tfh : T-helper folliculaire

TGF- β : Transforming Growth Factor Beta

Th : T-helper

ThPOK (ZBTB7B) : Zinc Finger And BTB Domain Containing 7B

TILs : Lymphocytes infiltrants la tumeur

TIM-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin Containing Protein-3

TLR : Toll Like Receptor

TNFR1 : Tumor Necrosis Factor Receptor 1

TNF α : Tumor Necrosis Factors alpha

TRAIL(TNFSF10) : Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand

Treg : T-regularory

XRCC1/XRCC3 : X-Ray Repair Cross Complementing 1/2

En France, 380 000 nouveaux diagnostics de cancer sont posés chaque année, et 60 % de ces cancers sont traités par radiothérapie. Une méthode basée sur l'effet des rayonnements ionisants qui détruisent les cellules tumorales et, dans certains cas, augmentent la réponse immune contre les cellules cancéreuses. Malgré des avancées technologiques récentes, la radiothérapie engendre des effets radiotoxiques indésirables sur les tissus sains situés dans le champ d'irradiation. Cependant, seulement 5 à 15 % des patients développent ces complications radio-induites, ce qui suggère l'existence d'une radiosensibilité individuelle des tissus sains. Il est donc important de rechercher les bases génétiques de cette radiosensibilité individuelle et de caractériser des marqueurs et des tests biologiques prédictifs de cette radiosensibilité individuelle. Les recherches pionnières réalisées par le laboratoire d'accueil ont montré que la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires (LT-CD4-EM) à partir du sang périphérique humain irradié permettait de stratifier la population. Plus récemment, le laboratoire d'accueil a montré une association génétique de plusieurs polymorphismes du gène *TRAIL (TNFSF10)* avec l'apoptose des LT-CD4-EM (Schmitz et al., 2007) (Baijer et al., 2016). Toutefois, la population de LT-CD4-EM contient des sous-populations d'effecteurs Th, identifiables par cytométrie en flux, dont la sensibilité aux rayonnements ionisants pourrait préciser une base cellulaire de la radiosensibilité individuelle.

En résumé, le projet de thèse s'articule autour de deux axes scientifiques :

- 1) La compréhension des effets des rayonnements ionisants sur les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 circulantes, quiescentes et après activation.
- 2) L'étude de l'association de polymorphismes génétiques sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* et le génome entier au test de radiosensibilité individuelle mesuré par l'apoptose des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires.

Le contexte de ce projet de thèse nécessite des éléments de compréhensions multiples présentés en introduction du manuscrit. Dans le premier chapitre, j'ai présenté les différentes techniques de radiothérapie et les effets radiotoxiques associés. Le premier chapitre comprend les dysfonctionnements du cycle cellulaire et les morts cellulaires radio-induites. Le second chapitre de l'introduction permet de comprendre la notion de radiosensibilité et de radiosensibilité individuelle. Ce chapitre détaille les principaux phénotypes proposés comme tests de radiosensibilité sur deux modèles cellulaires principaux : les fibroblastes et les lymphocytes-T. C'est en fin de chapitre que je traite de la corrélation entre des polymorphismes de type SNV et les effets radiotoxiques induits par la radiothérapie d'une part et avec les tests de radiosensibilité de lymphocytes-T-CD8 et de

lymphocytes-T-CD4 d'autre part. Enfin, le dernier chapitre regroupe les notions essentielles pour comprendre la physiologie des lymphocytes-T-CD4, de la différenciation en effecteurs (Th) et de la mise en place de la mémoire des lymphocytes-T-CD4. La fin de ce chapitre est dédiée au regroupement des études qui analysent les effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4.

Les résultats du premier axe du projet ont été structurés sous la forme d'une proposition d'article scientifique rédigé en français. Le second axe du projet portant sur l'analyse d'association pangénomique GWAS au phénotype d'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 est présenté dans la seconde partie de la partie résultat du manuscrit.

Ce manuscrit conduira à la conclusion et la discussion de l'ensemble des résultats du projet de thèse.

I. Chapitre 1 : Principe de la radiothérapie et morts cellulaires induites par les rayonnements ionisants

1. Les rayonnements ionisants

a) Type de rayonnements ionisants

En 1896, Henri Becquerel a mis en évidence le principe de radioactivité et d'irradiation en étudiant la fluorescence avec émission de rayons X de certains composés. Il sera le premier à observer un rayonnement émis par un atome d'uranium. Les travaux de Pierre et Marie Curie mettent en évidence l'existence d'autres éléments radioactifs, le polonium et le radium. L'irradiation correspond à l'action d'exposer un organisme ou une substance à un flux de rayonnements ionisants : rayon α , β , γ , X, protons et neutrons. L'irradiation se mesure en plusieurs unités : gray, rad, sievert et becquerel, l'unité internationale est le gray (Gy). Les rayonnements ionisants ont la capacité de pénétrer la matière. Le niveau de pénétrance dépend du type de rayonnement ([Tonnessen and Pounds, 2011](#)) (**Figure 1**).

Les rayonnements ionisants (RI) sont classifiés selon leur origine, leur pénétrance, leur charge et l'intensité de l'énergie mesurée en électron-volt (eV). Les rayonnements ionisants peuvent être à effet direct si les particules émises sont chargées (électrons, protons), et à effet indirect si les particules sont neutres (photons, neutrons). Plusieurs caractéristiques de l'élément radioactif influencent la pénétrance dans un milieu : la charge, la masse et la vitesse. L'émission α repose sur l'émission de particules α . Les particules α sont composées de 2 protons et de 2 neutrons et sont chargées positivement ($+2$). L'émission α est issue de radionucléides lourds tels que l'uranium, le plutonium, le radium, le thorium et le radon. Les particules α ont une énergie de 4 à 8 MeV ont un fort pouvoir ionisant et un faible niveau de pénétrance. Ce type d'émission ne traverse pas la barrière cutanée. L'émission β correspond à une émission d'électrons à très haute vitesse. Un électron chargé positivement induit des émissions positives (β^+) et un électron négatif une émission négative (β^-). Le rayonnement β a une énergie de 0,4 MeV plus faible que le rayonnement α . La pénétrance de ce type de rayonnement atteint les tissus en superficie et peut engendrer des lésions sur la peau. L'émission γ est une onde électromagnétique provenant du noyau de l'élément radioactif. Le noyau va émettre cette énergie sous forme de photons afin d'atteindre le niveau le plus bas de stabilité. L'énergie du rayonnement γ est plus importante que celles des précédents rayonnements, de l'ordre de 10 KeV. Les rayons γ ont le niveau de pénétrance le plus haut. L'exposition au rayon γ externe et interne peut-être létale pour un organisme vivant. L'émission de rayons X émane d'une trop grande énergie accumulée par les électrons orbitaux. Ceux-ci vont émettre, de la même façon que le noyau, des photons à grande vitesse. L'énergie de ce rayonnement est de l'ordre de 5 keV. De la même façon que les rayons γ , les rayons X traversent la barrière cutanée. Les rayonnements cosmiques émanent de la déstabilisation

d'atomes due aux fortes températures. Ce rayonnement est composé de particules relativistes et est composé de 85 % de protons (issus de noyaux d'hydrogène), 13 % de particules α et 2 % de noyaux lourds (issus d'atomes de fer et nickel) (Gianfaldoni et al., 2017) (Keith et al., 2013).

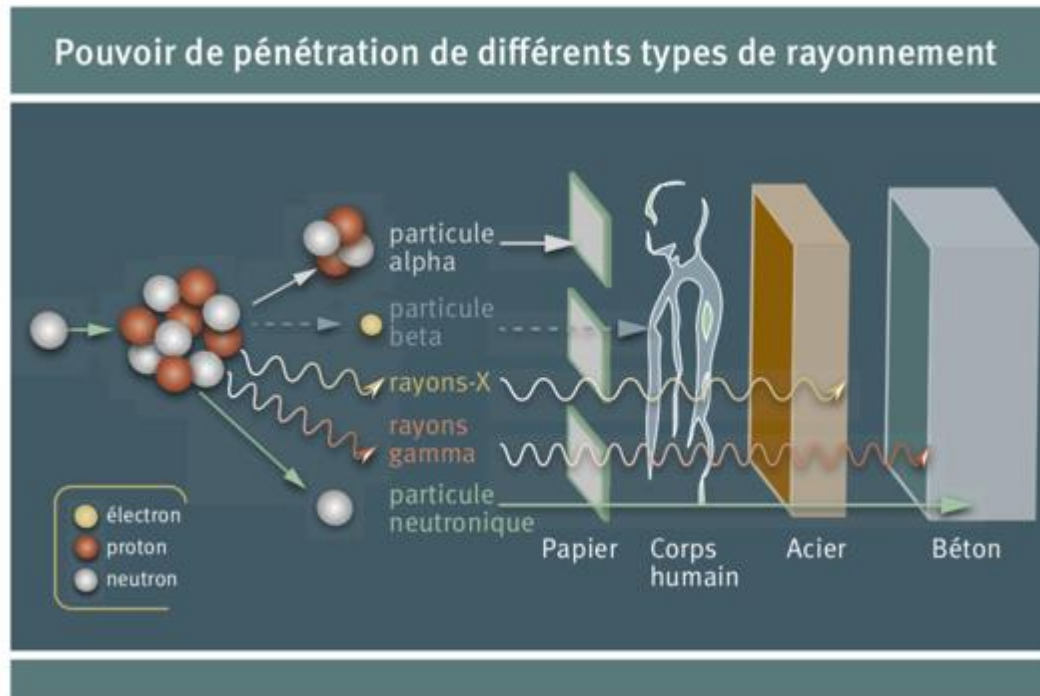


Figure 1 : Principaux types de rayonnements ionisants et leur niveau de pénétrance dans différentes matières

Différents types de rayonnements ionisants et leur composition : particule alpha, particule β , rayon X, rayon gamma et particules neutronique. Niveau de pénétrance des différents rayonnements ionisants à travers différents matériaux : papier, organisme humain, acier et le béton. Les particules α sont composées de proton et de neutron, elles ne peuvent pas pénétrer le papier. Les particules β sont composées d'électrons, qui peuvent pénétrer le papier mais pas la barrière cutanée chez l'homme. Les rayonnements X et γ sont composés de photon et ont le plus grand pouvoir de pénétrance, ils pénètrent la barrière cutanée et l'acier ("Types de rayonnements ionisants," 2017)

b) Sources de rayonnements ionisants

(1) Sources naturelles

Les sources d'irradiation peuvent être naturelles ou induites par l'homme. Les rayonnements naturels sont d'origines terrestre et cosmique. Les éléments naturellement radioactifs résident dans les sols et les roches et sont aussi référencés comme sources telluriques. Les chaînes de l'uranium-238, du thorium-232 et du potassium-40 représentent 1/3 du niveau d'irradiation au sol annuel mesuré. L'eau et l'atmosphère sont aussi des sources naturelles d'irradiation. La source majeure d'irradiation atmosphérique provient de l'émanation de radon des sols (Comité scientifique des Nations Unies pour

[l'étude des effets des rayonnements ionisants and Rapport à l'Assemblée générale, avec annexes scientifiques, 2000](#)).

(2) Sources non-naturelles

Les sources non-naturelles sont issues de diverses activités humaines. L'exposition médicale comprend d'une part, l'imagerie médicale (radiographie, scanner, IRM, produit de contraste) et d'autre part, les procédures thérapeutiques et de recherche, dont la radiothérapie administrée sous forme externe et interne. Les produits de combustion, certains matériaux utilisés pour la production d'objets consommés au quotidien tel que la télévision ou les téléphones portables sont des sources de rayonnement. Enfin, l'exposition peut provenir d'accidents nucléaires issus des centrales nucléaires (Chernobyl 1986, Fukushima 2011) et d'armements nucléaires (Hiroshima et Nagasaki 1945). Dans ces contextes, les rayonnements contaminent les couches de l'atmosphère et se propagent dans l'environnement. Les radionucléides issus de cette propagation sont inhalés et déposés sur les plantes et les sols. Enfin, l'industrie nucléaire emploie des travailleurs qui sont exposés au rayonnement, il s'agit du risque d'exposition professionnel ([United Nations Scientific Committee and on the Effects of Atomic Radiation, 1982](#)).

2. Base de la radiothérapie

a) Principe de la radiothérapie

Le cancer est la seconde cause de décès en France et est en augmentation d'en moyenne 400 000 cas par an en France. Chaque année en France, plus d'un million de personnes sont hospitalisées pour des cancers parmi lesquels 60 % de patients sont traités par radiothérapie ([Rapport cancer de France](#)). La radiothérapie est basée sur l'émission de rayonnements ionisants à forte énergie ou de particules radioactives ciblant les cellules tumorales de manière à limiter la prolifération tumorale et à les détruire. La radiothérapie utilise plusieurs sources de rayonnements X (majoritairement), de rayonnement γ , et de particules : protons, neutrons et électrons pouvant être administrés dans l'organisme par voie interne ou externe. Les techniques de radiothérapie modernes diffusent des rayons à haute énergie (5 et 25 MeV) modelés sous la forme de faisceaux par un accélérateur linéaire d'électron médical qui transforme des électrons en ondes électromagnétiques ([Gianfaldoni et al., 2017](#)). L'avantage des accélérateurs est de produire des rayonnements d'énergie élevée bien définie permettant l'administration de doses d'irradiation à différentes profondeurs. Le choix du type de radiothérapie dépend de la localisation, du type et de la taille de la tumeur. La dosimétrie utilisée est entre 20 et 80 Gy total fractionnée en 10 séances en moyenne. La radiothérapie peut être curative et alors guérir le patient, palliative afin de freiner l'évolution du cancer, ou encore symptomatique lorsqu'elle est utilisée pour soulager le patient ([Dillensege et al., 2021](#)).

b) Les différentes techniques de radiothérapie

Les techniques de radiothérapie ont évolué à travers le temps de façon à optimiser la destruction des cellules tumorales en protégeant au maximum les tissus sains environnants. La radiothérapie conformationnelle 3D est composée de 4 à 6 faisceaux qui délivrent une dose uniforme de manière homogène au niveau de la tumeur. Les faisceaux diffusent des rayons X de façon externe. Avant de démarrer le traitement, le praticien détermine par imagerie (IRM, scanner et TEP) : le positionnement du patient, la position de la tumeur, les bords et la taille de la tumeur afin de déterminer le volume à traiter. L'imagerie utilisée étant aussi basée sur l'émission de rayons X, cela ajoute des doses (10-20 mGy) à additionner aux doses de rayonnement du traitement. Le radiothérapeute décide ensuite de la dose totale du traitement, de l'étalement et du fractionnement du traitement (Nutting et al., 2001). La radiothérapie conformationnelle est utilisée à visée curative sur un large spectre de tumeurs dont les tumeurs : de la peau, de la prostate, du thorax (poumons et sein), de l'abdomen (foie, pancréas, estomac), du pelvis (utérus et ovaires), les cancers ORL, les tumeurs cérébrales, les lymphomes, les leucémies, les méningiomes, les cancers des os (ostéosarcome), les chondrosarcomes et les cancers des tissus mous ("Conditions Treated with Radiation Therapy | Stanford Health Care," n.d.). Certains types de cancer ne répondent pas aux thérapies basées sur des rayonnements, dont les tumeurs de Wilms, les rhabdomyosarcomes, le cancer colorectal, les carcinomes des tissus mous et le carcinome embryonnaire du testicule. Aussi, la radiothérapie a un effet limité sur les cancers métastatiques ("Radiation Therapy," n.d.).

La radiothérapie conformationnelle à modulation d'intensité (RMCI) est une technologie plus récente, elle permet de moduler au cours de la séance l'intensité des faisceaux, ce qui améliore la protection des tissus sains. Cette technologie permet au cours de la séance d'adapter les faisceaux d'irradiation aux volumes tumoraux de formes complexes, irrégulières et concaves. De cette façon, les faisceaux délimitent précisément les bords de la tumeur, ce qui d'une part limite les effets sur les tissus sains en marge de la tumeur; et d'autre part, rend possible l'utilisation de plus fortes doses d'irradiation. (Lin et al., 2012) (Dillensege et al., 2021). Cette technique est utilisée pour traiter des tumeurs extrêmement proches d'organes vitaux, dont les cancers : de la prostate, de la tête et du cou, du poumon, du sein, gynécologiques ; mais aussi pour des cancers du système gastro-intestinal et pour traiter des tumeurs cérébrales ("Cancer Treatments," n.d.) (Bortfeld, 2006).

La radiothérapie stéréotaxique ou CyberKnife est la technologie qui initialement a été développée pour cibler des zones intracérébrales. Elle délivre des doses élevées (5-20 Gy) en fractionnement faible, ce qui permet de délivrer de fortes doses d'irradiation sur des zones cibles très précises. L'objectif de cette technique est de favoriser la nécrose localisée du tissu. Elle est utilisée pour traiter des cancers

atteignant la glande pituitaire et le cerveau tels que le méningiome, le paragangliome, l'hémangioblastome et craniopharyngiome et notamment, dans le cas de microtumeurs cérébrales non opérables et de métastases ("[Stereotactic radiosurgery - Mayo Clinic](#)," n.d.) (Ricardi et al., 2016). La radiothérapie stéréotaxique est utilisée chez des patients présentant des cancers à petites cellules au niveau du poumon, du foie et de la moelle épinière ("[Stereotactic radiotherapy | Cancer treatment | Cancer Research UK](#)," n.d.). La radiothérapie stéréotaxique nécessite d'avoir un positionnement très précis effectué par radiothérapie guidée par l'image (Hajj and Goodman, 2015). La radiothérapie guidée par l'image (IGRT) est basée sur l'association entre un accélérateur linéaire et de l'imagerie réalisée par un scanner, permettant de calculer à chaque séance la forme, l'énergie et la dose du faisceau d'irradiation. Cela permet un ciblage plus précis de la zone à irradier et limite les effets sur les tissus sains (Dillensege et al., 2021).

La protonthérapie est la forme la plus sophistiquée et innovante de radiothérapie est basée sur l'émission de particules chargées à haute énergie : les protons. Grâce aux propriétés du proton, un seul faisceau est dirigé vers la tumeur. L'énergie émanant des protons est la plus faible lors du contact avec l'organisme et attendra son énergie maximale au sein de la tumeur. Cette technique permet une adaptation quasi millimétrique au volume tumoral et limite l'irradiation des tissus sains (Dillensege et al., 2021). Ainsi, cette technique est utilisée principalement dans les cancers pédiatriques du système nerveux central, dont les tumeurs de la fosse postérieure, les craniopharyngiomes et les médulloblastomes (Steinmeier et al., 2019). Elle est aussi utilisée chez des patients adultes ayant des tumeurs cérébrales à la base du crâne et oculaire qui sont difficilement traitables avec la technique de radiothérapie conformationnelle.

La radiothérapie interne ou Curiethérapie est basée sur l'administration à l'intérieur de l'organisme d'éléments radioactifs à émissions α ou β , dont l'iode 125 (cancer de la prostate), l'yttrium 90 (cancer du foie multimétastatique) et l'iridium 192 (cancer du sein). Les éléments radioactifs peuvent être déposés dans une cavité sur les bords de la tumeur, ou directement placés au sein de la tumeur (Dillensege et al., 2021). La radiothérapie interne est utilisée pour traiter des patients atteints de cancer de la prostate, utérin, du sein, du poumon, rectal, de la peau et au niveau de l'œil ("[Radiation Therapy](#)," n.d.).

c) Nouveaux protocoles de radiothérapie et thérapies combinées

Les études cliniques les plus récentes révèlent l'efficacité des protocoles d'hypofractionnement, c'est-à-dire une augmentation de la dose délivrée distribuée sur moins de séances. Par exemple, dans le cas de cancer de la prostate, la dose totale est de 60 Gy fractionnée en 20 séances et de carcinome du sein, la dose est de 28 Gy fractionnée en 5 séances (Hennequin and Dubray, 2013). Les protocoles FLASH délivrent une dose unique à forte dose entre 10 et 40 Gy sur des zones définies avec précision. Cette technique d'irradiation clinique repose sur le développement et l'utilisation d'accélérateur linéaire d'électrons capable de délivrer un débit de dose moyen de plus de 1000 Gy/s. Les recherches expérimentales réalisées chez l'animal démontrent que les protocoles d'irradiation FLASH protègent les tissus sains, notamment les tissus de la peau, et limitent fortement le développement de fibrose (Favaudon, 2019).

Plusieurs traitements ciblent les cellules tumorales qu'il est possible de combiner à la radiothérapie. La radiothérapie peut être utilisée en combinaison avec plusieurs thérapies, dont la chimiothérapie, des thérapies expérimentales ciblées (Glivec, Cetuximab, inhibiteur de checkpoints cellulaire, CDK4-CDK6) ou avec de l'immunothérapie, qui visent à stimuler la réponse immunitaire de l'organisme contre les cellules tumorales (Vial et al., 2019). L'immunothérapie est considérée comme une révolution parmi les traitements visant à la baisse du développement tumoral. L'immunothérapie a pour objectif d'inhiber les voies de signalisations cellulaires qui inhibent l'activité des lymphocytes-T-CD8 cytotoxiques infiltrant les tumeurs et les voies qui sont responsables de l'anergie des lymphocytes-T-CD8. L'inhibition de ces voies s'effectue par le biais de molécules, plus spécifiquement des anticorps monoclonaux appelés inhibiteurs de contrôle immunologique « checkpoint », qui ciblent les signalisations inhibant l'activité des lymphocytes-T-CD8 cytotoxiques. Les effets des inhibiteurs de contrôle immunologiques ont d'abord été démontrés dans des essais cliniques ; les premiers anticorps découverts ciblent la signalisation PD-1/PDL-1 (Migden et al., 2018) (Hamid et al., 2013) (Patnaik et al., 2015) et CTLA-4 (Mellman et al., 2011) (Lipson and Drake, 2011) (Hoos et al., 2010) (Ribas et al., 2007). Les anticorps monoclonaux ciblent d'une part le récepteur CTLA-4 et PD-1 à la surface des LT-CD8 et le ligand PDL-1 à la surface des cellules tumorales, de façon à bloquer les interactions inhibitrices de l'activité des LT-CD8 entre CTLA-4 et la molécule B7 à la surface des cellules dendritiques et entre PD-1 et PDL-1. De plus, l'inhibition de récepteur CTLA-4, qui est présent aussi à la surface des effecteurs différenciés lymphocyte-T-CD4 Treg permet de bloquer la fonction immunosuppressive des effecteurs Treg sur l'activité des LT-CD8 (Figure 2) (Ayoub et al., 2019). La « Food and drug administration » (FDA) autorise l'utilisation de 7 inhibiteurs de contrôle immunologique, qui sont dits de première génération, et qui ont été utilisés chez des patients atteints de cancer du poumon, de mélanome, de carcinome, de cancer de la vessie, et de cancer de la peau (Mellman et al., 2011) (Migden et al., 2018). De

nouveaux inhibiteurs de contrôle immunologique, de seconde génération, sont utilisés sur différents essais cliniques. Ces anticorps de seconde génération sont dirigés contre LAG-3 et TIM-3 à la surface des LT-CD8 et la molécule de surface B7-H4 à la surface des cellules dendritiques (Cogdill et al., 2017) (MacGregor and Ohashi, 2017).

Le traitement par radiothérapie seule a une fonction immunorégulatrice, notamment, en favorisant la mort immunologique des cellules tumorales, qui au cours de ce processus libèrent des antigènes reconnus par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques pourront à leur tour stimuler le recrutement des LT-CD8 circulants vers le site de la tumeur (Asna et al., 2018). La radiothérapie, d'une part, permet la surexpression du récepteur PD-1 et de son ligand à la surface des cellules tumorales, en combinaison avec un traitement d'immunothérapie, cela engendre une potentialisation de l'inhibition de la voie cellulaire médiée par PD-1 et son ligand (Sharabi et al., 2015). La radiothérapie favorise la production de TGF β qui remplit une fonction immunosuppressive sur les LT-CD8 (Saito et al., 2000). Enfin, il a aussi été démontré que la radiothérapie favorise le recrutement des cellules présentatrices de l'antigène et des LT-CD8 au sein de la tumeur en modulant l'activité des cellules myéloïde et la production d'IFN de type 1 (Deng et al., 2014). Il a été démontré que la combinaison du traitement par radiothérapie et par immunothérapie stimule les effets antitumoraux qui modulent le microenvironnement tumoral en favorisant l'activité cytotoxique des LT-CD8 (Kang et al., 2003).

Des études portent sur la combinaison de la radiothérapie, de l'immunothérapie et de nanoparticules. Les nanoparticules développées par Nanobiotix permettent de potentialiser l'effet de rayonnements du traitement par radiothérapie. Ce protocole peut être combiné avec de l'immunothérapie et a déjà été validé chez des patients atteints de sarcome du cou, pour les 3 premières phases du processus d'essai clinique (Bonvalot et al., 2019). Sur des modèles murins irradiés, il a été démontré plusieurs utilisations et actions des nanoparticules dont :

- Le transport des si-RNA contre des gènes régulant la prolifération tumorale, dont *EGFR*,
- La délivrance des radionucléides,
- La délivrance d'adjuvants immunologiques qui potentialise le traitement d'immunothérapie,
- La délivrance de nanoparticules exprimant directement à leur surface PD-1 et OX40 spécifiquement dans la tumeur, ce qui stimule la réponse cytotoxique des LT-CD8 de façon locale (Hagan et al., 2020).

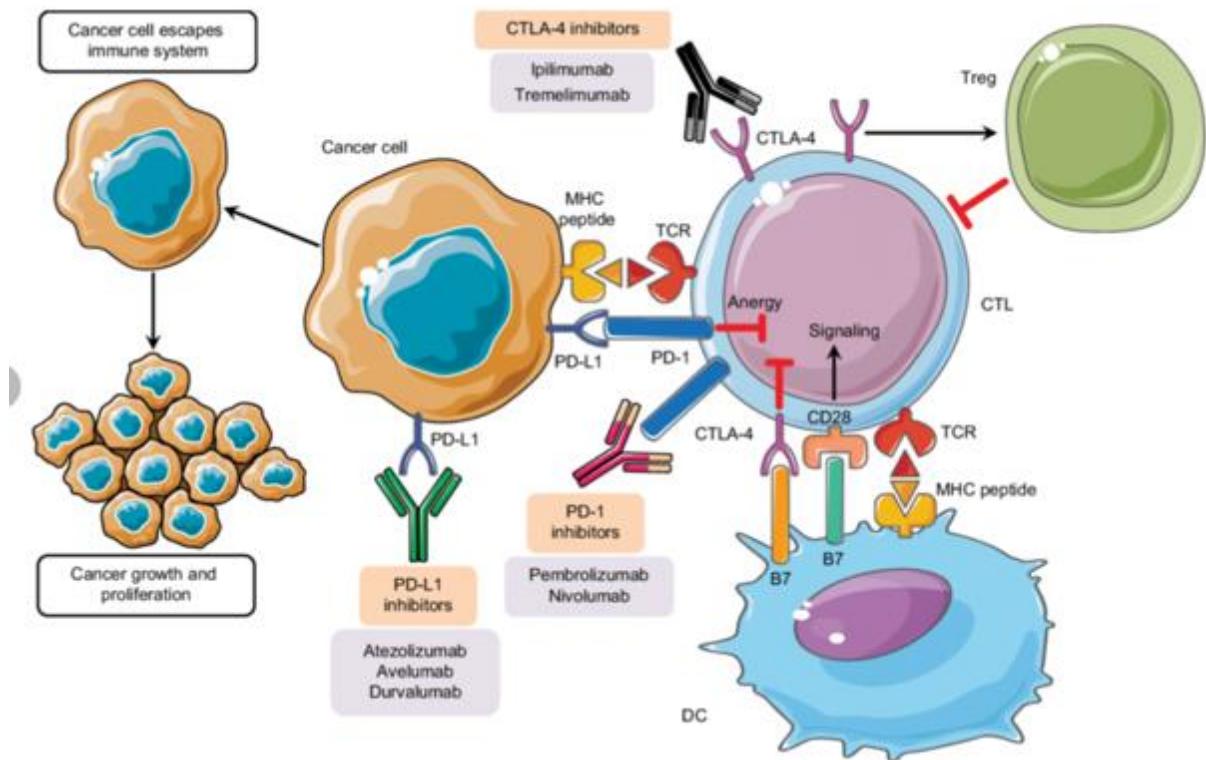


Figure 2 : Principales actions des inhibiteurs de points de contrôles immunologiques (PD1, PD-L1 et CTLA-4) sur les cellules du microenvironnement tumoral

Schéma résumant les fonctions des anticorps bloquant PD-1 (Programmed cell death 1), PDL-1 (Programmed death-ligand 1) et CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4) qui sont utilisés en immunothérapie. L'immunothérapie est un traitement qui vise l'élimination des cellules tumorales par le biais de la stimulation des cellules du système immunitaire, ici les lymphocytes-T-CD8 à activité cytotoxique. Les anticorps bloquant PD-1 (noms pharmacologique : pembrolizumab, Nivolumab) et PDL-1 (noms pharmacologique : Atezolizumab, Avelumab, Durvalumab) à la surface des lymphocytes-T-CD8 cytotoxiques permettent de bloquer l'interaction PD-1/PDL-1 (exprimé par les cellules tumorales) responsable de l'anergie des lymphocytes-T-CD8 cytotoxiques. L'anticorps bloquant CTLA-4 (noms pharmacologique : Ipilimumab), permet d'inhiber l'interaction entre CTLA-4 exprimé à la surface des lymphocytes-T-CD8 cytotoxiques et des Treg et avec les cellules dendritiques, qui inhibent l'activité des lymphocytes-T-CD8 cytotoxiques. L'inhibition des voies de signalisation qui favorisent l'anergie des lymphocytes-T-CD8 va potentialiser l'action ciblée de ces cellules adapté de (Ayoub et al., 2019).

d) Effets secondaires radiotoxiques

L'étude des effets secondaires du traitement par radiothérapie au début du XXe siècle a permis de décrire et classifier les effets des rayonnements ionisants sur la santé humaine. Les effets sur l'organisme sont classifiés en deux catégories : déterministes et stochastiques. Cliniquement, les effets radiotoxiques de la radiothérapie sont classifiés en fonction du moment de leur apparition, selon deux catégories : aigu (précoce) et tardif (chronique).

(1) Effets déterministes vs stochastiques

Les effets non-stochastiques sont décrits après l'exposition d'un tissu et apparaissent après une dose d'irradiation « seuil » de façon non-linéaire (**Figure 3**). Les effets sur la physiologie humaine varient en fonction de la durée d'exposition ([Little, 2003](#)). La valeur seuil dépend du type de tissu exposé, de la durée d'exposition et du type de rayonnement ionisant et correspond à la dose d'irradiation à laquelle se manifestent des symptômes cliniques ([Choudhary, 2018](#)). Les effets non-stochastiques sont caractérisés par une détérioration fonctionnelle d'un tissu ou organe qui a lieu immédiatement après l'exposition aux rayonnements ionisants. L'atteinte à la fonctionnalité du tissu exposé est induite par la mort cellulaire directe d'un groupe cellulaire issu de ce tissu. Le terme non-stochastique a été remplacé par « déterministes », car l'effet est déterminé par la dégradation d'un groupe cellulaire impliqué dans la fonction du tissu. La sévérité de cet effet dépend de la dose d'irradiation et peut être réversible. L'altération de la fonction d'un tissu peut engendrer des lésions secondaires sur d'autres tissus et favorise l'apparition de fibrose ([Commission internationale de protection contre les radiations et al., 2009](#)) ([CIPR commission, n.d.](#)). Les effets déterministes comprennent les effets secondaires de la radiothérapie aigus (précoces) et tardifs (chroniques) qui seront développés dans la partie suivante.

Les effets radio-induits stochastiques sont des événements aléatoires dont la probabilité d'apparition dépend de la dose d'irradiation. Ils sont mobilisables par le modèle linéaire sans seuil (**Figure 3**). Les effets stochastiques engendrent des symptômes cliniques chroniques observés à long terme. Ces effets ont pour origine une altération d'une seule ou d'un petit groupe de cellules. Il existe trois issues dans le cas où une cellule est exposée aux rayonnements ionisants : 1) La cellule utilise ses mécanismes de réparation de lésion à l'ADN ce qui lui permet de continuer son destin cellulaire normalement, 2) La cellule entre en mort cellulaire, 3) La cellule échappe au système de réparation ou réalise une réparation partielle des dommages. Une cellule qui progresse dans le cycle cellulaire avec des aberrations génétiques peut par exemple se diviser de manière incontrôlée, favorisant le processus tumoral qui fait partie des effets stochastiques ([Goodman, 2010](#)). Dans le contexte de la radiothérapie, l'effet stochastique principal est le cancer secondaire radio-induit.

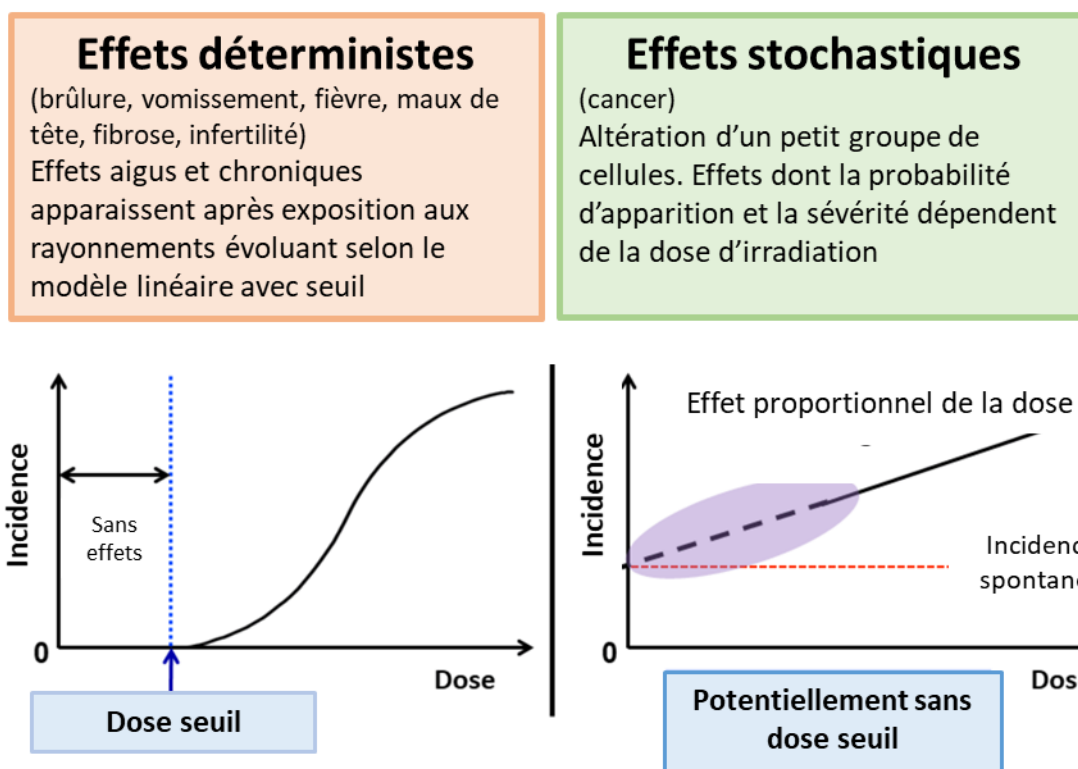


Figure 3 : Définition, exemple et modélisations des effets déterministes et stochastiques induits par les rayonnements ionisants

Définition et exemple d'effets induits par les rayonnements ionisants déterministes et stochastiques. Les effets déterministes sont modélisés par un modèle linéaire avec une dose d'irradiation seuil, en deçà de cette dose seuil, aucun effet ne se manifeste. Les effets déterministes se manifestent chez les individus après irradiation sous la forme d'effets cliniques, par exemple : brûlure, vomissement, fièvre, maux de tête, fibrose et de l'infertilité. Les effets stochastiques sont modélisés par un modèle linéaire sans seuil, ainsi la sévérité des effets biologiques et/ou cliniques sont proportionnels à la dose d'irradiation reçu. L'effet stochastique principal est le cancer radio-induit, adapté de ([Ministry of environment, n.d.](#)).

(2) Effets aigus (précoces) induits par la radiothérapie

Les technologies actuelles de radiothérapie limitent au maximum l'irradiation des tissus sains. Toutefois, le traitement par radiothérapie induit des effets secondaires chez les patients qui peuvent être classifiés en fonction de leurs apparitions. Les effets aigus ou précoces apparaissent entre 24 heures et les premières semaines après l'exposition aux rayonnements. Les effets tardifs ou chroniques se manifestent plusieurs mois après l'exposition aux rayonnements. Les effets secondaires aigus et tardifs dépendent de la zone irradiée et de la dose délivrée ([Chaturvedi and Jain, 2019](#)). Les effets aigus sont majoritairement observés pour des tissus ayant un fort pouvoir de renouvellement tels que la peau et les muqueuses ainsi que le système hématopoïétique. Les effets aigus sont résumés en fonction de la zone irradiée dans le **Tableau 1**. Les complications des effets aigus peuvent être responsables du développement d'effets tardifs tel que la fibrose.

(3) Effets tardifs (chroniques) induits par la radiothérapie

Les effets chroniques peuvent se manifester plusieurs mois ou années après l'exposition. Ces manifestations peuvent créer des pathologies irréversibles chez le patient nécessitant une longue prise en charge médicale, c'est le cas pour la fibrose, les cancers secondaires radio-induits et l'infertilité (Choudhary, 2018). Les principaux effets tardifs sont résumés dans le **Tableau 1**. Le risque de cancer radio induit est de 0,2 à 1%. Les cancers hématologiques principalement des leucémies se développent dans les 3 premières années après l'exposition. Les cancers solides surviennent en moyenne 10 ans après la première exposition (Hoskin, 2002). Le cancer primaire de type Hodgkinien traité par radiothérapie est corrélé au développement de cancers secondaires au niveau du sein, du poumon, de la thyroïde et de l'estomac. Le cancer primaire du sein est corrélé au développement de cancers secondaires au poumon, du sein opposé et de leucémie. Le cancer primaire du testicule est corrélé au développement de cancers secondaires des tissus mous, sur la zone pelvienne, des os, ainsi qu'au développement de leucémie et de lymphome. Le cancer primaire de l'utérus est associé au développement de cancer secondaire au niveau du rectum, au développement de leucémie et de sarcome. Enfin, les cancers pédiatriques primaires sont corrélés au développement de cancer secondaire au niveau de la thyroïde, du sein, de leucémie et de sarcome (Majeed and Gupta, 2021).

Tissus organes présents dans la zone irradiée	Effets secondaires aigus	Effets secondaires tardifs	Conséquences sur la qualité de vie
Peau et muqueuse	Érythème Inflammation Desquamation Sécheresse Humidité Nécrose Épidermite	Alopécie Télangiectasie Fibrose Trouble de la pigmentation Radiodermite chronique	Changement de perception de goût Difficulté à déglutir et avaler
Glande salivaire	Gonflement Sensibilité Xérostomie Carie dentaire Réduction production de salive Ostéonécrose		Difficulté à parler Difficulté à manger
Système nerveux	Fatigue Perte appétit Nausée, Vomissement Maux de tête Encéphalopathie (rare) Œdème Convulsion	Fatigue persistante Effet neurocognitif Maladie cérébrovasculaire Dysfonctionnement neuro-endocrinien Cancer secondaire Encéphalite Myélite	Défaut sensoriel Paraplégie
Moelle épinière	Syndrome de Lhermitte (myélopathie)	Hémorragie Télangiectasie Syndrome des motoneurones	Défaut sensoriel Paraplégie

Poumon	Encombrement des voies respiratoires Toux Dyspnée Fièvre Pneumonie bilatérale Douleur thoracique Souffrance cardiaque	Inflammation complication de la pneumonie	Toux chronique Essoufflement Inconfort respiratoire
Cœur	Péricardite Épanchement péricardite Dysfonction vasculaire	Fibrose du myocarde Cardiopathie Sténose artères coronaires	
Système gastro-intestinal	Anorexie Nausée-vomissement Crampe abdominale Diarrhée Augmentation sécrétion de mucus Rectite Dysphagie	Diarrhée chronique Défaut d'absorption Obstruction de l'iléus Télangiectasie des muqueuses Ulcération, formation de fistule Fibrose Atrophie	Inconfort digestif Incontinence
Système urinaire	Hématurie Dysurie Incontinence Dysfonctionnement de la vessie Nécrose de la vessie	Dysfonction du « détrusor » Ulcération des muqueuses Formation de fistule	Inconfort urinaire
Gonades	Insuffisance ovarienne Azoospermie temporaire Impotence	Stérilité permanente	Difficulté à concevoir des enfants
Utérus et vagin	Érythème Ulcération Prédisposition aux infections	Formation de Fistule Sténose vaginale Vaginisme	
Œil	Kératite Conjonctivite Cataracte		Troubles visuels
Squelette		Retard croissance (enfant) Fragilité os Arthropathie Ostéosclérose Ostéite Ostéonécrose	

Tableau 1 : Résumé des effets radiotoxiques qui se manifestent chez les patients après un traitement par radiothérapie

Principaux effets radiotoxiques (secondaires) aigus (précoces) et tardifs (chroniques) qui se manifestent chez les patients atteints de cancers traités par radiothérapie. Les effets radiotoxiques présents chez les patients dépendent de la zone irradiée et de la dose d'irradiation. Ainsi, ce tableau répertorie les effets aigus et tardifs radiotoxiques pour différentes zones irradiées : peau et muqueuse, glande salivaire, système nerveux, moelle épinière, poumon, cœur, système gastro-intestinal, système urinaire, gonades, utérus, œil et le squelette. La dernière colonne du tableau référence les principales conséquences des effets radiotoxiques sur la qualité de vie des patients, adapté de (Majeed and Gupta, 2021) (Barazzuol et al., 2020) (Dillensege et al., 2021).

(4) La lymphopénie

La lymphopénie est définie comme la baisse du nombre de lymphocytes circulants (inférieur à 1500/mm³) et peut être induite par les rayonnements ionisants et donc par le traitement de radiothérapie. Une approche récente pour évaluer la radiosensibilité individuelle dans un contexte clinique s'intéresse à la lymphopénie. La lymphopénie est variable en fonction du type de lymphocytes et en fonction du type de cancer. Des cinétiques différentes de lymphopénie sont rapportées parmi les sous-populations de lymphocytes lors de la radiothérapie et varient en fonction de l'âge des patients, de la localisation de l'irradiation, de la dose et du fractionnement. Cinq semaines après radiothérapie, la perte de LT-CD4 est de 27 % chez des patients ayant un cancer de type carcinome du cou et de la tête, 17 % chez les patientes ayant un cancer de type carcinome utérin et 86 % chez les patients atteints de tumeur du système nerveux. Chez les patientes atteintes de carcinome utérin, le nombre de LT-CD4 tend à redevenir normal dès 24 mois après la radiothérapie, mais pas chez les patients ayant un carcinome du cou et de la tête (Verastegui et al., 2003). Belka et al démontrent que la lymphopénie des LT-CD4 est plus durable que celle des LT-CD8 et des LB (Belka et al., 1999). Le volume d'irradiation et le fractionnement sont corrélés au taux et à la profondeur de la lymphopénie. La lymphopénie des LT-CD4 est induite par la répétition de dose fractionnée. Des traitements à dose totale élevée (> 65 Gy), mais à fractionnement faible dans un temps court (< 25 jours), induisent des lymphopénies moins importantes que des traitements à dose totale plus faible, mais très fractionnée et plus étendue (entre 25 et 45 jours) (Terrones-Campos et al., 2019). La localisation de la zone irradiée est corrélée au développement de la lymphopénie, celle-ci est plus importante lorsque la zone irradiée est proche d'organes lymphoïdes (thymus, ganglions, rate). Ainsi, la lymphopénie, à savoir la perte du nombre de lymphocytes est présente chez 80 % des patients atteints de cancer ORL, ayant été irradiés au niveau du cou (Lin et al., 2018). La lymphopénie radio-induite est associée à un faible pronostic de survie chez les patients traités par radiothérapie pour des cancers de types : glioblastomes, cancers ORL, cancers broncho-pulmonaires, cancers du pancréas et de cancers de l'œsophage (Venkatesulu et al., 2018). L'ensemble de ces études permet l'émergence de nouveaux protocoles de radiothérapie qui prennent en compte la perte du nombre de lymphocytes et donc la radiosensibilité individuelle.

La caractérisation des effets radiotoxiques a été propice à l'ouverture des champs de recherche clinique et fondamentale sur la compréhension et la prédiction des effets secondaires de la radiothérapie. De plus, les effets radiotoxiques induits par la radiothérapie peuvent se manifester différemment en fonction des individus. Ce constat est à la base des questionnements de prédictions de la sensibilité au traitement de radiothérapie et plus largement aux rayonnements ionisants. Cette thématique est abordée dans le chapitre 2 de cette introduction. Outre les symptômes cliniques, la radiothérapie et plus généralement les rayonnements ionisants induisent des dommages à échelle

tissulaire, cellulaire et moléculaire. La suite de ce premier chapitre analyse plus précisément des perturbations induites par les rayonnements ionisants au niveau du cycle cellulaire, et des morts cellulaires. Notamment, car l'impact de l'irradiation sur le cycle cellulaire et la mort cellulaire des lymphocytes-T-CD4 sont au cœur de ce projet de thèse.

3. Dérégulations du cycle cellulaire, sénescence et morts cellulaires induites par les rayonnements ionisants

La radiobiologie est une science récente (XXe siècle) qui étudie les effets des rayonnements ionisants sur la physiologie d'un organisme et sur le système biologique. Dans cette partie seront détaillés les dysfonctionnements du cycle cellulaire et les morts cellulaires induits par les rayonnements ionisants.

a) Dérégulations du cycle cellulaire induites par les rayonnements ionisants

Le cycle cellulaire est le processus permettant la formation à partir d'une cellule mère, de deux cellules filles partageant le même matériel génétique. Ce processus cellulaire comprend 4 étapes durant lesquelles s'effectuent la réplication du génome et la division par mitose. La phase G1 est une phase de croissance et de préparation du matériel de l'ADN pour la phase suivante de duplication. La cellule en G1 peut aussi changer de destin cellulaire pour entrer en phase de quiescence G0. La phase S est la phase de réplication du génome, elle sera suivie d'une phase G2 durant laquelle la cellule révise l'intégrité de son génome avant la phase de mitose (M). La phase M est elle-même subdivisée en 5 étapes : prophase, métaphase, anaphase, télophase et cytodierèse. L'homéostasie cellulaire repose sur le bon déroulement du cycle cellulaire. Ainsi ces étapes sont régulées par des complexes protéiques conservés de la levure à l'homme : les complexes kinase-dépendant-cycline (CDK) et cyclines, de leurs activateurs, de leurs inhibiteurs et de modifications post-traductionnelles. Les étapes de régulations du cycle sont appelées points de contrôles ou « checkpoint » et sont au nombre de 6. Les deux points de contrôles principaux sont réalisés lors de la transition G1/S régulée par CDK4-6-2/Cycline D-E et de la transition G2/M régulée par CDK1/Cycline-B. Ces points de contrôles sont caractérisés par une cascade de signalisations permettant d'accéder à l'étape du cycle suivante (Favaudon, 2000).

Les rayonnements ionisants, induisant des dommages à l'ADN radio-induit, principalement des cassures double brin qui perturbent la signalisation des points de contrôles et sont responsables d'arrêts du cycle cellulaire. Les dommages à l'ADN sont responsables d'un arrêt en phase G1 afin d'empêcher les cellules de dupliquer l'ADN contenant des erreurs. Les anomalies chromosomiques et les cassures à l'ADN sont responsables d'un arrêt en phase G2. La kinase ATM, protéine clé dans la reconnaissance des cassures double brin, permet l'initiation de la signalisation du point de contrôle en phase G1 et en phase G2. ATM fait partie de la famille des PIKKs, se caractérisant par la présence d'un

domaine PI3K (Pawlik and Keyomarsi, 2004) (Samuel et al., 2002). Le mécanisme d'activation par phosphorylation de ATM par l'irradiation est peu connu. La signalisation médiée par ATM aboutissant à l'arrêt du cycle en phase G1 est détaillée dans la **Figure 4a**. En phase G1, une seconde signalisation dépendante de ATM est induite par l'irradiation, elle n'implique pas de transcription de gènes et se met en place plus rapidement. Ces signalisations aboutissent à l'inhibition de la formation des complexes CDK4/6-CyclineD et CDK2-CyclineE, et sont schématisées en **Figure 4a** (Bartek and Lukas, 2001). Deux signalisations induites par les rayonnements ionisants dépendant de ATM et p53, sont responsable de l'arrêt en phase G2 du cycle (Pawlik and Keyomarsi, 2004) (Samuel et al., 2002). Ces signalisations aboutissent à l'inhibition de la formation du complexe CDK1/CyclineB et à l'inhibition du facteur Rb qui est un activateur transcriptionnel Rb, et sont détaillées en **Figure 4b**.

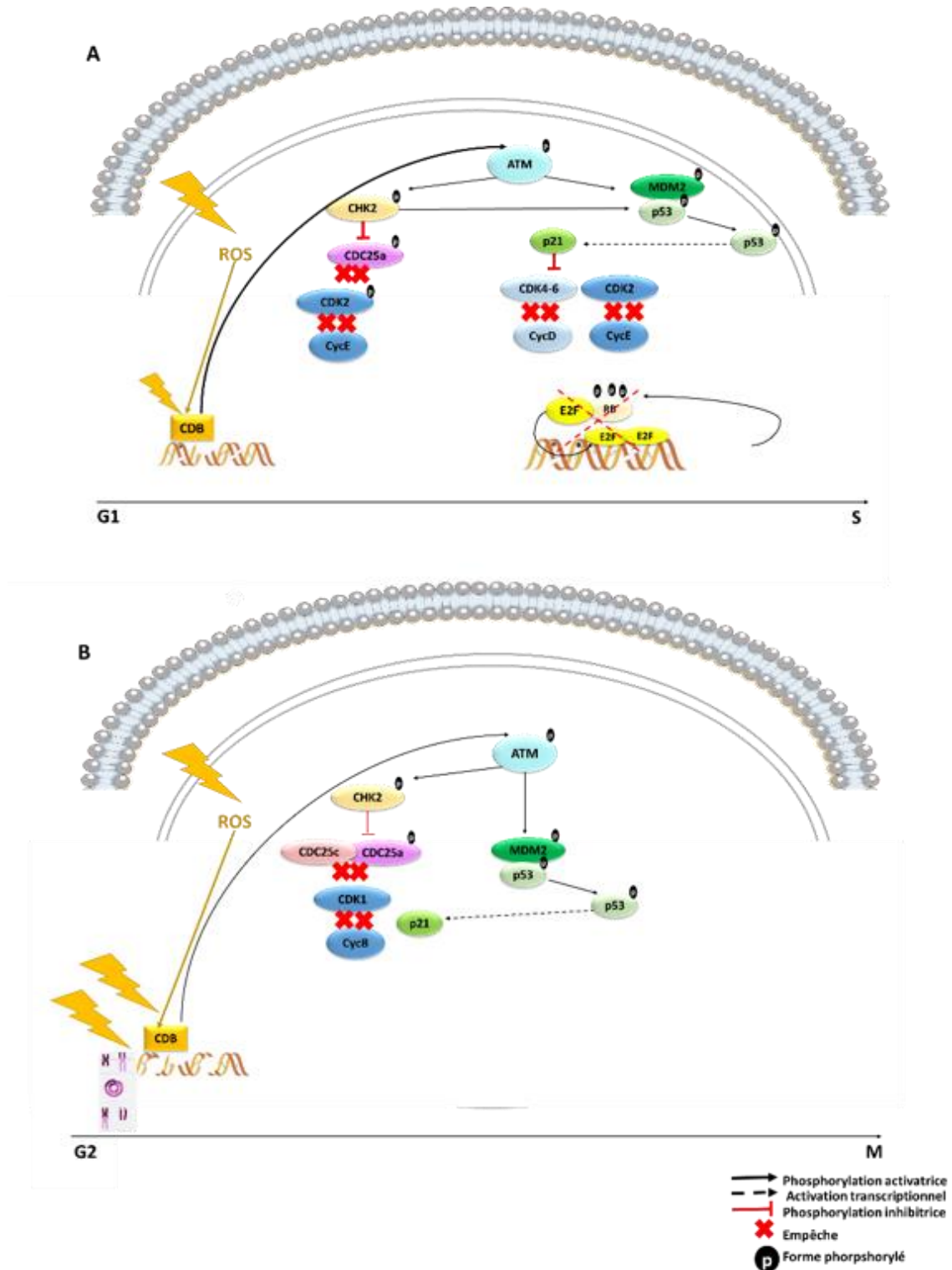


Figure 4a et 4b : Principales signalisations cellulaires à l'origine des arrêts du cycle cellulaire lors des points de contrôle G1/S et G2/M, induites par les rayonnements ionisants

Schéma des signalisations cellulaires principales à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire induit par les cassures ADN doubles brins (CDB), qui surviennent lors de la transition G1/S (a) et G2/M (b). Les deux signalisations à l'origine des arrêts en G1/S et en G2/M sont dépendantes de la kinase ATM, dont l'activation est médiée par les cassures ADN doubles brins induites par les rayonnements ionisants. Les arrêts cellulaires lors des transitions G1/S et G2/M sont initiés par la reconnaissance/réparation des

cassures ADN doubles brins et par l'élévation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont à l'origine de l'activation de la kinase ATM par phosphorylation. L'activation de la kinase ATM aboutit à l'arrêt en G1/S par deux voies, la première est médiée par l'activation de la kinase CHK2 et la seconde par l'activation de MDM2. En phase G1, les deux voies aboutissent à l'inhibition de la formation des complexes CDK2/CyclineE et CDK4-6/CyclineD. En phase G2, les deux voies aboutissent à l'inhibition de la formation du complexe CDK1/CyclineB, adapté de (Suzuki et al., 2011).

L'arrêt du cycle cellulaire laisse le temps aux cellules de réparer les cassures simple et double brin. La reprise du cycle dépend du nombre seuil de cassures persistant dans la cellule. Des études démontrent que ce seuil est entre 10 et 20 cassures par cellule. Ces cellules, progressant en mitose avec des anomalies, accumuleront des dommages cytogénétiques importants tels que les cassures chromosomiques. Ces cassures sont à l'origine de pertes de matériel génétique, d'arrêts du cycle cellulaire permanent et de la mort cellulaire (Deckbar et al., 2011).

La mort cellulaire se définit par un arrêt répliatif et un arrêt définitif des fonctions métaboliques de la cellule menant à sa dégradation. Il existe différents types de morts radio-induites qui sont très bien caractérisés dans la littérature et seront passés en revue dans les parties suivantes. Les morts cellulaires sont caractérisées selon plusieurs critères : modification de la morphologie cellulaire, le fonctionnement de la mort et la signalisation de la mort.

b) Sénescence induite par les rayonnements ionisants

La sénescence, est l'arrêt permanent et irréversible du cycle cellulaire. Les cellules sénescents sont sans activité de répliation et ne prolifèrent plus, mais sont métaboliquement actives. Les cellules sénescents, morphologiquement, sont grandes et étalées et peuvent contenir plusieurs noyaux (polynuclées). Étant métaboliquement actives, elles ont une forte croissance en taille et en masse cellulaire. Cette croissance est contrôlée par la dégradation des composants cellulaires par les enzymes lysosomales (Hernandez-Segura et al., 2018).

Deux types de sénescence sont décrites dans la littérature. Initialement, c'est la sénescence répliatif associée à un raccourcissement des télomères qui a été décrite. Un stress cellulaire (stress oxydatif, dommages ADN, agent chimique, agent oncogène) est à l'origine d'une sénescence prématurée (précoce). Le stress oxydatif induit par les rayonnements ionisants induit une sénescence prématurée. La sénescence prématurée est régulée par deux signalisations médiées par les protéines p53 et p16 en début de phase G1 (Sia et al., 2020). La signalisation cellulaire spécifique de la sénescence permet de caractériser les cellules sénescents par un pattern spécifique d'expression de gènes, de protéines et de facteurs de sécrétions. Les cellules sénescents sont caractérisées par une activité importante de l'enzyme SA-βgalactosidase (SA-β-gal), une expression protéique importante de la Cycline D1 et des inhibiteurs de CDK : p16 et p21, ainsi que d'une perte de l'expression nucléaire de la protéine LamineB1 perturbant l'intégrité de l'enveloppe nucléaire. La porosité nucléaire permet la translocation de

fragment d'hétérochromatine dans le cytoplasme. Les cellules sénescentes secrètent des facteurs spécifiques du phénotype sécrétoire associés à la sénescence (SASP) qui sont des : cytokines (IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13), chimiokines (CCL2, CXCL1/CXCL2), facteurs de croissance et des métalloprotéases (MMP) (Orjalo et al., 2009) (Li et al., 2018). Ces caractéristiques sont utilisées en biologie afin d'identifier les cellules sénescentes. Dans un contexte d'irradiation, ce sont les dommages à l'ADN qui initient la signalisation de la sénescence aboutissant à l'activation du SASP, celle-ci est résumée en **Figure 5**. La signalisation dépend d'une part, de l'activation du facteur NF-KB par p53, qui stimule la transcription des facteurs du SASP ; et d'autre part de l'inhibition du complexe CDK4-6/CyclineD par p16 et p21 qui régule le point de contrôle du cycle cellulaire G1/S. Des études récentes démontrent l'induction du processus de sénescence en phase G2 du cycle. La signalisation est alors médiée par la protéine p21 et de la kinase ATM (Muthna et al., 2010) (Correia-Melo et al., 2016).

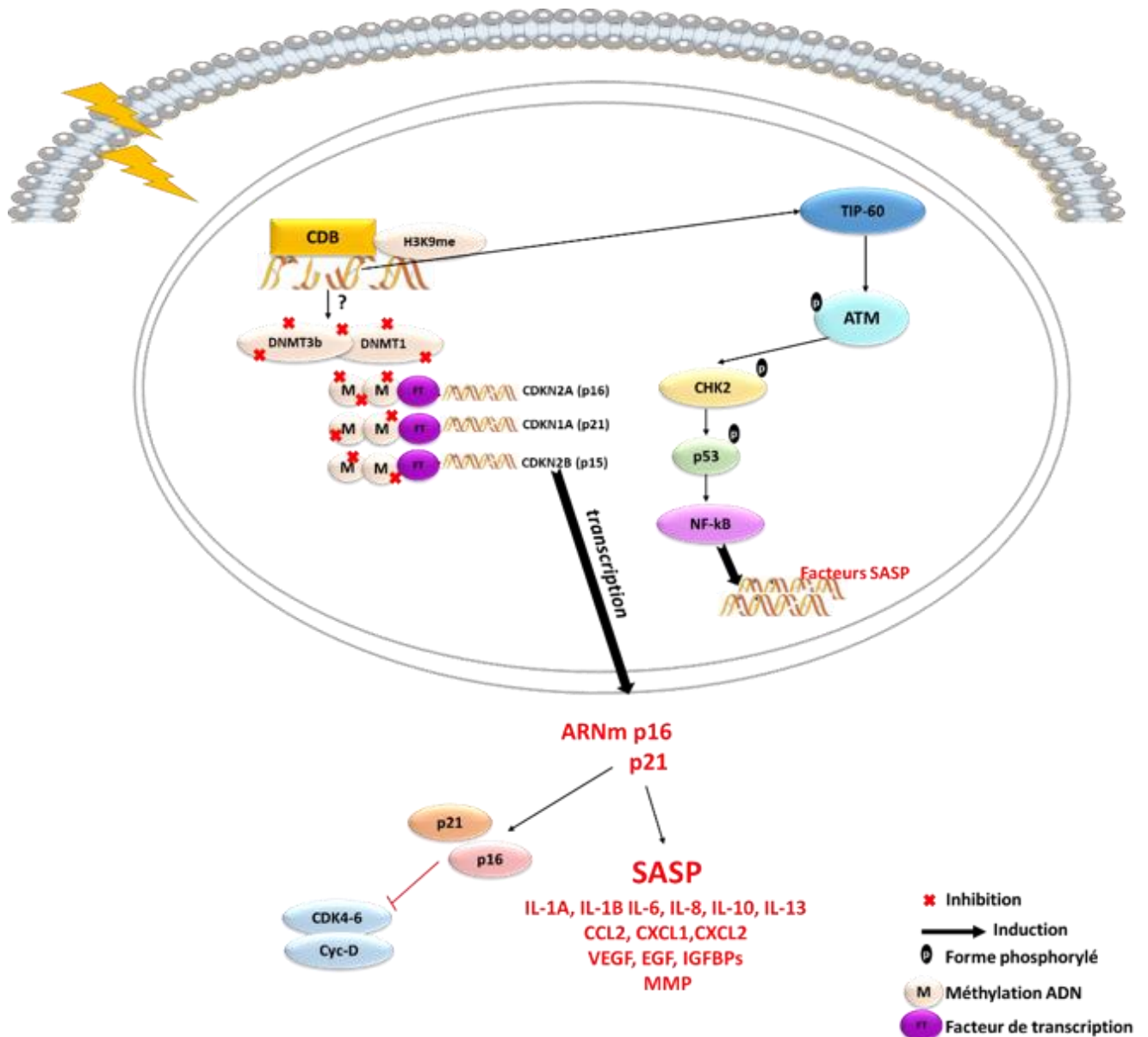


Figure 5 : Principales signalisations cellulaires induites par les rayonnements ionisants aboutissant à la sénescence

Schéma des principales signalisations cellulaires initiée par les cassures ADN double brin (CDB) induite par les rayonnements ionisants aboutissant à la sénescence cellulaire. Deux voies principales induisent la sénescence. La première dépend de l'inhibition de l'activité de méthyltransférases (enzyme qui méthyle l'ADN : DNMT1 et DNMT3b) sur les promoteurs de trois gènes clés : CDKN2A (p16), CDKN1A(p21) et CDKN2B (p15). La déméthylation des promoteurs permet la transcription des gènes p16, p21 et p15 en ARNm. C'est principalement les ARNm p16 et p21 qui activent le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). D'autre part, les protéine p16 et p21 vont inhiber la formation du complexe CDK4-6/CyclineD en phase G1 du cycle cellulaire, ce qui aboutit à un arrêt cellulaire permanent. La seconde signalisation dépend de l'activation de la kinase ATM par phosphorylation, celle-ci active des facteurs (CHK2, p53, NF-kB) qui stimulent la transcription des facteurs du SASP. Les facteurs du SASP sont les interleukines : IL-1A-B, IL-6, IL-8, IL-10 et IL-13, les chimiokines : CCL2, CXCL12 et CXCL13, ainsi que le VEGF, EGF, IGFBP et les métalloprotéases (MMP), adapté de (Li et al., 2018).

c) Catastrophe mitotique induite par les rayonnements ionisants

La mort cellulaire par catastrophe mitotique provient de l'incapacité des cellules à terminer la phase de mitose du cycle cellulaire. Elle a d'abord été décrite comme catastrophe microtubulaire, qui résulte d'une dérégulation des microtubules en phase de mitose ; le terme catastrophe mitotique a été fixé à la fin des années 1980. À ce jour, la définition et la caractérisation de ce type de mort sont encore controversées. La catastrophe mitotique fait suite à un dysfonctionnement dans la régulation des points de contrôles du cycle cellulaire, plus particulièrement les points de contrôle de la transition G2/M. Les cellules vont passer ces points de contrôles alors qu'elles contiennent des anomalies génétiques, dont des dommages à l'ADN et des aberrations chromosomiques. Cela est responsable d'une entrée prématurée des cellules en phase de mitose, déclenchant la mort par catastrophe mitotique. Ce type de mort peut être induite après plusieurs cycles cellulaires défectueux, responsables de l'accumulation d'anomalies génétiques. La mort mitotique est caractérisée par des modifications morphologiques, dont la micronucléation et la multinucléation. Au niveau cellulaire, la mort mitotique est associée à un défaut de réplication de l'ADN et une condensation chromosomique prématurée (Sia et al., 2020).

Le processus de signalisation aboutissant à ce type de mort est peu compris, alors qu'il s'agit du type de mort cellulaire principalement activée suite à une exposition aux rayonnements ionisants (Sia et al., 2020). Les anomalies de points de contrôles et mitotiques, notamment d'assemblage du fuseau, de ségrégation de chromosome, d'attachement des chromosomes au kinétochore et de cytokinèse sont corrélées à l'induction de la mort mitotique (Wonsey and Follettie, 2005) (Zhen et al., 2007). La qualification de mort cellulaire pour la catastrophe mitotique est discutée. Notamment, l'article de *Vikifahmetoglu et al* met en lumière des arguments démontrant que la catastrophe mitotique précéderait une mort par nécrose ou par apoptose. Les arguments cités par l'étude sont la perméabilité des membranes et la fragmentation chromosomique décrites aussi dans le processus d'apoptose. De la même manière, la signalisation médiée par p53 et caspases sont communes aux voies de catastrophe mitotique et de la mort par apoptose (Vakifahmetoglu et al., 2008).

d) Apoptose induite par les rayonnements ionisants

L'apoptose est une mort cellulaire programmée et physiologique. Elle intervient dans la régulation cellulaire lors du développement, mais aussi lors de nombreux processus cellulaires. L'apoptose a été décrite en 1972 par *Kerr et al* et se caractérise de façon très spécifique. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par (Kerr et al., 1972) :

- Une forme sphérique due au phénomène de rétraction des pseudopodes accompagnée d'une baisse du volume cellulaire.

- La conservation de l'intégrité des membranes
- Un bourgeonnement (blebbing) de la membrane plasmique et une relocalisation des organites
- Au niveau nucléaire, l'enveloppe et le noyau se fragmentent et la chromatine se condense.
- Le processus progressant se forment des corps apoptotiques dont l'élimination est toujours réalisée par phagocytose. Ainsi, le contenu intracellulaire n'est pas déversé dans l'environnement cellulaire et protège les cellules avoisinantes.

(1) Signalisation intrinsèque (mitochondriale)

La littérature scientifique répertorie trois voies de signalisations qui sont à l'origine de l'apoptose : la voie intrinsèque, la voie extrinsèque et la voie des céramides. Ces 3 voies de signalisations peuvent être induites par les rayonnements ionisants par l'intermédiaire des dommages à l'ADN et/ou des produits du stress oxydatif. La voie intrinsèque est initiée en réponse au dommage à l'ADN, elle dépend de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale et des protéines mitochondriales de la famille des BCL-2. La voie mitochondriale aboutit au relargage du cytochrome-C de la mitochondrie vers le cytoplasme permettant l'activation par de la cascade de signalisation des caspases. Les caspases sont des protéines exprimées sous forme inactive et sont activées par clivage, sous forme active, elles ont une activité protéolytique et dégradent plusieurs substrats cellulaires (Eriksson and Stigbrand, 2010). La reconnaissance d'un dommage à l'ADN va activer dans le noyau la kinase ATM par phosphorylation, qui à son tour active la protéine p53 par phosphorylation. La protéine p53, active à son tour la transcription de trois gènes pro-apoptotiques de la famille des BCL-2 : *PUMA*, *BAX* et *NOXA*. La protéine PUMA subit une translocation vers le cytoplasme pour empêcher la formation du complexe entre BCL-XL (anti-apoptotique) et p53, rendant la protéine p53 cytoplasmique libre. La protéine p53 empêche la formation du complexe entre BCL-2 (anti-apoptotique) et BAX (pré-apoptotique), rendant la protéine BAX libre. La protéine BAX induit la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie. La mitochondrie relargue des molécules de cytochrome-C, qui se lie avec les protéines APAF1 et la forme active de la caspase9, pour former l'apoptosome correspondant à l'oligomérisation de 7 liaisons APAF1/pro-caspase9. La caspase9 activée active à son tour les pro-caspase3 et pro-caspase7 par un processus de clivage. Plus tardivement au cours du processus, les protéines CAD, AIF et l'endonucléase G sont relarguées de la mitochondrie et induisent la fragmentation de l'ADN (Elmore, 2007) (Figure 6).

(2) Signalisation extrinsèque

La voie extrinsèque est indépendante de l'activité mitochondriale. La signalisation extrinsèque émane de la liaison du ligand de la famille du TNF aux récepteurs de mort cellulaire. Cette signalisation permet l'activation de la pro-caspase 8. Les deux voies intrinsèque et extrinsèque convergent vers l'activation

des pro-caspase3 et pro-caspase7 (Sia et al., 2020). Les rayonnements ionisants induisent des dommages à l'ADN dont le processus de reconnaissance induit l'activation d'ATM et de p53 par ATM. La protéine p53 activée induit la transactivation au niveau de la membrane des récepteurs de morts cellulaires CD95 (FAS-R), TNFR1 et DR5 (TNFSF10B) et de leurs ligands, dont CD95L (CD178), TNF α et (TRAIL)(TNFSF10). L'interaction ligand récepteur induit la trimérisation du récepteur et le regroupement (clustering) des domaines DD intracellulaire du récepteur. Les domaines DD des récepteurs recrutent la protéine adaptatrice FADD. La protéine FADD change de conformation et expose son domaine de mort cellulaire (DED) qui permet le recrutement et l'interaction avec la caspase8 activée pour former le complexe DISC. Le complexe DISC permet l'activation de la pro-caspase 3 et pro-caspase7 (Maier et al., 2016). La voie d'apoptose extrinsèque via les récepteurs de morts cellulaires peut activer la signalisation intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose. En effet, la caspase8 activée est capable de cliver la protéine BID, ce qui favorise la déphosphorylation de la protéine cytosolique BAD. Sous forme déphosphorylée BAD transloque vers la mitochondrie et stimule le relargage du cytochrome-C entraînant la signalisation de caspase de la voie apoptotique intrinsèque (Zha et al., 1996) (Figure 6).

(3) Signalisation des céramides

La voie des céramides est indépendante de la signalisation de cassure induite par ATM et p53. Les ROS induits par les rayonnements ionisants induisent une oxydation des lipides de la membrane plasmique, ce qui active la sphingomyélinase, qui hydrolyse la sphingomyéline au niveau de la membrane et relargue un facteur secondaire : les céramides. Les céramides activent les voies de signalisation RAC1/MEKK/JNK qui activent les pro-caspases1/3/6 (Kolesnick and Fuks, 2003) (Haimovitz-Friedman et al., n.d.). L'irradiation induit deux phases de production de céramides, la première survient immédiatement après l'irradiation et la seconde quelques heures suivant l'irradiation (Lin et al., 2000) (Vit and Rosselli, 2003). Les céramides sont capables de stimuler le relargage du cytochrome-C de la mitochondrie. Ainsi la voie apoptotique des céramides converge vers la voie apoptotique intrinsèque (Siskind et al., 2002) (Figure 6).

(4) Signalisation des caspases exécutives et élimination des cellules apoptotiques

Les caspases initiatrices des signalisations intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose : caspase9 et caspase8 ont pour cibles plusieurs composants cellulaires dont : les cytokératines, la protéine PARP, les protéines de la membrane plasmique et les protéines nucléaires (nuMA). Les caspases3 et caspase7 sont exécutives et terminales et sont communes à toutes les signalisations de l'apoptose. Les caspases terminales activent des endonucléases qui dégradent le contenu nucléaire (ADN, histone) et des protéases qui dégradent les protéines cellulaires. Ces enchaînements de dégradations des composants

cellulaires sont responsables des modifications morphologiques des cellules apoptotiques. La caspase3 par exemple active l'endonucléase CAD qui dégrade l'ADN chromosomique et induit une condensation des chromosomes (Sakahira et al., 1998). La caspase3 désorganise le cytosquelette, en clivant plusieurs protéines régulatrices des composants du cytosquelette dont la protéine GELSOLINE impliquée dans la polymérisation de l'actine favorisant la formation de corps apoptotiques (Kothakota et al., 1997).

(5) Externalisation des phosphatidylsérines et élimination par phagocytose

Le processus menant à l'asymétrie des phospholipides membranaires et à l'externalisation sur la membrane plasmique externe des phosphatidylsérines (PS) est mal compris. Il est associé à la perte de l'activité aminophospholipide translocase à la membrane et est régulé par les protéines FAS, la caspase8 et la caspase3. L'externalisation des PS permet la reconnaissance des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires pour la dernière étape du processus d'apoptose : l'élimination. La reconnaissance et l'élimination par les cellules phagocytaires se réalisent sans inflammation et n'affectent pas la viabilité des cellules de l'environnement. L'externalisation des PS est utilisée en routine en biologie afin d'identifier les cellules apoptotiques. La protéine annexineV reconnaît et interagit fortement et spécifiquement avec les PS à la surface des cellules. Ainsi, il est possible d'identifier par marquage, les cellules positives pour l'annexineV afin de quantifier l'apoptose par différentes techniques de biologie : cytométrie en flux, l'immunofluorescence, le western-blot. Cette méthode de quantification de l'apoptose ne permet pas de discriminer les 3 types de voies d'apoptose. Les cellules nécrotiques (un autre type de mort cellulaire qui sera développé en partie suivante) perdent l'intégrité de leur membrane (plasmique et nucléaire). Ainsi, elles sont aussi positives au marquage annexineV (Bossy-Wetzel and Green, 2000). Pour discriminer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques, il faut réaliser un marquage dirigé contre l'ADN, en utilisant par exemple un intercalant fluorescent de l'ADN tel que l'iodure de propidium (classiquement) ou le Hoechst 33258 (utilisé dans notre étude). La positivité pour le marquage de l'ADN reflétant alors la perméabilité de l'enveloppe cellulaire, présente uniquement dans les cellules nécrotiques (Crowley et al., 2016).

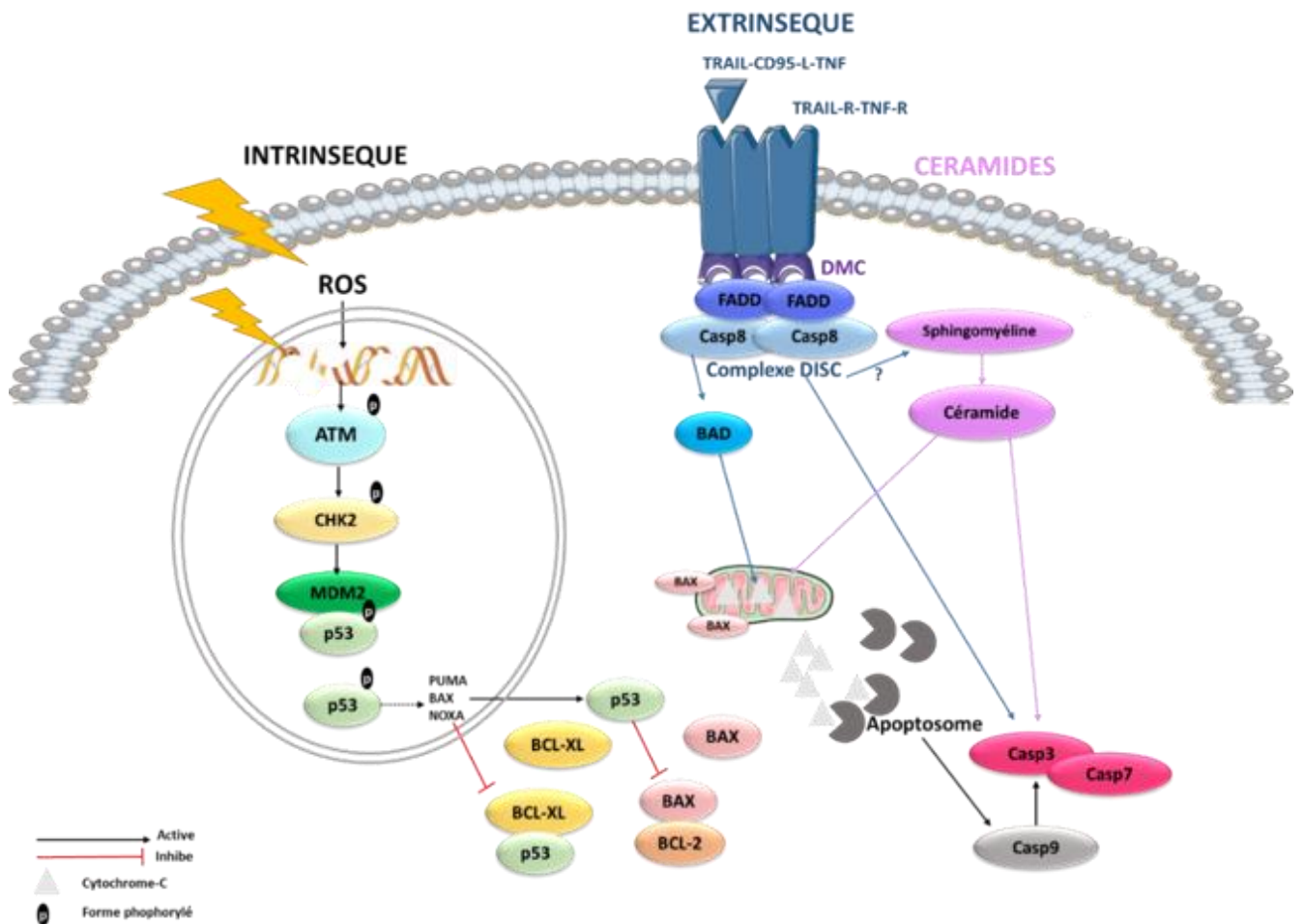


Figure 6 : Trois signalisations principales (intrinsèque, extrinsèque et céramides) induites par les rayonnements ionisants aboutissant à la mort cellulaire par apoptose

Schéma résumant les trois signalisations principales : intrinsèque ou mitochondriale, extrinsèque ou par récepteurs de mort cellulaires et céramides, aboutissant à la mort cellulaire par apoptose et à l'activation de la caspase (casp) exécutives (caspase3 et caspase7) induite par les rayonnements ionisants. La voie intrinsèque est dépendante des dommages à l'ADN et aboutit au relargage du cytochrome-C et à la formation de l'apoptosome qui permet l'activation des caspase3 et caspase7 par la pro-caspase9. La voie extrinsèque dépend des récepteurs de mort cellulaire et aboutit à la formation du complexe DISC (caspase9, FADD et domaine de mort cellulaire du trimère de récepteurs). Enfin les céramides sont produits suite à l'oxydation des lipides membranaires par la sphingomyélinase, les céramides stimulent le relargage du cytochrome-C de la mitochondrie et active les caspases terminales caspase3 et caspase7, adapté de (Rahmanian et al., 2016).

e) Nécrose induite par les rayonnements ionisants

La nécrose est une forme de mort non-programmée, elle se caractérise par un gain du volume cellulaire, la rupture de la membrane plasmique, la dilatation des organites et le déversement des composés cellulaires dans l'environnement cellulaire. Plusieurs revues démontrent que la nécrose est régulée par des voies de signalisation, renforçant l'idée qu'il ne s'agit pas d'une mort accidentelle. Les récepteurs de morts cellulaires TNFR1, CD95-R, DR5 (TNFRSF10B) et les récepteurs de la famille des Toll-like-receptor TLR3 et TLR4 régulent la nécrose. La nécrose régulée est aussi retrouvée dans la littérature sous le terme de « nécroptosis » (Golden et al., 2012). La nécrose est caractérisée par différentes altérations des fonctionnements cellulaires, mais la cause de l'induction de ces changements n'est pas résolue. Cette mort cellulaire induit des altérations mitochondriales en augmentant la perméabilité des membranes et la production de facteur du stress oxydant, dont les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS). La nécrose est associée à des altérations lysosomales et nucléaires, à la dégradation des lipides, et une augmentation de calcium qui active davantage de protéase. Il n'existe pas de consensus concernant les marqueurs permettant l'identification des cellules nécrotiques via des marqueurs biochimiques spécifiques (Kroemer et al., 2009).

f) Autophagie induite par les rayonnements ionisants

L'autophagie est un processus physiologique basé sur le processus d'auto-digestion de complexes protéiques et d'organites cellulaires. Ce processus est caractérisé par la présence de vacuoles cytoplasmiques visible en microscopie électronique. Les organites et protéines sont séquestrés dans des vésicules à double membrane appelée autophagosomes. Ces autophagosomes et leur contenu sont dégradés par les enzymes lysosomales. Ce processus est initialement induit dans les cellules déficitaires en énergie et assure donc la survie cellulaire dans des conditions défavorables ; mais est aussi induit face à différents stress dont les rayonnements ionisants. La signalisation induisant l'autophagie est initiée par l'activation par dimérisation des récepteurs EGFR et ERBB2. Ce dimère EGFR/ERBB2 stimule les voies de signalisations PI3K/AKT et MTOR qui enclenchent la formation de vésicules. Les gènes de la famille *ATG* sont à la base du processus de vacuolisation (Elmore, 2007). L'autophagie en réponse aux rayonnements ionisants est mieux décrite dans les cellules tumorales, notamment l'autophagie donne aux cellules tumorales des propriétés de radiorésistance (Maier et al., 2016).

Les rayonnements ionisants sont à la base du traitement de radiothérapie qui vise à éliminer ou à freiner la croissance des cellules tumorales, tout en limitant les effets radiotoxiques sur les tissus sains. Cependant, des effets surviennent chez les individus et se manifestent immédiatement après l'irradiation, il s'agit dans ce cas des effets aigus (précoces) et peuvent apparaître plusieurs mois après l'irradiation, il s'agit alors des effets tardifs (chroniques). Cliniquement, il s'est avéré que les effets induits par la radiothérapie pouvaient varier d'un individu à l'autre. Les rayonnements ionisants ont des effets à échelle cellulaire et induisent des arrêts au cours du cycle cellulaire qui peuvent se révéler permanents et enclencher le processus de sénescence. Les rayonnements ionisants induisent plusieurs types de morts cellulaires, dont la catastrophe mitotique, l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. Dans le but de caractériser les effets radiotoxiques du traitement de radiothérapie et plus largement les effets des rayonnements ionisants sur l'organisme humain ; un pan de la recherche a développé des tests mesurant la sensibilité aux rayonnements ionisants aussi appelée radiosensibilité. Certains de ces tests de radiosensibilité sont basés sur les effets biologiques des rayonnements ionisants, dont la mort cellulaire par apoptose. Ainsi, le second chapitre de l'introduction aborde les notions de radiosensibilité et de radiosensibilité individuelle et précise l'ensemble des principaux tests cellulaires et génétiques permettant de la mesurer.

II. Chapitre 2 : Radiosensibilité individuelle : tests cellulaires et génétiques permettant de la mesurer

1. Définir et évaluer la radiosensibilité individuelle par des tests cellulaires

a) Historique et définition de la notion de radiosensibilité individuelle

De la découverte des effets des rayonnements ionisants sur l'organisme humain et de l'application des rayonnements en thérapie a émané l'intérêt de trouver et définir une caractéristique biologique reflétant l'intensité des effets biologiques qui seront induits après une exposition aux rayonnements ionisants. Cette notion d'un paramètre qui prédit l'ensemble des effets des rayonnements, c'est la notion de sensibilité aux rayonnements ionisants aussi appelée radiosensibilité. La radiosensibilité peut être caractérisée à différentes échelles biologiques, à savoir sur un type cellulaire, tissu ou organe précis ; mais aussi à l'échelle d'un organisme entier. La radiosensibilité intrinsèque aux lymphocytes-T-CD4 est développée dans le prochain chapitre.

La radiosensibilité fait référence aux effets néfastes sur les tissus radio-induits après l'administration de fortes doses de rayonnement ionisant (principalement après une radiothérapie). Elle implique la mort de cellules non-cancéreuses. La radiosusceptibilité concerne les cancers induits par les rayonnements ou toute autre caractéristique stochastique antérieure. La cancérogenèse radio-induite peut être la conséquence la plus importante de l'exposition à de faibles doses de rayonnement (Gomolka et al., 2019) (Gomolka et al., 2020).

La sensibilité aux rayonnements à l'échelle d'un individu est appelée radiosensibilité individuelle. Historiquement, la caractérisation de ce paramètre a été réalisée selon une approche de test et de marqueur génétique unique (mono-test) (mono-marqueur). Puis, au fil des recherches dans le domaine de la radiobiologie, la caractérisation de la radiosensibilité a été réalisée par plusieurs type d'approches, notamment, de tests sur différents types cellulaires et de marqueurs génétiques multiples. Les premières applications des rayonnements dans les années 1900 dans les secteurs : médicaux et industriels, notamment sur la radiothérapie, ont mis en lumière que les rayonnements ont des effets différents d'un tissu à l'autre et différents d'un individu à l'autre (Granzotto et al., 2011). C'est principalement dans le contexte du traitement par radiothérapie qu'il existe plusieurs raisons poussant à la recherche d'un paramètre qui mesure la radiosensibilité :

- Évaluer la sensibilité des différents types de cellules cancéreuses aux rayonnements ionisants diffusés par la radiothérapie
- Le fait que, les effets secondaires radiotoxiques du traitement par radiothérapie qui peuvent varier d'un individu à l'autre

- Comprendre l'implication de la radiosensibilité dans les différences d'efficacité de réponse au traitement par radiothérapie

En France, l'accident de surirradiation d'Epinal sur des patients traités par radiothérapie est une démonstration des effets différentiels chez les individus. La même erreur dosimétrique a été réalisée chez tous les patients et a eu pour conséquence une variabilité dans les effets tissulaires observés. Les radiothérapeutes, radio-physiciens et radiobiologistes ont menés des travaux de recherche pour développer des tests biologiques qui évaluent la radiosensibilité individuelle et se sont posés les questions du choix du modèle d'irradiation : *in vivo*, *in vitro* et *ex vivo* et le choix du type de tissus pour développer ce test (Ash, 2007).

Ce sont principalement les effets aigus (précoces) et tardifs (chroniques) du traitement par radiothérapie qui permettent d'étudier les différences de radiosensibilité *in-vivo* chez l'Homme. Jusqu'à récemment, il n'y avait pas eu de classification fixe permettant de renseigner la sévérité des effets radiotoxiques. Aussi dans certaines études, les patients ont été classés par groupe ou par grade de sévérité mais, il n'y a pas de corrélation entre les groupes ou grades. Toutefois, dès 2018, le consortium de radiogénomique a officialisé et fixé une seule classification : la classification « Common Terminology Criteria for Adverse Events » (CTCAE). Elle est basée sur 6 niveaux (grades) de sévérité : (0) aucun effet ; (1) toxicité moyenne ; (2) toxicité modérée ; (3) toxicité sévère ; (4) toxicité dangereuse pour la vie du patient ; et (5) toxicité qui induit la mort du patient (Gomolka et al., 2019). Le grade 5 correspond à des réactions extrêmement rares qui sont dues à des catastrophes nucléaires, ou à des erreurs de dosimétrie.

Chez l'Homme, il est difficile d'avoir accès à l'ensemble des tissus pour analyse. Ainsi les praticiens ont étudié les cellules sanguines et les cellules de la peau accessibles en réalisant des prises de sang et des biopsies (Joubert et al., 2008). Pour refléter la radiosensibilité individuelle, les chercheurs ont étudiés des caractéristiques cellulaires radio-induite mesurées sur des cellules primaires ou des lignées irradiées *in vitro*. Les types cellulaires sélectionnés varient en fonction des études. Les effets radiotoxiques de la radiothérapie ou des caractéristiques cellulaires radio-induites sont associés à différents tests biologiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle. Le premier test de radiosensibilité a été développé par les équipes de recherche de Puck et Marcus, il s'agit d'un test *in vitro*, le test clonogénique, qui mesure la capacité à former des colonies vivantes suite à une irradiation. (Puck and Marcus, 1956). Au fil des années, les chercheurs ont évalué la radiosensibilité individuelle en développant une multitude d'autres tests qui seront détaillés dans cette partie. En outre, il n'existe pas actuellement d'unique caractéristiques cliniques ou cellulaires reflétant la radiosensibilité humaine et de test standard permettant de mesurer la radiosensibilité.

b) Test clonogénique sur des fibroblastes

Les chercheurs Marcus et Puck ont développé le premier test de radiosensibilité clonogénique sur des cellules tumorales. Le test clonogénique est basé sur le tracé de courbe de survie en fonction de la dose d'irradiation permettant la mesure de la fraction survivante (SF2) ou sur la dose correspondant à 37 % de survie (Dbar) (Fertil et al., 2012). Suite à cette découverte, Dechavanne et al publient en 1996 une association entre le test clonogénique réalisé sur des fibroblastes de biopsie de peau irradiés en culture à 2 Gy et la radiosensibilité de patients souffrant du syndrome génétique d'ataxie télangiectasie causé par une mutation sur le gène *ATM* (Deschavanne and Fertil, 1996). La corrélation entre la valeur de SF2 et la radiosensibilité individuelle a aussi été démontrée pour plusieurs syndromes génétiques dont le syndrome de Ligase IV et de Nijmegen (El-Nachef et al., 2021). Joubert et al réalisent un test clonogénique sur des fibroblastes primaires et démontrent qu'en fonction du résultat au test clonogénique (SF2) il est possible de classer les individus en trois groupes de sensibilités (Joubert et al., 2008) (Figure 7). La plus grande contrainte de ce test repose sur la nécessité de réaliser une biopsie de peau sur les patients et sur la durée de l'expérimentation qui est longue, car il faut au minimum plusieurs jours pour cultiver des fibroblastes primaires.

c) Quantification d'aberrations cytogénétiques dans les fibroblastes

Les techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) et de condensation prématurée des chromosomes (PCC) ont permis, dans les années 1990, d'étudier par microscopie les chromosomes lors des phases du cycle cellulaire. Ces techniques ont permis de quantifier les aberrations chromosomiques dans les fibroblastes, dont les micronoyaux, les chromosomes dicentriques et les translocations d'ADN. Le nombre de micronoyaux augmente après irradiation *in vitro* de fibroblastes, et est proposé comme test de radiosensibilité. De plus, ce test de radiosensibilité est corrélé significativement à la mesure SF2 obtenue par le test de radiosensibilité mesuré par la survie clonogénique (O'Driscoll et al., 1999). Toutefois, le test de quantification de micronoyaux n'a pas montré d'association avec des effets secondaires du traitement par radiothérapie chez des patients ayant un cancer du col de l'utérus, du cou et de la tête (Stonina and Gasińska, 1997). Une autre étude d'association entre le nombre de micronoyaux radio-induits aux effets secondaires précoces et tardifs induits par la radiothérapie démontre que le test de quantification de micronoyaux dans les fibroblastes est insuffisant et prédit les effets secondaires que de quelques individus (Nachtrab et al., 1998). Plus récemment en 2016, un axe d'étude du projet Copernic démontre que la quantification de micronoyaux dans des fibroblastes irradiés *in vitro* à 2 Gy sur une cohorte d'une centaine de patients permet de catégoriser la radiosensibilité individuelle en trois groupes : radiorésistance (groupe 1), radiosensibilité modérée (groupe 2) et hyper-radiosensibilité (groupe 3) (COPERNIC project investigators et al., 2016) (Figure 7). Enfin, des équipes scientifiques ont étudié d'autres aberrations

cytogénétiques. L'étude de *Virsik et al* et démontre que l'irradiation *in vitro* induit une augmentation des chromosomes dicentriques et des translocations dans les fibroblastes et lymphocytes humains et suggère la possibilité d'évaluer la radiosensibilité individuelle par la quantification de ce type d'aberrations chromosomiques. ([Virsik-Peuckert et al., 1997](#)).

d) Cassures ADN double-brin dans les fibroblastes

Les cassures ADN double brin sont analysées généralement par microscopie après immunomarquage de la forme phosphorylée de l'histone γ -H2AX. L'équipe de recherche française *Foray et al* a développé comme test de radiosensibilité individuelle, la quantification de la forme phosphorylée de l'histone γ -H2AX reflétant le nombre de cassures ADN double brin dans les fibroblastes après une irradiation *in vitro* à 2 Gy ([Foray et al., 1998](#)). Leurs études démontrent que la quantité de cassures non réparées dans des fibroblastes irradiés est proportionnelle à la sévérité des effets secondaires dus au traitement par radiothérapie et permet de classer la radiosensibilité des individus en plusieurs groupes. De la même manière que pour la quantification des micronoyaux radio-induits dans les fibroblastes, le projet international COPERNIC a étudié la corrélation entre le test de quantification des cassures ADN double brins par la quantification de la forme phosphorylée de l'histone γ -H2AX et les effets secondaires induits par la radiothérapie (**Figure 7**). Leurs résultats confirment l'association entre la quantification des cassures ADN double brin et la radiosensibilité individuelle des patients et permet de caractériser quatre groupes de radiosensibilités ([COPERNIC project investigators et al., 2016](#)). Les résultats du projet Copernic montrent une corrélation entre le test de radiosensibilité de quantification des cassures ADN double brin et le test de quantification des micronoyaux dans les fibroblastes irradiés ([COPERNIC project investigators et al., 2016](#)). Cependant, une étude démontre que le test de radiosensibilité de quantifications des cassures ADN double brin est inversement proportionnel à la mesure du SF2 obtenue au test de survie clonogénique ([Joubert et al., 2008](#)).

L'équipe française de recherche de *Viau et al* ont mesuré les cassures ADN double brin en quantifiant la forme phosphorylée de l'histone γ -H2AX par microscopie (comptage de foyers) et par cytométrie en flux dans des fibroblastes humains irradiés. La méthode par cytométrie en flux qui est plus pratique et plus précise que le comptage de foyers est proposée comme test de radiosensibilité individuelle. *Viau et al* démontrent que la mesure de l'intensité de γ -H2AX par cytométrie est corrélée avec la sévérité des effets secondaires induits par radiothérapie. Ainsi, à partir de ce test, ils proposent une courbe de triage qui permettrait de prédire et de classer les effets de la radiothérapie en trois groupes : non-affectés/asymptomatiques, patients ayant des effets secondaires modérés et patients ayant des effets secondaires graves nécessitant une hospitalisation ([Viau et al., 2015](#)) (**Figure 7**). Cette méthode

d'identification des cassures ADN double brin par marquage de γ -H2AX est controversée, car l'intensité de fluorescence totale ne permet pas d'analyser le nombre de foyers et leurs tailles par cellules.

e) Quantification de la translocation d'ATM phosphorylée dans les fibroblastes

L'équipe de *Foray et al* ayant initialement développé le test de radiosensibilité basé sur la quantification de cassures ADN double brins dans les fibroblastes primaires, a développé un second test de radiosensibilité. Ce test est basé sur la quantification dans des fibroblastes primaires, de la translocation «nucleoshuttling» de la protéine ATM phosphorylée du cytoplasme vers le noyau après une irradiation *in vitro* à 2 Gy ([Bodgi et al., 2013](#)). Le test est basé sur la corrélation entre le retard de la translocation nucléaire de la protéine ATM phosphorylée dans les fibroblastes et la réaction sévères de patient ayant reçu un traitement par radiothérapie. La translocation cyto-nucléaire d'ATM phosphorylée est proposée comme test de radiosensibilité individuelle afin de classer la radiosensibilité des patients en trois groupes. Le premier groupe est radiorésistant (groupe I); le second a une radiosensibilité modérée causée par le retard de nucléoshuttling de l'ATM (groupe II) et le dernier groupe présente hyper-radiosensibilité, causée par une réparation déficiente des cassures ADN double brins et un fort retard de translocation d'ATM (groupe III) ([Bodgi et al., 2013](#)) ([Granzotto et al., 2011](#)) (**Figure 7**). L'association de ce test à la radiosensibilité individuelle de patients a aussi été confirmée en 2016 dans le projet européen ([COPERNIC project investigators et al., 2016](#)). En 2018, l'équipe de recherche *Foray et al* innove le test de nucleoshuttling d'ATM et propose un test de mesure de la phosphorylation de la protéine ATM phosphorylée par la technique d'ELISA dans le noyau de fibroblastes, cette mesure ne nécessite pas de culture *in vitro* au préalable ([Pereira et al., 2018](#)).

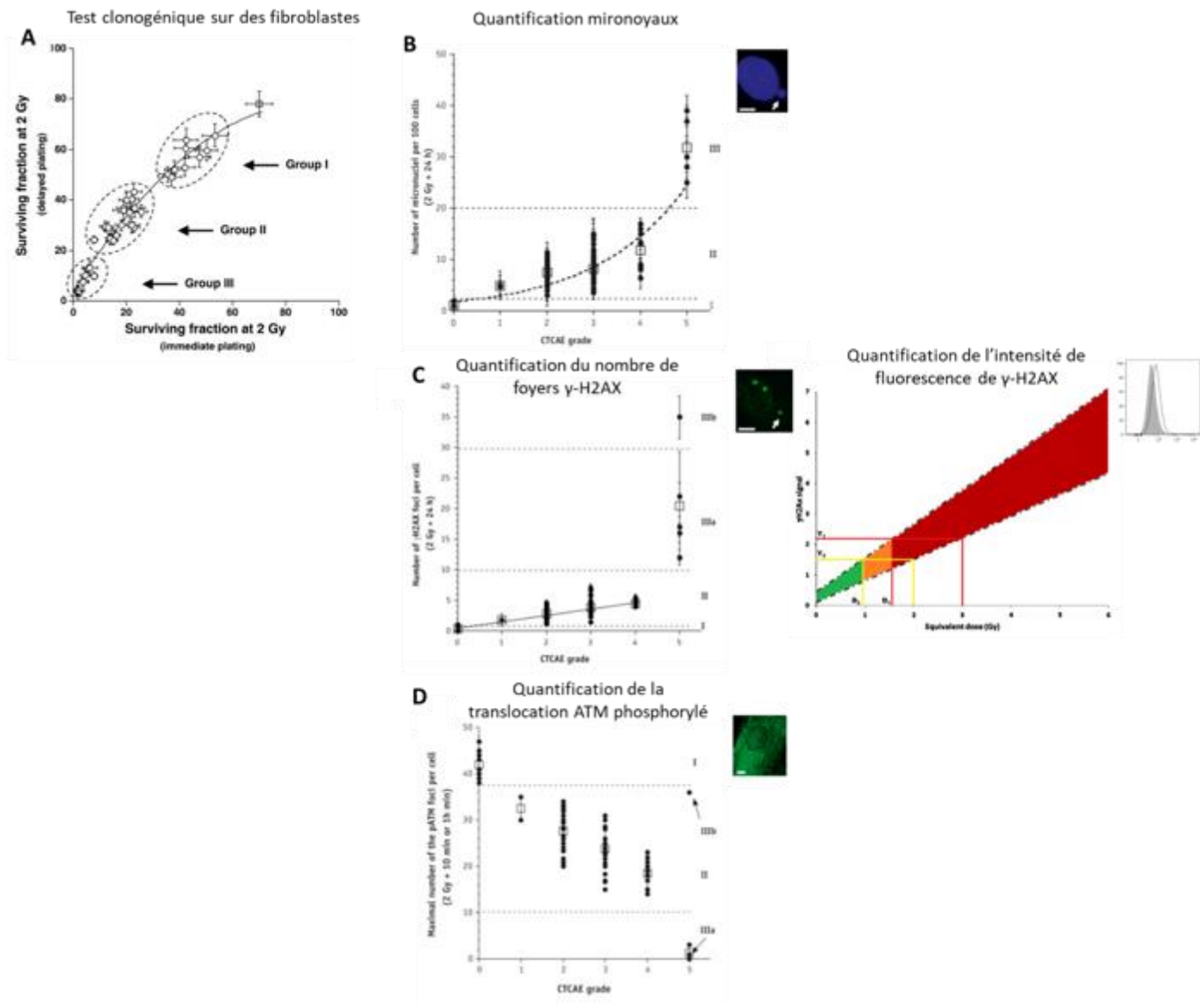


Figure 7 : Principaux tests cellulaires prédictifs de la radiosensibilité individuelle, réalisés sur des fibroblastes primaires humains, légende page 48

Figure 7 : Principaux tests cellulaires prédictifs de la radiosensibilité individuelle, réalisés sur des fibroblastes primaires humains

(a) La quantification de la fraction survivante (SF2) résultats du test clonogénique effectué sur des fibroblastes primaires humains après irradiation *in vitro* à 2 Gy. Le graphique représente le SF2 obtenu immédiatement après irradiation en fonction du score obtenu 24 heures après irradiation. Le SF2 est continu en fonction des individus, mais il est possible de déterminer 3 types de score SF2 (entourés en pointillé), qui permettent de déterminer 3 groupes de radiosensibilité individuelle indiqué sur le graphique. Le groupe I a un fort SF2 correspond à une résistance à l'irradiation, le groupe II a un score SF2 moyen et correspond à une sensibilité moyenne. Le groupe III a un faible score SF2 qui correspond à une sensibilité à l'irradiation. (b) Quantification de micronoyaux mesurés par microscopie dans des fibroblastes primaires humains 24 heures après irradiation à 2 Gy. La quantification est réalisée pour des individus de grades de toxicité induite par la radiothérapie différents (de 0 à 5, 0 étant pas de toxicité et 5 une toxicité maximale). La quantification de micronoyaux permet de catégoriser la radiosensibilité individuelle des patients en 3 groupes (indiqué sur le graphique). Le groupe I a un faible taux de micronoyaux (0-5) et est associé à une résistance à l'irradiation, le groupe II présente quelques micronoyaux (5 et 20) et est associé à une sensibilité moyenne à l'irradiation, le groupe III présente plus de 20 micronoyaux et est associé à une sensibilité importante à l'irradiation. (c gauche) Quantification de foyers γ -H2AX reflétant les cassures ADN double brin mesuré par microscopie dans des fibroblastes primaires humains 24 heures après irradiation à 2 Gy. La quantification est réalisée pour des individus de grades de toxicité induite par la radiothérapie différents (de 0 à 5, 0 étant pas de toxicité et 5 une toxicité maximale). La quantification de foyers γ -H2AX permet de catégoriser la radiosensibilité individuelle des patients en 3 groupes (indiqué sur le graphique). Le groupe I a un faible taux de foyers γ -H2AX (0-2) et est associé à une résistance à l'irradiation, le groupe II présente quelques foyers γ -H2AX (2 et 10) et est associé à une sensibilité moyenne à l'irradiation, le groupe IIIa présente plus de 10 foyers γ -H2AX et est associé à une sensibilité importante à l'irradiation et le le groupe IIIb présente plus de 30 foyers γ -H2AX et est associé à une sensibilité extrême à l'irradiation. (c droite) La quantification de cassures ADN double brins a aussi été réalisée en mesurant l'intensité de fluorescence de γ -H2AX par cytométrie en flux, dans des fibroblastes primaires après irradiation à 2 Gy. Cela permet de déterminer une courbe de triage, qui catégorise la radiosensibilité individuelle des patients. (d) Quantification de translocation de la protéine ATM phosphorylé dans le noyau, mesurée dans des fibroblastes primaires humains après irradiation à 2 Gy. La quantification est réalisée pour des individus de grades de toxicité induite par la radiothérapie différents (de 0 à 5, 0 étant pas de toxicité et 5 une toxicité maximale). La quantification de foyers γ -H2AX permet de catégoriser la radiosensibilité individuelle des patients en 3 groupes (indiqué sur le graphique). Le groupe I à une forte expression cytoplasmique de ATMp (40 foyers) et est associé à une résistance à l'irradiation, le groupe II présente dans le cytoplasme entre 30 et 10 foyers ATMp et est associé à une sensibilité moyenne à l'irradiation, le groupe IIIa présente moins de 10 foyers ATMp et est associé à une sensibilité importante à l'irradiation, adapté de (COPERNIC project investigators et al., 2016) (Joubert et al., 2008).

2. Caractéristiques biologiques radio-induite discriminant les différences individuelle et tests cellulaires évaluant la radiosensibilité individuelle, impliquant les lymphocytes-T- CD4 et les lymphocytes CD8+

a) Apoptose tardive des lymphocytes-T-CD8 : le test RILA

Les tests de radiosensibilité développés sur les fibroblastes humains ont plusieurs limites dont la réalisation d'une biopsie et le délai de culture *in vitro*. Les cellules sanguines et principalement les lymphocytes sont le second type cellulaire d'intérêt pour le développement d'un test évaluant la radiosensibilité humaine. Premièrement, les données analysées sur les survivants des bombes atomiques et de l'accident nucléaire de Tchernobyl ont démontré que les rayonnements ont un effet sur les lymphocytes. Deuxièmement, car l'accès aux lymphocytes est beaucoup plus pratique et nécessite une simple prise de sang. Les principaux tests de radiosensibilité portent sur la mort cellulaire par apoptose des lymphocytes et sont associés aux effets secondaires induits par la radiothérapie.

L'équipe française d'Ozsahin et Crompton en 1997 a mis au point un test cellulaire évaluant la radiosensibilité individuelle, basé sur la mesure de l'apoptose des cellules sanguines exprimant le récepteur de surface CD8 (CD8+) (référéncé comme lymphocytes-T-CD8 par les auteurs), après irradiation *in vitro* à 8 Gy (RILA). C'est le sang total dilué au 1/10^e qui est irradié à 8 Gy, 48 heures post-irradiation l'échantillon est marqué avec des anticorps anti-CD8 et de l'iodure de propidium, puis les globules rouges sont lysés, pendant 10 minutes. Dans les études qui caractérisent le test RILA, bien que dans leurs conditions expérimentales, il n'y a pas de marquage du récepteur CD3, les cellules sanguines exprimant le CD8 sont référéncées comme lymphocytes-T-CD8. Le test repose sur l'identification des cellules en apoptose tardive qui perdent du contenu nucléaire, caractérisées par une fluorescence plus faible de l'iodure de propidium, et qui ont une taille plus petite que les cellules vivantes (IP- FSC-). Le score RILA est ensuite calculé par la proportion de cellules en apoptose tardive mesurée après irradiation à 8 Gy soustraite à la proportion de cellules en apoptose tardive mesurée en condition contrôle sans irradiation (Ozsahin et al., 1997) (Crompton et al., 1999). Le score obtenu au test du RILA est inversement proportionnel aux effets toxiques induits par le traitement par radiothérapie (Ozsahin et al., 1997) (Crompton et al., 1999). Une étude, publiée en 2005 par le même groupe de recherche, a analysé la corrélation entre le score du RILA et les effets secondaires de radiothérapie tardifs chez 399 patients ayant différents types de cancers : sein, tête et cou, poumon, génito-urinaire, gastro-intestinal, hématologique et gynécologique. Leurs résultats démontrent que le score au RILA est corrélé à l'incidence d'effets secondaires tardifs induits par la radiothérapie. Dans cette étude, le test RILA classifie les effets tardifs survenant deux ans après le traitement par radiothérapie en trois groupes. Un score RILA supérieur à 24 est associé à une faible incidence d'effets toxiques correspondant aux effets de grade 1 ; entre 16 et 24 est associé à une incidence d'effets

toxiques modérés correspondant aux effets de grade 1 ; et inférieur à 16 est associé à forte incidence d'effet toxique induit par radiothérapie correspondant aux effets de grade 2 et grade 3 (Ozsahin et al., 2005). La prédiction des effets tardifs induits par la radiothérapie par le test RILA a été confirmée sur différentes cohortes de patients ayant différents types de cancer, ces études furent publiées en 2008, 2010, en 2015 (Azria et al., 2008) (Azria et al., 2015). L'étude publiée en 2015 associe le score RILA inférieur à 12 à la fibrose radio-induite sur une cohorte de patientes ayant des cancers du sein (Azria et al., 2015) (Bourgier et al., 2016) (Figure 8).

Les arguments majeurs du test de radiosensibilité RILA sont d'une part, son association avec des effets cliniques radiotoxiques et d'autre part d'avoir été reproduit par des équipes de recherches au niveau européen afin de prédire des effets induits par la radiothérapie de grade 2 (Bordón et al., 2009) (Foro et al., 2014) (Fuentes-Raspall et al., 2015) (Schnarr et al., 2009). Parmi ces études figure celle du projet européen REQUITE qui a étudié l'analyse de l'association du score RILA aux effets tardifs induits par la radiothérapie sur 1319 patients ayant des cancers du sein, de la prostate et du poumon en France, en Allemagne et en Grande-Bretagne. La répartition du score RILA est différente en fonction du type de cancer et est plus étendue chez les patientes ayant des cancers du sein. Pour le même type de cancer, il y a une variation dans l'étendue des valeurs du RILA en fonction du lieu où a été réalisée l'étude. Toutefois, la moyenne du RILA pour chaque type de cancer est identique pour chaque lieu de test. Cette étude confirme le pouvoir prédictif du test RILA pour les effets tardifs induits par la radiothérapie de grade 2 et ceux indépendamment de l'origine des patients. Toutefois, il est possible qu'il faille adapter le score RILA au type de cancer (Talbot et al., 2019).

b) Quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires pour discriminer les différences individuelles

Les travaux dirigés par Schmitz *et al* portent sur la caractérisation de la radiosensibilité individuelle et de la recherche de marqueurs génétiques prédictifs de celle-ci. Dans leur première étude en 2003, l'équipe a irradié *in vitro* des PBMCs issus de 136 donneurs sains à 0,5 1 et 2 Gy et avait démontré que la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 était variable d'un individu à l'autre. Pour quantifier l'apoptose radio-induite après irradiation à 0.5, 1 et 2 Gy, ils ont transformé les courbes représentant le pourcentage de cellules apoptotiques en fonction des doses croissantes d'irradiation en courbe de survie. Puis, à partir des courbes de survie a été calculé le coefficient exponentiel qui quantifie l'apoptose radio-induite. Dans un second temps, ils démontrent qu'il existe une différence d'apoptose radio-induite entre les lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4), lymphocytes-T-CD8 (LT-CD8) et les lymphocytes-B (LB). Au sein du même donneur, l'apoptose radio-induite entre les lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4), lymphocytes-T-CD8 (LT-CD8) et les lymphocytes-B (LB) est corrélée. Ainsi

si l'individu présente une sensibilité d'apoptose radio-induite des LT-CD4, le même profil sera retrouvé dans les LT-CD8 et LB. Leurs résultats démontrent que la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 permet de discriminer des différences individuelles (Schmitz et al., 2003) (**Figure 8**).

L'héritabilité de la quantification de l'apoptose radio-induite a été décrite et publiée en 2007 (Schmitz et al., 2007). L'analyse de l'apoptose radio-induite a été réalisée dans les sous-populations naïves, centrales mémoire (CM), et effecteurs mémoires (EM), des LT-CD4 et LT-CD8 issus de PBMC irradiés *in vitro* sur une gamme de doses de 1 à 6 Gy. La quantification de l'apoptose radio-induite a été obtenue en calculant le coefficient de régression exponentiel des courbes de dose réponse 17 heures après irradiation à des doses croissantes de 1 à 2 Gy. Premièrement, l'étude démontre une variabilité dans les proportions de sous-populations entre les individus et un effet de l'âge des individus sur la proportion de sous-populations. Secondement, qu'il existe une hétérogénéité d'apoptose dans les sous-populations LT-CD4, les populations NAÏVES et CM ont un pourcentage de survie après irradiation de 100 % même après une irradiation à 6 Gy dans les LT-CD4 et LT-CD8. Ainsi seules les populations de LT-CD4 EM et de LT-CD8 EM entrent en apoptose après irradiation des PBMCs (Schmitz et al., 2007). Dans la continuité de la caractérisation du test de radiosensibilité, la question de l'implication génétique dans l'apoptose radio-induite des lymphocytes est étudiée. L'héritabilité de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM et LT-CD8-EM a été mesurée par une analyse de corrélation familiale et démontre que l'héritabilité la plus importante est celle de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM. Les analyses de ségrégation sur l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM dans les familles ont permis de démontrer que le modèle de ségrégation, qui est significativement le plus associé à l'apoptose radio-induite, est mendélien additif ou dominant avec un gène majeur impliqué et selon un modèle bi-allélique, dont le génotype hétérozygote est similaire au génotype homozygote pour l'allèle majeur (Schmitz et al., 2007). Les expérimentations développées par l'équipe et appliquées depuis 2000 ont permis la quantification de l'apoptose radio-induite sur de larges séries d'échantillons et de population lymphocytaires, afin de détecter dans les conditions de standardisation des différences interindividuelles hérissables et par la suite identifier des marqueurs génétiques de type polymorphismes SNV associés.

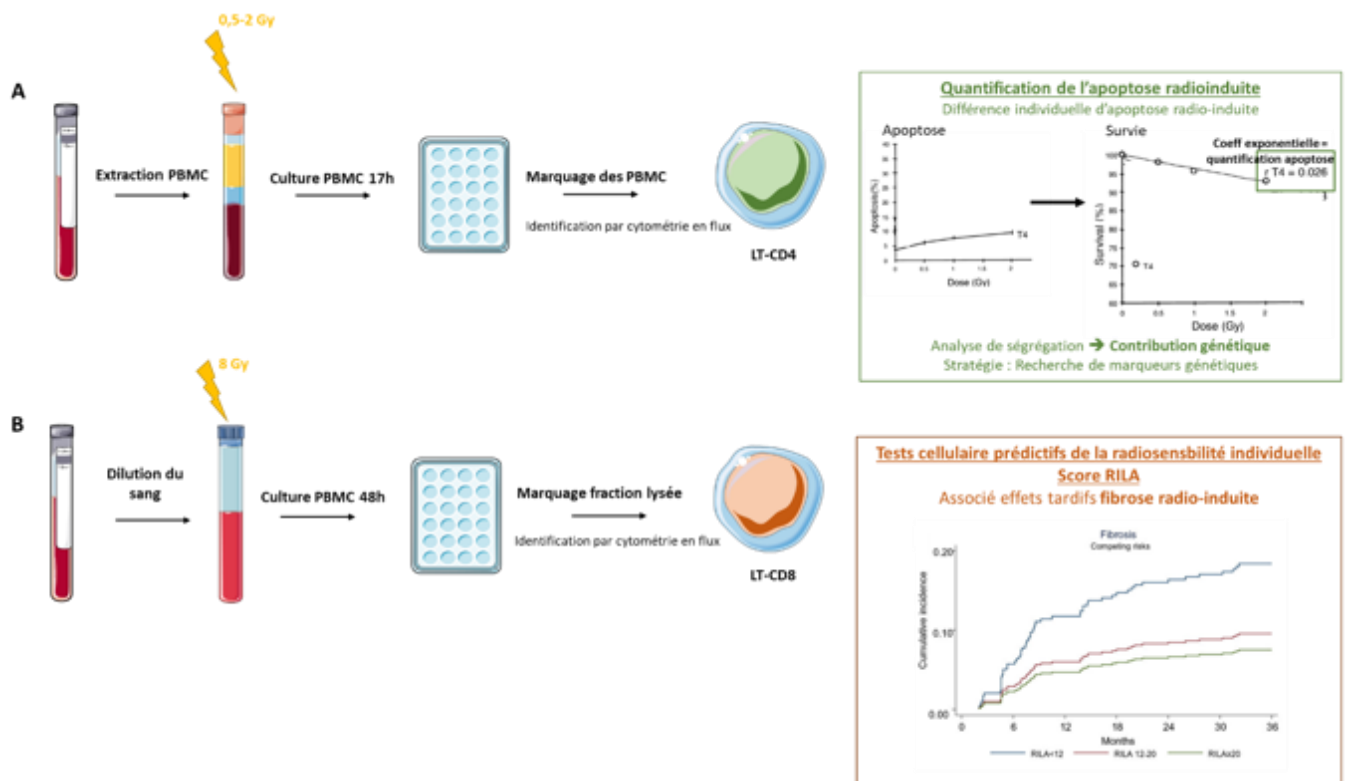


Figure 8 : Quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 pour discriminer des différences individuelles de sensibilité à l'irradiation et tests RILA mesuré sur les lymphocytes-T-CD8 prédictif des effets radiotoxiques induits par la radiothérapie

(a) Schéma de la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 reflétant les différences individuelles de sensibilité à l'irradiation. Les cellules du sang périphériques (PBMCs) sont isolées du sang total, puis irradiées en plaque de culture et cultivées jusqu'à 17h après irradiation (0,5, 1 et 2 Gy), puis les PBMCs sont marqués pour identifier les lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4) et les cellules annexineV (AnnV) positives. Le pourcentage de cellules AnnV positives qui sont apoptotiques a été quantifié, puis a été transformé pour obtenir les courbes de survie. Le coefficient de régression exponentiel de la courbe de survie correspond à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4, adapté de (Schmitz et al., 2007). (b) Principe du test RILA, mesuré sur les lymphocytes-T-CD8, prédictif de la radiosensibilité individuelle. C'est le sang dilué qui est irradié à 8 Gy et mis en culture pendant 48h, puis le sang dilué est lysé pour séparer les globules rouges des cellules mononuclées du sang. C'est la fraction lysée qui est passée en cytométrie pour identifier les lymphocytes-T-CD8 et l'apoptose tardive. Le score RILA est obtenu par la différence d'apoptose tardive entre la condition non irradiée et irradiée à 8 Gy. En fonction du score RILA, il est possible de prédire le risque d'apparition de la fibrose (effets radiotoxiques induits par radiothérapie). Dans ce schéma figure une courbe de prédiction de la fibrose chez des patientes atteintes de cancer du sein grâce au score RILA (inférieur à 12 = fort risque, entre 12 et 20 = risque moyen et supérieur à 20 = faible risque), adapté de (Azria et al., 2015).

c) Autres tests de radiosensibilité individuelle effectués sur les cellules mononuclées du sang périphérique ou les lymphocytes-T

La littérature référence des études portant sur le développement de tests de radiosensibilité individuelle réalisée sur les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) et les LT-CD4, mais qui n'implique pas une mort cellulaire. Ces tests reposent sur l'étude : des quantifications d'aberrations cytogénétiques, de l'expression génique (transcriptionnelle), de l'épigénétique, de la protéomique ou encore l'étude des profils cytokiniques. De nombreuses études proposent comme test de radiosensibilité individuelle la quantification d'aberrations chromosomiques induites après irradiation *in vitro* de PBMC (Lankoff et al., 2006) (Smart et al., 2003) (Fajgelj et al., 1997) (Kondrashova et al., 1997). Les mêmes études dans les LT-CD4 sont peu nombreuses. Pectu et al démontre que le nombre de micronoyaux induit par une irradiation *in vitro* à 2 Gy dans des LT-CD4 est associé à la radiosensibilité de patients atteints de sclérose (Petcu et al., 2006). Une étude démontre la possibilité de discriminer les différences de radiosensibilité individuelle en mesurant l'expression génique de *CDKN1A* dans les PBMCs. Dans une cohorte de 2 patientes atteintes de cancer du sein, les résultats de Badie et al, démontrent que les patientes présentant une toxicité importante après la radiothérapie, ont une diminution de l'expression de *CDKN1A* (Badie et al., 2008). Une étude expose le potentiel d'utilisation des techniques d'étude du transcriptome à haut débit dans le but d'évaluer la radiosensibilité individuelle de patients. Chez des patientes atteintes de cancer du sein, il a été démontré que le profil d'expression de 29 gènes de lymphocytes-T irradiés permet de clustériser les patientes présentant une toxicité importante après radiothérapie (Henríquez Hernández et al., 2009). L'étude de régulation épigénétique dans les PBMCs, notamment des mi-RNA est aussi envisagée pour évaluer la radiosensibilité individuelle. Chez des patients atteints de cancer de la prostate présentant après radiothérapie des saignements rectaux, il a été démontré que l'expression de deux miRNA pouvaient permettre de discriminer l'intensité de cet effet secondaire. En effet la majorité des patients présentant des saignements importants (grade 2–3) ont une faible expression du miRNA Ku80 et une forte expression miR-99a (Someya et al., 2015). De nombreuses études portent sur l'évaluation de la radiosensibilité individuelle de patients, en étudiant l'expression protéiques de cytokines. Ces cytokines sont dosées dans le plasma sanguin. Le niveau plasmatique de TGF- β permet des discriminer les patients qui présentent ou non une pneumonie après radiothérapie (Anscher et al., 1998). Le niveau plasmatique d'IL-8 est corrélé au développement de lésion pulmonaire chez des patients traités par radiothérapie. Les patients développant des lésion pulmonaire ont moins d'expression plasmatique d'IL-8 (Hart et al., 2005). Une élévation des niveaux plasmatique d'IL-10 et d'IL-6 sont aussi corrélés au développement de lésion pulmonaires induite par la radiothérapie (Arpin et al., 2005). Au-delà des cytokines, certaines études se sont penchées sur la corrélation entre la radiosensibilité individuelle et

l'expression de protéines. Ces protéines sont recherchées dans les PBMCs de patients traités par radiothérapie qui présentent différents degrés d'effets secondaires, par spectroscopie de masse. Chez des patients atteints de cancer du poumon à petites cellules, il a été démontré que le niveau d' α -2-macroglobuline permet de discriminer les patients qui développent ou non des lésions pulmonaires (Oh et al., 2011). Chez des patientes atteintes du cancer du sein, c'est l'expression de la protéine AK2, mesurée dans des lymphocytes-T irradié, qui permet de discriminer les différences entre les patientes qui développent ou non de la fibrose après radiothérapie (Lacombe et al., 2019).

3. Polymorphismes génétiques de type SNV prédictifs de la radiosensibilité individuelle

a) Syndromes génétiques associés à la radiosensibilité individuelle

Les premières études d'associations génétiques aux effets des rayonnements ionisants proviennent de la découverte de mutations qui provoquent des syndromes d'origine monogénique dont le symptôme principal est une sensibilité accrue aux rayonnements ionisants. Le syndrome d'Ataxie télangiectasie (AT) provient d'une mutation sur le gène *ATM*. En 1967, il a été caractérisé des effets radiotoxiques, aboutissant un décès d'un patient 8 mois après avoir reçu une irradiation à 30 Gy pour traiter un lymphosarcome. Après irradiation, les effets radiotoxiques développés sont : la mucosite, des érythèmes cutanés, une peau suintante et croûteuse, une perte de poids, des difficultés respiratoires et de cicatrisation de la peau (Gotoff et al., 1967). À la suite, de la description d'effets radiotoxiques chez des patients atteints du syndrome AT, il a été découvert que des patients atteints d'autres syndromes présentaient aussi une sensibilité extrême à l'irradiation pouvant entraîner la mort du patient. Parmi les mieux caractérisés dans la littérature, il y a le syndrome de rupture de Nijmegen (NBS), résultant d'une mutation sur le gène *NBS1*. Les patients atteints du syndrome NBS développent après irradiation de la fièvre, une neutropénie, des infections répétées, une dysphagie, une œsophagite érosive, de la dermatite, une pneumonie, des saignements (Bakhshi et al., 2003). Le syndrome de Fanconi résulte d'une mutation sur les gènes *FA*, principalement *FA-A*. Après irradiation, les patients ayant ce syndrome développent des thrombocytopenies et décèdent précocement après radiothérapie (Bremer et al., 2003). Le syndrome de la Ligase IV est caractérisé par une mutation sur le gène de *LIG4*. Après radiothérapie, ces patients développent, des érythèmes sévères, de la desquamation, des ulcères nécrotiques, une perte de poids et une encéphalopathie (O'Driscoll et al., 2001). Le syndrome du Gorlin résulte d'une mutation sur le gène *PATCH1*, dont les patients présentent aussi une extrême sensibilité à l'irradiation et une forte radiosusceptibilité (Mitchell et al., 2005) (Larsen et al., 2014). Il a été démontré *in vitro* dans des fibroblastes de patients, que les patients atteints du syndrome de Gorlin présentent, une diminution de la fraction survivante obtenues lors du test clonogénique, une augmentation des cassures ADN et modifications des signalisations de reconnaissance des cassures ADN et de réparation de cassures ADN (Vulin et al., 2018).

L'ensemble de ces syndromes résultent de mutation sur des gènes impliqués dans des voies de signalisation de reconnaissance et de réparations des cassures ADN. La fréquence de ces syndromes est rare 1/10000 et est détectable dans les premières années de la vie. Les caractérisations des effets radiotoxiques chez des patients atteints de syndromes génétiques représentent la première démonstration d'une corrélation entre la génétique d'un individu et sa radiosensibilité.

b) Association de polymorphismes génétiques de type SNV sur un ou plusieurs gènes candidats

Les polymorphismes sont des variations du génome à un locus donné, qui varie selon les individus. Parmi les types de polymorphismes, le polymorphisme SNP de l'anglais « Single Nucleotide Polymorphism » puis renommé SNV (Single Nucleotide Variant) est une variation d'un seul nucléotide sur une séquence. Ils représentent la forme la plus abondante de variations génétiques (90 %). Leur fréquence d'apparition est de 1/300 paires de bases et ils sont soit sans effet sur l'expression génique soit fonctionnels affectant directement une protéine ou sa régulation (Vignal et al., 2002). Ce sont les corrélations entre des polymorphismes sur un ou plusieurs gènes candidats à la radiosensibilité individuelle qui sont donc recherchées. Le ou les gènes sont sélectionnés en raison de l'hypothèse de l'implication de leur fonction biologique dans la réponse aux rayonnements ionisants. Grâce au criblage génétique à haut débit, de nombreuses études génétiques d'association cas-témoins peuvent désormais comparer à grande échelle les profils génétiques des personnes hypersensibles aux rayonnements des profils génétiques de personnes radio-résistantes. Un SNV étant une variation d'un seul nucléotide, il existe deux allèles. Deux allèles identiques définissent le génotype homozygote et, deux allèles différents, le génotype hétérozygote. L'allèle définit comme majeur à une plus haute fréquence dans la population et l'allèle mineur est caractérisé par la variation de plus faible fréquence. Ce type de polymorphisme peut être identifié par génotypage ou séquençage, par hybridation sur de puces ADN, et/ou par extension d'amorce par la technique de PCR (Perkel, 2008).

(1) Association de polymorphismes génétiques SNV aux effets secondaires de la radiothérapie

Les premières études génétiques d'association à la radiosensibilité individuelle effectuées dans les années 2000, testaient l'association de gènes candidats impliqués dans les signalisations de réparation par excision de bases (*XRCC1, XRCC3*), de la réparation des cassures double-brin (*ATM, BRCA1, BRCA2*), de stress oxydatif (*GSTP1, SOD2*) ou encore de la réponse inflammatoire (*TGF- β*) (Andreassen, 2010). Les polymorphismes les plus étudiés associés aux effets toxiques induits par la radiothérapie sont résumés dans le **Tableau 2**. Dans ce tableau récapitulant les principaux polymorphismes génétiques (SNVs) associés aux effets induits par la radiothérapie, il est observé que des polymorphismes sur un

même gène sont associés à la radiosensibilité de patients atteints de différents types de cancer (sein, tête et cou, prostate et poumons) et donc pour des effets secondaires différents car présents sur différents organes. Les effets prédits par la présence, chez les patients, de ces SNVs sur les gènes *ATM*, *XRCC1*, *SOD2* et *TGF-β* sont majoritairement prédictifs d'effets tardifs de la radiothérapie spécifiques de la zone irradiée (**Tableau 2**). Dans le cas du cancer du sein, c'est principalement des effets cutanés sévères et de la fibrose. Dans le cas du cancer de la prostate, il s'agit de dysfonctionnement érectile, des saignements rectaux et de dysfonctionnements du système urinaire (**Tableau 2**). Une revue publiée en 2015 résume l'ensemble des associations génétiques corrélées aux effets induits par la radiothérapie qui ont été reproduites dans plusieurs études indépendantes. Cette étude décrit que les associations impliquant les variants des gènes *XRCC1* et *TGF-β* sont les plus reproductibles ([Herskind et al., 2016](#)). Dans le cadre du projet de méta-analyse du Radiogenomics Consortium, l'association du SNV rs1801516 sur le gène *ATM* avec un risque accru de toxicité de tissus sains a été démontrée sur 5456 patients traités pour des cancers du sein et de la prostate provenant de 17 cohortes ([Andreassen et al., 2016](#)). Considérant que les SNVs issus de séquençage de gènes candidats se concentrent sur les gènes *ATM*, *XRCC1*, *XRCC3* et *TGF-β*, il serait possible d'envisager une détection de la radiosensibilité individuelle des patients en séquençant non pas un unique SNV, cela semble insuffisant, mais un panel de gènes. Toutefois, une approche par séquençage de gènes candidats induit un biais de sélection, car il est possible que d'autres polymorphismes de type SNVs soient associés, mais dans d'autres régions génomiques.

Gène	SNP	Voie de signalisation	Type de cancer	Effet prédictif	Références
ATM	rs1801516	Fonction Kinase Activé par les cassures ADN	Sein cou et tête Sein	>grade 3	(Azria et al., 2008)
	rs1801516	double brin	Sein	T : fibrose	(Christian N. Andreassen et al., 2006)
	rs664677	Agit en mitose et en méiose	Prostate	P et T	(Angèle et al., 2003)
	21 séquence	Favorise la réparation des cassures par recombinaison	Sein	T	(Cesaretti et al., 2005)
	rs1800058	homologue et par NHEJ	Prostate	T	(Edvardsen et al., 2007)
	rs1801516	Active les points de	Sein	T	(Rosenstein et al., 2007)
	rs1800058	contrôles du cycle cellulaire	Sein	P et T	(Edvardsen et al., 2007)
	rs1801516	qui bloque le cycle	Prostate	P	(Ho et al., 2007)
	rs1801516		Poumon	T	(Rosenstein et al., 2007)
	111G > A			P	(Zhang et al., 2010)
126713G > A					
BRCA1	rs16942	Suppresseur de tumeur Inhibe la prolifération cellulaire Fonction ligase Favorise la réparation des cassures ADN double brin par recombinaison homologue Régulation des points de contrôles du cycle cellulaire Régulateur transcriptionnel	Sein Poumon	T	(MacDermed, 2015) (Kelsey et al., 2013)
XRCC1	pos1321 G>A	Protéine de structure Intervient sur site de cassures ADN simple brin	Sein Cou et tête Sein	>grade 3	(Azria et al., 2008)
	G28152A	Processus de réparation par excision de base (BER)	Cou et tête Sein	T sévère T : fibrose	(Lazzari et al., 2017) (Alsbeih et al., 2010)
	rs25487	Interagit avec la PARP, la Ligase-III et la Polymérase-β	Prostate	Tous	(Brem et al., 2006)
	rs3213235		Endomètre	T	(Burri et al., 2008)
	rs25489			T : sévère	(De Ruyck et al., 2005)
	codon 194 variant		Poumon Peau		(Kelsey et al., 2013)
	rs25487			P	(Chang-Claude et al., 2005)
	XRCC1 codon 399 combine à APEX codon 148		Sein	Tous	(Moullan et al., 2003)
	The exon 6 194Trp en combinaison				
	399Gln		Sein	T	(Seibold et al., 2015)
rs2682585					
XRCC3	pos1075 C>T	Processus de réparation de cassures ADN double brin par recombinaison homologue	Sein Cou et tête Cou et tête	>grade 3	(Azria et al., 2008)
	rs861539	Favorise la stabilité de la brèche	Prostate	T : fibrose	(Alsbeih et al., 2010)(C. N. Andreassen et al., 2006)
	rs861539	Fait partie du complexe RAD21	Endomètre	T	(Burri et al., 2008)
	IVS5-14	Recrute RAD51	Sein	T : sévère	(De Ruyck et al., 2005)
	C18067T			T	(Lazzari et al., 2017)

SOD2	pos47 T>C rs4880 codon 16 Val/Ala	Intervient dans le stress oxydatif Enzyme antioxydante Détoxifie l'ion superoxyde (O ₂ .) en peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) et oxygène (O ₂)	Sein Cou et tête Prostate Sein	>grade 3 T : fibrose P et T	(Azria et al., 2008) (Burri et al., 2008) (Andreassen et al., 2003)
TGF-β	870 T>C rs1982073 codon 10 et position -509 codon -509 codon 10 C-509-T pos -509 pos 869 pos915 pos -509 combinaison pos+869	Cytokine produite par des cellules immunitaires dont les lymphocytes Module l'inflammation Contrôle la prolifération, l'activation et la différenciation cellulaire des cellules immunitaires et des fibroblastes Peut stimuler l'apoptose Rôle dans la croissance des cellules cancéreuses Favorise l'angiogenèse des cellules endothéliales Favorise la migration des cellules musculaires Favorise la transition épithélio-mésenchymateuse Régulateur transcriptionnel par activation de la voie SMAD	Sein Cou et tête Cou et tête Sein Sein Poumons Sein Prostate Sein	>grade 3 T : fibrose T : fibrose T : fibrose P T T : fibrose P T T	(Azria et al., 2008) (Alsbeih et al., 2010) (Andreassen et al., 2005) (Giotopoulos et al., 2007) (Yuan et al., 2009) (Grossberg et al., 2018) (Peters et al., 2008) (Quarmby et al., 2003)
TNF-α	Rs1800629	Cytokine pro-inflammatoire produite par les cellules immunitaires dont les macrophages et les lymphocytes-T Module l'inflammation dans le microenvironnement tumoral, le système nerveux et dans le placenta Favorise la survie ou la mort en fonction du type cellulaire Favorise la survie des cellules cancéreuses et la transition épithélio-mésenchymateuse	Sein cou et tête	Tous	(Talbot et al., 2012)

Tableau 2 : Résumé des principaux polymorphismes génétiques de type SNV issus de gènes candidats associés aux effets radiotoxiques présents chez les patients après un traitement par radiothérapie

Résumé des principaux polymorphismes génétiques de type SNV issus de gènes candidats retrouvés dans la littérature scientifique et leurs associations aux effets toxiques précoces/aigus (P) et tardifs/chroniques (T) présents chez les patients après un traitement par radiothérapie. Pour chaque SNV est répertorié dans la première colonne le nom du gène sur lequel il est présent, dans la seconde le nom du SNV ou sa position La troisième colonne référence les principales fonctions du gène candidat. La quatrième colonne référence pour chaque SNV la zone du corps qui a été irradiée chez les patients de l'étude. La cinquième colonne référence pour chaque SNV, si sont association a été

démontrée pour un effet précoce (P), tardif (T) ou les deux. Enfin la dernière colonne référence pour chaque SNV la référence et l'année de l'étude d'association.

(2) Association de polymorphismes génétiques SNV à des caractéristiques cellulaire radio-induite après irradiation *in vitro*

Dans cette partie, nous nous concentrerons l'association de polymorphismes génétiques issus de gènes candidats aux tests de radiosensibilités cellulaires impliquant les LT-CD8 : score RILA et les LT-CD4 : apoptose des LT-CD4-EM.

Association de polymorphismes génétiques de type SNV candidats au test de radiosensibilité individuelle RILA :

Le groupe de recherche ayant développé le test de radiosensibilité individuelle RILA, étudié en 2008 l'association de polymorphismes de type SNV de plusieurs gènes candidats aux effets secondaires induits par la radiothérapie. Les SNVs étudiés sont sur les gènes : ATM, SOD2, XRCC1, XRCC3, TGFB1, et RAD21. L'analyse de la corrélation entre les SNVs issus de la liste des gènes candidats et la présence d'effets secondaires induits par la radiothérapie chez les patients de l'étude révèle que les patients ayant manifesté des effets secondaires après la radiothérapie présentent au moins 4 SNVs issus des gènes candidats : ATM, SOD2, XRCC1, XRCC3, TGFB1, et RAD21 (Azria et al., 2008). Dans la seconde partie de cette même étude, l'analyse de corrélation démontre une association entre les polymorphismes SNVs issus de la liste de gènes candidats et le test de radiosensibilité individuelle RILA. Plus particulièrement, les patients de la cohorte ayant un score au test de radiosensibilité RILA égale à 9 présentent les SNVs sur les gènes candidats ATM, SOD2, XRCC1, XRCC3, TGFB1, et RAD21 (Azria et al., 2008).

Association de polymorphismes génétiques de type SNVs candidats à la radiosensibilité individuelle basé sur la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4-effecteur mémoire :

Le groupe de recherche piloté par Schmitz et al ayant développé la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM pour discriminer des différences sensibilité à l'irradiation; a démontré en 2007, l'héritabilité de la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM (Schmitz et al., 2007). Pour rappel, la quantification de l'apoptose radio-induite dans les LT-CD4 EM correspond au coefficient exponentiel de la courbe représentant la survie cellulaire en fonction des doses croissantes d'irradiation. L'analyse de l'héritabilité de la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM a été une première étape pour initier la recherche de marqueurs génétiques prédictifs de l'apoptose radio-induite des LT-CD4 et plus largement de la radiosensibilité individuelle. Une étude du transcriptome par microarray a été réalisée dans les LT-CD4-EM circulants non irradiés sur 8 individus

sains sensibles et résistants à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM. L'analyse du transcriptome a démontré une expression différentielle constitutive du gène *TRAIL (TNFSF10)* entre les individus de phénotype sensible, intermédiaire et résistant. Ainsi, ce gène a été sélectionné comme gène candidat pour la recherche de polymorphismes génétiques de type SNVs associés à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM. Un séquençage ciblé du gène *TRAIL (TNFSF10)* a été réalisé par PCR chez 374 individus sains apparentés phénotypés pour leur sensibilité à l'apoptose radio-induite des LT-CD4 EM, et a démontré la présence de 3 SNVs : rs1131532, rs3815496 et rs1131535 associés à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4 EM. Considérant ces 3 SNVs, l'allèle exprimé majeur ou mineur et le génotype associé permettent de prédire l'apoptose radio-induite des LT-CD4 EM et donc de la radiosensibilité. Le génotype homozygote pour l'allèle majeur du SNV rs3815496 du gène *TRAIL (TNFSF10)* est associé à un fort taux d'apoptose radio-induit des LT-CD4-EM (radiosensibilité), et le génotype homozygote pour l'allèle mineur est associé à une faible apoptose radio-induite des LT-CD4-EM (radiatorésistance par rapport à la radiosensibilité observée chez les individus de génotype homozygote pour l'allèle majeur) (Baijer et al., 2016) (Figure 9). Enfin, il a été démontré dans un échantillon de 113 patientes ayant des cancers du sein issus de la cohorte Co-Ho-RT, que les deux SNVs rs1131532 et rs3815496 sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* sont associés à la présence de la dermatite aiguë, qui est un effet secondaire précoce de la radiothérapie (Baijer et al., 2016).

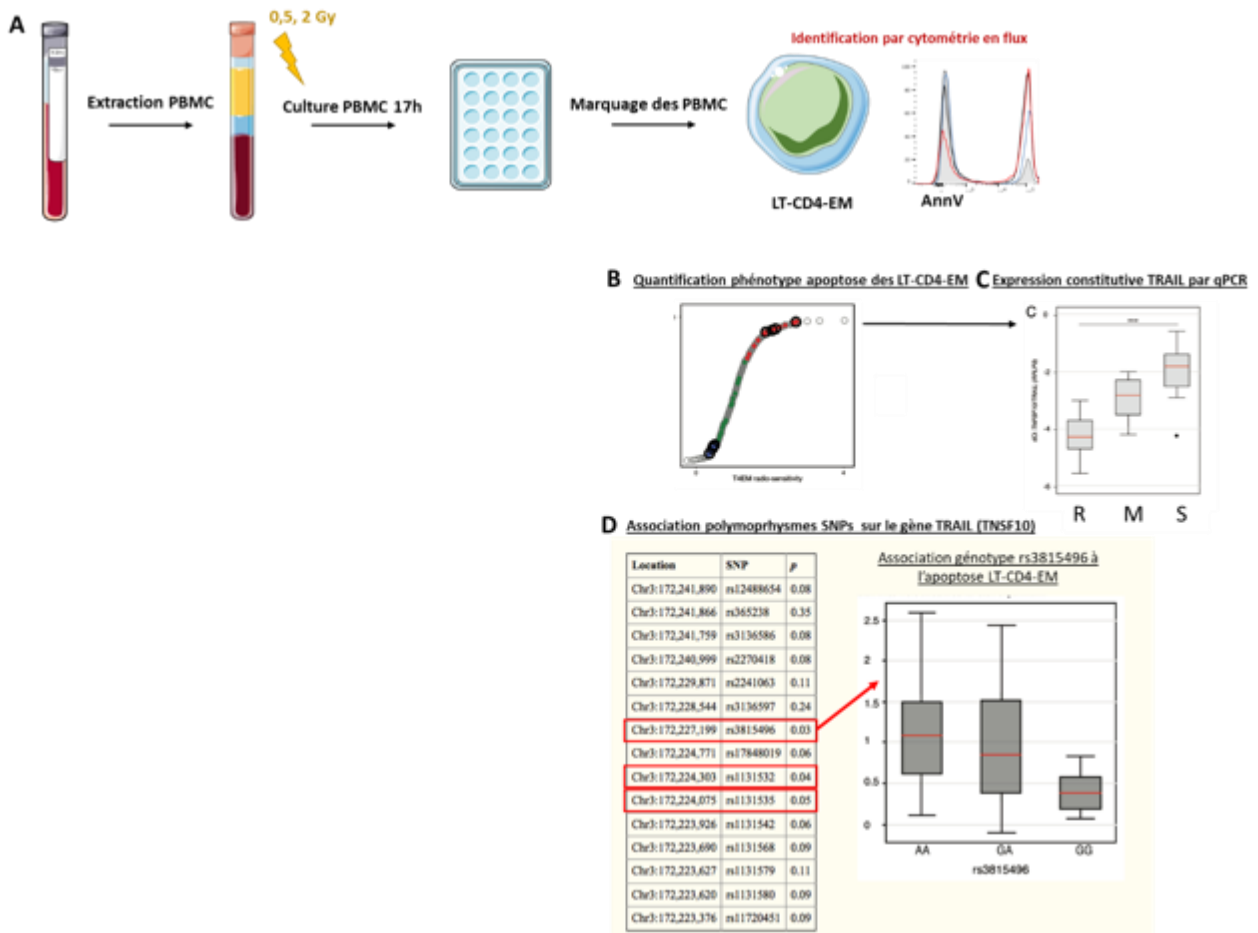


Figure 9 : Association de polymorphismes de type SNV sur gène *TRAIL* (*TNFSF10*) à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4-effecteur mémoire

Résumé des étapes menant à l'analyse d'association de polymorphismes génétiques sur le gène *TRAIL* *TNFSF10* à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires (LT-CD4-EM) (a) Schéma expérimental de la purification des cellules du sang périphérique (PBMC) à partir de sang total, les PBMCs sont irradiés puis cultivés 17 h après irradiation. Les PBMCs sont ensuite marqués afin d'identifier les LT-CD4-EM et l'apoptose par quantification des cellules annexineV (AnnV) positives, (b) Distribution de la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires (correspond au coefficient exponentiel de la courbe représentant la survie cellulaire en fonction des doses croissantes d'irradiation) sur 373 individus sains, (c) Expression par q-PCR du gène *TRAIL* (*TNFSF10B*) dans les lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires (LT-CD4-EM) chez 15 individus résistants (R), moyens (M) et sensibles (S) à l'apoptose radio-induite, (d) (gauche) Résultat de l'analyse d'association de polymorphismes génétiques de type SNV sur le gène *TRAIL* (*TNFSF10*) à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires (correspond au coefficient exponentiel de la courbe représentant la survie cellulaire en fonction des doses croissantes d'irradiation) de 374 individus sains apparentés. (droite) L'association génétique du génotypes du SNP rs3815496 sur le gène *TRAIL* (*TNFSF10*) AA n=55, GG n=6, et GA, n=65 (individus sains) à la quantification de l'apoptose des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires (correspond au coefficient exponentiel de la courbe représentant la survie cellulaire en fonction des doses croissantes d'irradiation), adapté de (Baijer et al., 2016).

c) Analyse d'association pangénomique (GWAS)

Les techniques de séquençage à très haut débit qui permettent de séquencer l'intégralité du génome, ou l'intégralité des séquences codantes du génome ont permis d'étendre l'identification et donc le génotypage de polymorphismes génétiques non plus à un panel de gènes prédéfinis à l'ensemble des SNVs du génome de manière indépendante (Cao et al., 2011). Le génotypage par puce à haut débit utilise des machines (scanners) *Illumina* et *Affimetrix* qui détectent un grand nombre de variants par gènes. Les variants non inclus dans les puces peuvent également être analysés s'ils sont en déséquilibre de liaison avec les variants présents dans la puce grâce au calcul par imputation. Le GWAS est un type d'analyse d'association de la totalité du génome à un phénotype (ensemble des caractères apparents d'un individu ou organisme, cela peut être des observations et/ou des caractéristiques biologiques cliniques ou cellulaires). Les analyses statistiques sont essentielles à l'interprétation des données de génotypage par GWAS. La statistique d'association d'un SNV à un phénotype est corrigée par le grand nombre de tests il s'agit de la correction multitest de Bonferroni, cela permet d'éviter d'obtenir des associations de type « faux positif ». Ainsi, seule une association avec le phénotype biologique étudié passera le seuil de la correction statistique de Bonferroni (Brothwell et al., 2019) (Hayes, 2013). En fonction du type de cohorte, du degré d'apparentement des individus, le modèle d'analyse utilisé est différent. Le modèle d'analyse FBAT (Family Based Association Test) prend en compte les relations familiales dans l'analyse de GWAS. Le modèle mixte linéaire ne prend pas en compte les relations familiales et est surtout utilisé pour les individus non apparentés (Lasky-Su and Lange, 2010). Certains facteurs ont un rôle important dans l'analyse statistique du GWAS car ils influent sur la puissance statistique de l'analyse : la fréquence d'un allèle dans les différentes populations étudiées, la taille de la cohorte et le nombre de tests représentant le nombre de questions biologiques.

(1) Analyse d'association pangénomique (GWAS) aux effets secondaires de la radiothérapie

Une analyse par GWAS réalisée sur une cohorte de patients atteints de cancer de la prostate ayant eu une radiothérapie démontre qu'un SNV (rs2268363) sur le gène *Follicle stimulating hormone receptor (FSHR)* est associé aux dysfonctions érectiles induites pas la radiothérapie (Kerns et al., 2010). Deux SNVs au locus 6q21 sur le gène *PR domain zinc finger protein 1 (PRDMI)* sont associés aux effets radiotoxiques induits par la radiothérapie dans une cohorte de patients ayant des lymphomes Hodgkiniens (Best et al., 2011). Kerns et al réalisent en 2013, une nouvelle étude d'association génétique par GWAS et démontre une association de 8 SNVs au locus 9p21.2 avec les dysfonctions urinaires induites par la radiothérapie chez des patients atteints de cancer de la prostate (Kerns et al., 2013). Lors de cette nouvelle analyse GWAS Kerns et al ne retrouve pas l'association génétique de rs2268363 sur le gène *FSHR*, cela est certainement expliqué par le fait que les deux études portent sur

des effets secondaires différents induits par la radiothérapie. *Fachal et al* démontre une forte association génétique par une analyse GWAS de deux SNVs rs10497203 et rs7582141 sur le gène *TANC1* aux effets secondaires radio-induits dans une cohorte de patients atteints de cancer de la prostate (*Fachal et al., 2014*). Un séquençage du génome entier suivi d'une analyse GWAS a été réalisé sur une large cohorte de patients ayant des cancers du sein et du cou et de la tête, traités par radiothérapie. Cette analyse GWAS démontre que plus de 190 SNVs sont associés aux effets secondaires de la radiothérapie en ayant un seul de significativité proche du seuil. Ces SNVs sont situés sur différents gènes et le SNVs le plus associés est le rs13116075 situé sur le gène *CCRN4L* (*Barnett et al., 2014*). L'étude de *Morton et al* s'est focalisée sur la recherche de polymorphismes corrélés à l'induction de cancer radio-induit dans une cohorte de patientes ayant eu un cancer du sein. Ils démontrent que le SNV rs4342822 près du gène *PROX1* est associé à la survenue d'un cancer radio-induit (*Morton et al., 2017*). En comparant l'ensemble de ces associations aux effets de la radiothérapie, tirés d'analyse GWAS, on constate qu'il n'y a pas de redondance entre les études. Ainsi, il n'y donc pas d'unique ou de panel de biomarqueurs qui se dégage des autres. De plus, ces polymorphismes, issus d'analyse GWAS, ne sont pas communs avec les SNPs mis en lumière par séquençage de gènes candidats qui identifiait des SNVs sur les gènes *ATM*, *XRCC1*, *XRCC3* et *TGF-β*.

(2) Analyse d'association pangénomique (GWAS) à une caractéristique cellulaire observée après irradiation *in vitro*

Azria et al qui avaient corrélé dans un premier temps le score obtenu au test du RILA et les effets à un panel de SNVs de gènes candidats, ont réalisés en 2016 une étude d'association du génome entier par GWAS au phénotype du score RILA. L'étude de GWAS a été réalisée sur une cohorte de patientes ayant des cancers du sein traités par radiothérapie. Dans un premier temps, le score du RILA a été mesuré afin de prédire l'apparition de fibrose sous-cutanée et les résultats confirment de nouveau l'association entre un faible score au RILA et le développement de la fibrose radio-induite. Puis l'analyse génétique a été réalisée pour deux phénotypes : score obtenu au RILA et au développement de fibrose radio-induite. L'analyse après correction révèle une association de deux SNVs en déséquilibre de liaison rs1182531 (p-valeur = 4.2×10^{-9}) et rs1182532 (p-valeur = 3.6×10^{-8}) ; localisés sur le gène *PHACTR3*. Le génotype homozygote sur l'allèle majeur aux deux SNVs est associé à 35 % d'apoptose des LT-CD8, le génotype hétérozygote à 15.4 % et le génotype homozygote mineur à 11.5 % d'apoptose (*Bourgier et al., 2016*). Les deux SNVs sont situés dans des régions introniques et n'ont pas été associés à des manifestations cliniques dans d'autres études ou dans les bases de données. La protéine PHACTR3 régule l'actine et la phosphatase PP1. Toutefois, ce gène est exprimé majoritairement dans le cerveau et dans les tumeurs (cerveau, carcinome, poumon, leucémie) et la fonction dans l'apoptose des LT-CD8 ne semble pas étudiée.

L'association génétique par une analyse GWAS à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM développé par *Schmitz et al* fait partie de l'un des deux objectifs du projet de thèse et sera développée dans la partie résultat du manuscrit de thèse.

La radiosensibilité individuelle ou la sensibilité individuelle aux rayonnements ionisants a été caractérisée par plusieurs approches, d'une part par des tests cellulaires *in vitro* et d'autre part par une approche génétique. Les principaux tests cellulaires ont été mis au point sur les fibroblastes primaires, sur les lymphocytes-T-CD8 et les lymphocytes-T-CD4 circulants et sont basés sur la signalisation d'induction de cassures ADN double-brin et sur la mort cellulaire par apoptose. L'approche génétique correspond à la recherche de marqueurs prédictifs qui sont des polymorphismes de type SNV, dont l'association aux effets secondaires induits par la radiothérapie a d'abord été étudiée sur des gènes candidats. Cette stratégie possédant plusieurs limites, la stratégie gène candidat a été remplacée au profit d'approche génétique pangénomique (GWAS), prenant en compte l'ensemble des SNVs du génome. Enfin, il a été recherché des polymorphismes génétiques pouvant être associés aux tests de radiosensibilité développés sur les lymphocytes circulants. De cette façon, il est possible de croiser les deux approches permettant d'appréhender de manière plus complète la radiosensibilité individuelle.

III. Chapitre 3 : Physiologie des lymphocytes-T-CD4 et effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4

1. Physiologie et identification des lymphocytes-T-CD4 circulants

Dans le cadre de ce projet de thèse, il a été étudié l'effets des rayonnements ionisants sur les sous-populations circulantes de LT-CD4. Les lymphocytes-T-CD4 sont des cellules spécifiques du système immunitaire.

a) Généralités sur le système immunitaire

Les organismes rencontrent plusieurs menaces d'origine microbiologique, plus généralement appelés pathogènes. Parmi eux, les bactéries, les virus, les champignons, les prions, les parasites qui perturbent la physiologie des organismes et sont à l'origine de pathologie. Parmi les menaces externes figurent les allergènes. Les agressions peuvent aussi être d'origine interne dont, les cellules tumorales. Dans le but de se défendre, certains organismes ont développé un système de défense : le système immunitaire. Le système immunitaire inné est retrouvé chez les animaux et les végétaux. L'immunité acquise est plus spécifique et existe uniquement chez les vertébrés. Le système immunitaire permet la reconnaissance de menaces qu'elles soient d'origine externe ou interne et, via de nombreux acteurs, favorise leur élimination. Le système immunitaire inné fait intervenir dans un premier temps l'action des barrières physiques. Dans un second temps, les facteurs du complément qui neutralisent les pathogènes, les cellules polynucléées qui modulent l'inflammation (basophiles, éosinophiles, mastocytes) et les cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques) (Zhu and Paul, 2008).

L'immunité acquise fait intervenir les lymphocytes-B, qui ont une activité humorale en produisant des anticorps, et les lymphocytes-T qui induisent des réponses cellulaires spécifiques et des réponses immunorégulatrices. Les lymphocytes T en fonction du type de récepteur TCR et de co-récepteurs exprimés, vont être de type CD8 ou CD4. Les lymphocytes-T CD8 (LT-CD8) ont une activité directe sur les pathogènes via leur fonction lytique. Les lymphocytes-T CD4 (LT-CD4) ont une activité de production et de sécrétion de facteurs solubles : les cytokines et chimiokines qui stimulent les autres acteurs de la réponse immunitaire. La fonction des LT-CD4 explique la seconde nomenclature des LT-CD4 : lymphocytes-T helper. Les lymphocytes-T CD4 stimulent la production d'anticorps par les lymphocytes B, stimulent l'activité des macrophages, favorisent le recrutement des neutrophiles, éosinophiles et basophiles sur les sites d'inflammation et d'infection. Il existe des sous-populations de LT-CD4 qui possèdent une action cellulaire directe, sans production de cytokines. Il s'agit d'une différenciation spécifique des LT-CD4 en lymphocyte-T régulateur (Treg) et en lymphocyte-T cytotoxique (CTL) (Luckheeram et al., 2012). Il existe plusieurs sous-populations de LT-CD4, elles sont

le fruit de plusieurs étapes allant de la lymphopoïèse, en passant par la maturation des LT-CD4, l'activation des LT-CD4 et la différenciation (polarisation) en effecteurs différenciés.

b) Lymphopoïèse aboutissant à la différenciation des lymphocytes-T-CD4

L'hématopoïèse est un processus permettant le renouvellement des cellules sanguines, dont les érythrocytes, les plaquettes, les cellules immunitaires innées (monocytes, cellules dendritiques), les natural killer (NK) ainsi que les cellules lymphocytaires. Tous ces types cellulaires, ayant des fonctions variées, sont différenciés à partir de la cellule souche hématopoïétique (CSH). La CSH a la propriété de multipotence et d'auto renouvellement et est caractérisée par l'expression membranaire spécifique d'une glycoprophosphoprotéine : CD34 (Berenson et al., 1988). La CSH CD34⁺ est à l'origine des progéniteurs granulocytaires-monocytaires et des progéniteurs bipotents mégacaryocytaires-érythrocytaires. Lors de l'hématopoïèse, la CSH se différencie aussi en progéniteur lympho-granulo-macrophagique, ce progéniteur exprime spécifiquement les récepteurs de surface CD34 et CD45RA. Ce progéniteur CD34⁺CD45RA⁺ est à l'origine de la diversification primaire des lignages lymphoïdes, monocytaires et dendritique aussi référencés comme la fraction de progéniteur lympho-mono-dendritique (PLMD). Le progéniteur PLMD se différencie en deux sous-fractions : les précurseurs monocytaires et dendritiques appelés (PMD) et les progéniteurs lymphomyéloïdes (PLM). La fraction PLM à son tour se différencie en deux populations de progéniteurs lymphoïdes précoces (PLP) qui expriment les récepteurs de surface CD45RA, CD10 et IL-7R α (Haddad et al., 2004). La lignée qui se différencie à partir du progéniteur PMD ne sera pas à l'origine de la lignée lymphocytaire. Les deux fractions PLP sont les précurseurs des lignées de lymphocyte-T, de lymphocyte natural killer et de lymphocyte-B (**Figure 10**) (Haddad et al., 2004) (Hussen et al., 2018).

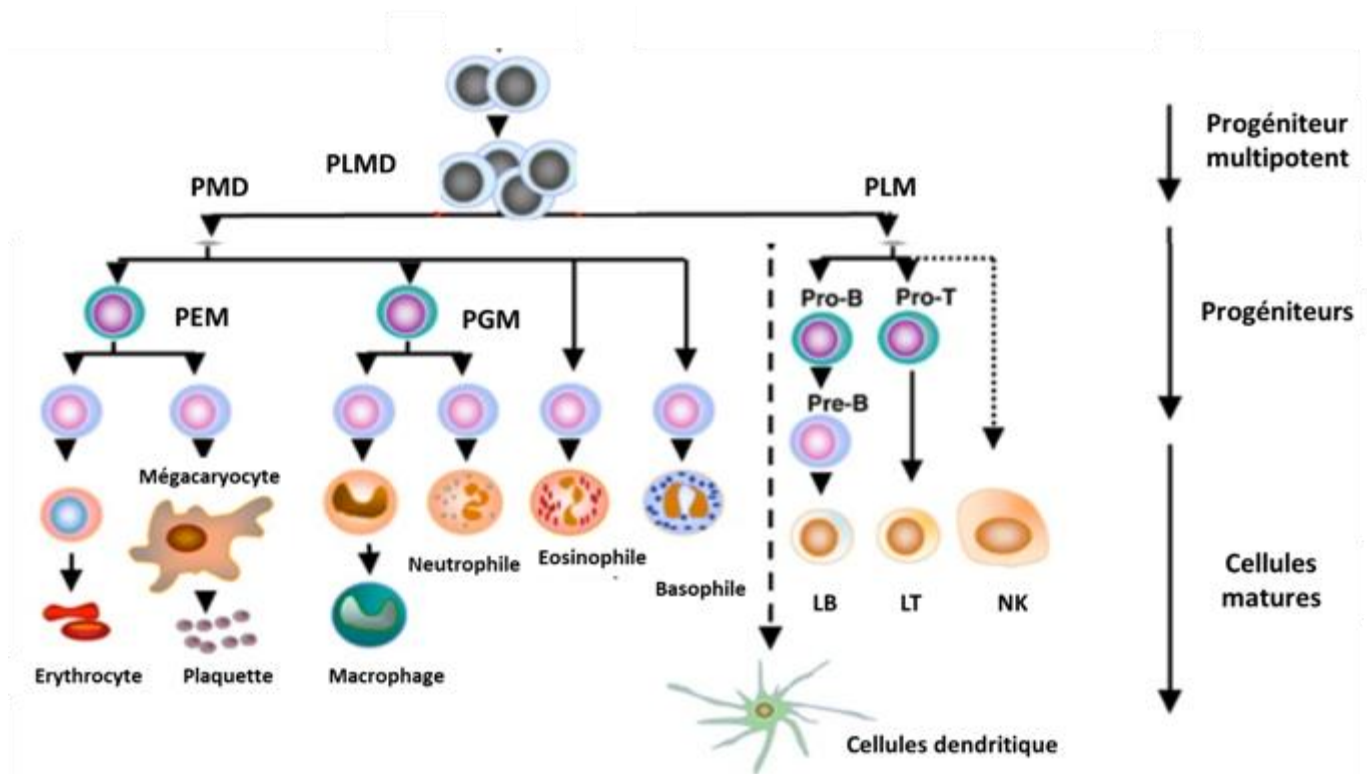


Figure 10: Représentation simplifiée de l'hématopoïèse humaine de l'adulte à partir d'une cellule souche hématopoïétique

Schéma simplifié de la différenciation d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) en progéniteurs lymphocytaire-mono-dendritique (PLMD), puis en progéniteurs mono-dendritique (PMD) et lymphocytaire (PLM). Le progéniteur PMD se différencie en progéniteur erythro-mégakaryocytaire (PEM) et en progéniteur granulo-monocytaire (PGM). Le progéniteur PEM est à l'origine des érythrocytes et des plaquettes, le progéniteur PGM est à l'origine des monocytes/macrophages et des neutrophiles. Le progéniteur lymphocytaire se différencie en deux types de progéniteurs lymphocytaires précoces à l'origine des lymphocytes-T (LT) et lymphocytes-B (LB). Pour la différenciation en lymphocytes-T et lymphocytes-B, il existe des progéniteurs intermédiaires (Pro, Pré) Le progéniteur PLM est aussi à l'origine des lymphocytes natural killer (NK), adapté de (Larsson and Karlsson, 2005).

c) Maturation des lymphocytes-T-CD4 dans les organes lymphoïdes primaires

Les précurseurs précoces de la lignée de lymphocytes-T et/ou leurs descendants (l'identité exacte de la cellule est peu connue) vont être capables de s'extraire de la moelle osseuse et de migrer vers l'organe lymphoïde primaire spécifique des lymphocytes-T : le thymus. Au cours de la maturation progressive aussi appelée : ontogénie des lymphocytes-T, les cellules sont appelées des thymocytes et n'expriment aucun des récepteurs lymphocytaires spécifiques (TCR-, CD3-, CD4-, CD8-). Les cellules immatures thymocytes prolifèrent massivement et acquièrent l'expression des récepteurs spécifiques des lymphocytes : le TCR de type 1 ou TCR de type 2 et le CD3 dans le cortex du thymus. Une minorité (20 %) des cellules vont exprimer à leur surface le TCR-1 (chaînes γ et δ) associé au CD3, ce sont les lymphocytes-T- γ - δ (LT- γ δ). Une seconde partie des thymocytes (20 %) vont exprimer le TCR-2 (chaînes

α et β) associé au CD3 et se différencier en lymphocytes-T-natural killer (LT-NK). La majorité des cellules (60 %) vont acquérir l'expression du TCR-2 associé aux récepteurs CD3, CD4 et CD8, les thymocytes sont alors doubles positifs (CD4+CD8+). Ces thymocytes vont subir un autre élément de différenciation et ne vont conserver l'expression que d'un récepteur CD4 ou CD8, ils sont simples positifs. Les TCR reconnaissant sur les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) les CMH de classe 1 maintiennent l'expression du récepteur CD8 et reconnaissant les CMH de classe 2 maintiennent le récepteur CD4 (Plum et al., 2000). Le choix du maintien de l'expression des récepteurs CD4 ou CD8 dépend du type de CMH et de l'antigène reconnu par le récepteur TCR. La régulation de l'expression des récepteurs CD4 et CD8 dépend aussi de l'induction d'un programme génétique spécifique faisant intervenir les gènes *CD4* et *CD8* et les facteurs de transcriptions ThPOK, RUNX3, BCL11B, et GATA3 (Taniuchi, 2018).

À ce stade de la différenciation, les thymocytes simples positifs sont capables de reconnaître les peptides du non-soi et du soi présentés par la molécule du CMH des cellules présentatrices de l'antigène. Dans le thymus, les cellules épithéliales du cortex ont la capacité de présenter des antigènes par leur CMH. Les prochaines étapes de différenciation vont permettre de sélectionner dans un premier temps uniquement les lymphocytes qui ont la capacité de reconnaître un peptide présenté par un CMH, c'est la sélection positive. La seconde sélection est une sélection négative et permet l'élimination des lymphocytes-T dont le TCR interagit trop fortement avec des antigènes du soi. À l'issue de cette dernière étape, 95 % des thymocytes meurent par apoptose et seulement 5 % des lymphocytes-T-CD4 matures et naïfs vont pouvoir atteindre les organes lymphoïdes secondaires : les nœuds lymphatiques (NL), la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses appelés plaques de Peyer, les amygdales ainsi que les tissus lymphoïdes associés aux voies respiratoires (MALT). Pour entrer dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes-T-CD4 matures et naïfs doivent acquérir l'expression de récepteurs essentiels CCR7 et le CD62L (L-Selectin). Les ligands de ces deux récepteurs sont respectivement les chimiokines CCL19/CCL21 et les motifs Lewis X sialylés des glycoprotéines de l'endothélium qui sont exprimés à la surface des cellules endothéliales. L'interaction entre CCR7 et CD62L et ses ligands favorise le processus d'enroulement et d'adhésion à l'endothélium (Förster et al., 1999) (Cyster, 2000).

d) Activation et différenciation des lymphocytes-T-CD4 naïfs en effecteur T-helper différencié (Th)

Les lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4) sortant du thymus sont naïfs et seront activés en réponse à une stimulation dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans les organes lymphoïdes secondaires, après une interaction avec une cellule présentatrice de l'antigène, les LT-CD4 activent leur récepteur TCR et subissent une différenciation en effecteurs spécifiques différenciés : Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Treg,

Tfh et CTL. Les LT-CD4 ont aussi la possibilité d'acquies un état de mémoires immunitaire : effecteur mémoire (EM), central mémoire (CM) et résident mémoire (RM).

(1) Activation des lymphocytes-T-CD4 naïfs

L'activation des LT-CD4 naïfs à lieu dans les organes lymphoïdes secondaires et dépend d'une stimulation antigénique, c'est-à-dire une interaction entre les récepteurs TCR et CD3 du LT-CD4 et la molécule CMH-II exprimée par une cellule présentatrice de l'antigène (CPA). L'activation majoritaire est réalisée par une interaction du récepteur TCR avec une cellule dendritique, qui reconnaît l'antigène d'un pathogène via ses récepteurs spécifiques : les toll-like-recepteurs (TLR) et les NOD-récepteurs. L'activation par une cellule dendritique, favorise l'activation du récepteur CD28 à la surface des LT-CD4 par les ligands CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2), exprimés à la surface des CPA. Le ligand CD40L exprimé à la surface des LT-CD4 interagit avec le récepteur CD40 présent à la surface des CPA, il s'agit du processus de co-stimulation (**Figure 11**). L'activation des LT-CD4 induit leur prolifération, donc leur sortie de l'état de quiescence métabolique et leur différenciation en effecteurs Th ([Luckheeram et al., 2012](#)) ([Jenkins et al., 2001](#)). Le processus de stimulation peut être mimée en culture *in vitro* et vise à stimuler le TCR et les récepteurs CD3 et CD28.

L'activation des LT-CD4 est caractérisée par l'acquisition de l'expression de molécules de surface spécifiques telles que CD69 et CD25 ([Werfel et al., 1997](#)) ([Shatrova et al., 2016](#)), mais aussi à la perte de molécule de surface telle que CD62L (L-Selectine) et CD127 qui correspond à la chaîne α du récepteur à l'IL-7. La régulation de l'expression de ces deux molécules de surface est détaillée dans la partie 1i de ce chapitre.

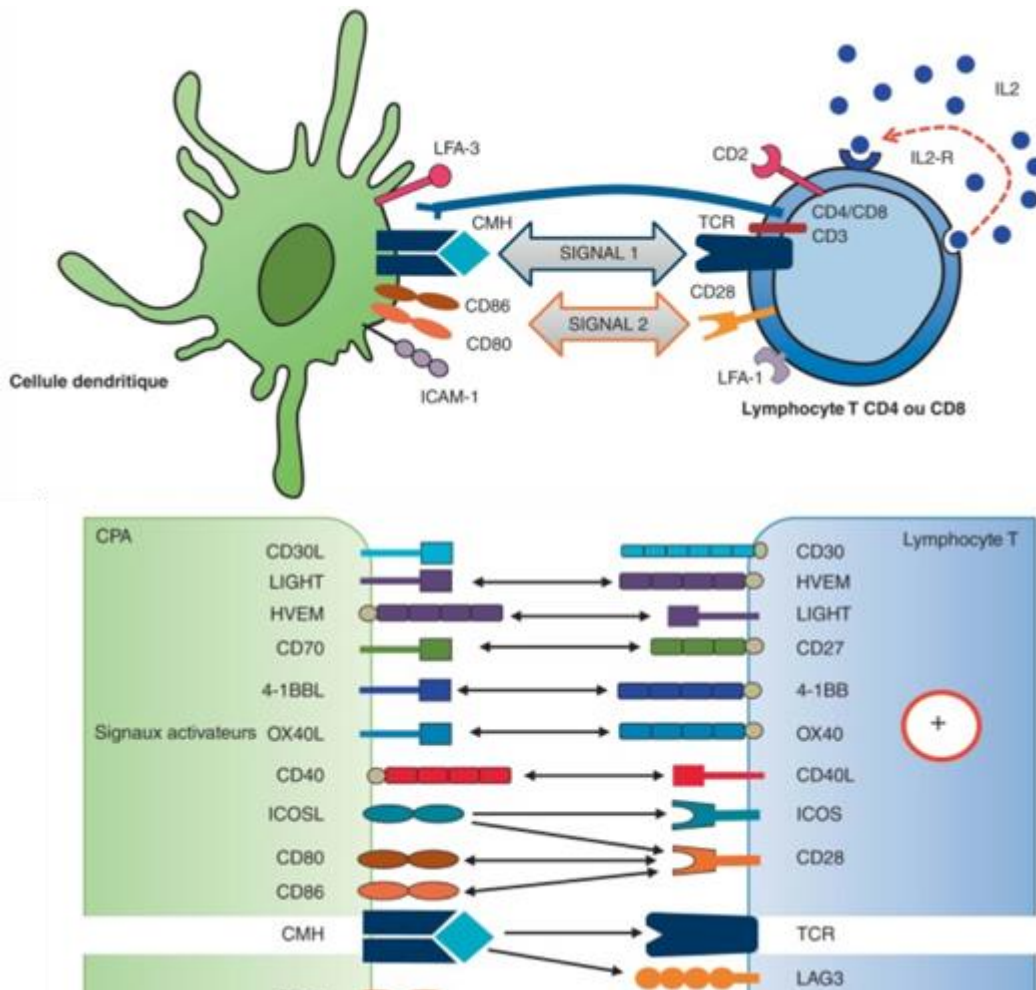


Figure 11 : Principales interactions entre le lymphocytes-T-CD4 et une cellule présentatrice de l'antigène aboutissant à l'activation des lymphocytes-T-CD4, par la stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28

Schéma représentant l'activation ou stimulation d'un lymphocyte-T-CD4 naïf (LT-CD4) par une cellule présentatrice de l'antigène (CPA) (cellule dendritique), par la stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28 interagissant respectivement avec l'antigène présenté par le CMH-II et les ligands CD80 et CD86; et par plusieurs signaux de co-stimulation. Parmi les principaux signaux de co-stimulation, il y a : l'interaction entre le récepteur CD40 exprimé à la surface de la CPA et CD40L exprimé à la surface du LT-CD4 naïf, l'interaction entre ICOS exprimé à la surface du LT-CD4 naïf et ICOSL exprimé par la CPA, l'interaction entre OX40 exprimé à la surface du LT-CD4 naïf et OX40L exprimé à la surface de la CPA, l'interaction entre 4-1BB exprimé à la surface du LT-CD4 naïf et le ligand 4-1BBL exprimé à la surface de la CPA, l'interaction entre CD27 (récepteur) exprimé à la surface du LT-CD4 naïf et CD70 (ligand) exprimé à la surface de la CPA, l'interaction entre HVEM (récepteur) exprimé à la surface de la CPA et LIGHT (ligand) exprimé à la surface du LT-CD4 naïf, et l'interaction entre CD30 exprimé à la surface du LT-CD4 naïf et CD30L exprimé à la surface de la CPA. L'activation permet la différenciation et l'entrée en prolifération des LT-CD4 naïfs (Galaine et al., 2016).

Suite à une activation du TCR des lymphocytes-T-CD4, a lieu le processus de différenciation, aussi référencé comme polarisation. Il existe plusieurs types de différenciation en différents lignages d'effecteurs différenciés (Th). Chaque lignage est spécifique et correspond à une production de combinaison de cytokines spécifiques. Pour chaque lignage, la différenciation dépend d'un environnement cytokinique précis et est extrêmement régulée, notamment par des facteurs de transcriptions. Dans le cadre du sujet de thèse, vont être abordés les effecteurs différenciés (et leurs voies de différenciations respectives) présents dans la circulation sanguine. Les principaux référencés dans la littérature sont les Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, T-régulateur (Treg) et les effecteurs folliculaires (Tfh).

(2) Différenciation, fonctions et identification des Th1

En 1993, les équipes de *Murphy et al* et *O'Garra et al* ont stimulées des LT-CD4 matures et naïfs *in vitro* avec des CPA présentant des antigènes de la bactérie *Listeria monocytogenes* ([Hsieh et al., 1993](#)). Suite à cette stimulation, les cellules LT-CD4 ont été différenciées et produisent de l'IFN- γ . La nomenclature de cette cellule est Th1, pour lymphocyte-T-helper-1 ([Hsieh et al., 1993](#)). L'activation des LT-CD4, dans un contexte cytokinique précis stimule l'expression génique des gènes spécifiques de la différenciation en Th1. En effet, la stimulation du TCR dans un environnement cellulaire contenant de l'IL-12 et de l'IFN- γ va stimuler la transcription du facteur central de la différenciation en Th1 : T-BET. Deux voies de signalisations favorisent la transcription de T-BET, premièrement la voie de signalisation ERK activée par le récepteur de EGR1 exprimé par les LT-CD4. Parallèlement, L'IL-12 et l'IFN- γ de l'environnement cellulaire produits par les cellules dendritiques activent la transcription des facteurs de transcriptions STAT1 et STAT4 qui activent à leur tour la transcription du facteur de transcription T-BET. Les facteurs de transcription T-BET, STAT4 et STAT1 stimulent directement la transcription des gènes codant l'IFN- γ , d'IL-2 et l'IL-12. Les facteurs STAT1 et STAT4 en stimulant la transcription de T-BET sont à l'origine d'une amplification ou rétrocontrôle positif de la signalisation IFN- γ /IL-12. Le facteur de transcription T-BET stimule la transcription des gènes codant pour IFN- γ et le récepteur à l'IL-12 (IL-12R β). Le récepteur à l'IL-12 entraîne une voie de signalisation qui inhibe la transcription des gènes codant pour l'IL-4 spécifique de la différenciation Th2 et la transcription de ROR γ essentiel à la différenciation en Th17. Cela renforce donc la différenciation vers le lignage Th1 ([Zhu and Paul, 2008](#)) ([Luckheeram et al., 2012](#)).

Fonctions cellulaires des Th1 :

Les Th1 sont des acteurs de la réponse cellulaire et permettent l'élimination des pathogènes intracellulaires tels que *Salmonella typhimurium* et *Mycobacterium tuberculosis* ([Hohl, 2015](#)). L'IFN- γ sécrété par les Th1 active les cellules polynucléaires phagocytaires (macrophages, cellules microgliales,

cellules dendritiques). L'IL-2 stimule l'activité cytotoxique des lymphocytes-CD8 et des lymphocytes-natural-killer. Les Th1 régulent l'inflammation en réponse à une infection par allergène (Cohn et al., 2014).

Identification des Th1 :

En biologie, l'expression de récepteurs de surface est utilisée afin d'identifier, par la technique de cryométrie en flux, les sous-populations lymphocytaires de LT-CD4. Les Th1 sont caractérisés par l'expression de CXCR3 et CCR5 et par l'absence d'expression de CCR6 et CCR4. Des marquages intracellulaires de cytokines spécifiques, nécessitant la fixation et la perméabilisation des cellules, permettent aussi de caractériser les sous-populations lymphocytaires de LT-CD4. Ainsi les cellules positives à un immunomarquage pour l'IFN- γ et l'IL-2 sont identifiées comme Th1. Enfin, il est possible d'identifier les Th1 par l'expression transcriptionnelle de T-BET et STAT4 (**Tableau 3**).

(3) Différenciation, fonctions et identification des Th2

En 1986, les travaux de *Mossmann et al*, *Coffman et al* et *Bottomly et al* ont mis en lumière une première différenciation de LT-CD4 matures et naïfs en culture *in vitro* (Mosmann et al., 1986) (Bottomly, 1988). Ces travaux ont été confirmés en 1990 par les résultats de *Le Gros et al* et *Swain et al*, qui démontrent que la stimulation antigénique en présence d'IL-4 conduit à une différenciation des LT-CD4 associées à la production et la sécrétion d'IL-4. Leurs travaux ont démontré que cette différenciation dépend de la présence d'IL-2 et de facteurs de transcription dans le milieu. Les LT-CD4 produisant de l'IL-4 ont comme nomenclature Th2 pour lymphocyte-T-helper-2 (Le Gros, 1990) (Swain et al., 1990). En effet, la présence d'IL-2 et d'IL-4 dans l'environnement cellulaire est propice à une différenciation des LT-CD4 matures et naïfs en Th2. L'IL-4 permet l'activation du facteur STAT6, celui-ci recrute STAT3 et active le facteur clé de la différenciation GATA3. GATA3 se fixe sur un locus du gène codant l'IL-4. L'IL-2 permet l'activation du facteur STAT-5, qui se fixe sur un second locus du gène codant l'IL-4. La fixation de GATA3 et de STAT5 sur le gène codant l'IL-4 stimule la transcription de celui-ci. Le facteur GATA3 actif recrute la protéine GFI-1 qui stimule la prolifération des Th2. Le facteur GATA3 réprime la différenciation vers le lignage Th1 en inhibant directement la transcription de T-BET et STAT4, protéines centrales de la différenciation Th1 (Stark et al., 2019) (Luckheeram et al., 2012). Une seconde voie de différenciation en Th2 est indépendante de la présence d'IL-4 dans le milieu, en effet les CPA sécrètent de l'IL-6 qui active le facteur NFAT capable de stimuler la transcription du gène codant l'IL-4. L'IL-6 en activant la protéine SOCS-1 réprime la différenciation Th1 en inhibant STAT1 (Diehl and Rincón, 2002). Les Th2 sécrètent principalement de l'IL4, mais aussi de l'IL-5, de l'IL-10 et de l'IL-13.

Fonctions cellulaires des Th2 :

Les Th2 ont un rôle majeur dans l'élimination des pathogènes extracellulaires bactériens et parasitaires et dans la stimulation de la réponse humorale médiée par les lymphocytes-B. L'IL-4 et l'IL-13 produits par les Th2 régulent l'activation des lymphocytes-B stimulant ainsi la production d'anticorps et le basculement « switch » d'immunoglobulines d'IgG1 vers IgE à la surface des lymphocytes-B. Les Th2 recrutent les éosinophiles et basophiles sur le site de l'inflammation (Xu et al., 2019). Les Th2 stimulent la production de mucus par les cellules épithéliales. Une réponse excessive des Th2 est associée au développement de pathologie dont les allergies et l'asthme (Carty et al., 2018).

Identification des Th2 :

Les Th2 sont caractérisés par l'expression des récepteurs de surface CCR4 et CRTH2 et par l'absence de CCR6 et CXCR3. Il est possible d'identifier par immunomarquage intracellulaire, les cellules exprimant l'ensemble des cytokines de type Th2 : IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13. Enfin, il est possible d'identifier les Th2 par l'expression transcriptionnelle de GATA3 et STAT5 (**Tableau 3**).

(4) Différenciation, fonctions et identification des Th17

Les travaux de *Stockinger et al* et *Weaver et al* ont démontrés qu'une stimulation *in vitro* peut induire une différenciation de LT-CD4 en type cellulaire qui n'exprime pas l'IL-4 et l'IFN- γ , mais exprime l'IL-21 et l'IL-17. Ces cellules ont comme nomenclature Th17 pour lymphocyte-T-helper-17 (Bettelli et al., 2006) (Weaver et al., 2007). La différenciation des Th17 est induite en 3 étapes faisant intervenir différentes cytokines produites principalement par les CPA : IL-6, IL-21 et l'IL-23 et le TFG- β à faible concentration. La première étape permet l'activation transcriptionnelle des gènes codant l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et le récepteur à l'IL-23 (IL-23R). L'IL-6 et le TFG- β activent le facteur clé de la différenciation en Th17 : ROR- γ -t, qui active la transcription des gènes codant l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et le récepteur à l'IL-23 (IL-23R). L'IL-6, l'IL-21 active le facteur STAT3 qui active ROR- γ -t, et module aussi directement l'expression des gènes cibles de ROR- γ -t. Le facteur RUNX1 permet également l'activation de ROR- γ -t. La seconde étape de la différenciation correspond à la voie d'autoamplification médiée par l'activation transcriptionnelle du gène codant l'IL-21. L'IL-21 interagit avec le TGF β et renforce la signalisation de différenciation. Enfin, la dernière étape permet l'expansion et le maintien des cellules différenciées en Th17, en réponse à l'IL-23 produit par les CPA. Le facteur AHR réprime l'expression des facteurs STAT1 et STAT5 ce qui bloque la différenciation en d'autres lignages Th (Schmitt and Ueno, 2015) (Luckheeram et al., 2012).

Fonctions cellulaires des Th17 :

Les Th17 participent à la réponse immunitaire contre les pathogènes extracellulaires de type bactériens et fongiques. Les Th17 ont un rôle dans le développement de pathologies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, psoriasis, inflammation intestinale) et dans le développement de l'asthme. Les cytokines produites par les Th17 stimulent le recrutement des neutrophiles sur le site d'inflammation. L'IL-22 produit par les Th17 stimule la sécrétion de peptides antibactériens par les muqueuses. Enfin, l'IL-21 produit par les Th17 stimule la différenciation des lymphocytes-B en plasmocytes et stimule l'activation des lymphocytes-NK (Korn et al., 2009).

Identification des Th17 :

L'étude de l'expression des récepteurs de surface des Th17 est en constante évolution, à ce jour, il est difficile de trouver un consensus parmi l'ensemble des études. Toutefois, il semble clair que les Th17 expriment le marqueur de surface CCR6 (Mousset et al., 2019). Certaines études associent l'expression du CCR6 au CCR4, au CXCR3 et à l'IL-23R. L'expression transcriptionnelle de ROR- γ -t et du facteur STAT3 permet de caractériser les Th17. Enfin, il est possible de caractériser les Th17 par immunomarquage intracellulaire des cytokines spécifiques : IL-17, IL-22 et l'IL-21 (Tableau 3).

Plasticité des Th17 :

En fonction de leur environnement cytokinique, les Th17 qui ne sont pas aussi stables que les Th1 et Th2 vont moduler leur fonction, c'est le processus de plasticité des Th17. Il existe plusieurs types de plasticité des Th17, les mieux décrits sont Th1-Th17 et Treg-Th17. Ces populations sont caractérisées par leur profil de sécrétion de cytokines qui diffère de celui des Th17. En effet, les Th1-Th17 secrètent de l'IFN- γ . Ces cellules expriment les facteurs ROR- γ -t et T-BET et se caractérisent par l'expression de récepteurs de surface CCR6 et CD161. Un environnement cytokinique à forte concentration d'IL-6 et de TGF- β stimule la plasticité Treg-Th17. Les Treg-Th17 sont caractérisés par l'expression de ROR- γ -t et FOXP3 et produisent de l'IL-17 bien que dotés des propriétés suppressives caractéristiques des Treg (Guéry and Hugues, 2015).

(5) Différenciation, fonctions et identification des Th9

Une étude réalisée par Schmitt et al en 1994 avait déjà mis en lumière la production d'IL-9 par les LT-CD4 en réponse à une stimulation in vitro. La production d'IL-9 dans leur étude est dépendante de l'IL-2, du TGF- β et d'IL-4 (Schmitt et al., 1994). Toutefois, la caractérisation des Th9 qui produisent de l'IL-9 a été réalisée en 2008. Un large panel de cytokines dont l'IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-21, IL-25 et le TGF- β présents dans l'environnement activent une différenciation en Th9 (Veldhoen et al., 2008) (Dardalhon et al., 2008). Ces cellules produisent de l'IL-9 et l'IL-10, dont la transcription du gène est

activée par plusieurs facteurs. Les voies de signalisations de la différenciation en Th9 sont complexes, car elles sont communes avec d'autres sous-populations effectrices Th. En effet, la littérature référence des signalisations médiées par GATA3 et STAT6 communes à la signalisation Th2, par les protéines de types SMAD communes à la signalisation Treg. Les facteurs IRF4, PU-1 et NFAT1, ayant un rôle dans la différenciation Th1 et Th2, stimulent la transcription du gène IL-9 (Kaplan, 2017).

Fonctions cellulaires des Th9 :

Ces cellules sont décrites principalement dans un contexte pathologique de type allergies, auto-immunes et de pathologies cancéreuses chez l'homme. Les cellules Th9 identifiées comme positives au marquage IL-9 sont retrouvées dans le sang de patients allergiques. Dans ce contexte, les Th9 stimulent le recrutement des éosinophiles et des mastocytes, induisent la métaplasie des cellules en gobelet de l'épithélium respiratoire et stimulent la production d'IgE par les plasmocytes. Dans un contexte tumoral, les Th9 favorisent le recrutement des LT-CD8 ayant une activité cytotoxique (Kaplan, 2013).

Identification des Th9 :

Les Th9 sont identifiées par l'expression des récepteurs de surfaces CCR6, CCR3 et CXCR3 et par l'absence des récepteurs CCR4 et CRTH2 spécifiques des Th2. Les cellules Th9 sont identifiées comme les cellules positives à un immunomarquage intracellulaire de l'IL-9 (Tableau 3).

(6) Différenciation, fonctions et identification des Th22

La caractérisation de la population cellulaire Th22 est assez récente, l'article qui décrit cette population a été publié en 2009 (Duhon et al., 2009). Cette population a d'abord été caractérisée par la production d'IL-22, cependant les Th17 sont aussi capables de produire de l'IL-22. Ainsi, les Th22 sont caractérisés par la production d'IL-22 et l'absence de production d'IL-17 et d'IFN- γ qui sont spécifiques des Th17 et Th1. La différenciation des Th22 est régulée par T-BET (facteur régulant la différenciation Th1) et le récepteur de l'Aryl hydrocarbure (AHR) (Gregor et al., 2017).

Fonctions cellulaires des Th22 :

Les Th22 sont très présents dans l'épithélium de la peau et ont un rôle majeur dans la réponse antibactérienne et antifongique. Les Th22 favorisent la réparation des dommages aux barrières épithéliales, en stimulent la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Les Th22 favorisent la sécrétion de peptides antimicrobiens et de chimiokines dans l'environnement, ce qui stimulent le recrutement d'autres lymphocytes T effecteurs (Gregor et al., 2017).

Identification des Th22 :

Les Th22 sont caractérisés par l'expression des récepteurs de surface CCR4, CCR10, CCR6, CXCR6, CCR2 et CCR5. Les cellules Th22 sont identifiées comme les cellules positives à un immunomarquage intracellulaire de l'IL-22 et négatives à un immunomarquage de l'IL-17 (Plank et al., 2017) (Tableau 3).

(7) Différenciation, fonctions et identification des Treg

Les travaux de *Weiner et al* en 1994 ont démontrés une nouvelle voie de différenciation de LT-CD4 associée à la production de TGF- β . Cette population a été dans un premier temps nommée Th3 (Chen et al., 1994). La nomenclature Th3 a évolué vers T-reg pour lymphocyte-T-régulateur expliqué par la fonction immunorégulatrice de ces cellules. Il existe deux populations de Treg, les natural-Treg (n-Treg) dont la différenciation a lieu dans le thymus, ainsi les n-Treg possèdent toutes les caractéristiques de Treg, à savoir l'expression transcriptionnelle de *Foxp3* et l'expression de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25), en restant sous état naïf. La survie des n-Treg dépend de la présence d'IL-2. Le processus de différenciation après une stimulation de LT-CD4 matures et naïfs aboutit au Treg-induit (i-Treg). Les n-Treg se différencient des i-Treg par l'expression de la protéine Neuropiline-1 (NRP-1). La différenciation en i-Treg est induite par l'IL-2 et le TGF- β présents dans l'environnement cellulaire. Le TGF- β active par phosphorylation les facteurs de transcriptions SMAD2 et SMAD3 qui activent à leur tour la transcription du facteur clé de la différenciation i-Treg : FOXP3. SMAD3 réprime la signalisation de différenciation en Th17 en inhibant la transcription du facteur ROR- γ -t. l'IL-2 active le facteur STAT5 qui à son tour stimule la transcription du gène codant FOXP3 (Koizumi and Ishikawa, 2019).

Fonctions cellulaires des Treg :

Les cellules Treg sont nommées à partir de leur fonction majeure, à savoir une fonction immunosuppressive sur les autres populations de LT-CD4 effectrices et sur les LT-CD8. Les Treg inhibent l'activation des LT-CD4 naïfs en bloquant la présentation d'antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène. Les Treg capturent l'IL-2 essentiel à la survie et à la différenciation des autres populations d'effecteurs, présent dans le milieu et par compétition, privent les autres sous-populations d'effecteurs différenciés Th (Josefowicz et al., 2012). Les Treg produisent des cytokines anti-inflammatoires immunosuppressives d'IL-10, l'IL-35 et le TGF- β . L'IL-35 produit par les Tregs déclenche l'arrêt du cycle cellulaire et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires des autres populations d'effecteurs différenciés Th. Les Tregs produisent la Galectine-1 (GAL-1) qui induit l'apoptose des cellules exprimant les récepteurs de surfaces CD45, CD43 et CD7. Les Tregs ont la capacité d'induire l'apoptose des sous-populations d'effecteurs différenciés Th en activant le facteur pro-apoptotique BIM. Enfin les Treg régulent et inhibent la prolifération des autres effecteurs différenciés Th en produisant de l'adénosine monophosphate cyclique (AMP) (Siri et al., 2012).

Identification des Treg :

Les Treg sont caractérisés par l'expression du récepteur de surface CD25, l'absence d'expression du récepteur de surface CD127. L'expression spécifique du facteur de transcription FOXP3 est utilisée afin d'identifier et de marquer les Tregs par la technique d'immunomarquage intracellulaire. Enfin, l'expression de la protéine de surface NRP-1 permet de discriminer entre n-Treg et i-Treg (Siri et al., 2012) (Tableau 3).

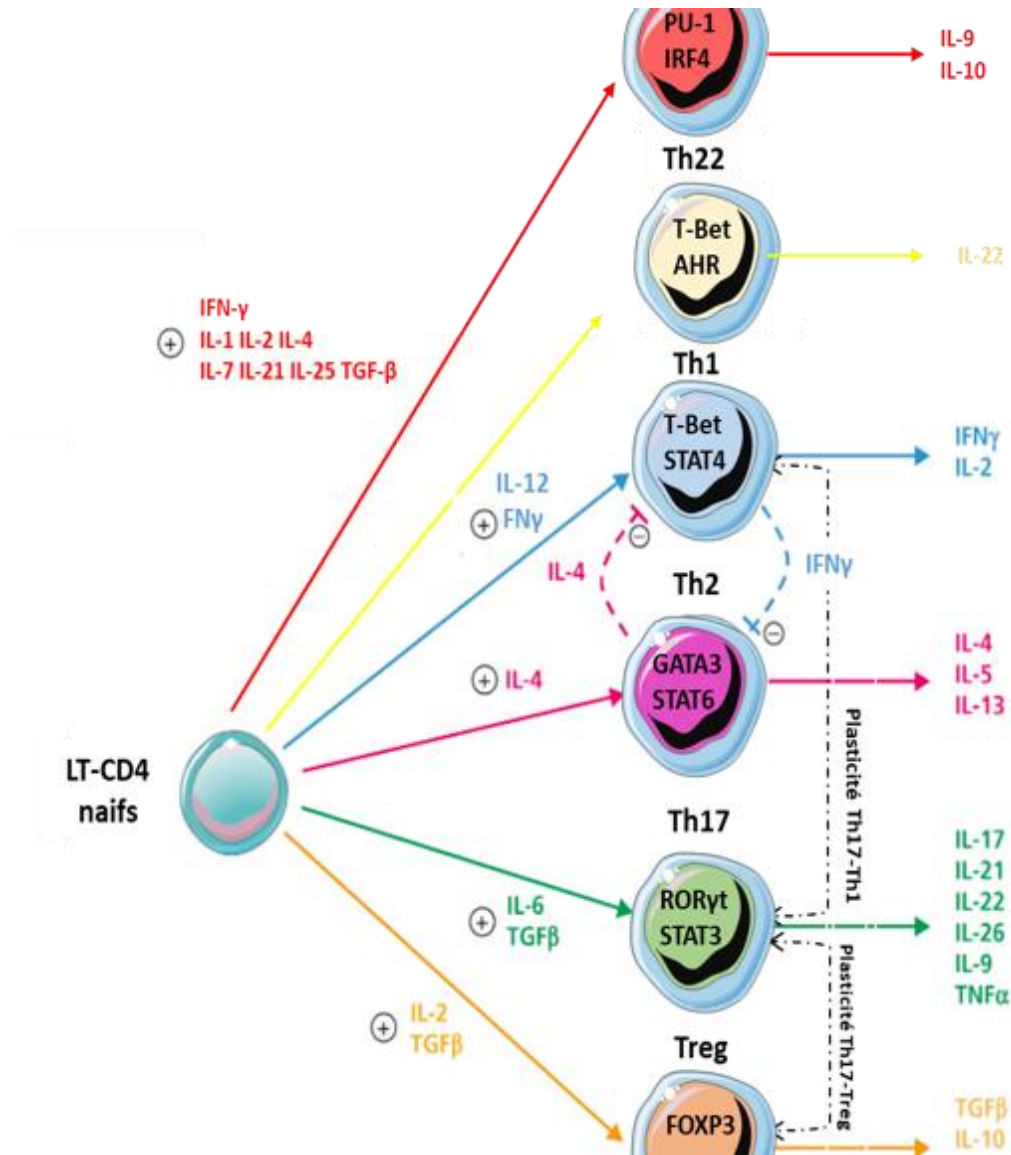


Figure 12 : Différenciation des principaux effecteurs T-helper différenciés (Th) de lymphocytes-T-CD4 circulants

Schéma des types de différenciations d'un lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4) naïf en effecteurs de type T-helper (Th) Th9, Th22, Th1, Th2, Th17 et Treg. Chaque voie de différenciation dépend d'un environnement cytokinique (signal d'induction) spécifique qui figure sur le schéma. Ainsi, la différenciation en Th9 dépend de l'IFN- γ , de l'IL-1, de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-7, de l'IL-21, de l'IL-25 et du TGF- β , la différenciation en Th1 dépend de l'IL-12 et de l'IFN- γ , la différenciation en Th2 dépend de l'IL-4, la différenciation en Th17 dépend de l'IL-6 et du TGF- β et la différenciation en Treg dépend du TGF- β . Chaque voie de différenciation fait intervenir des facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, la différenciation en Th9 nécessite l'action des facteurs de transcriptions PU-1 et IRF4, la différenciation en Th22 des facteurs de transcriptions T-Bet et AHR, la différenciation en Th1 des facteurs de transcriptions T-Bet et STAT4, la différenciation en Th2 des facteurs de transcriptions GATA3 et STAT6, la différenciation en Th17 des facteurs de transcriptions ROR γ t et STAT3 et la différenciation en Treg du facteur de transcription FOXP3. Chaque effecteurs différenciés Th produit des cytokines spécifiques qui figures sur le schéma respectivement à côté de chaque effecteur différencié Th adapté de (Boschetti et al., 2012).

(8) Différenciation, fonctions et identification des lymphocytes-T-CD4 à activité cytotoxique (CTL)

Dans les années 2000, une population de LT-CD4 possédant les mêmes caractéristiques cytotoxiques que les LT-CD8 a été décrite. Elle a été nommée LT-CD4 cytotoxique (CTL) en référence à ses fonctions. Cette population sécrète des granules cytotoxiques contenant les protéines de type granzyme-B et perforine qui lors du processus de dégranulation induisent la destruction de la cellule cible. Les LT-CD4-CTL produisent et sécrètent des cytokines de type Th1 (IFN- γ , IL-2) et du TFN- α (Appay et al., 2002). Ces cellules ont été décrites dans des contextes d'infections virales *in-vivo* (CMV, HIV, Influenza, hépatite) (Aslan et al., 2006) (Zaunders et al., 2004) (van Leeuwen et al., 2004), de maladies auto-immunes (Thewissen et al., 2007), participent à la réponse anti-tumorale et sont retrouvées en nombre plus important chez les personnes très âgées (Hashimoto et al., 2019). Il est possible d'obtenir des LT-CD4-CTL en culture *in vitro* en réponse à une stimulation avec un antigène de manière prolongée (Fleischer, 1984).

Les LT-CD4-CTL se différencient à partir de LT-CD4 matures et naïfs et de tout type d'effecteurs différenciés Th. Majoritairement, les LT-CD4-CTL différencient à partir de l'effecteur Th1. La différenciation en effecteur CTL est régulée par deux facteurs de transcription clé T-BET et EOMES, qui stimulent la transcription des gènes codants les protéines de type granzymes-B et perforines (Glimcher et al., 2004). Certaines études indiquent qu'il est possible que certaines cellules acquièrent progressivement une activité cytotoxique après plusieurs différenciations. Ainsi, la nomenclature CTL ne représenterait pas une population uniforme, mais plutôt l'acquisition d'une fonction cellulaire supplémentaire (Takeuchi and Saito, 2017).

Identification des LT-CD4-CTL :

De la même manière que les autres effecteurs différenciés Th lymphocytaires, les LT-CD4-CTL sont caractérisés par l'expression de récepteurs de surfaces. Ces récepteurs sont communs avec ceux exprimés à la surface des lymphocytes NK et LT-CD8 et sont corrélés à la fonction cytotoxique. L'expression membranaire des récepteurs NKG2A et NKG2D et des glycoprotéines LAMP1 et LAMP2 sont exprimés à la surface des CTL et sont corrélés au processus de dé-granulation (Lanier, 2008) (Graham et al., 2007). L'expression du récepteur CRTAM exprimé par les LT-CD4-CTL est corrélée aux premières étapes de la différenciation (Arase et al., 2005). Les cellules LT-CD4-CTL expriment la molécule de surface CD57 et il est possible qu'elles perdent l'expression progressivement des récepteurs CD27 et CD28 (Phetsouphanh et al., 2019) (Casazza et al., 2006) (Tableau 3).

(9) Différenciation, fonction et identification des Tfh

Les lymphocytes-effecteurs-folliculaires (Tfh) sont des effecteurs qui se différencient à partir des cellules LT-CD4 matures et naïfs. Les Tfh ont la spécificité d'être présents uniquement dans les organes folliculaires, ces cellules stimulent le développement et la réponse cellulaire des lymphocytes-B. La différenciation en Tfh est induite par la présence d'IL-12, d'IL-23 et de TGF- β et est régulée par les facteurs de transcription BCL6, ASCL2, C-MAF et BATF. Les Tfh sont caractérisés par l'expression du récepteur de surface CXCR5 qui est essentiel à leur migration jusqu'aux organes folliculaires, et du récepteur CXCR4 essentiel à leur localisation dans les « zones sombres » des organes folliculaires.

	Th1	Th2	Th17	Th1- Th17	Treg- Th17	Th9	Th22	Treg	CTL	Tfh
Signaux d'induction	IL-12 IFN- γ IL-2	IL-2 IL-4	IL-6 IL-21 IL-23 TGF- β		IL-6 TGF- β	IFN- γ IL-1 IL-2 IL-4 IL-7 IL-21 IL-25 TGF- β		TGF- β IL-2		IL-12 IL-23 TGF- β
Facteur de transcription	T-BET STAT1 STAT4	GATA3 STAT5 STAT6 STAT3	ROR- γ -t STAT3 RUNX1	ROR- γ -t T-BET	ROR- γ -t FOXP3	GATA3 STAT6 IRF4 PU-1 SMADs	T-BET AHR	FOXP2 NEUROILINE1 SMAD2 SMAD3 STAT5		BCL6 ASCL2 C-MAF BATF
Récepteurs de surface	CXCR3 CCR5 CCR6 CCR4	CCR4 CRTH2 CCR6 CXCR3	CCR6 CCR4 ? CXCR3 ? IL23R	CCR6 CXCR3 ? CD161		CCR6 CXCR3 CCR3 CCR4 CRTH2	CCR4 CCR10 CCR6 CXCR6 CCR2 CCR5	CD25 CD127	NKG2A NKG2D CD57 LAMP	CXCR5 CXCR4
Sécrétome	IFN- γ IL-2 IL-12	IL-4 IL-5 IL-10 IL-13	IL-17 IL-22 IL-21	IFN- γ	IL-7	IL-9 IL-10	IL-22 IL-17	IL-10 IL-32 TGF- β	Granzyme Perforine	

Tableau 3 : Récapitulatif de la caractérisation des lymphocytes-T-CD4 effecteurs différenciés Th circulants

Résumé de la caractérisation des effecteurs de lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4) de type T-helper (Th) : Th1, Th2, Th17, Th1-Th17, Th17-Treg, Th9, Th22, Treg, CTL et Tfh ; incluant les signaux d'induction de la différenciation, les facteurs de transcription exprimés, les récepteurs de surface exprimés et les molécules sécrétées. Parmi les récepteurs de surface, sont notifiés en rouge les récepteurs de surface qui ne sont pas exprimés dans l'effecteur Th, adapté (Stadhouders et al., 2018).

e) Fonctions des effecteurs différenciés T-helper de lymphocytes-T-CD4 dans le microenvironnement tumoral

Au sein de la tumeur coexistent différents types d'effecteurs différenciés de lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4) qui par leur sécrétomes influencent les actions cellulaires des cellules immunitaires. Les lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4) reconnaissent les antigènes présentés par la molécule CMH-II et sont aussi référencés comme T-helper (traduit comme lymphocytes-T-aidant) n'ont pas d'actions cellulaires ciblant directement les cellules tumorales, à l'exception des lymphocytes-T-CD4 à activité cytotoxique (LT-CD4-CTL). Après la maturation et l'activation des LT-CD4, les cellules se différencient en effecteurs spécifiques dont la fonction principale est la production de cytokines. Ces cytokines modulent l'environnement cellulaire, dont les actions cellulaires des LT-CD8 cytotoxiques. La compréhension du rôle des effecteurs de type Th est complexe, ainsi sera détaillé le rôle des principaux effecteurs tumoraux : T-régulateur (Treg), T-helper1 (Th1), T-helper2 (Th2) et T-helper17 (Th17). Des expériences de déplétion des Treg CD4+CD25+ chez la souris ont démontré la fonction immunosuppressive des Treg sur les autres types de lymphocytes ([Shmizuji et al](#)), médiée principalement par la sécrétion de TGF-beta, d'IL-10 et d'IL-35 et inhibe donc la fonction cytotoxique anti-tumorale des LT-CD8, en inhibant la production des granzymes, perforines, des ligands pro-apoptotiques de type FAS et de l'IFN-gamma ([Maj et al., 2017](#)).

Les Th1 produisent et sécrètent de l'IFN-gamma qui est une cytokine principalement anti-tumorale. L'IFN-gamma stimule l'activation des cellules à activité cytotoxique LT-CD8 et des NK, favorise la présentation d'antigènes tumoraux en augmentant l'expression de la molécule CMH par les cellules dendritiques, stimule la différenciation en macrophage anti-tumoral M1 et inhibe l'action immunosuppressive médiée par les Treg. L'INF-gamma participe à l'échappement des systèmes d'immunosurveillance en favorisant l'expression de PD-1 dans les cellules tumorales ([Castro et al., 2018](#)). Les Th17 produisent de l'IL-17 qui en fonction des types de tumeurs et du type d'étude est décrit comme ayant des fonctions anti-tumorales et pro-tumorales. La présence d'IL-17 est associée à l'augmentation d'inflammation dans l'environnement tumoral, stimule l'angiogenèse qui est en faveur de la survie des cellules, mais l'IL-17 stimule aussi l'activation des cellules anti-tumorales à activité cytotoxique LT-CD8 et NK ([Qian et al., 2017](#)). Appréhender la fonction des Th2 semble aussi complexe que celle des Th17, en effet l'action de l'IL-4 produite par les Th2 a des actions pro et anti-tumorales. L'IL-4 favorise la croissance tumorale et l'angiogenèse, ce qui est en faveur du développement de la tumeur. Toutefois, l'IL-4 permet le recrutement au sein de l'environnement tumoral de cellules anti-tumorales telles que les éosinophiles et les macrophages, et est capable d'activer la mort cellulaire par nécrose des cellules tumorales, ce qui est en défaveur du développement de la tumeur ([Ellyard et al., 2007](#)). Les Th9 font partie des plus récents types de Th décrits dans l'environnement tumoral, leur

fonction dépend du type de cancer. En effet, les Th9 et plus précisément les cytokines IL-9 et IL-10 produites par les Th9 sont associées à une réponse pro-tumorale dans un contexte de cancer hématologique et sont associées à un rôle anti-tumoral dans un contexte de cancer solide tel que : mélanome, poumons, côlon et le sein (Zheng and Lu, 2020). L'action anti-tumorale de l'IL-9 peut être indirecte et est médiée d'une part, par la stimulation de l'expression des molécules de CMH-I par les cellules dendritiques favorisant l'activation des cellules cytotoxiques, dont les LT-CD8 par les cellules dendritiques (Dabadghao et al., 1998). D'autre part par l'activation et le recrutement des mastocytes sur le site de la tumeur inhibant la croissance tumorale (Stassen et al., 2000). L'IL-9 a une action anti-tumorale directe, en stimulant la voie apoptotique extrinsèque dans les cellules tumorales (Fang et al., 2015).

Les études de l'action cellulaire directe ciblant les cellules tumorales, se sont concentrées sur les LT-CD8 cytotoxiques, puis il a été mis en lumière que les LT-CD4 sont capables d'acquies des fonctions cytotoxiques et lytiques. Ces cellules expriment un récepteur CD4 et les mêmes récepteurs de surface que les LT-CD8 cytotoxiques et les LT-NK (NKG2A, NKG2D) et sont capables d'induire la mort cellulaire après l'exocytose des granules contenant des granzymes (Cheroutre and Husain, 2013). Dans un modèle expérimental de mélanome murin, il a été démontré que la différenciation de toutes les cellules CD4+ en LT-CD4 cytotoxique permet d'éradiquer la tumeur chez la souris. La même étude démontre qu'il existe une synergie dans l'action anti-tumoral des LT-CD4 et LT-CD8 cytotoxiques (Thiault et al., 2020). L'action des LT-CD4 anti-tumorale a aussi été décrite après différenciation *in vitro* dans un modèle de mélanome murin (Quezada et al., 2010). Les principaux rôles des LT-CD4 effecteurs différenciés Th sur les cellules cancéreuses sont schématisés en **Figure 13**.

La compréhension de l'impact des cytokines produites par les différents effecteurs de LT-CD4 (Th) et l'action cytotoxique des LT-CD4 pourrait favoriser l'émergence de stratégies thérapeutiques visant à inhiber le développement tumoral et à potentialiser l'activation des lymphocytes-T-CD8 et T-CD4 cytotoxique en combinaison des traitements d'immunothérapie de radiothérapie pour stimuler les signalisations anti-tumorales.

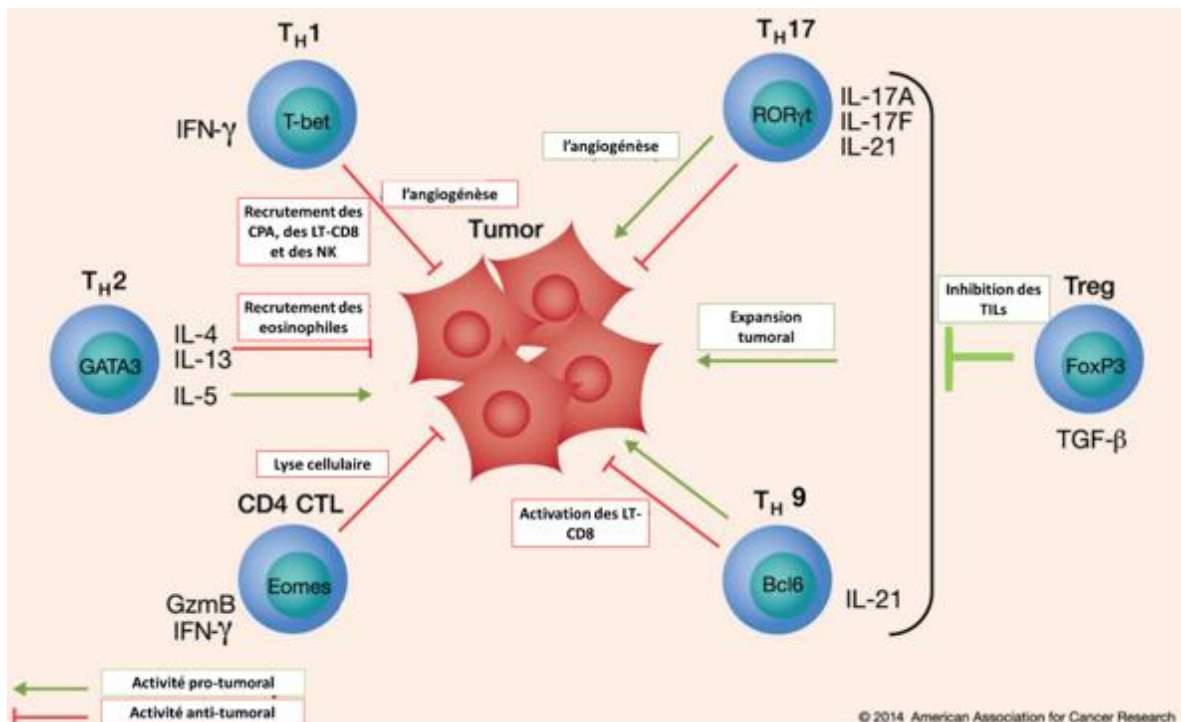


Figure 13 : Principaux rôles des effecteurs différenciés Th1, Th2, Th17, Th9, CTL et Treg au sein du microenvironnement tumoral

Schéma résumant les effets des lymphocytes-T-CD4 effecteurs différenciés Th infiltrant la tumeur et des cytokines sécrétées sur le développement tumoral. Les Treg ont une fonction pro-tumorale car elle inhibe l'ensemble des autres effecteurs Th et les lymphocytes-T-CD8 cytotoxiques. Les Th1 qui produisent de l'IFN- γ et les CTL ont un rôle anti-tumorale. Les Th1 favorisent l'inhibition du processus d'angiogenèse tumorale et favorisent le recrutement des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et donc l'activation des lymphocytes-T-CD8 (LT-CD8) et les lymphocytes-T natural killer (NK) qui possèdent une activité cytotoxique. Les effecteurs lymphocytes-T-CD4 à activité lytique (CTL) ont une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales. Les Th2, Th17 et Th9, ont une fonction anti- et pro tumorale, qui dépend du contexte cytokinique. L'IL-5 produit par les Th2 à une action pro-tumorale, mais les Th2 stimulent le recrutement des eosinophiles qui sont anti-tumorales. Les Th17 favorisent le processus d'angiogenèse tumorale. Les Th9 ont une action anti-tumorale en stimulant l'activation des LT-CD8 à activité cytotoxique. Les Tregs ont une action pro-tumorale médiée par le TGF- β et en favorisant l'anergie des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs), adapté de (Kim and Cantor, 2014)

f) Ontogénie et caractéristiques des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires

La mémoire immunitaire agit suivant un ensemble de différenciations cellulaires qui permettent la protection contre les pathogènes à long terme, elle est basée sur le souvenir d'une première et précédente exposition à un pathogène. Les acteurs de la mémoire immunitaire sont les lymphocytes mémoires, dans le cas les LT-CD4, il en existe trois sous-types possédant des caractéristiques spécifiques : LT-CD4 effecteurs mémoires (EM), les LT-CD4 centrales mémoires (CM) et les LT-CD4 mémoires résidents (RM) (Nguyen et al., 2019). Dans cette partie, l'origine des cellules mémoires, les propriétés des cellules mémoires et leurs fonctions seront passées en revue.

(1) Caractéristiques et fonctions des lymphocytes-T-CD4 mémoires

Toutes les cellules mémoires ont des propriétés communes, notamment d'avoir subi une première activation de leur TCR. La seconde stimulation du TCR permet aux cellules mémoires d'avoir une réponse plus forte face à l'infection (vitesse, intensité, qualité de la réponse). Enfin, elles expriment des récepteurs de surfaces permettant la migration vers les organes lymphoïdes et tissus non-lymphoïdes (Soon et al., 2019).

Les trois types de cellules mémoires se différencient par leurs caractéristiques et leurs propriétés de migration. Les cellules central mémoire (CM) circulent entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires, c'est une population cellulaire homogène qui prolifère et se différencie en réponse à une stimulation antigénique. Les cellules CM ont peu de fonctions immunologiques, elles représentent la mémoire dite réactive. Les cellules effecteur mémoire (EM) circulent du sang jusqu'au site d'infections dans les organes non-lymphoïdes, où elles prolifèrent et produisent des cytokines en réponse à la stimulation de manière rapide et robuste. Les cellules EM conservent leur état et leur fonction d'effecteur Th (Sallusto et al., 2004). Les cellules EM font partie de la réponse protectrice immunitaire. Les cellules résident mémoire (RM) ont comme spécificité d'être présentes dans les tissus non-lymphoïdes et n'ont pas la possibilité de circuler par le sang ou la lymphe. Cela confère aux cellules RM une position stratégique car elles ont une action rapide sur le site de l'infection où elles stimulent le recrutement des autres cellules mémoires et les LT-CD8 en produisant des chimiokines attractantes dont CXCL10 et CXCL9. Elles sont caractérisées par l'expression des récepteurs de surfaces CD44, CD11A et CD69 et par l'absence d'expression du récepteur CD62L. En fonction du tissu où résident les cellules RM, d'autres récepteurs de surface sont ajoutés au panel d'expression dont CXCR3, CCR5, CCR2 et CCR7 (Gregor et al., 2017) (Lanzavecchia and Sallusto, 2000).

(2) Ontogénie des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires et centrales mémoires

Les processus cellulaires aboutissant aux cellules mémoires sont mieux décrits pour les lymphocytes-B et lymphocytes-T-CD8. La compréhension de l'acquisition de la fonction mémoire des LT-CD4 est complexe et cela est dû à plusieurs propriétés des LT-CD4 :

- Les LT-CD4 se différencient en plusieurs sous-types effecteurs Th, ce qui rend difficile la recherche d'un progéniteur mémoire commun.
- Les LT-CD4 prolifèrent moins que les LT-CD8.
- Les LT-CD4 mémoires sont instables, ce qui rend leur étude difficile.
- Les LT-CD4 mémoires subissent le processus de plasticité cellulaire, ce qui rend difficile le traçage « tracking » des cellules.

Deux modèles sont envisagés dans l'acquisition de la mémoire des LT-CD4. Lors d'une première infection, les LT-CD4 matures et naïfs sont activés par leur récepteur TCR et se différencient en effecteur puis une fois l'infection terminée, les effecteurs différenciés Th meurent par apoptose lors de la phase de contraction. Une petite proportion de cellules survie à la phase de contraction, il s'agit des cellules qui acquerront la caractéristique de mémoire (Zhang et al., 2007).

- Le premier modèle linéaire est basé sur l'identification d'une cellule progénitrice commune (PM) à tous les LT-CD4, indépendamment de leur type d'effecteur.
- Le second modèle linéaire repose, sur l'existence d'une cellule progénitrice commune par type d'effecteur différencié Th, ainsi chaque progéniteur conserve les caractéristiques spécifiques à son effecteur différencié Th. Ainsi les cellules mémoires conservant leur empreinte cellulaire sont aussi nommées pré-effecteur différencié (pré-Th) (**Figure 14**).

Des études sur le destin cellulaire des LT-CD4 effecteurs différenciés (Th) ont été réalisées afin de comprendre les mécanismes de différenciation en cellules EM et CM. Les travaux de *Harrison et al* démontrent qu'après-stimulation, les Th1 activés lors de la stimulation ont la capacité d'opter pour destin cellulaire effecteur mémoire. Ces résultats sont confirmés par les travaux de *Marshall et al*, et précisés, car l'étude de *Marshall et al* démontre que les LT-CD4 effecteurs folliculaires Tfh peuvent acquérir un destin cellulaire mémoire de type EM et CM (Marshall et al., 2011). Les résultats de *Pepper et al* démontrent qu'après stimulation, les LT-CD4 exprimant les récepteurs de surfaces CCR7 et CXCR5 sont les cellules qui deviennent centrales mémoires (Pepper et al., 2011). Enfin l'étude de *Tubo et al* est la plus citée dans la recherche des mécanismes de différenciation en EM et CM, car elle démontre que toute cellule LT-CD4 après stimulation peut devenir une cellule mémoire, que les effecteurs Th conservent leur identité de Th en devenant des cellules EM, et que les cellules exprimant le récepteur de surface CXCR5, mais n'exprimant pas PD1, s'orienteraient vers un état CM (Tubo et al., 2013). Ainsi, l'ensemble de ces études tend à démontrer que le modèle d'un progéniteur commun à toutes les cellules mémoires n'est pas réaliste.

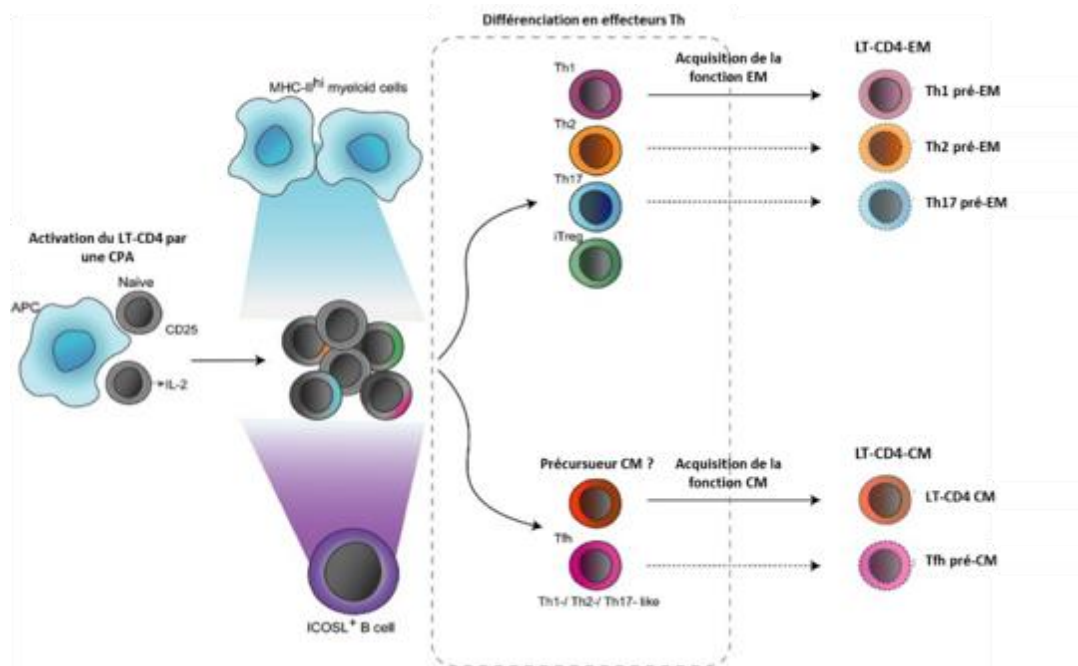


Figure 14 : Principaux modèles de différenciation des lymphocytes-T-CD4 en effecteur mémoire (EM) et centrale mémoire (CM), après une première activation

Schéma des étapes de la différenciation d'une cellule lymphocyte-T-CD4 naïve en effecteur mémoire (EM) et centrale mémoire (CM). Le LT-CD4 subit une première activation par interaction avec une cellule présentatrice de l'antigène (CPA), puis peut se différencier en effecteur T-helper (Th). L'hypothèse principale pour expliquer l'acquisition de la mémoire immunitaire, et donc de devenir un effecteur mémoire repose sur le fait que ce sont les effecteurs différenciés Th qui acquièrent, lors d'une seconde activation, la possibilité de devenir un effecteur mémoire (EM). Ainsi, chaque type d'effecteurs différenciés (Th) conserve son état de différenciation et sa fonction en devenant effecteur mémoire. Cette hypothèse va à l'encontre de l'existence d'une cellule progénitrice effecteur mémoire. La principale hypothèse pour expliquer un destin cellulaire de central mémoire (CM), repose sur le fait que lors de la seconde activation, seuls les effecteurs folliculaires (Th) seraient à l'origine des cellules CM (Soon et al., 2019).

Régulation de la différenciation en lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire et central mémoire

La nature de l'interaction et sa durée entre le récepteur TCR du LT-CD4 et le CMH-II des cellules présentatrices de l'antigène (CPA), qui sont à l'origine de l'activation des LT-CD4 naïfs, ont un impact sur la différenciation en effecteur Th et en effecteur Th EM à plus long terme. Les récepteurs induit par une co-stimulation par un lymphocyte-B impact aussi le destin du LT-CD4 mémoires. Une interaction prolongée favorise une différenciation en Th1-EM. La cytokine IL-2 et la chaîne α de son récepteur (CD25) qui ont déjà un rôle majeur dans la différenciation en effecteur sont de nouveau importantes dans la différenciation en EM (Snook et al., 2018). L'expression des récepteurs de surfaces CD27 et CD70 est aussi nécessaire à l'acquisition de l'état effecteur mémoire (McKinstry et al., 2014). Concernant l'activation de la mémoire de type centrale mémoire, une étude démontre qu'elle dépend de l'activité d'activateurs transcriptionnels dont OCA-B (Shakya et al., 2015).

(3) Caractérisation des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires et centrales mémoires

Les lymphocytes-T-CD4 naïfs, CM et EM n'expriment pas les mêmes récepteurs membranaires. L'expression de ces récepteurs est certainement associée au processus de différenciation (CM et EM) et à leurs fonctions. La combinaison d'expression ou d'absence de ces récepteurs permet l'identification des cellules CM et EM. La molécule de surface CD45 est une glycoprotéine qui possède un domaine tyrosine phosphatase. Il existe plusieurs isoformes de CD45 dont : CD45RA et CD45RO. L'isoforme CD45RA est exprimé à la surface des LT-CD4 naïfs, il a été démontré que les LT-CD4 naïfs qui répondent à une stimulation in vitro avec de la PHA expriment CD45RA, mais pas l'isoforme CD45RO. L'isoforme CD45RO est exprimée à la surface des LT-CD4 mémoires CM et EM. Il a été démontré que CD45RO est exprimé à la surface de LT-CD4 qui répondent à une stimulation par « rappel d'antigène » ([LaSalle and Hafler, 1991](#)) ([Mackay et al., 1990](#)).

La glycoprotéine CD62L (L-Selectine) est de la famille des séléctines qui reconnaît des ligands exprimés par les cellules endothéliales des veinules à endothélium épais (motifs Lewis X sur les glycoprotéines de l'endothélium). L'interaction entre CD62L et ses ligands favorise l'adhésion des LT-CD4 à l'endothélium. L'adhésion est fondamentale à l'entrée des LT-CD4 dans les organes lymphoïdes secondaires ([Cyster, 2000](#)). Ainsi, CD62L est exprimée à la surface des LT-CD4 naïf et CM ([Picker et al., 1993](#)).

Une seconde molécule est fondamentale au processus d'entrée dans les organes lymphoïdes secondaires, c'est le récepteur couplé aux protéines G CCR7. Les ligands de CCR7 sont les chimiokines CCL19 et CCL21. CCL19 et CCL21 sont présents au niveau de à l'endothélium des veinules à endothélium épais, des cellules parenchymateuses dans les zones T des ganglions lymphatiques, des cellules endothéliales aux ouvertures des vaisseaux lymphatiques dans les tissus périphériques et au niveau des cellules endothéliales aux ouvertures des vaisseaux lymphatiques dans les tissus périphériques ([Gunn et al., 1998](#)). L'interaction entre CCR7 et ses ligands est essentiel au processus d'enroulement à l'endothélium des veinules à endothélium épais ([Förster et al., 1999](#)). L'expression du récepteur de surface CCR7 est fondamentale pour différencier les LT-CD4 centrale mémoire des LT-CD4 effecteur mémoire. Les cellules CCR7+ sont centrales mémoires, elles migrent vers les ganglions lymphatiques et n'ont pas de fonction effectrice immédiate, mais elles stimulent efficacement les cellules dendritiques ([Sallusto et al., 1999](#)). Ainsi, les cellules CM expriment aussi à leur surface CCR7, CD45RO, CD62L et CXCR5 de façon non spécifique, car CXCR5 est aussi exprimée à la surface des effecteurs folliculaires. Les CM sont aussi caractérisés par l'absence d'expression de PD1.

Les cellules EM sont donc caractérisées par l'absence d'expression des récepteurs de surfaces CD45RA, CD62L, CCR7, CXCR5 et de PD1. Les cellules EM expriment à leur surface le récepteur de surface CD45RO (Sallusto et al., 2004). En **Figure 15** est résumé les principales molécules exprimées à la surface des LT-CD4 permettant d'identifier les LT-CD4 naïf, central mémoire et effecteur mémoire. Les LT-CD4 EM et CM peuvent exprimer des récepteurs de surfaces spécifiques aux effecteurs différenciés Th. Ainsi, des lymphocytes EM et CM exprimant à leur surface CXCR3 à leur surface sont des Th1-EM/CM et exprimant CCR4 des Th2-EM/CM (Rivino et al., 2004) (Song et al., 2005). Il est donc possible de caractériser et d'identifier les lymphocytes-T-CD4 par le pattern d'expression de molécules de surface spécifique de leur état mémoire et de leur différenciation en effecteurs Th.



CD45RO	-	+	+
CD45RA	+	-	-
CCR7	+	+	-
CD62L	+	+	-
CD27	+	+	+/-
CD28	+	+	+/-
CD31	+/-	-	-
CD95	-	+	+
CD49d	-	+/-	+
CXCR3	-	+	+
CD11a	-	+	+
CD122	-	+	+/-
CD127	+	+	-

Figure 15 : Caractérisation phénotypique des lymphocytes-T-CD4 naïf et mémoires : effecteur mémoire (EM) et central mémoire (CM)

Résumé des principales molécules de surface CD45RO, CD45RA, CCR7, CD62L, CD27, CD28, CD31, CD95, CD49d, CXCR3, CD11a, CD122 et CD127 exprimée (+) ou non (-) à la surface des LT-CD4 naïf (TN), central mémoire (CM) et effecteur mémoire (EM), adapté de (Caccamo et al., 2018).

g) Métabolisme et épigénétique associés à la quiescence des lymphocytes-T-CD4

L'activité métabolique des cellules mémoires est spécifique et permet le maintien de l'état de quiescence. Les cellules mémoires CM et EM utilisent spécifiquement la phosphorylation oxydative mitochondriale et l'ATP comme source d'énergie. Les cellules EM utilisent la glycolyse en anaérobie comme source énergétique (Chapman et al., 2020). Les cellules mémoires (EM et CM) ont comme caractéristique la quiescence cellulaire, définie par une inactivité fonctionnelle, transcriptionnelle et métabolique. Un changement du statut épigénétique permet de verrouiller l'expression des gènes impliqués dans l'activation, la prolifération et dans la différenciation en effecteurs différenciés Th. Ces modifications épigénétiques incluent la méthylation de promoteur, la modification d'histones, la régulation par des mi-RNA (Youngblood et al., 2013). L'étude du statut épigénétique des cellules mémoires démontre que les cellules mémoires présentent des histones méthylées sur les gènes des facteurs de transcription clés de différenciation en effecteurs Th dont : GATA3, T-BET, ROR- γ -t, FOXP3 et les gènes codant les interleukines produites par les effecteurs Th (Wei et al., 2009). Cela est un argument supplémentaire qui démontre que les cellules mémoires sont issues d'effecteurs différenciés Th. Les modifications épigénétiques n'induisent pas de blocage de la transcription de gènes spécifiques des lignages effecteurs de façon irréversible, ce qui va permettre aux cellules mémoires lors d'une stimulation de réactiver la transcription des gènes de lignage effecteur.

h) Maintien et survie des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires

Les lymphocytes mémoires peuvent enclencher leurs actions plusieurs mois après la première stimulation de leur TCR (Fundamental immunology book). La survie et le renouvellement des cellules mémoires dépend de cytokines : IL-7, IL-2 et de leurs récepteurs IL-7R (CD127) et IL-2R (Kondrack et al., 2003). L'IL-7 est produit par les cellules stromales des organes lymphoïdes secondaires, principalement les ganglions lymphatiques et la rate (Mazzucchelli et al.). Les mécanismes de régulations du maintien des cellules mémoires sont peu connus. Toutefois, l'étude de Riou et al démontre que l'IL-2 et l'IL-7 inhibent la signalisation apoptotique en inhibant le facteur de transcription FOXO3A, dont la fonction est de stimuler la transcription des gènes pré-apoptotiques *BIM* et *FAS* dans les cellules mémoires (Riou et al., 2007).

i) La fonction et la régulation des molécules de surface CD62L, CD127 et CCR6 exprimées à la surface des lymphocytes-T-CD4

Il a été référencé en amont de cette partie, que les molécules ou récepteurs de surface exprimés à la surface des lymphocytes-T-CD4 permettent d'identifier les sous-populations d'effecteurs différenciés Th. Au-delà de l'identification, ces molécules ont des fonctions et leurs expressions sont régulées dans les lymphocytes-T-CD4. La molécule CD62L (L-Selectine) est déjà exprimée dans les précurseurs

hématopoïétiques lymphoïdes et leur permet de quitter la moelle osseuse (Kohn et al., 2012). La molécule de surface CD62L est une glycoprotéine transmembranaire d'adhésion nécessaire au processus d'attachement et de roulement à l'endothélium sanguin, et donc est nécessaire à la migration des leucocytes dont les lymphocytes-T vers les organes lymphoïdes. CD62L est exprimé de manière constitutive dans le cytoplasme et dont l'expression génique est régulée par le facteur de transcription FOXO1 (Kerdiles et al., 2009). Son expression étant constitutive, c'est son expression membranaire qui est régulée par clivage par deux métalloprotéases (MMP) ADAM-17 et ADAM-8 (Smalley and Ley, 2005) (Gómez-Gaviro et al., 2007) (Ann, 2012). Le clivage de CD62L induit son retrait de la membrane plasmique et la baisse d'expression est associée à l'activation des lymphocytes-T, ce qui est notamment décrit après une infection virale et bactérienne.

Le récepteur à l'IL-7 est composé de deux chaînes CD127 (α) et d'une chaîne CD132 (γ -c). CD127 est une glycoprotéine membranaire qui régule dans les lymphocytes-T-CD4, la survie cellulaire et la prolifération. CD127 et plus largement les signalisations induites par l'IL-7 et son récepteur permettent la maturation des lymphocytes-T-CD4 dans le thymus, le maintien des lymphocytes-T-CD4 dans les organes périphériques (Fry and Mackall, 2005) et stimule le développement des cellules mémoires (Kondrack et al., 2003). L'interaction de l'IL-7 avec CD127 induit son interaction avec CD132 et l'hétérodimérisation du récepteur, qui active différentes voies de signalisations dont JAK-STAT, PI3K-AKT et MAPK dans le but de favoriser la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire et la prolifération, et de réprimer la transcription des gènes pro-apoptotique (Jiang et al., 2005). De la même manière que pour la molécule d'adhésion CD62L, il a déjà été démontré une baisse de l'expression de CD127 après des infections virales et notamment par le HIV (Crawley and Angel, 2012), mais aussi dans un contexte de pathologie tel que les allergies, l'asthme (Moniuszko et al., 2013b), la polyarthrite rhumatoïde (Aerts et al., 2008) et le diabète de type 1 (Moniuszko et al., 2013a). Une étude démontre l'effet anti-apoptotique en culture de l'IL-7 précisément sur des lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire. Les résultats de la même étude démontrent que l'inhibition de l'apoptose est induite par une activation de la voie de signalisation JAK-STAT5 qui stimule directement la transcription des gènes anti-apoptotiques *BCL-2*, *BCL-XL* et *MCL-1* (Chetoui et al., 2010).

CCR6 (CD196) est un récepteur couplé aux protéines G transmembranaire qui reconnaît comme ligand la chimiokine CCL20. La cristallisation et la caractérisation de la liaison CCL20 à CCR6 a été publiée en 2020 (Wasilko et al., 2020), cependant très peu d'étude se concentrent sur la signalisation et la régulation de CCR6. L'expression de CCR6 en réponse à son ligand permet aux lymphocytes-T-CD4 et spécifiquement aux lymphocytes-T-CD4 mémoire de quitter la circulation et d'entrée vers le site d'inflammation dans les tissus, notamment dans la barrière intestinale, la peau et les tissus oculaires,

c'est ce que l'on appelle la chimioattractivité (Schutysen et al., 2003). L'acquisition de l'expression de CCR6 à lieu au moment de l'activation des lymphocytes-T-CD4 (Ebert and McColl, 2002). Les études de Yang et al et Ebert et al démontrent qu'une augmentation de la transcription du gène CCR6 est corrélée à une augmentation de l'expression de CCR6 à la surface des lymphocytes-T-CD4 mémoires, suggérant ainsi une régulation transcriptomique de l'expression de CCR6 à la surface des cellules (Yang et al., 1999) (Ebert and McColl, 2002). L'expression de CCR6 à la surface des lymphocytes-T-CD4 favorise le relargage des ions calciques (Ca²⁺) (Liao et al., 1999). Concernant la régulation de CCR6, une étude de Steinfeld et al met en lumière la présence d'un îlot CpG dans une partie non codante du gène CCR6. Cet îlot CpG est régulé par méthylation et dé-méthylation. Dans les lymphocytes-T-CD4, cette étude démontre que les lymphocytes-T-CD4 qui expriment à leur surface CCR6 ne présentent pas de méthylation sur cet îlot CpG. En forçant cette région à rester déméthylée, par utilisation d'un inhibiteur de la méthylation (5'-azacytidine), Steinfeld et al force l'expression de CCR6 dans des lymphocytes-T-CD4 naïfs qui ne l'exprimaient pas (Steinfeld et al., 2011).

2. Principe de cytométrie en flux et du tri cellulaire permettant l'identification des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 dans le projet de thèse

Le premier cytomètre en flux commercial a été développé en 1972 par l'équipe de Lee et Len Herzenberg, basé sur la technologie de séparation de gouttelettes permettant la séparation de particules (Herzenberg and Herzenberg, 2004). La cytométrie en flux permet l'étude multiparamétrique précise, qualitative et quantitative de particules isolées en suspension entraînées par un flux liquide. Cette technique a atteint son plein potentiel grâce au développement des anticorps monoclonaux et au couplage des anticorps à des molécules fluorescentes (fluorochromes) (Idziorek et al., 2018). Le principe de la cytométrie en flux est décomposé en plusieurs étapes (McKinnon, 2018) :

- Le système fluide pressurisé, aussi appelé liquide de gaine (solution saline) qui entraîne de façon focalisée les cellules en suspension, au préalable marquées avec des anticorps couplés à des fluorochromes vers les sources d'excitation.
- Les sources d'excitation qui sont des lasers de type diode.
- Les détecteurs qui détectent la fluorescence émise par les cellules. Une série de filtres dichroïques orientent la lumière fluorescente vers des détecteurs spécifiques et des filtres passe-bande déterminent les longueurs d'onde de la lumière qui sont lues afin que chaque fluorochrome individuel puisse être détecté et mesuré.
- Le système d'amplification du signal composé de tubes photomultiplicateurs de photons.
- La conversion du signal de type photon en signal numérique transmis à un ordinateur.

- Un logiciel qui permet l’affichage des données de fluorescences et l’analyse des données (fichier format fcs).

Les cytomètres conventionnels actuels possèdent plusieurs lasers et, grâce à l’action des filtres qui sélectionnent des longueurs d’onde précises, il est possible de mesurer plus de 20 paramètres de fluorescences sur une cellule, en plus de la granulosité et de la taille des cellules (FSSC/SCCS). La technique de cytométrie en flux permet des applications très larges en biologie. L’immunophénotypage des sous-populations de LT-CD4 est réalisé essentiellement par cytométrie. Dans notre étude, nous avons réalisé l’immunophénotypage des sous-populations LT-CD4, l’étude de l’apoptose et de la prolifération cellulaire par cytométrie en flux.

Tri-cellulaire :

La même technologie a été utilisée dans le but de trier des cellules, de les récupérer afin de les mettre en culture, ou de réaliser des applications de biologie moléculaire. Le tri permet la séparation physique de cellules ou de particules d’intérêt à partir d’une population hétérogène. Les cellules sont aspirées de l’échantillon et injectées une à une par une buse dans un courant continu de tampon. Une onde de vibration est appliquée au jet de cellules permettant de rompre le jet en gouttelettes à un point précis. Le trieur va apposer une charge à chaque gouttelette formée. Au moment de l’interaction de la cellule avec le faisceau laser, la fluorescence émise génère un signal qui est traité par le programme de tri afin de décider si la cellule doit être triée ou non. Dans le cas d’une cellule devant être triée, la cellule passe entre les plaques de déflection fortement chargées et est déviée du côté de la plaque de charge opposée à celle de la cellule (Givan, 2011).

3. Effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-CD4 et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 circulants

Les études sur l’effet des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-CD4 humain et plus précisément les lymphocytes-CD4 mémoires sont limitées et hétérogènes. Les études des effets de l’irradiation sur l’ensemble des cellules du sang périphérique PBMC sont plus nombreuses (Tichy et al., 2018). Les modèles d’étude (*in vitro*, *ex vivo*), les cohortes et les types d’irradiation varient d’une étude à l’autre. Il est possible de catégoriser les études en 3 groupes :

- Les études réalisées sur les cellules sanguines provenant de l’exposition d’individus lors de catastrophes nucléaires accidentelles ou non (Hiroshima, Nagasaki et Tchernobyl). Ces études regroupent différentes cohortes étudiées sur plusieurs dizaines d’années (1950-2015).

- Les études dans lesquelles les cellules du sang périphérique (PBMC) sont irradiées *in vitro*. Dans ces études, il est important de comparer les types de rayonnement lié au type d'irradiateur, le débit de dose d'irradiation et le modèle cellulaire. En effet, certaines études traitent des effets sur cellules quiescentes ou cellules stimulées *in vitro*.
- Les études réalisées dans le cadre de l'étude des effets du traitement par radiothérapie sur la physiologie des cellules sanguines, qui traitent principalement du nombre de cellules.

a) Effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4 quiescents *in vitro*

Une partie des études référence les effets des rayonnements ionisants sur la fraction totale de LT-CD4 circulants, quiescents et irradiés *in vitro*. Plusieurs fonctions cellulaires ont été évaluées dont : le nombre de cellules, la mort cellulaire, la sénescence, les cassures ADN double-brin, l'expression génique et les aberrations chromosomiques. Dans cette partie, sera résumé l'ensemble des effets sur LT-CD4 et LT-CD4 mémoires irradiés à moyennes ou hautes doses (1 et 30 Gy).

L'irradiation *in vitro* influe sur le nombre de cellules lymphocytaires, en effet l'étude de *Kusunoki et al*, des cellules isolées de PBMC ont été irradiées dans un irradiateur à source césium. L'irradiation à des doses de 2 à 8 Gy *in vitro* impacte le nombre de LT-CD3 et plus précisément les LT-CD4. La perte du nombre de LT-CD4 est plus importante comparée à la perte de monocytes et cellules dendritiques (*Yamaoka et al., 2004*) (*Kusunoki et al., 1999*). L'étude publiée en 1990 de *Nakamura et al* démontre que les LT-CD4 et LT-CD8 sont sensibles à l'irradiation, et qu'une dose de 2 Gy induit l'apoptose de 50% de ces cellules (*Nakamura et al., 1990*). Certaines études comparent la sensibilité à l'apoptose après une irradiation *in vitro* entre les différentes cellules circulantes. Ainsi, les résultats de *Philippé et al* démontrent que l'apoptose radio-induite est la plus élevée dans les Lymphocytes-B et les LT-CD4, plus particulièrement dans les LT-CD4-mémoires. Cette étude démontre aussi que les LT-CD4 ont une baisse du potentiel d'interaction avec les anticorps (*Philippé et al., 1997*). Les données de *Heylmann et al* publiées en 2021 confirment celles de *Philippé et al* car elles montrent que l'irradiation induit l'apoptose radio-induite de 50 % des cellules LT-CD4, ce qui représente dans leur étude la plus haute radiosensibilité à l'apoptose parmi l'ensemble des cellules présentes dans le sang périphérique (PBMC). De plus, l'induction de l'apoptose par l'irradiation sur les LT-CD4 est saturée dès la dose de 2 Gy et donc non-linéaire au-delà de cette dose (*Heylmann et al., 2021*). Une étude contredit le fait que la radiosensibilité des LT-CD4 est plus importante que celle des CD8 (*Wilkins et al., 2002*). Les études bibliographiques démontrent que la mort radio-induite principale des LT-CD4 est l'apoptose, cela est nuancé par les données de *Falcke et al* qui montrent que dans leur condition d'irradiation *in vitro*, les lymphocytes-T meurent principalement par nécrose (*Falcke et al., 2018*).

L'irradiation induit une augmentation massive du nombre de cassures ADN double-brin par noyau dans les LT-CD4, les cassures (en moyenne 10 par noyaux) sont révélées par comptage des foyers γ -H2AX et 53BP1 en microscopie. Les cassures sont induites rapidement entre 10 et 30 min après irradiation et disparaissent complètement 24 h après irradiation (Sak and Stuschke, 2010), cette observation est expliquée par l'activation du processus de réparation de ces cassures (Horn et al., 2013). L'étude de Heylmann et al démontre le même résultat, à la différence que dans leur étude, les cassures radio-induites sont réparées dès 6 h après exposition (Heylmann et al., 2021). De la même manière, l'étude d'Andrievski et al démontre aussi dans les LT-CD4 que l'irradiation *in vitro* induit une induction de cassure ADN double-brin et précise que le nombre de cassures est plus important dans les LT-CD4 en comparaison aux lymphocytes-T-CD3 totaux (Andrievski and Wilkins, 2009).

Au-delà d'affecter le nombre de cellules, la viabilité cellulaire et le patrimoine génétique, l'irradiation *in vitro* de sang périphérique (PBMC) modifie l'expression génique des LT-CD4. Les cellules LT-CD4 irradiées présentent une augmentation de l'expression des gènes *CDKN1A* (*p21*) pro-sénescent, *BAX* pro-apoptotique, *PCNA*, *GADD45* impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, et *DDB2* impliqué dans les dommages à l'ADN (Gruel et al., 2008). Enfin, il a été démontré que l'irradiation impacte la capacité de liaison aux anticorps des LT-CD4, ce qui se manifeste par une diminution de l'intensité de fluorescence de marquage extracellulaire mesurée cytométrie dans les LT-CD4 (Philippé et al., 1997).

b) Effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4 stimulés *in vitro*

Les données sur l'étude de la physiologie et la prolifération des LT-CD4 sont réalisées grâce à la stimulation *in vitro* des récepteurs CD3 et CD28 dans un milieu de culture contenant des agonistes recombinants des récepteurs CD3 et CD28, des agents mitogènes phytohaemagglutinine (PHA) ainsi que des cytokines minimales et nécessaires à l'activation des LT-CD4 (IL-2 et l'IL-15) (Nk and Lv, 1989). Ce modèle permet de mimer une stimulation physiologique. Une étude publiée en 1984 compare la survie des LT-CD4 stimulés (avec un protocole PHA) au LT-CD8 stimulés. Leurs résultats montrent un taux de survie des LT-CD4 stimulés irradiés à 1 Gy de 40 % et aucune différence entre les deux populations comparées (Manori et al., 1984). L'étude de Heylmann et al a porté sur l'effet de l'irradiation (1 et 2 Gy) sur des PBMCs stimulés *in vitro*. Leurs résultats démontrent que les LT-CD4 stimulés irradiés ont 4 fois moins d'induction d'apoptose et de nécrose radio-induite en comparaison au LT-CD4 non stimulés quiescents. Cette résistance à l'apoptose des LT-CD4 qui prolifèrent est indépendante de l'induction de cassures ADN double-brin, car le nombre de foyers γ -H2AX est identique entre cellules en prolifération et cellules quiescentes (Heylmann et al., 2018).

c) Effets des rayonnements ionisants sur les Lymphocytes-T-CD4 différenciés (Th) circulants *in vitro*

Il n'existe que peu de connaissances sur l'effet des rayonnements ionisants sur les LT-CD4 effecteurs différenciés Th circulants humains. Les modèles murins sont plus utilisés pour étudier l'effet des rayonnements sur les effecteurs différenciés Th. Toutefois, ce paragraphe référence les quelques études concernant les effecteurs différenciés Th circulants humains. Les travaux de *Nguyen et al* analysent l'effet de l'irradiation sur les sous-populations d'effecteurs différenciés Th quiescents et circulants de LT-CD4 mémoires incluant les EM et CM exprimant le récepteur de surface CCR6 (ce qui englobe les effecteurs Th17, Th9, Th17 (CXCR3-)). L'étude démontre une résistance à l'apoptose radio-induite des LT-CD4 mémoires exprimant le récepteur de surface CCR6. De plus, l'irradiation *in vitro* (2 Gy) induit une augmentation de l'expression protéique de P16 et de l'activité de la bêta-galactosidase sans activation du profil cytokinique SASP dans les effecteurs LT-CD4 mémoires exprimant le récepteur de surface CCR6. Ce pattern d'expression moléculaire est celui de la sénescence (cf. chapitre 1). Ainsi, il existe une corrélation entre la sensibilité à l'apoptose des LT-CD4 mémoires exprimant le récepteur CCR6 et le processus de sénescence radio-induit ([Nguyen et al., 2020](#)). Les effets des rayonnements ionisants ont été caractérisés sur la viabilité des effecteurs différenciés Treg dans deux études scientifiques réalisées par *Cao et al* et *Beauford et al*. *Cao et al* démontrent que les cellules Treg font plus d'apoptose radio-induite que les LT-CD4. Tandis que *Beauford et al* démontrent le contraire, à savoir que les Treg sont résistants à l'apoptose radio-induite ([Cao et al., 2011](#)) ([Beauford et al., 2020](#)).

d) Effets de la radiothérapie sur les lymphocytes-T-CD4

Un champ de recherche traitant des effets de la radiothérapie se focalise sur l'effet du traitement pendant la durée de celui-ci et les potentiels effets à long terme du traitement sur les cellules sanguines, en particulier sur les lymphocytes, car une perte de l'intégrité de ces cellules pourrait perturber à long terme le processus d'immunité adaptative des patients. Les effets du traitement par radiothérapie sur les cellules sanguines ont déjà été caractérisés dans le contexte de la lymphopénie sur différents types de cancers (cf chapitre 2). La radiothérapie chez des patients atteints du cancer de l'œsophage induit une baisse de moitié du nombre de LT-CD4 totale pendant le traitement, et le nombre de LT-CD4 revient à la normale 3 mois post-radiothérapie ([Wang et al., 2019](#)). La même étude chez des patients atteints de cancer de la prostate n'indique pas de baisse du nombre de LT-CD4 lors du traitement, mais démontre que les LT-CD4 ont un taux de prolifération plus important pendant la radiothérapie ([Eckert et al., 2018](#)). Le ratio LT-CD4/LT-CD8 est modifié chez les patients atteints de cancer de l'œsophage pendant le traitement par radiothérapie, car l'effectif de LT-CD4 est stable, mais le nombre de LT-CD8 augmente lors du traitement ([Lv et al., 2020](#)). La baisse du nombre de LT-CD4

circulant est constatée chez les patientes développant un cancer du col de l'utérus avec une restauration du nombre de LT-CD4 6 à 9 semaines post-radiothérapie. La perte de LT-CD4 est associée à un taux faible d'efficacité du traitement et de survie des patientes (van Meir et al., 2016). La baisse du nombre de LT-CD4 et du ratio LT-CD4/LT-CD8 est aussi retrouvée chez les patients atteints de cancer oral (Dovšak et al., 2018).

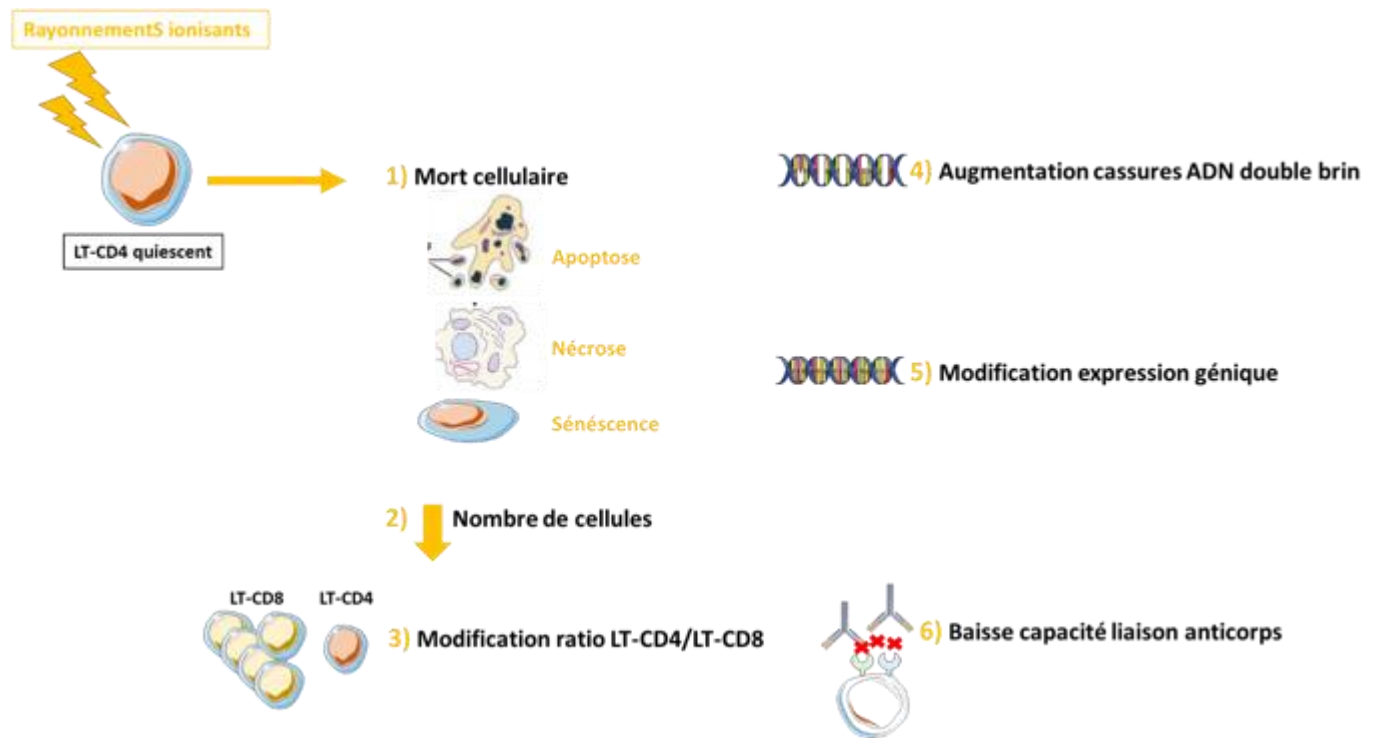


Figure 16 : Résumé des effets biologiques induits par les rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4

Résumé des principaux effets des rayonnements ionisants (RI) sur les lymphocytes-T-CD4 quiescent (LT-CD4). L'irradiation induit la mort cellulaire dont l'apoptose, la nécrose et la sénescence. L'irradiation induit une perte du nombre de LT-CD4 circulant, ainsi qu'un déséquilibre du ratio de LT-CD4/LT-CD8, en faveur des LT-CD8. L'irradiation induit des dommages à l'ADN dont des cassures double brin et induit des modifications de l'expression de certains gènes. Enfin, l'irradiation induit une baisse dans la capacité de liaison des anticorps aux récepteurs à la surface des LT-CD4.

La biologie des lymphocytes-T-CD4, incluant les étapes depuis leur formation vers leur différenciation en effecteurs différenciés Th et en cellules mémoires, ainsi que la caractérisation permettant l'identification des sous-populations circulantes sont bien décrits dans la littérature scientifique. Les effecteurs différenciés sont aussi présents dans le microenvironnement tumoral et régulent le microenvironnement. Actuellement, les effets des rayonnements ionisants et du traitement de radiothérapie sont principalement décrits sur la population totale de lymphocytes-T-CD4. Au vu de la diversité d'effecteurs différenciés et sous-population de lymphocytes-T-CD4 : naïf, central mémoire, effecteur mémoire et terminal effecteur, il est important de caractériser les effets des rayonnements ionisants sur les sous-populations de LT-CD4 circulantes sous leurs deux états de quiescence et après une stimulation/activation.

Objectifs du projet de thèse

Ce projet de thèse s'inscrit dans la continuité de l'étude et de la compréhension des effets des rayonnements ionisants sur la population hétérogène de lymphocytes-T-CD4 et sur la précision du test de radiosensibilité individuelle basé sur l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoires (LT-CD4-EM). Les travaux précédents du laboratoire ont étudié l'apoptose des LT-CD4-EM induite par les rayonnements ionisants. L'apoptose radio-induite varie d'un individu à l'autre a été associée à trois polymorphismes génétiques de type SNV sur le gène *TRAIL (TNFSF10)*.

Le projet de thèse s'articule autour de deux axes :

- I. L'étude des effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4, les lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 effecteurs différenciés T-helper circulants
- II. La recherche de polymorphismes génétiques de type SNV associés à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires, qui reflètent les différences de radiosensibilité individuelle

Le premier objectif de ce projet de thèse a été de comprendre les effets des rayonnements ionisants sur l'induction de l'apoptose, l'expression des récepteurs de surfaces, l'expression génique, mais aussi les effets sur la prolifération de ces cellules dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 naïve, effecteur mémoire terminal effecteur et les effecteurs différenciés de type T-helper (Th). Les résultats de cet axe ont été regroupés dans la première partie de la partie résultats du projet de thèse de ce manuscrit.

Le second objectif porte sur la recherche d'association de polymorphismes génétiques à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM. En effet après un génotypage pan génomique réalisé en collaboration avec le CNRGH, nous avons étudié l'association de polymorphismes de type SNV sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* puis recherché d'autres polymorphismes sur l'ensemble des gènes du génome par une analyse pangénomique (GWAS). L'analyse a été réalisée en utilisant FBAT, qui prend en compte l'appareillement des individus. Les raisons de la variabilité individuelle de l'apoptose radio-induite des LT-CD4 EM étant très certainement d'origine multifactorielle, notre hypothèse était donc qu'un seul polymorphisme semblait insuffisant pour prédire l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM pour une majorité d'individus. En lien avec le premier axe du projet, nous avons étudié la corrélation du SNV rs1131532 sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* à la quantification de l'apoptose dans les sous-populations d'effecteurs Th. L'analyse d'association génétique GWAS est présentée et analysée dans la seconde partie des résultats du projet de thèse du manuscrit.

I. Introduction

La radiothérapie est utilisée comme traitement contre le cancer chez 60 % des patients. Elle peut être combinée à d'autres traitements visant la diminution du développement tumoral : la chimiothérapie, l'immunothérapie, les thérapies ciblées et la chirurgie (Seliger, 2019). Ce traitement est basé sur l'utilisation de rayonnements ionisants qui affectent les tissus sains autour des tumeurs ainsi que les cellules sanguines, dont les cellules lymphocytaires. Ces effets sont dits radiotoxiques et touchent 5 à 15 % des patients. Les effets dépendent de la zone irradiée et de la dose totale administrée. Ils peuvent survenir précocement après l'exposition ou tardivement après l'exposition.

Peu d'études portent sur la caractérisation des effets des rayonnements ionisants et du traitement par radiothérapie sur les cellules lymphocytaires et très peu d'études traitent des effets sur les effecteurs différenciés T-helper (Th). En effet, la plupart des études présente les effets de l'irradiation *in vitro* sur le nombre et la mort cellulaire de la totalité des cellules du sang périphérique (PBMC) (Kusunoki et al., 2003) (Nakamura et al., 1990) (Heylmann et al., 2021) (Wilkins et al., 2002). Des études plus spécifiques examinent le nombre de lymphocytes-T-CD4 et lymphocytes-T-CD8 aussi référencé comme lymphopénie avant, pendant et après le traitement par radiothérapie dans le cadre de différents types de cancers. Ces études démontrent que, de manière systématique, le nombre de lymphocytes ne retourne pas à son état initial après la radiothérapie (Verastegui et al., 2003) (Belka et al., 1999). Il est donc envisageable que la baisse du nombre de lymphocytes ou qu'une différence de la fonctionnalité puisse impacter d'une part les lymphocytes-T-CD4 infiltrant (TILs) du micro-environnement tumoral et d'autre part avoir une incidence sur les réponses immunitaires après le traitement par radiothérapie.

La population de lymphocytes-T-CD4 circulante est quiescente et hétérogène. Elle comprend des cellules naïves et des effecteurs différenciés Th effecteur mémoire (EM) et central mémoire (CM). Au sein du tissu sanguin, les cellules ont un potentiel de stimulation/activation qui leur permet de quitter l'état de quiescence et de se différencier en effecteur (cf introduction manuscrit). C'est pourquoi il est essentiel de caractériser de la façon la plus complète les effets des rayonnements ionisants sur l'ensemble des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 sous leurs deux états : quiescents et stimulés.

Dans cette étude, nous avons cherché à caractériser les effets des rayonnements ionisants en utilisant un modèle d'irradiation *in vitro* et en évaluant pour les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 dont les effecteurs différenciés de type Th, l'apoptose, la proportion, l'expression de récepteurs de surface et la prolifération. Nos résultats mettent en lumière une hétérogénéité d'apoptose radio-induite dans les lymphocytes-T-CD4, où seules les cellules EM sont sensibles à l'irradiation *in vitro*. Au sein de la population EM, nous avons démontré la résistance à l'apoptose radio-induite de la sous-population

CCR6+CD127+ et celles des effecteurs Th17, Th9 et Th17 (CXCR3+) qu'elle contient. La résistance à l'apoptose radio-induite de ces sous populations de T-CD4-EM est indépendante de l'expression génique du ligand *TRAIL* et de ses récepteurs pro-apoptotiques initiant la voie d'apoptose précédemment décrite dans le cadre du phénotype de radiosensibilité des T-CD4-EM. L'irradiation induit dans les lymphocytes-T-CD4 une diminution de l'expression des récepteurs de surface CD62L, CCR6 et CD127, ce qui aboutit à un enrichissement des populations sensibles à l'apoptose radio-induite. La même étude effectuée sur des cellules après stimulation *in vitro* démontre que la sortie de l'état de quiescence protège les cellules EM de l'apoptose radio-induite et qu'il existe un effet différentiel sur la prolifération des sous-populations en fonction de la dose d'irradiation. En effet, seule une dose d'irradiation à 8 Gy freine la prolifération des lymphocytes-T-CD4 et des sous-populations EM et CM.

II. Matériel et Méthode

Purification des cellules du sang périphérique (PBMCs)

Les PBMCs ont été purifiés à partir de sang total de donneurs sains volontaires prélevés en tubes Vacutainer CPT (BD). La récupération des PBMC a été réalisée suivant les recommandations du fabricant. Brièvement, après une centrifugation à 1500 RCF la fraction cellulaire est récupérée après élimination du plasma et transférée dans des tubes pour lavage. Deux lavages dans du milieu de culture RPMI-Ultraglutamine (*Gibco*) sont réalisés par centrifugation à 400 RCF durant 10 minutes.

Décongélation de PBMCs

Les échantillons génotypés, préservés par congélation à -180 °C, proviennent de la cohorte Génétique des Cellules Sanguines, Les donneurs ont été prélevés entre 2000 et 2005 lors du protocole de recherche sous la promotion de la Fondation Jean Dausset CEPH dont Pr. Gilles Thomas fut l'investigateur principal. Ils ont été décongelés à 37 °C durant 45 secondes, puis lavés avec du milieu de culture RPMI-Ultraglutamine (*Gibco*) complété avec 15 % de SVF, pénicilline-streptomycine (*Gibco*), 20mM HEPES (*Gibco*), 2mM Pyruvate de sodium (*Gibco*). Enfin, ils ont été centrifugés à 180 RCF durant 10 minutes.

Culture cellulaire

Les PBMCs, après purification ou après décongélation, ont été maintenues en culture dans du milieu de culture RPMI-Ultraglutamine (*Gibco*) complété dans une étuve à 20 % ou à 12% d'O₂, 5 % de CO₂ à 37 °C.

La stimulation/activation *in vitro*, des PBMCs complets, a été réalisée par TransAct (*Miltenyi biotec*) au 1/1000 suivant les recommandations du fabricant. Les PBMCs ont été marquées avec du CFSE-FITC (*ThermoFisher*) au 1/1000 durant 5 minutes à 37 °C suivant les recommandations du fabricant. Les PBMCs ont ensuite été lavées avec du milieu de culture RPMI-Ultraglutamine (*Gibco*) avant d'être mis en culture dans un milieu de culture RPMI-Ultraglutamine (*Gibco*) complété. Les PBMCs stimulées en culture ont été lavées avec du milieu RPMI, 48 h après la stimulation de façon à éliminer le réactif TransAct. Après lavage, les PBMCs stimulées ont été maintenues en culture jusqu'à 7 jours maximum après la stimulation *in vitro* en présence d'IL-2 à 50 unité/ml.

Protocole d'irradiation

Les PBMCs isolées de sang frais ou décongelées ont été irradiées *in vitro* dans l'irradiateur GSRD1 diffusant des rayons gamma issus d'une source césium 137 à énergie de 180,28 TBq. Plusieurs doses ont été réalisées : à 0,5 Gy avec une dosimétrie de 0,74 Gy/min, à 2 Gy avec une dosimétrie de 0,74 Gy/min et à 8 Gy avec une dosimétrie de 3,72 Gy/min.

Cytométrie en flux

Anticorps et différents marquages : les PBMCs ont été marquées 17 h et 48 h après culture ou culture et irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy dans un tampon (140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES; à pH7.4) pendant 1 heure avec les anticorps référencés dans le **Tableau 4**. Les échantillons marqués ont été lavés dans le même tampon et centrifugés à 180 RCF pendant 10 minutes avant l'analyse au cytomètre en flux ou avant le tri cellulaire par cytométrie en flux.

Cytomètres en flux utilisés : Les échantillons ont été analysés avec le cytomètre en flux analyseur LSR-II (BD) et les tris cellulaires ont été réalisés avec le cytomètre trieur InFlux (BD). Avant le passage des échantillons, les billes CST (BD) ont été passées pour calibrer les voltages des PMT des lasers du cytomètre analyseur LSR II. Les billes de compensation (BD) ont été passées après les billes de CST afin de définir avec précision la matrice de compensation. Les contrôles de fluorescence (Fluorescence Minus One ; FMO) ont été utilisés pour déterminer le gating pour les récepteurs de surface CCR4 et CXCR3.

Des fichiers au format .fcs correspondant à la totalité de l'échantillon (en moyenne 500.000 évènements) ont été enregistré sur le logiciel d'acquisition DIVA, post compensé pour les superpositions de spectres d'émission des fluorochromes et analysés grâce au logiciel Flowjo (version 10.8.1)

Anticorps	Fournisseur
AnnV-FITC	BD, BioLegend
AnnV-APC	BioLegend
CD4-BUV737	BD
CD8-APCFire	BioLegend
CD3-BB700	BD
CD62L-BV421	BioLegend
CD45RA-APC	BioLegend
CD45RA-BV650	BioLegend
CCR6 (CD196)-PECy7	BioLegend
CD127-PE	BioLegend
CCR4 (CD194)-PEDazl	BioLegend
CXCR3(CD183)-BV785	BioLegend
CD25-BV605	BioLegend
CD57-BV605	BioLegend
CD69-BUV395	BD
KI-67-Pacific Blue	BioLegend
HO33258	

Tableau 4 : Les anticorps fluorescents utilisés pour l'immunophénotypage des sous-populations de lymphocytes-T-CD4

Rétro-transcription et préamplification en multiplex, amplification et PCR quantitative (qPCR)

Les cellules ont été récoltées directement après tri cellulaire à la plateforme de tri cellulaire de l'IRCM (Jan Baijer, Nathalie Déchamps) dans les réactifs du kit one-step RT-PCR (*ThermoFisher*) de rétro-transcription et de pré-amplification contenant le mélange des amorces TaqMan à la dilution de 0,2X pour les gènes tests marqués FAM et pour les gènes contrôles marqués VIC. Chaque condition a été réalisée sur un nombre identique de 300 cellules en triplicata 6h après culture et/ou irradiation à 2 et 8 Gy. La rétro-transcription a été réalisée par un cycle de PCR à 55 °C pendant 10 minutes, puis un cycle de PCR à 50°C pendant 50 minutes et l'étape de dénaturation et d'amplification de l'ADN a été réalisée par 15 à 18 cycles de PCR à 95 °C pendant 15 secondes et 62° pendant 45 secondes sur un Thermal Cycler de Applied Biosystems 2720 dans la continuité immédiate du tri cellulaire. Après pré-amplification, les ADN complémentaires ont été dilués au 1/10 pour réaliser la PCR quantitative gène par gène avec un mix contenant par échantillon le réactif Gene master Mix (*ThermoFisher*), les amorces TaqMan à 1X et de l'eau. La q-PCR est réalisée par 35 cycles contenant une étape à 95 °C pendant 15 secondes, suivie d'une étape à 62 °C pendant 45 secondes dans le thermocycleur HT7900 (*Applied Biosystems*). Les amorces TaqMan utilisées lors de la rétro-transcription et la q-PCR ; pour lesquelles

des résultats figurent dans la partie résultat du manuscrit, sont résumées dans le **Tableau 6**. La quantification de l'expression génique a été réalisée par calcul du ΔCT correspondant à la normalisation des CT par les CT du gène de référence RPLP0 et par le calcul de l'expression relative correspondant au $2^{-\Delta CT}$.

Gènes	Références des amorces TaqMan
<i>TRAIL (TNFSF10)</i>	HS00234356_m1 (FAM)
<i>DR-5 (TNFRSF10B)</i>	Hs00269492_m1 (FAM)
<i>DR-4 (TNFRSF10A)</i>	Hs00366278_m1 (FAM)
<i>RPLP0</i>	Hs99999902_m1 (VIC)

Tableau 5 : Les amorces Taqman utilisées en q-PCR

Extraction d'ADN et génotypage

L'analyse d'association des polymorphismes SNV sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* et l'analyse d'association pan-génomique GWAS ont été réalisées en collaboration avec le CNRGH (Claire Dandine-Roulland, Edith Le Floch, Jean-François Deleuze). Les ADNs de 922 individus apparentés issus de la collection GCS conservée au CEA Fontenay aux Roses ont été préparés et conditionnés par J. Baijer et A. Schmitz. Les ADNs ayant déjà été séquencés ont été re-dosés et aliquotés suivant les spécifications du CNRGH avant d'être transférés de manière re-anonymisée au CNRGH. Une extraction d'ADN à partir de PBMCs préservées et congelées (env. 400) a été réalisée sur Macherey Nagel Nucleospin Blood pour les individus n'ayant aucune fraction d'ADN disponible. Ces ADN ont été mis en solution et dosés par NanoDrop 1000 avant d'être stockés et répertoriés dans les bases de données locales. Des fractions formatées et re-anonymisées selon les recommandations du CNRGH ont été jointes aux ADNs extraits antérieurement. Le CNRGH a réalisé des contrôles qualité internes à la plateforme de génotypage du CNRGH. À la suite de cela, quelques échantillons ont été ré-extraits et finalement les ADNs ont tous été génotypés sur un même lot, par la puce Infinium Global Screening Array-24 Kit- (*Illumina*) (GSAMD) contenant 700 000 tag-SNPs.

Analyses bio-informatiques relatives aux analyses d'associations

L'analyse bio-informatique a été réalisée au CNRGH (Claire Dandine-Roulland, Edith Le Floch, Jean-François Deleuze) en lien étroit avec Jan Baijer qui développe et maintient les bases de données de la cohorte GCS à l'IRCM. Cette étape a permis le contrôle de la qualité des données de la cohorte d'individus génotypés ; à savoir (i) la validation du sexe biologique, (ii) l'appartenance génétique réelle aux familles répertoriées, (iii) le taux d'hétérozygotie et (iv) l'origine génétique ancestrale des individus grâce à la base génétique 1000 Genomes (www.internationalgenome.org). L'analyse d'association des

SNVs sur le gène TRAIL (TNFSF10) et l'analyse d'association pan-génomique à la quantification de l'apoptose radio-induite ont été réalisées par le Family Based Association Test (FBAT) version 205_beta (Laird et al., 2000) sur le langage de programmation R. Les valeurs p d'association de chaque SNV (signal) ont été soumises à la correction multitest de Bonferroni. L'analyse d'association des SNVs sur le gène TRAIL (TNFSF10) a été réalisée par FBAT pour les modèles génétiques dominant, récessif et additif de façon normalisée ou non pour les co-variables âge et sexe de l'individu. L'analyse d'association pan-génomique a été réalisée par FBAT sans option du logiciel, pour le modèle génétique additif de façon normalisée pour les co-variables âge et sexe de l'individu.

III. Résultat de l'axe d'étude des effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4 et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 circulantes quiescentes et après activation *in vitro*

1. Étude des effets des rayonnements ionisants sur les lymphocytes-T-CD4 et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4

L'irradiation induit l'apoptose uniquement au sein de la sous-population de lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires

L'effet de l'irradiation a été étudié dans les populations de lymphocytes-T-CD4 après des doses délivrées *in vitro* à 0,5, 2 et 8 Gy à des cellules issues du sang périphérique (PBMCs). Ces expérimentations ont pour objectif de décrire et comprendre les propriétés cellulaires intrinsèques aux différentes sous-populations de lymphocyte-T-CD4 (LT-CD4) quiescentes en réponse à des doses croissantes d'irradiation.

Pour chaque échantillon, un fichier de cytométrie en flux non sélectif totalisant environ 500.000 évènements est enregistré et analysé a posteriori. La **Figure 17A** présente, pour un fichier, les étapes de l'identification et de sélection des évènements correspondant aux différents compartiments cellulaires sur la base de l'expression de récepteurs de surface. Les acquisitions de données de mesures de fluorescence ont été réalisées pour chaque condition à 17 et 48 heures après irradiation à des doses de 0 à 8 Gy sur une série d'échantillons de sang frais de 12 individus donneurs sains non apparentés. L'ensemble des sous-populations a été identifié par leur profils immunophénotypiques. Pour simplifier la rédaction de l'analyse des données, le terme « les cellules exprimant un récepteur de surface X », pourra être simplifié en « positives pour le récepteur X » et symbolisé par (X+). De la même manière, le terme « les cellules n'exprimant pas le récepteur de surface X » sera simplifié en « négatives pour le récepteur X » et symbolisé par (X-).

L'identification des compartiments cellulaires repose sur une procédure par étapes hiérarchisées. Les évènements correspondants aux doublets sont éliminés en premier par analyse, puis parmi les lymphocytes sélectionnés sur les paramètres de diffusion FSC et SSC, les cellules Hoechst+ sont éliminées. Les cellules exprimant le récepteur de surface CD3 (CD3+) représentant les lymphocytes-T sont sélectionnées. Parmi les cellules CD3+ sont identifiées les cellules exprimant le récepteur CD4 (CD4+) mais n'exprimant pas le récepteur CD8 (CD8-) et représentant donc la population totale de lymphocytes-T-CD4, simplifié dans les figures et dans la rédaction par LT-CD4 total (**Figure17A**). La population de lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4) est une population cellulaire non homogène, qui comprend des cellules naïves et des effecteurs différenciés T-helper (Th), de deux types : (i) effecteur mémoire (EM) et (ii) central mémoire (CM). La population de Th différenciée Treg (CD127- et CD25+)

est identifiée dans la population de LT-CD4 total. La population de LT-CD4 ne comprenant pas les cellules Treg est nommée lymphocytes-T-CD4 conventionnels et simplifiée dans l'étude par LT-CD4conv. L'expression des récepteurs de surface CD62L et CD45RA permet de caractériser les populations de LT-CD4conv naïves (CD62L+ CD45RA+), CM (CD62L+ CD45RA-), EM (CD62L- CD45RA-) et CD62L- CD45RA+. Les populations d'effecteurs différenciés Th sont caractérisées par l'expression des récepteurs de surface CCR6, CXCR3 et CCR4. Dans notre étude, les effecteurs Th1 sont CCR6-CCR4-CXCR3+, les effecteurs Th2 sont CCR6-CCR4+CXCR3-, les effecteurs Th17 sont CCR6+CCR4-CXCR3-, les effecteurs Th17 (CXCR3+) sont CCR6+CCR4-CXCR3+, les effecteurs Th9 sont CCR6+CCR4+CXCR3+ et les effecteurs Th22 sont CCR6+CCR4+CXCR3- (**Figure17A**). Les effecteurs Th17 sont donc caractérisés selon deux patterns d'expression de récepteurs de surface ; cela provient du fait qu'il n'existe pas de consensus sur l'identification des effecteurs différenciés Th17.

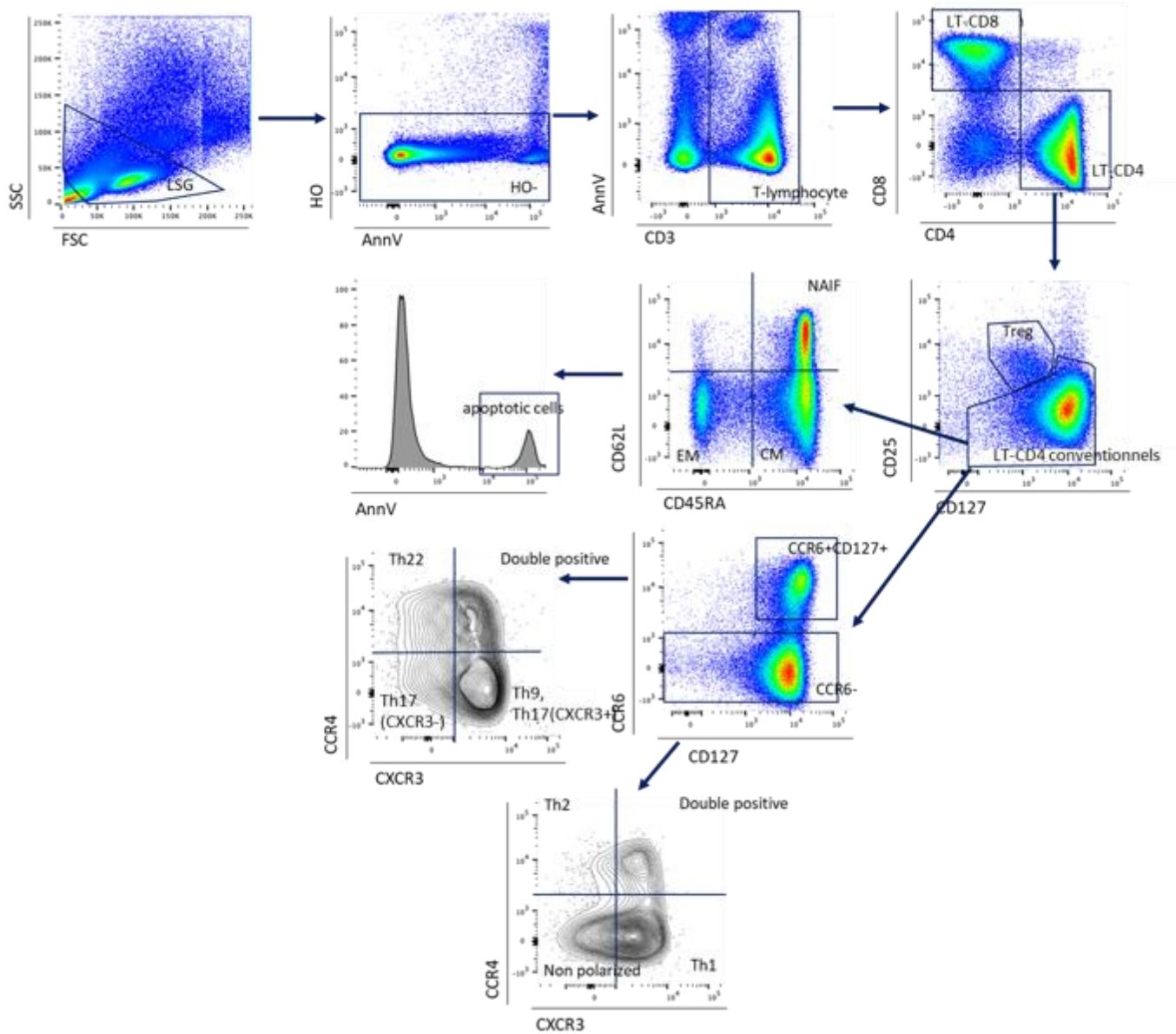
Avant d'étudier l'effet de l'irradiation sur des processus cellulaires, il a été vérifié que l'irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy n'induit pas de perte sélective des LT-CD4 dans la population de LT total (**Figure17B**). La proportion de lymphocytes-T-CD4 parmi les lymphocytes-T reste stable avec les doses d'irradiation ce qui suggère que dans les conditions expérimentales, il est possible d'étudier les effets de l'irradiation dans la population de LT-CD4. En condition contrôle non irradiée, la population de LT-CD4conv est composée en moyenne, pour la série des 12 individus étudiés, de 50 % de cellules naïves, de 30 % de cellules CM et de 20 % de cellules EM (**Figure 17C**). La mort cellulaire par apoptose a été analysée par mesure de l'intensité de fluorescence de l'AnnexineV (AnnV) (**Figure17D**) et par la quantification du pourcentage de cellules exprimant l'AnnV 17 h et 48 h après irradiation dans les populations de LT-CD4conv naïves, CM et EM. Les histogrammes de fluorescence montrent que l'irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy n'induit pas de déplacement de la population de cellules AnnV- mais induit une augmentation de la proportion de cellules AnnV+ et par conséquent du pourcentage de cellules apoptotiques dans la sous-population EM (CD62L-CD45RA-) (**Figures 17D et 17E gauche**). Il n'est pas observé d'apoptose dans les populations naïves (CD62L+CD45RA+) et CM (CD62L+CD45RA-) (**Figures 17D et 17E droite**). En moyenne, pour la série de 12 individus étudiée, dans la population de LT-CD4-EM, l'apoptose est augmentée de 2 fois 17 h après une irradiation à 8 Gy et est augmentée de 3 fois 48 h après une irradiation à 8 Gy, par rapport à la condition contrôle non irradiée.

A. Protocole d'irradiation *in vitro* des PBMCs

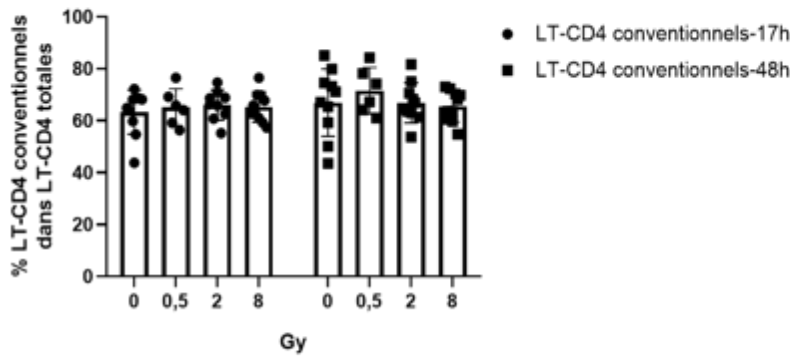


Analyses par cytométrie en flux

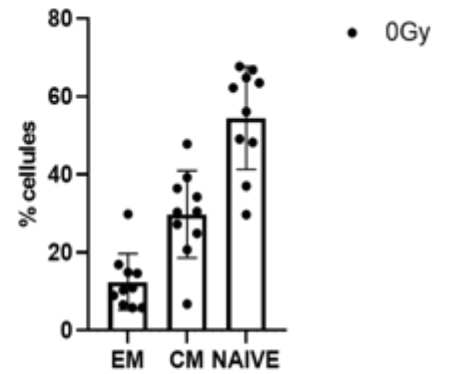
1. Identification des sous-populations de LT-CD4
2. Analyse de l'intensité de l'AnnV et quantification du % de cellules AnnV+
3. Analyse intensité de fluorescence de CD62L, CD45RA, CCR6 et CD127



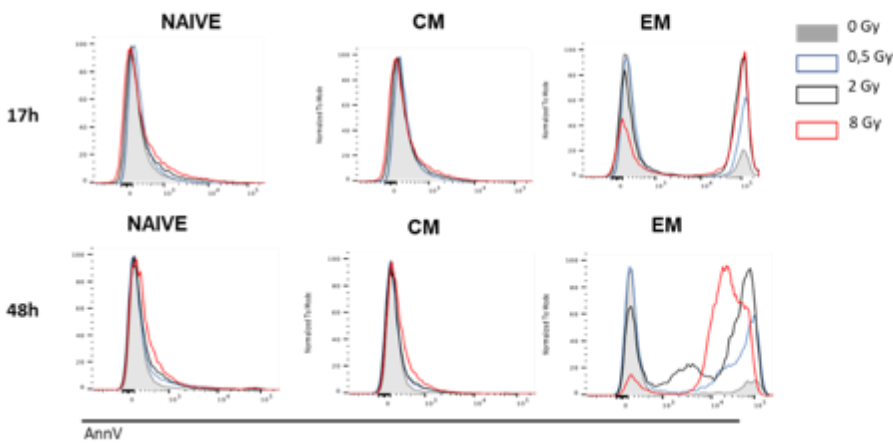
B. Proportion de LT-CD4 conventionnels dans les LT-CD4 totale post irradiation



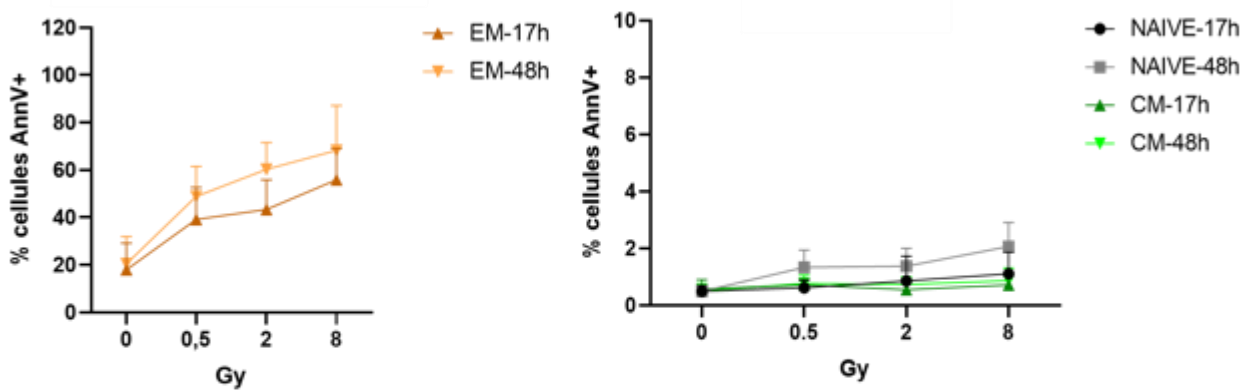
C. Proportion de de LT-CD4 conventionnels NAIVE, CM et EM en condition non irradiée



D. Intensité de fluorescence de l'AnnV dans les sous-populations de LT-CD4 conventionnels NAIVE, CM et EM post irradiation



E. Quantification des cellules AnnV+ dans les sous-populations de LT-CD4 conventionnels NAIVE, CM et EM post irradiation



Test statistique de Student

	EM			
	17h		48h	
0,5 vs 0 Gy	0,002	**	0,0001	***
2 vs 0 Gy	0,0001	***	1,83E-07	****
8 vs 0Gy	8,75E-07	****	1,036E-06	****

Figure 17 : L'irradiation induit l'apoptose uniquement au sein de la sous-population de lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires. légende en page 110

Figure 17 : L'irradiation induit l'apoptose uniquement au sein de la sous-population de lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires.

A. Schéma expérimental d'irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy de PBMCs humains avant mesure et schéma d'analyse par gating hiérarchique d'un fichier représentatif de mesure par cytométrie en flux. L'identification des différents compartiments cellulaires sur la base de l'expression de récepteurs de surface conduit à la quantification de l'apoptose radio-induite par compartiment. Les irradiations, mesures et analyses ont été réalisées pour 12 donneurs sains à 17 et 48 heures après irradiation à 0, 0,5, 2 et 8 Gy. **B.** Histogramme présentant les proportions de lymphocytes-T-CD4 parmi les lymphocytes-T mesurées, à 17h et 48 h après irradiation (doses 0,5, 2 et 8 Gy) et condition contrôle non irradiée ; n=12 **C.** Histogrammes présentant les proportions des populations naïves, CM et EM parmi les lymphocytes-T-CD4 conventionnels, mesurées 17h et 48 h après irradiation (doses 0,5, 2 et 8 Gy) et condition contrôle non irradiée ; n=12 **D.** Superposition d'histogrammes de fluorescence AnnexineV mesurée pour un même échantillon sanguin irradié à dose 0 (gris), 0,5 (bleu), 2 (noir) et 8 (rouge) Gy à 17h et 48 h et chacune des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 (naïve, CM et EM). **E.** Courbes dose-effet présentant le pourcentage (moyenne et écart type) de cellules AnnexineV positives en fonction de la dose d'irradiation à 0, 0,5, 2 et 8 Gy dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels EM (orange), naïve (noir) et CM (vert) mesuré à 17h et 48 h, n=12. Des tests statistiques de Student ont été réalisés comparant à 17h et 48 h après une irradiation, à 0, 0,5, 2 et 8 Gy, le pourcentage moyen de cellules apoptotiques. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type. * valeur $p < 0.05$, ** valeur $p < 0.01$, *** valeur $p < 0.0001$, **** valeur $p < 0.00001$.

La population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteur mémoire est hétérogène pour la sensibilité à l'apoptose radio-induite. Elle présente d'une part une population CCR6+CD127+ résistante à l'apoptose radio-induite et d'autre part et une population CCR6- sensible à l'apoptose radio-induite. La résistance des CCR6+CD127+ est indépendante de la signalisation pro-apoptotique médiée par TRAIL (TNFSF10).

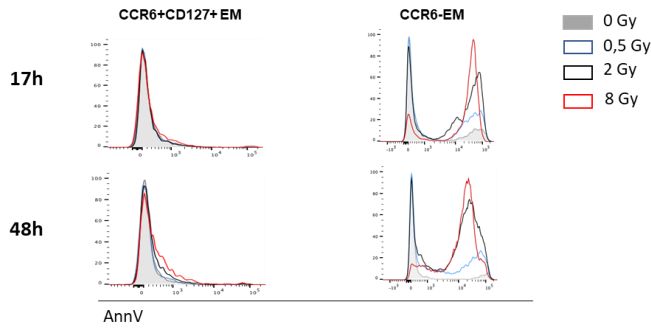
Afin de préciser les effets de l'irradiation dans la population de LT-CD4conv EM, nous avons analysé l'apoptose après irradiation au sein des sous-populations ; d'une part CCR6+CD127+ et CCR6- et d'autre part dans les effecteurs différenciés Th compris dans les CCR6+CD127+ et CCR6-. Les histogrammes d'intensité de fluorescence AnnexineV dans la population de LT-CD4conv EM CCR6+CD127+, 17 h et 48 h après une irradiation à 0,5, 2 ou 8 Gy ne révèlent pas, contrairement à la population de LT-CD4conv EM CCR6-, d'augmentation dose dépendante d'un pic de forte fluorescence correspondant aux cellules apoptotiques. Dans les LT-CD4conv EM CCR6- la proportion de cellules apoptotiques augmente de manière dose dépendante à 17 h et massivement à 48 h (**Figure 18A**). Dans la série des 12 individus étudiée, la proportion de cellules apoptotiques, 17 h après irradiation à 8 Gy, est en moyenne de 5% dans la population CCR6+CD127+EM et en moyenne de 75 % dans la population CCR6-EM (**Figure 18A**). 48 h après irradiation à 0.5, 2 et 8 Gy, l'hétérogénéité entre les populations de LT-CD4conv CCR6+CD127+EM et CCR6-EM persiste et est amplifiée. En effet, une irradiation à 8 Gy induit, en moyenne, l'apoptose de 10 % des cellules EM CCR6+CD127+EM et de 90 % dans des cellules CCR6-EM (**Figure 18B**). Ainsi, dans la série de 12 donneurs sains étudiés, 17 h et 48 h après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, il est observé que la population de LT-CD4conv CCR6-EM présente 5 fois plus de cellules apoptotiques que la population de LT-CD4conv CCR6+CD127+EM (**Figures 18A et 18B**). Afin de déterminer si la résistance à l'apoptose des CCR6+CD127+EM est dépendante d'une signalisation cellulaire autonome ou de l'environnement cellulaire, la population de lymphocytes-T-CD4 EM CCR6+CD127+ a été isolée par tri cellulaire puis irradiée à 2 et 8 Gy. Cette expérience réalisée sur un seul échantillon, montre que la résistance à l'apoptose radio-induite observée après irradiation sur cellules triées CCR6+CD127+EM est similaire à celle observée lorsque ce sont les PMBCs totaux qui sont irradiés. Cela suggère que la résistance à l'apoptose radio-induite des CCR6+CD127+EM dépend d'une signalisation spécifique et non de l'environnement (**Figure 18C**).

Ce résultat suggère une possible hétérogénéité entre LT-CD4-EM, CCR6+CD127+ et CCR6-, qui pourrait être médiée par la signalisation de l'apoptose TRAIL dépendante, impliquée précédemment dans la sensibilité à l'apoptose des LT-CD4-EM. L'expression génique du ligand *TRAIL (TNFSF10)* et de ses récepteurs pro-apoptotiques *TNFRSF10B (DR-5)* et *TNFRSF10A (DR-4)* a été mesurée dans une série d'échantillons, par RTqPCR 6 h après irradiation à 2 et 8 Gy dans les sous-populations de LT-CD4conv

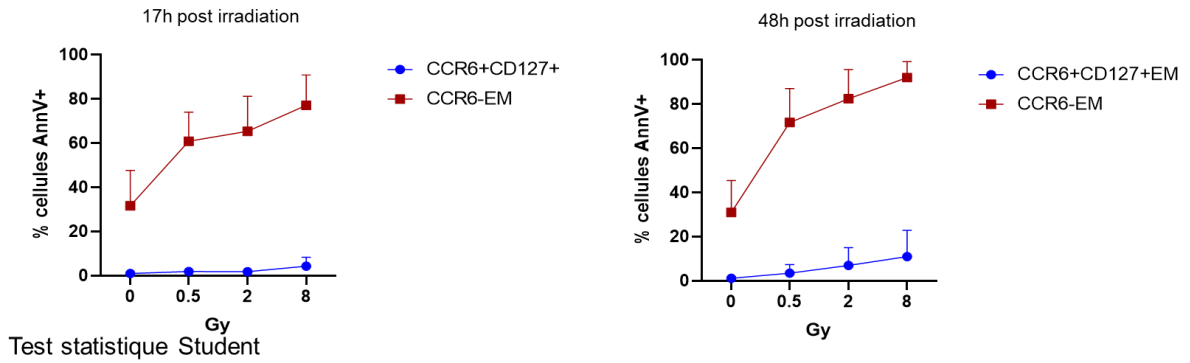
triées : CCR6+CD127+-EM et CCR-EM. Les expressions relatives du ligand *TRAIL* (*TNFSF10*) et du récepteur pro-apoptotique *TNFRSF10A* (*DR-4*) ne diffèrent pas 6 h après irradiation à 2 et 8 Gy dans les deux sous-populations (**Figure 18D gauche et centre**). Dans les deux populations CCR6+CD127+EM et CCR6-EM, l'expression relative du récepteur pro-apoptotique *TNFRSF10B* (*DR-5*) est augmentée de 2 fois après une irradiation à 2 Gy et 3 fois après une irradiation à 8 Gy, par rapport à la condition contrôle non irradiée (**Figure 18D droite**). Ces expériences ne révèlent pas de différence d'expression du gène *TNFRSF10B* (*DR-5*) entre CCR6+CD127+EM et CCR6-EM.

La population de LT-CD4conv est composée d'effecteurs différenciés Th, CCR6- : Th1, Th2, Th et Treg) et CCR6+ : Th9, Th17 (CXCR3+), Th17 (CXCR3-) et Th22 (identifiés selon le gating en Figure 17A); et pour lesquels nous avons quantifié à 17 h et 48 h après irradiation l'apoptose radio-induite. Dans les effecteurs différenciés, il existe une hétérogénéité d'apoptose radio-induite visible dès 17 h après irradiation (**Figure 18E**). Dans les effecteurs Treg, Th2, Th1 et Th non polarisés, l'irradiation induit à 17 h et à 48 h à une augmentation dose dépendante du pourcentage de cellules apoptotiques. Les résultats, sur la série de 12 donneurs étudiée révèlent, que 48 h après irradiation à 8 Gy, il y'a 3 fois plus de cellules apoptotiques dans les Tregs et Th CCR6- : Th1, Th2, Th non polarisés comparé à la condition contrôle et 1,5 fois plus de cellules apoptotiques dans les Th CCR6+ : Th9, Th17 (CXCR3+), Th17 (CXCR3-) et Th22, 48 h après irradiation à 8 Gy comparée à la condition contrôle. Cette augmentation du pourcentage de cellules apoptotiques dans les effecteurs Th9, Th17 et Th22 est donc beaucoup moins importante comparée aux effecteurs radio-sensibles : Treg, Th2, Th1 et Th non polarisés. Ainsi, les effecteurs Th9, Th17 (CXCR3), Th17 (CXCR3-) et Th22 sont 2 fois moins sensibles que les effecteurs Treg, Th2, Th1 et Th non polarisés (**Figure 18E**).

A. Intensité de fluorescence de l'AnnV dans les sous-populations CCR6+CD127+EM et CCR6-EM post irradiation



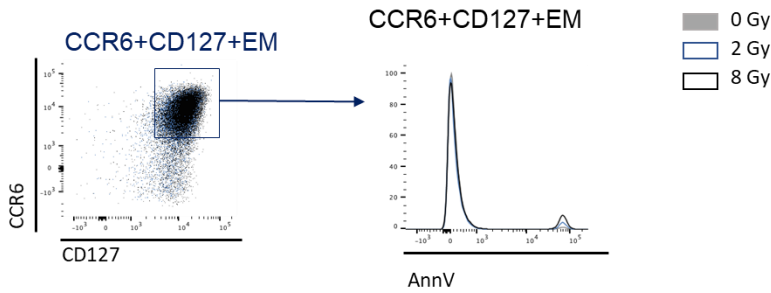
B. Quantification des cellules AnnV+ dans les sous-populations CCR6+CD127+EM et CCR6-EM post irradiation



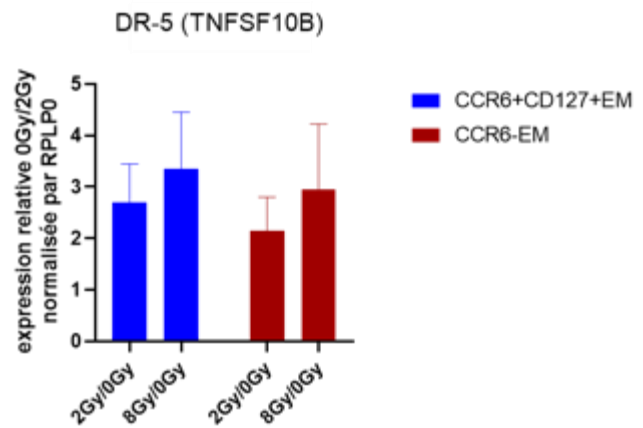
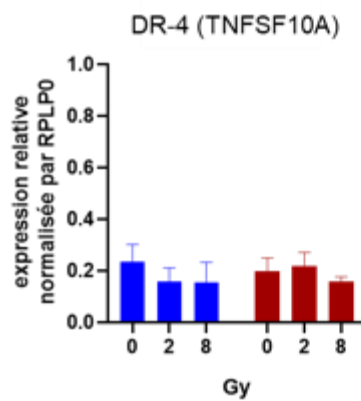
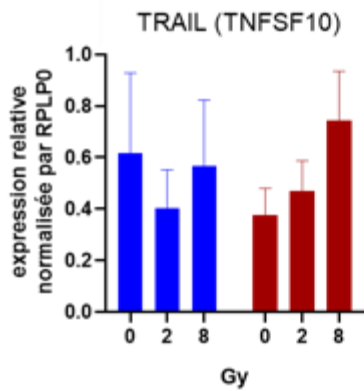
Test statistique Student

	CCR6+CD127+EM vs CCR6-EM	
	17h	48h
0 Gy	5,20E-06 ****	2,00E-06 ****
0.5 Gy	3,50E-07 ****	4,86E-07 ****
2 Gy	9,85E-10 ****	4,48E-12 ****
8 Gy	2,00E-12 ****	2,11E-13 ****

C. Intensité de fluorescence de l'AnnV dans la sous-populations CCR6+CD127+EM triée post irradiation



D. Expressions relatives des gènes *TRAIL*, *DR5* and *DR4* dans les sous-populations CCR6+CD127+EM et CCR6-EM mesurées par q-PCR post irradiation



E. Quantification des cellules AnnV+ dans les effecteurs Treg et dans les effecteurs Th-EM post irradiation

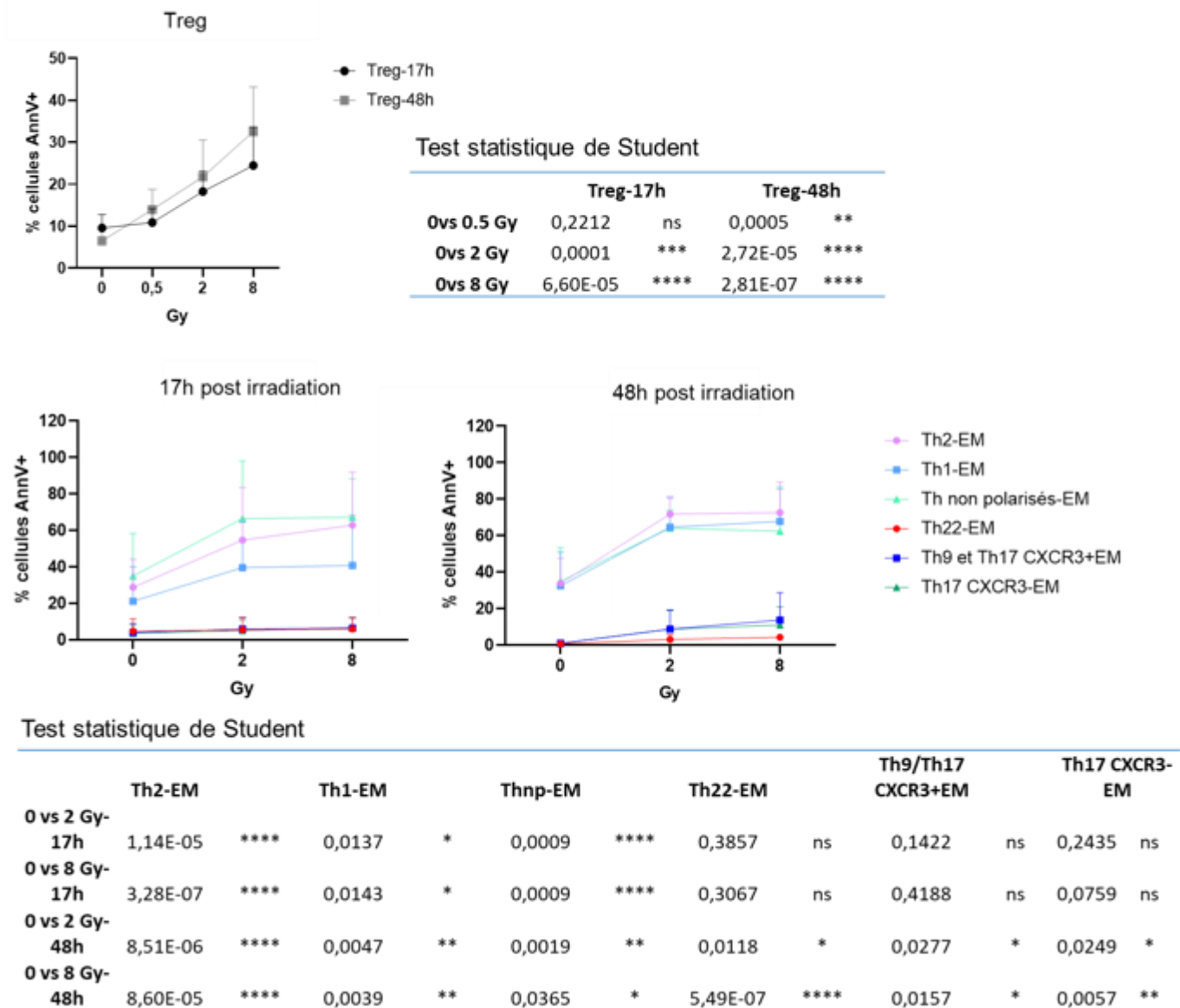


Figure 18 : La population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteur mémoire est hétérogène pour la sensibilité à l'apoptose radio-induite. Elle présente d'une part une population CCR6+CD127+ résistante à l'apoptose radio-induite et d'autre part et une population CCR6- sensible à l'apoptose radio-induite. La résistance des CCR6+CD127+ est indépendante de la signalisation pro-apoptotique médiée par TRAIL (TNFSF10). Légende en page 116

Figure 18 : La population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteur mémoire est hétérogène pour la sensibilité à l'apoptose radio-induite. Elle présente d'une part une population CCR6+CD127+ résistante à l'apoptose radio-induite et d'autre part et une population CCR6- sensible à l'apoptose radio-induite. La résistance des CCR6+CD127+ est indépendante de la signalisation pro-apoptotique médiée par TRAIL (TNFSF10).

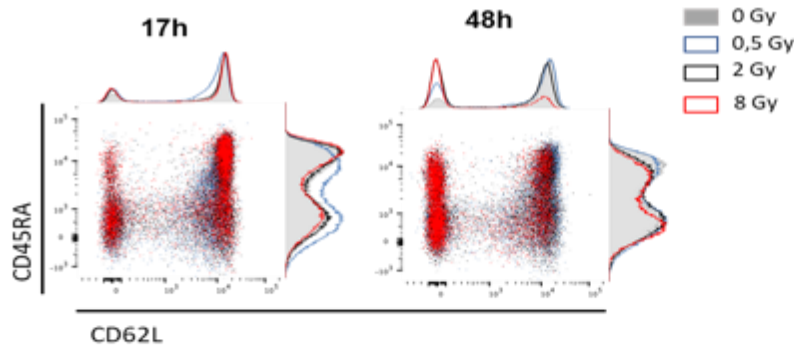
A. Superposition d'histogrammes de fluorescence AnnexineV mesurée pour un même échantillon sanguin irradié à dose 0 (gris), 0,5 (bleu), 2 (noir) et 8 (rouge) Gy à 17h et 48 h et pour chacune des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels EM CCR6+CD127+ et CCR6-. n=1 **B.** Courbes dose-effet présentant le pourcentage (moyenne et écart type) de cellules l'AnnexineV positives en fonction de la dose d'irradiation à 0, 0,5, 2 et 8 Gy dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels EM CCR6+CD127+ (bleue) et CCR6- (rouge) mesuré à 17h et 48 h , n=12. Table des résultats des tests statistiques de student comparant le pourcentage de cellules apoptotiques quantifié en condition contrôle non irradiée avec ceux à 0,5 2 et 8 Gy pour les populations CCR6+CD127+ EM et CCR6-EM **C.** Distribution de fluorescence CD127 versus CCR6 des LT-CD4 de la fraction cellulaire CCR6+CD127+ EM triée, 17 heures après tri cellulaire et irradiation avec les limites du critère de tri (encadré noir) (gauche) et superposition d'histogrammes d'intensité de fluorescence Annexine V mesurée 17h après irradiation à 2 (bleue) et 8 (noir) Gy correspondant au critère du tri (droite), n=1. **D.** Histogrammes présentant les résultats de RTqPCR pour l'expression relative des gènes *TRAIL (TNFSF10)*, *DR-5 (TNFRSF10B)* et *DR-4 (TNFRSF10A)* mesurée dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels : CCR6+CD127+ EM et CCR6- EM, en condition contrôle non irradiée et 6 heures après irradiation à 2 et 8 Gy. **E.** Courbes dose-effet présentant le pourcentage (moyenne et écart type) de cellules l'AnnexineV positives en fonction de la dose d'irradiation à 0, 0,5, 2 et 8 Gy dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteurs mémoires différenciés : Treg, Th22, Th9 et Th17 (CXCR3+), Th17 (CXCR3-), Th1, Th2 et Th non-polarisés, n=12. Table des résultats des tests statistiques de student comparant le pourcentage de cellules apoptotiques quantifié en condition contrôle non irradiée au pourcentage de cellules apoptotiques quantifié à 0,5 ,2 et 8 Gy pour tous les effecteurs différenciés. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type. * valeur p<0.05, ** valeur p< 0.01, *** valeur p < 0.0001, **** valeur p< 0.00001.

L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels une diminution de l'expression du récepteur de surface CD62L (L-Selectin).

En parallèle de l'étude de la mort cellulaire par apoptose, l'expression des récepteurs de surface a été étudiée. Les distributions des lymphocytes-T-CD4 (LT-CD4) en fonction de l'intensité de fluorescence des récepteurs de surface CD62L et CD45RA ont été analysées dans la population de LT-CD4conv. Nos résultats montrent que les distributions des LT-CD4 en fonction de l'intensité de fluorescence du récepteur CD62L mais pas du CD45RA montrent une diminution dose dépendante et progressive de 17 h à 48 h de la proportion de lymphocytes-T-CD4 CD62L+ (**Figure 19A**). La baisse d'expression du récepteur CD62L se traduit par une augmentation dose dépendante et progressive dans le temps des sous-populations CD62L- et par une diminution dose dépendante et progressive dans le temps de la proportion des sous-populations CD62L+. La proportion de la population naïve CD62L+CD45RA+ est stable 17 h après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy. Cependant, 48 h après irradiation, il est observé respectivement après une irradiation de 2 Gy et 8 Gy, une diminution de la proportion de cellules naïves de 1.5 fois et de 3 fois comparée à la condition contrôle non irradiée dans la série des 12 donneurs étudiés (**Figure 19B gauche**). La proportion des cellules CM CD62L+CD45RA- diminue de manière dose dépendante dès 17 h après irradiation. En effet il est observé après une irradiation de 8 Gy, une diminution de la proportion de cellules CM de 1.5 fois comparée à la condition contrôle non irradiée dans la série des 12 donneurs étudiés. La diminution dose dépendante de la proportion de la population CM est accentuée 48 h après irradiation. En effet, 48 h après une irradiation à 8 Gy, la proportion de cellules CM est 3 fois inférieure à la condition contrôle non irradiée dans la série des 12 donneurs étudiés (**Figure 19B gauche**). En corollaire, la proportion de la population EM CD62L-CD45RA- augmente de manière dose dépendante, dès 17 h après irradiation à partir d'une dose de 8 Gy, par rapport à la condition contrôle non irradiée. L'augmentation de la proportion de la population EM dose dépendante est massive 48 h après irradiation, où il est observé respectivement après une irradiation de 0,5, 2 Gy et 8 Gy, une augmentation de la proportion de cellules EM, 2 fois, 3 fois et 4 fois supérieure à la condition contrôle non irradiée dans la série des 12 donneurs étudiés (**Figure 19B droite**). Enfin, l'irradiation dès 2 Gy induit 17 h après irradiation une augmentation de la proportion de cellules CD62L-CD45RA+ qui est 3 fois supérieure à la proportion mesurée dans la condition contrôle non irradiée dans la série des 12 donneurs étudiés. Ces cellules ne sont pas caractérisées dans le sang et sont présentes uniquement en culture *in vitro*. Dans nos conditions de culture, elles apparaissent après l'irradiation des PBMCs. L'augmentation de la proportion de cellules CD62L-CD45RA+ est massive 48 h après irradiation et est observée dès une dose de 2 Gy. L'augmentation de la proportion de cellules CD62L- CD45RA+, 48 h après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy est, 2 fois, 3 fois et 4 fois supérieure

à la proportion mesurée en condition contrôle non irradiée dans la série des 12 donneurs étudiés (Figure 19B droite).

A. Intensité de fluorescence de CD62L et CD45RA dans les LT-CD4 conventionnels post irradiation



B. Proportion de LT-CD4 NAIF, EM, CM et CD62L-CD45RA+ dans les LT-CD4 conventionnel post irradiation

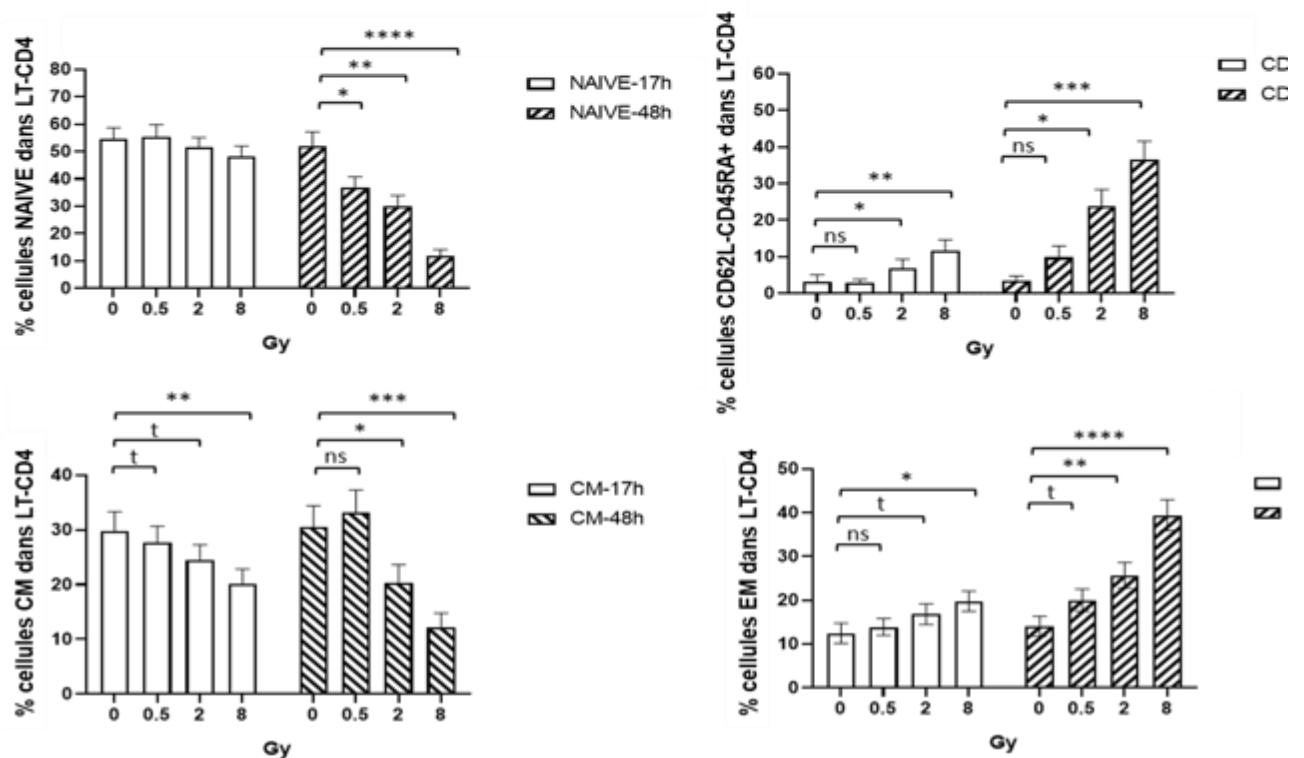


Figure 19 : L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels une diminution de l'expression du récepteur de surface CD62L (L-Selectin).

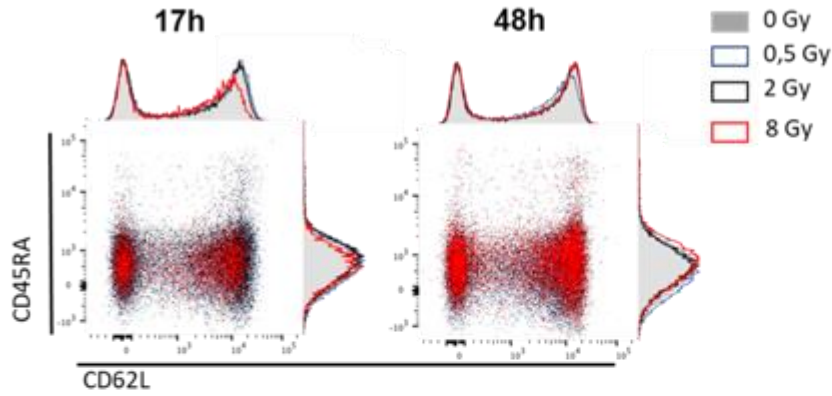
A. Superposition d'histogrammes d'intensité des fluorescences des récepteurs de surface CD62L et CD45RA mesurée dans les lymphocytes-T-CD4 conventionnels en condition contrôle non irradiée et 17h et 48 h après irradiation à 0,5 (bleu), 2 (noir) et 8 (rouge) Gy, n=1. **B.** Histogrammes présentant les proportions des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels naïfs, CM, EM et des cellules CD62L-CD45RA+, quantifié en condition contrôle non irradiée et 17h et 48 h après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, n=12. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type, * valeur p<0.05, ** valeur p< 0.01, *** valeur p < 0.0001, **** valeur p< 0.00001.

L'irradiation induit une diminution de l'expression du récepteur CD62L spécifiquement à la surface de la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels CCR6-, mais pas dans la population CCR6+CD127+.

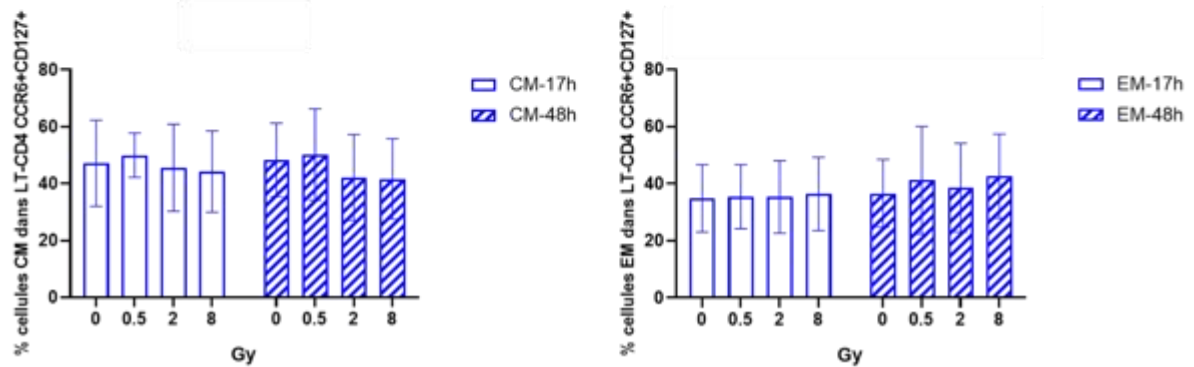
Nous nous sommes aussi intéressés à l'expression de CD45RA et CD62L dans les populations de LT-CD4conv CCR6+CD127+EM et CCR6-EM (ayant des sensibilités à l'apoptose radio-induite différentes). L'expression des récepteurs de surface CD62L et CD45RA a été étudiée 17 h et 48 h après irradiation dans ces deux populations de LT-CD4conv : CCR6+CD127+ et CCR6- (**Figure 20**). La population de LT-CD4conv CCR6+CD127+ est composée à parts égales de cellules CM (CD62L+CD45RA-) et EM (CD62L-CD45RA-) dans la série des 12 donneurs étudiés (**Figure 20A**). Les cellules LT-CD4conv CCR6+CD127+ ne sont pas impactées par l'irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy pour l'intensité de fluorescence du récepteur CD62L et les proportions des sous-populations CCR6+CD127+ CM et EM restent donc inchangées (**Figure 20B**). Les cellules de la population de LT-CD4conv CCR6- en fonction de l'expression des deux récepteurs CD62L et CD45RA sont distribuées en trois sous-populations : naïves (CD62L+CD45RA+), CM (CD62L+CD45RA-) et EM (CD62L-CD45RA-) (**Figure 20C**). Dans les LT-CD4conv CCR6-, l'irradiation induit, dès 17 h après irradiation, une évolution de la distribution avec une diminution dose dépendante des cellules de forte intensité de fluorescence pour le récepteur de surface CD62L ce phénomène ne touche pas le récepteur de surface CD45RA. Cette baisse est amplifiée 48 h après irradiation (**Figure 20C**). Dans la population de LT-CD4conv CCR6-, la proportion de la population naïve CD62L+CD45RA+ est stable 17 h après une irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy. Cependant, 48 h après irradiation, il est observé respectivement après une irradiation de 2 Gy et 8 Gy, une proportion de cellules naïves 2 fois et 3 fois inférieure à la proportion mesurée en condition contrôle non irradiée dans la série de 12 individus étudiés (**Figure 20D gauche**). La proportion des cellules CM CD62L+CD45RA- diminue de manière dose dépendante uniquement 48 h après irradiation, où il est observé après une irradiation de 8 Gy, une diminution de la proportion de cellules CM 2 fois inférieure à la condition contrôle non irradiée dans notre série d'échantillons (**Figure 20D gauche**). La proportion de la population EM (CD62L-CD45RA-) augmente de manière dose dépendante dès 17 h après irradiation à partir d'une dose de 2 Gy par rapport à la condition contrôle non irradiée. L'augmentation dose dépendante de la proportion de la cellules EM est massive 48 h après irradiation, où il est observé à 48 h respectivement après une irradiation de 2 Gy et 8 Gy, une augmentation de la proportion de cellules EM 2 fois et 4 fois supérieure à la condition contrôle non irradiée dans notre série de 12 échantillons (**Figure 20D droite**). L'irradiation induit dès 17 h l'augmentation de la proportion de cellules CD62L-CD45RA+ qui n'existe pas en condition contrôle non irradiée. L'augmentation de la proportion de cellules CD62L-CD45RA+ est massive 48 h après irradiation et est observée dès une dose de 0,5 Gy. L'augmentation de la proportion de cellules CD62L-CD45RA+, 48 h respectivement après

irradiation à 2 et 8 Gy est, 6 fois, et 8 fois supérieure à la condition contrôle non irradiée dans notre série d'échantillons (**Figure 20D droite**).

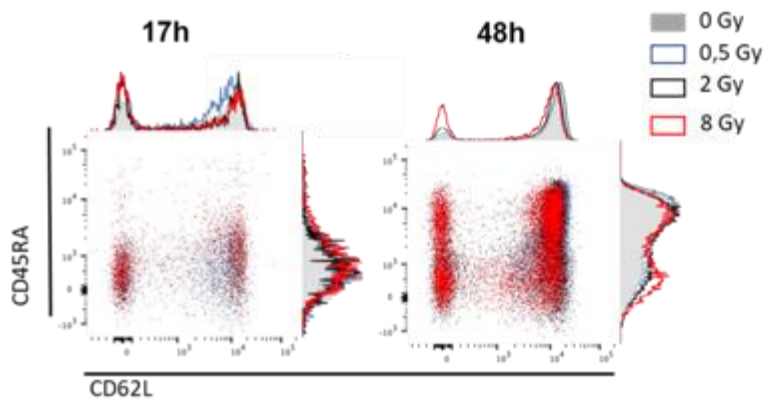
A. Intensité de fluorescence de CD62L et CD45RA dans les LT-CD4 conventionnels CCR6+ post irradiation



B. Proportion de LT-CD4 NAIF, EM, CM et CD62L-CD45RA+ dans les LT-CD4 conventionnel CCR6+ post irradiation



C. Intensité de fluorescence de CD62L et CD45RA dans les LT-CD4 conventionnels CCR6- post irradiation



D. Proportion de LT-CD4 NAIF, EM, CM et CD62L-CD45RA+ dans les LT-CD4 conventionnel CCR6- post irradiation

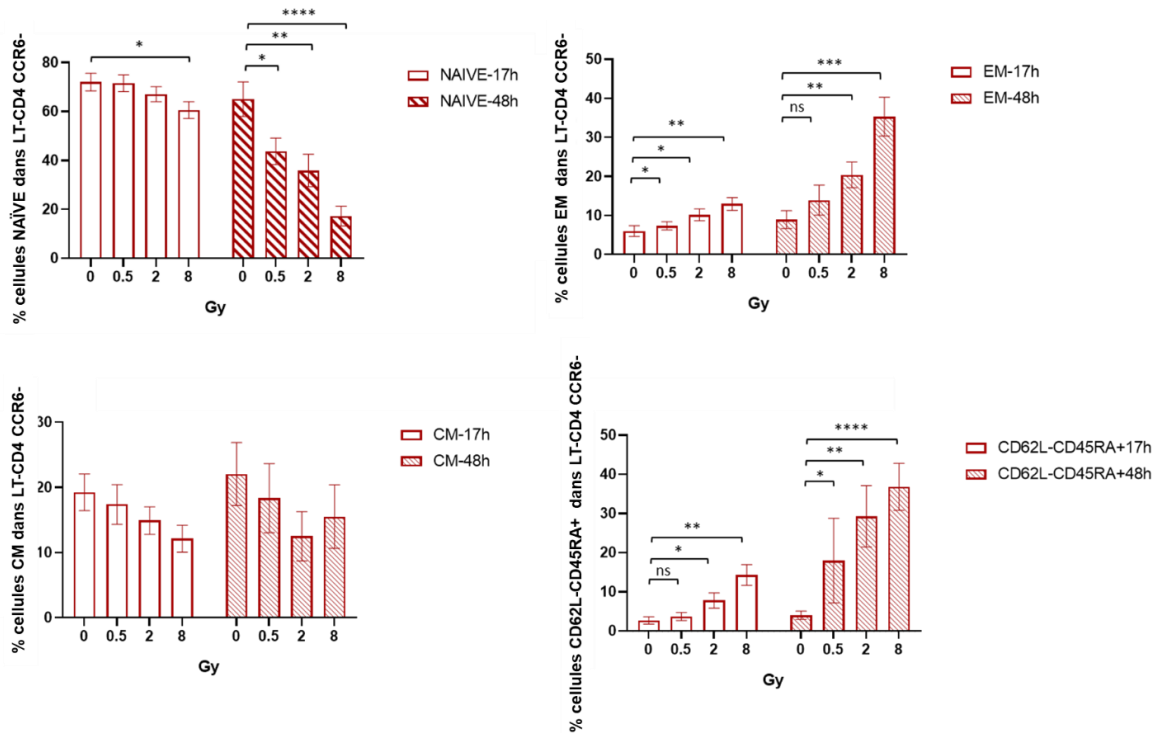


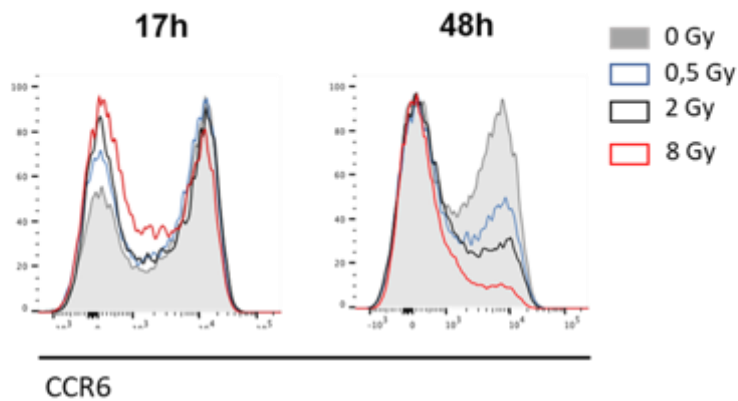
Figure 20 : L'irradiation induit une diminution de l'expression du récepteur CD62L spécifiquement à la surface de la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnel CCR6-, mais pas dans la population CCR6+CD127+.

A. Superposition des histogrammes d'intensité de fluorescence des récepteurs de surface CD62L versus CD45RA mesurée dans les lymphocytes-T-CD4 conventionnels CCR6+CD127+ en condition contrôle non irradiée, 17h et 48 h après irradiation à : 0,5 (bleue), 2 (noir) et 8 (rouge) Gy, n=1. **B** Histogrammes présentant les proportions des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels CCR6+CD127+ : CM et EM quantifié à 17h et 48 h, en condition contrôle et après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, n=12. **C.** Superposition des histogrammes d'intensité de fluorescence des récepteurs de surface CD62L versus CD45RA mesurée dans les lymphocytes-T-CD4 conventionnels CCR6- en condition contrôle non irradiée, 17h et 48 h après irradiation à : 0,5 (bleue), 2 (noir) et 8 (rouge) Gy, n=1. **D.** Histogrammes présentant les proportions des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels CCR6- : CM), EM, naïve et CD62L-CD45RA+ quantifié à 17h et 48 h, en condition contrôle et après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, n=12. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type, * valeur p<0.05, ** valeur p<0.01, *** valeur p<0.0001, **** valeur p<0.00001.

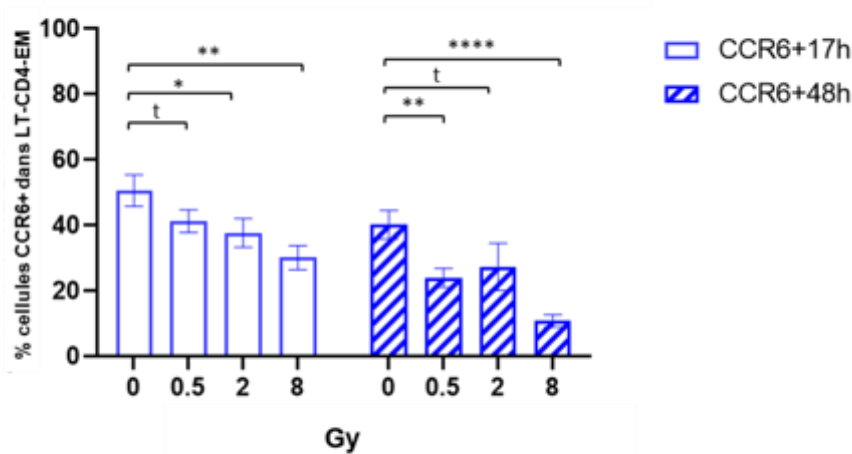
L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteurs mémoires une diminution de l'expression du récepteur de surface CCR6.

Dans le but de caractériser la composition et l'évolution radio-induite de la composition du compartiment LT-CD4conv EM, l'expression du récepteur de surface CCR6 a été étudiée 17 h et 48 h après irradiation. Au sein de la population LT-CD4conv EM, la proportion de cellules positives pour le récepteur CCR6 baisse de manière dose dépendante dès 17 h après une irradiation à 0.5 Gy. La diminution dose dépendante de l'expression de CCR6 à la surface des LT-CD4conv EM est amplifiée 48 h après irradiation (**Figure 21A**). Dans les LT-CD4conv EM, l'irradiation induit 17 h après irradiation une diminution de la proportion de cellules CCR6+ dès une dose de 2 Gy et amplifiée à 8 Gy. La proportion de CCR6+ est respectivement de 1.5 fois et 2 fois inférieure après irradiation par rapport à la condition contrôle non irradiée, dans notre série de 12 donneurs sains. Le même profil est observé 48 h après irradiation avec la diminution de la proportion de cellules CCR6+ après irradiation à 0.5, 2 et 8 Gy respectivement de 2 fois, 2 fois et 3 fois par rapport à la condition contrôle non irradiée (**Figure 21B**). De façon corollaire à la diminution de la proportion de cellules CCR6+ radio-induite, il a été observé une augmentation de la proportion de cellules CCR6- dès 17 h après irradiation à 2 Gy et 8 Gy. Cette augmentation radio-induite de la proportion de cellules CCR6- est accentuée 48 h après irradiation où la proportion de cellules CCR6- après irradiation à 0.5, 2 et 8 Gy est 1.5 fois supérieure à la condition contrôle non irradiée (**Figure 21C**).

A. Intensité de fluorescence de CCR6 dans les LT-CD4-EM post irradiation



B. Proportion de cellules CCR6+ dans les LT-CD4-EM post irradiation



C. Proportion de cellules CCR6- dans les LT-CD4-EM post irradiation

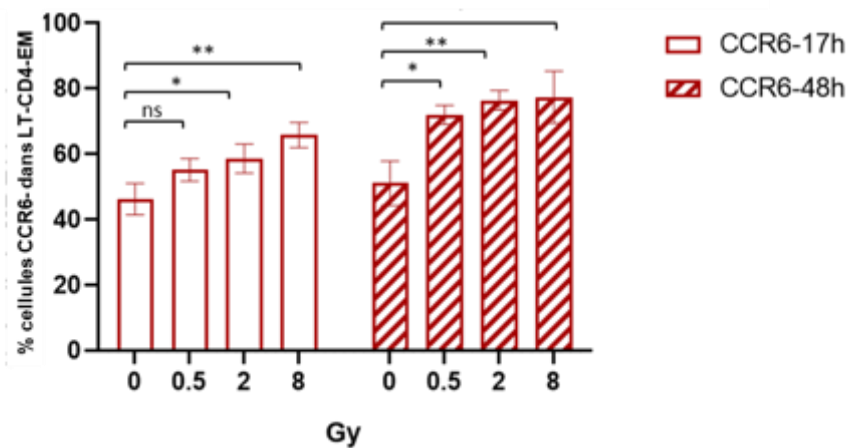


Figure 21 : L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteurs mémoires une diminution de l'expression du récepteur de surface CCR6. Légende en page 124

Figure 21 : L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteurs mémoires une diminution de l'expression du récepteur de surface CCR6.

A. Superposition des histogrammes d'intensité de fluorescence pour le récepteur de surface CCR6 mesurée dans les lymphocytes-T-CD4 conventionnels EM à 17h et 48 h, en condition contrôle non irradiée (gris) et après irradiation à : 0.5 (bleu), 2 (noir) et 8 (rouge) Gy, n=1. **B et C** Histogrammes présentant les proportions des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels EM : CCR6+(B) et CCR6-(C) quantifiés à 17h et 48 h, en condition contrôle et après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, n=12. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type, * valeur $p < 0.05$, ** valeur $p < 0.01$, *** valeur $p < 0.0001$, **** valeur $p < 0.00001$.

L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnel effecteur mémoire, une baisse de l'expression du récepteur de surface CD127, et plus spécifiquement dans la population CCR6- effecteur mémoire.

Dans le but de caractériser la composition et l'évolution radio-induite de la composition du compartiment LT-CD4conv EM, l'expression des récepteurs de surface CD127 a été étudiée 17 h et 48 h après irradiation dans les compartiments LT-CD4conv EM CCR6- et LT-CD4conv EM CCR6+. Les distributions d'intensité de fluorescence pour CD127 révèlent que l'irradiation induit 17 h après exposition et dès une dose de 0,5 Gy une diminution de la proportion de LT-CD4 positifs pour le marqueur CD127 dans la population de LT-CD4conv EM. La diminution dose dépendante de la proportion de LT-CD4 CD127+ est amplifiée 48 h après irradiation (**Figure 22A haut**). La perte de l'expression de CD127 se traduit par l'augmentation dans les LT-CD4conv EM de la proportion de cellules CD127- observée 17 h après irradiation et dès 0.5 Gy. Dans la population LT-CD4conv EM et dans la série de 12 individus étudiés, 17 h après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, la proportion de cellules CD127- est respectivement 1,7 fois, 1,7 fois et 2,5 fois supérieure à la proportion mesurée en condition contrôle non irradiée (**Figure 22B**). Les proportions de LT-CD4 positifs pour le récepteur CD127 ont ensuite été étudiées dans les sous-populations CCR6+ EM et CCR6- EM, qui sont respectivement résistante et sensible à l'apoptose radio-induite. La proportion de LT-CD4 CD127+ diminue de manière dose dépendante dès 17 h après irradiation dans la sous-population de LT-CD4conv EM CCR6- mais pas dans la sous-population CCR6+EM. La diminution dose dépendante de l'expression de CD127 à la surface des cellules CCR6-EM est massive 48 h après irradiation (**Figure 22A milieu et bas**). La proportion de cellules CD127- dans les populations LT-CD4conv EM CCR6+ est stable 17 h et 48 h après irradiation (**Figure 22C**) tandis que dans la population de LT-CD4conv CCR6-, l'irradiation induit une augmentation dose dépendante et progressive dans le temps de la proportion de cellules CD127-. 48 h après une irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, la proportion de cellules CD127- est respectivement 2 fois et 3 fois supérieure à la proportion mesurée en condition contrôle dans la série de 12 prélèvements étudiés (**Figure 22D**).

L'hétérogénéité de sensibilité à l'apoptose radio-induite démontrée au sein des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 est résumée dans un schéma récapitulatif en **Figure 23**. La diminution radio-induite de l'expression des molécules de surface CD62L, CCR6 et CD127 à la surface des lymphocytes-T-CD4 et lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire est aussi résumé dans le schéma en **Figure 23**.

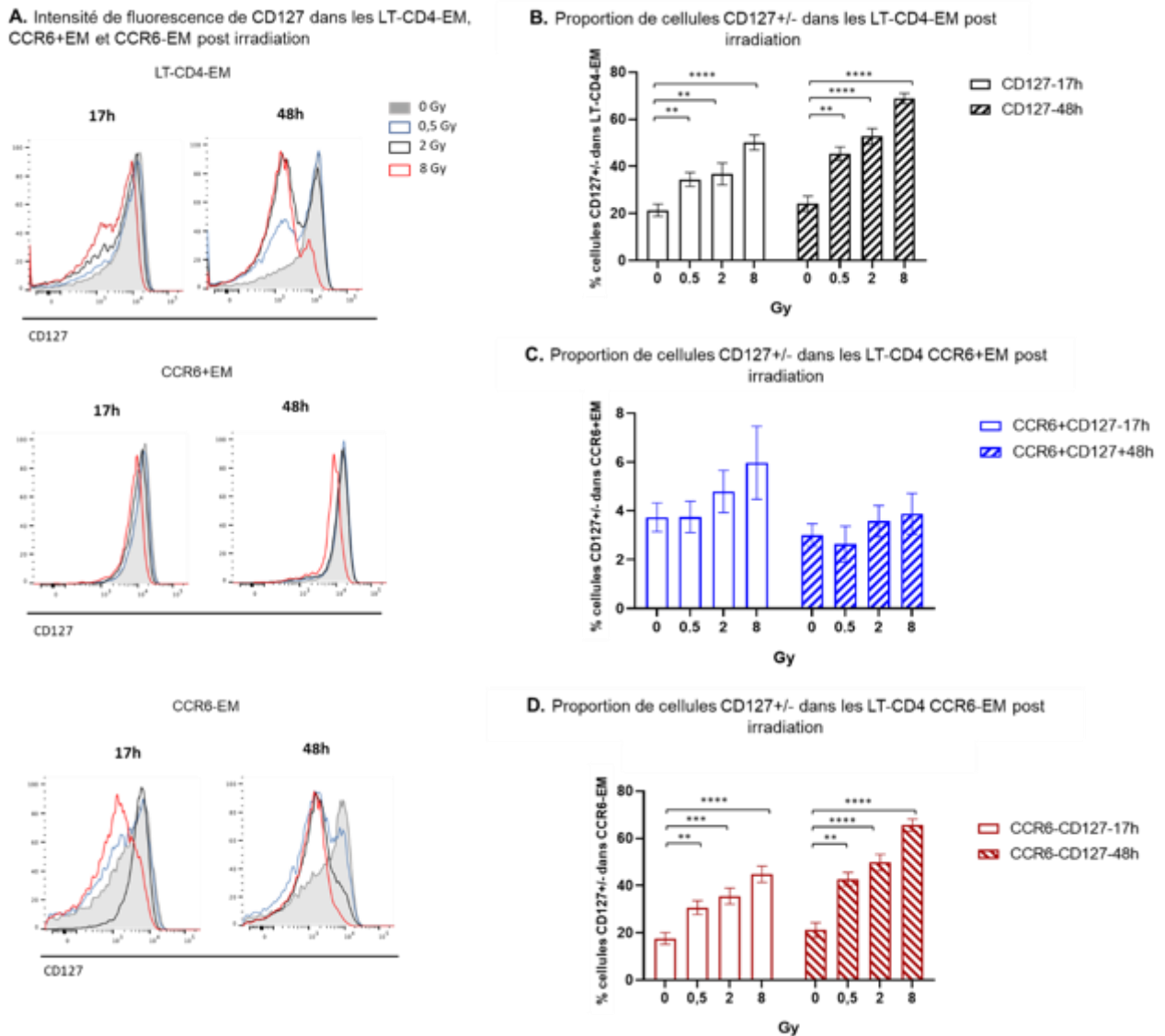
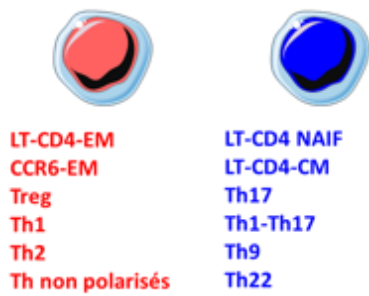


Figure 22 : L'irradiation induit dans la population de lymphocytes-T-CD4 conventionnels effecteurs mémoires une baisse de l'expression du récepteur de surface CD127 spécifiquement dans la population CCR6- effecteur mémoire.

A. Superposition des histogrammes d'intensité de fluorescence pour le récepteur de surface CD127 mesurée dans les lymphocytes-T-CD4 conventionnels : EM (haut), CCR6+ EM (milieu) et CCR6- EM (bas) à 17h et 48 h, en condition contrôle non irradiée (gris) et après irradiation à : 0,5 (bleue), 2 (noir) et 8 (rouge) Gy, n=1. **B, C** et **D** Histogrammes présentant les proportions des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels ; EM (**B**), EM CCR6+ (**C**) et EM CCR6- (**D**) quantifiés à 17h et 48 h, en condition contrôle et après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, n=12. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type, * valeur $p < 0.05$, ** valeur $p < 0.01$, *** valeur $p < 0.0001$, **** valeur $p < 0.00001$.

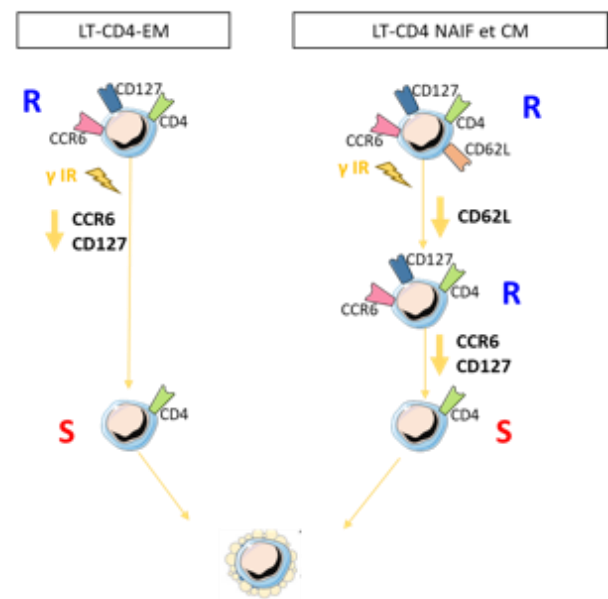
1. Sensibilité à l'apoptose radio-induite



Corrélation entre la sensibilité à l'apoptose et la diminution radio-induite de CD62L, CCR6 et CD127 ??

→ Induit par l'irradiation
 R : Résistance à l'apoptose radio-induite
 S : Sensibilité à l'apoptose radio-induite

2. Diminution radio-induite de l'expression CD62L CCR6 et CD127



Hypothèse: Amplification de la sensibilité à l'apoptose médiée par la diminution de l'expression de CD62L, CCR6 et CD127

Figure 23 : Schéma bilan de la caractérisation de l'hétérogénéité de radiosensibilité à l'apoptose dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 conventionnels et de la baisse d'expression radio-induite dans les lymphocytes-T-CD4 des récepteurs de surface CD62L, CCR6 et CD127.

2. Étude de la prolifération et de l'apoptose radio-induite dans les lymphocytes-T-CD4 et dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 après activation et irradiation *in vitro*

Dans le cadre de notre étude sur les effets de l'irradiation sur les LT-CD4, nous nous sommes interrogés sur les effets de l'irradiation sur la mort cellulaire par apoptose (**Figure 24**) et sur la prolifération (**Figure 25**) des LT-CD4 et des sous-populations de LT-CD4 après une activation *in vitro*. Pour étudier la prolifération, les PBMCs ont été marqués au CFSE qui se lie de façon covalente aux protéines du cytoplasme, et dont l'intensité diminue à chaque division cellulaire. Deux protocoles d'irradiation ont été élaborés. Dans le premier, l'irradiation et la stimulation sont concomitantes et ont été réalisées à la suite du marquage au CFSE, puis les PBMCs ont été cultivés pour une durée de 7 jours. Durée pendant et après laquelle, les paramètres de prolifération (nombre de divisions cellulaires et index de division) et la sensibilité à l'apoptose radio-induite ont été étudiés (**Figure 24A**). Dans le second protocole, les irradiations ont été réalisées au 6^{ème} jour après stimulation et expansion sur les PBMCs en prolifération. La sensibilité à l'apoptose radio-induite est alors étudiée dans les conditions standard à 17 h après l'irradiation, soit le 7^{ème} jour (**Figure 24A**).

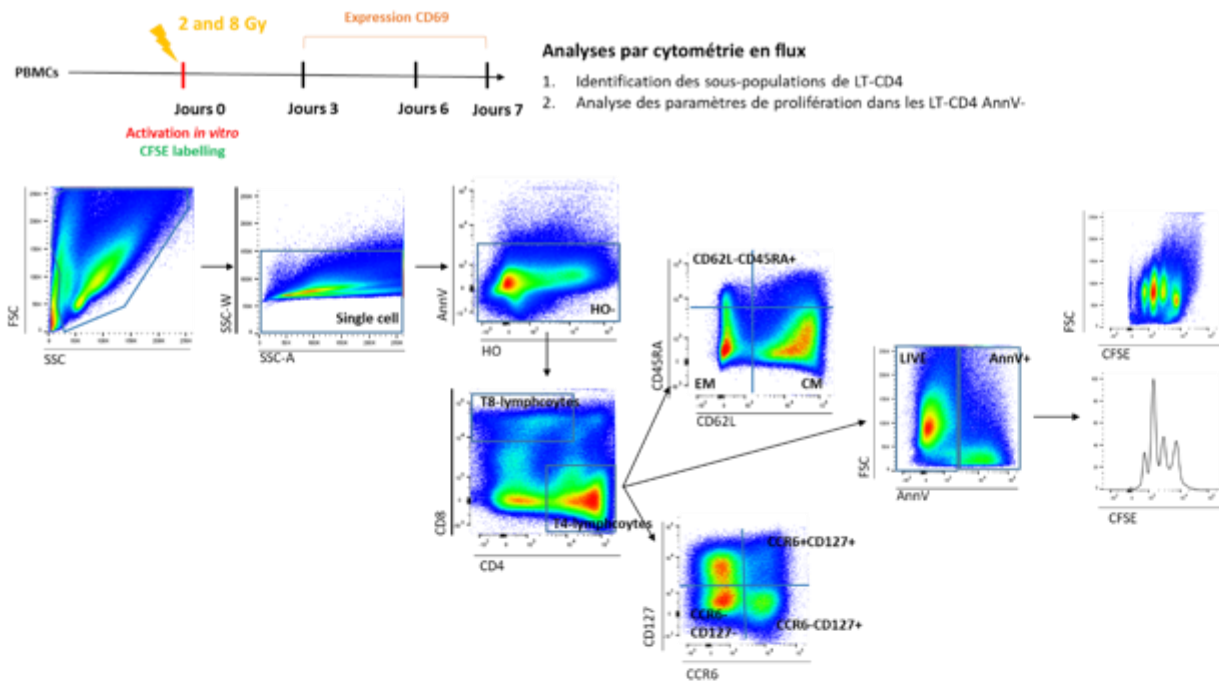
La stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28 lors de l'irradiation protège les lymphocytes -T-CD4 et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire de l'apoptose radio-induite.

L'expression du récepteur de surface CD69, spécifique de la stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28, a été mesurée 3 jours, 6 jours et 7 jours après la stimulation et irradiation à 2 et 8 Gy. Dans nos conditions de culture, le récepteur CD69 est exprimé 3 jours après la stimulation par la majorité des lymphocytes T-CD4. Il n'est pas détecté de différence dans le niveau d'expression, ni dans la proportion de cellules positives pour CD69, en fonction de la dose d'irradiation 3 jours après la stimulation. L'expression de CD69 est transitoire et est maximale 3 jours après la stimulation. Le niveau d'expression ainsi que la proportion de LT-CD4 positifs (CD69+) décroissent 6 et 7 jours après la stimulation. La dynamique observée sur les échantillons irradiés à 2 Gy est semblable à celle observée pour les non irradiés alors que les échantillons irradiés à 8 Gy présentent une proportion de cellules CD69+ supérieure à celle observée dans le non irradié. L'expression de CD69 observée 3 jours après activation *in vitro*, permet de confirmer que, dans nos conditions expérimentales, les LT-CD4 répondent à l'activation *in vitro* à toutes les doses d'irradiation (**Figure 24B**).

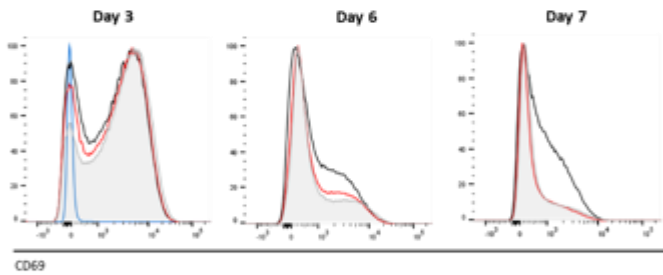
Dans les PBMCs stimulées, 7 jours après stimulation, la population de LT-CD4 contient des populations effecteur mémoire et central mémoire, dont les proportions varient peu après irradiation à 2 et 8 Gy (**Figure 24C**). L'apoptose a été analysée par mesure de l'intensité de fluorescence AnnV dans les LT-CD4 et les sous-populations CM et EM, 7 jours après stimulation et irradiation. Dans la population de LT-CD4 et dans les cellules CM et EM, les irradiations à 2 et 8 Gy n'induisent pas de modification de la

distribution de la fluorescence de l'AnnV. **(Figure 24D gauche)**. La quantification du pourcentage de cellules apoptotiques AnnV+ démontre que l'irradiation à 2 et 8 Gy n'induit pas d'augmentation de la proportion de cellules apoptotiques dans les LT-CD4 et les sous-populations CM et EM, 7 jours après stimulation **(Figure 24D droite)**. Dans un second temps, en lien avec la caractérisation des différences de sensibilité à l'apoptose radio-induite décrites des sous-populations de LT-CD4conv quiescentes CCR6+CD127+ et CCR6-, nous avons analysés 7 jours après stimulation et irradiation, l'apoptose dans les sous-populations CCR6+CD127+, CCR6-CD127+ et CCR6-CD127-. En effet, les LT-CD4 après stimulation présentent une population CCR6-CD127- qui n'est pas caractérisée à l'état non irradié dans les cellules quiescentes. Dans les LT-CD4, 7 jours après stimulation, la proportion de CCR6+CD127+ est minoritaire (en moyenne 10 %) comparée aux populations CCR6-CD127+ (en moyenne 20 %) et CCR6-CD127- (en moyenne 50 %) dans la série de donneurs analysée. Les proportions relatives des trois sous-populations sont stables après irradiation à 2 et 8 Gy **(Figure 24E)**. Dans les populations CCR6-CD127+ et CCR6-CD127-, les irradiations à 2 et 8 Gy ne changent pas les distributions de fluorescence AnnV, 7 jours après stimulation et irradiation tandis que dans la population CCR6+CD127+, les distributions de l'intensité de fluorescence l'AnnV montrent un déplacement du pic de fluorescence principale après irradiation à 8 Gy **(Figure 24F gauche)**. La quantification du pourcentage de cellules apoptotiques suggère une légère augmentation de la proportion de cellules apoptotiques dans les CCR6-CD127+ et CCR6-CD127- 7 jours après stimulation et irradiation à 8 Gy. Toutefois, l'augmentation n'est pas statistiquement significative. Dans la population minoritaire CCR6+CD127+, il est observé dans la série d'échantillons étudiée une augmentation de 2 fois de la proportion de cellules apoptotiques 7 jours après irradiation à 8 Gy par rapport à la condition contrôle non irradiée. Toutefois, le résultat est en dessous du seuil de significativité de 5 % et est à confirmer sur un échantillon plus large **(Figure 24F droite)**. En comparaison avec l'apoptose radio-induite mesurée dans les sous-populations de LT-CD4 CCR6- quiescentes (48 h après irradiation), la stimulation bloque drastiquement l'apoptose radio-induite dans les CCR6- mais peut être moins dans les CCR6+CD127+.

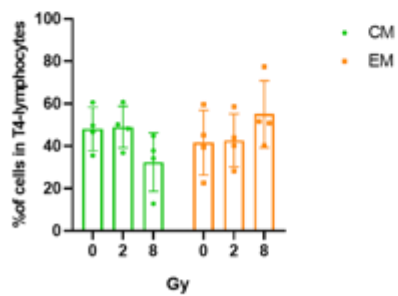
A. Protocole d'activation et d'irradiation *in vitro* des PBMCs



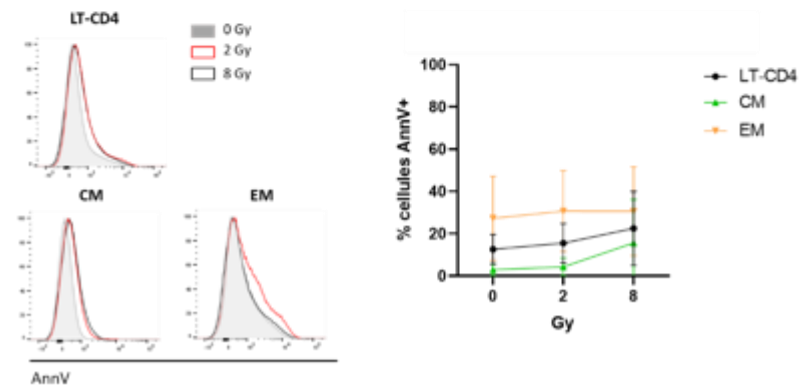
B. Intensité de fluorescence de CD69 dans les LT-CD4 post irradiation 3,6 et 7 jours après activation



C. Proportion de LT-CD4 CM et EM post irradiation 7 jours après activation



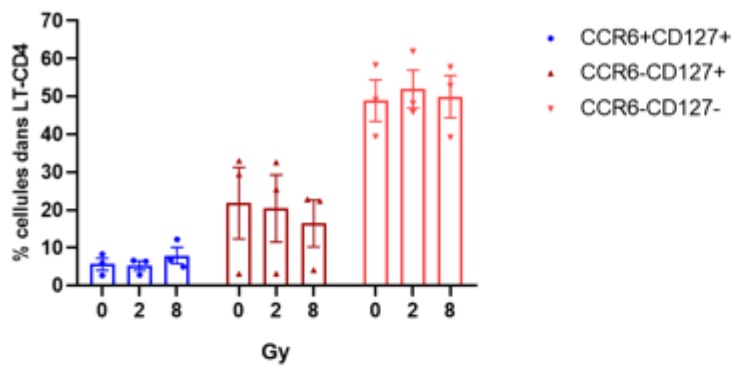
D. Intensité de fluorescence de l'AnnV et quantification des cellules AnnV+ dans les LT-CD4, les LT-CD4-CM, les LT-CD4-EM post irradiation 7 jours après activation



Test statistique de Student

	LT-CD4		CM		EM	
2 vs 0 Gy	0,31	ns	0,13	ns	0,40	ns
8 vs 0 Gy	0,16	ns	0,15	ns	0,41	ns

E. Proportion de LT-CD4 CCR6+CD127+ et CCR6- post irradiation 7 jours après activation



F. Intensité de fluorescence de l'AnnV et quantification des cellules AnnV+ dans les sous-populations CCR6+CD127+ et CCR6- post irradiation 7 jours après activation

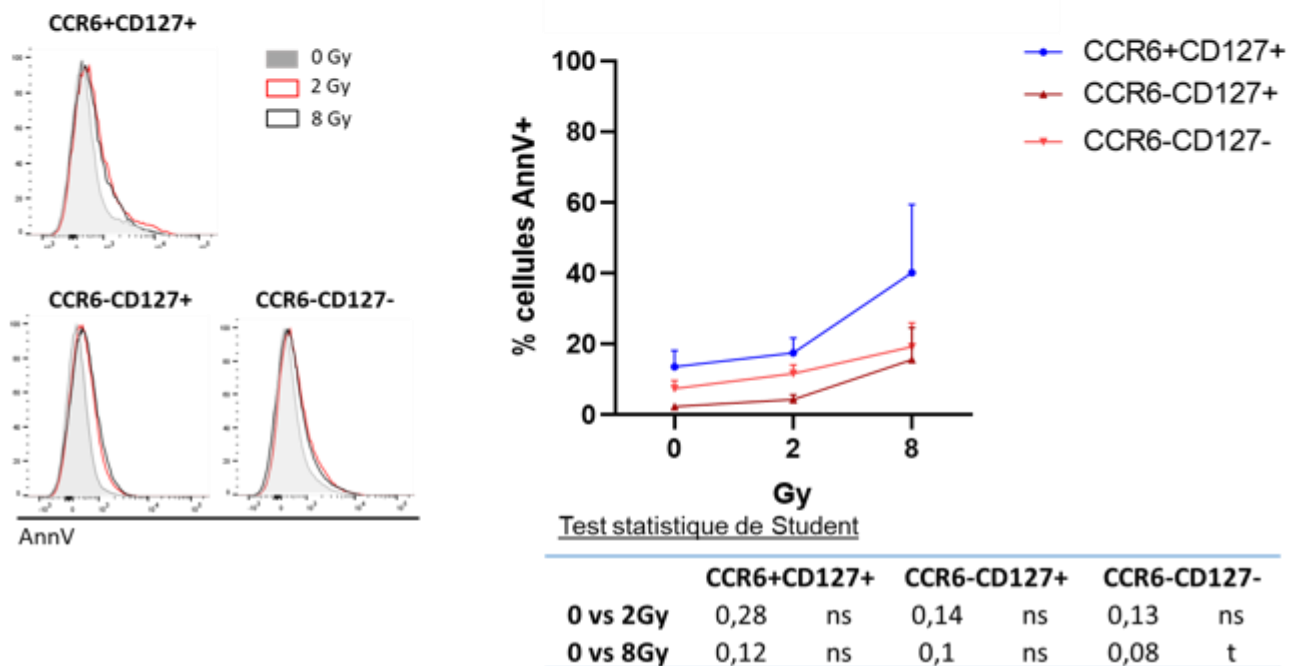


Figure 24 : La stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28 lors de l'irradiation protège les lymphocytes -T-CD4 et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire de l'apoptose radio-induite. Légende en page 131

Figure 24 : La stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28 lors de l'irradiation protège les lymphocytes -T-CD4 et les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire de l'apoptose radio-induite.

A. Schéma expérimental de stimulation *in vitro* et marquage CFSE, avant irradiation à 2 et 8 Gy des PBMCs et schéma d'analyse par gating hiérarchique d'un fichier cytométrie en flux après stimulation et expansion de 3 jours. L'identification des différents compartiments cellulaires sur la base de l'expression de récepteurs de surface conduit à la quantification de l'apoptose radio-induite par compartiment et à la quantification des proportions relatives des sous populations lymphocytaires comme décrit précédemment. **B.** Superposition d'histogrammes de fluorescence CD69 des lymphocytes-T-CD4 mesurée 3, 6 et 7 jours après stimulation sans irradiation (gris) et après irradiation à 2 (rouge) et 8 (noir) Gy, n=1. **C.** Histogrammes des proportions des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 : CM et EM, quantifiés 7 jours après stimulation, en condition contrôle non irradiée et après irradiation à 2 et 8 Gy, n=4 **D.** Superposition des distributions de fluorescence AnnexineV mesurée dans les lymphocytes-T-CD4 et les sous-populations CM et EM, 7 jours après stimulation, en condition contrôle non irradiée et après irradiation à 2 (rouge) et 8 (noir) Gy, n=1. Courbes dose-effet des proportions de cellules AnnexineV+ dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 (noir), CM (vert) et EM (rouge clair), mesurées 7 jours après stimulation, en condition contrôle non irradiée et 7 jours après irradiation et stimulation à 2 et 8 Gy, n=4 **E.** Histogramme des proportions des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 : CCR6+CD127+ (bleue), CCR6-CD127+ (rouge) et CCR6-CD127- (rouge claire), quantifiées 7 jours après stimulation en condition contrôle non irradiée et 7 jours après stimulation et irradiation à 2 et 8 Gy, n=4 **F.** Superposition des histogrammes de fluorescence AnnexineV des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 : CCR6+CD127+, CCR6-CD127+ et CCR6-CD127-, 7 jours après stimulation en condition contrôle non irradiée (gris) et irradiation à 2 (rouge) et 8 (noir) Gy, n=4. Courbes dose-effet des proportions de cellules AnnexineV+ dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 : CCR6+CD127+ (bleu), CCR6-CD127+ (rouge) et CCR6-CD127- (rouge clair) mesurée 7 jours après stimulation en condition contrôle non irradiée et 7 jours après stimulation et irradiation à 2 et 8 Gy, n=3. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type, * valeur $p < 0.05$, ** valeur $p < 0.01$, *** valeur $p < 0.0001$, **** valeur $p < 0.00001$.

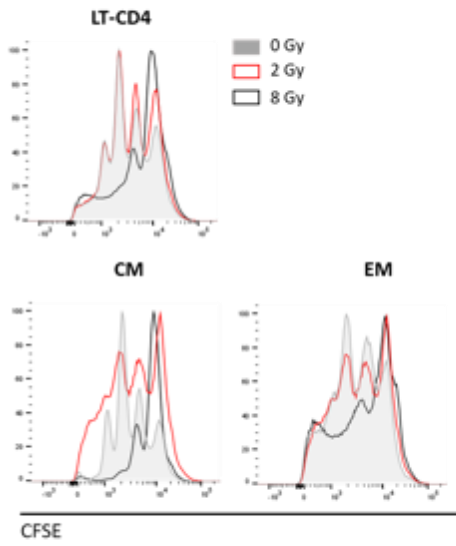
Une dose d'irradiation à 2 Gy n'interfère pas avec la prolifération des Lymphocytes-T-CD4 et des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire ; CCR6+CD127+, CCR6-CD127+ et CCR6-CD127-.

L'analyse de la prolifération a été réalisée d'une part dans les LT-CD4 et les sous-populations CM et EM ; et d'autre part dans les sous-populations : CCR6+CD127+, CCR6-CD127+ et CCR6-CD127- de LT-CD4 non apoptotiques (AnnV-). Le marquage au CFSE permet d'identifier le nombre de divisions cellulaires et de quantifier l'index de division qui est calculé en prenant en compte le nombre de divisions, le nombre de cellules qui ne se divisent pas (1^{er} pic) et le nombre de cellules par division sur la plateforme dédiée du logiciel Flowjo (**Figure 25A**). L'analyse de l'intensité de fluorescence du CFSE dans les LT-CD4, et les sous-populations CM et EM révèle que le nombre de générations, la proportion de cellules par génération et l'index de division sont identiques entre les conditions non irradié et irradié à 2 Gy (**Figure 25A et 25B**). Les LT-CD4 réalisent 7 jours après stimulation en condition non irradiée et irradiée à 2 Gy, 5 divisions cellulaires. Après une irradiation à 8 Gy, le nombre de générations est moins important, la majorité des cellules ne se sont donc pas divisées (**Figure 25A**) et il n'a été observé qu'une seule division dans les LT-CD4-CM et 2 divisions dans les LT-CD4-EM. Après une irradiation à 8 Gy, nous quantifions, dans les LT-CD4 et les sous-populations CM et EM, des index de division 4 fois inférieure à ceux mesurés après une irradiation à 2 Gy (**Figure 25B**). Ainsi, après une irradiation à 8 Gy, la majorité des LT-CD4 et des cellules CM et EM ne se divisent pas.

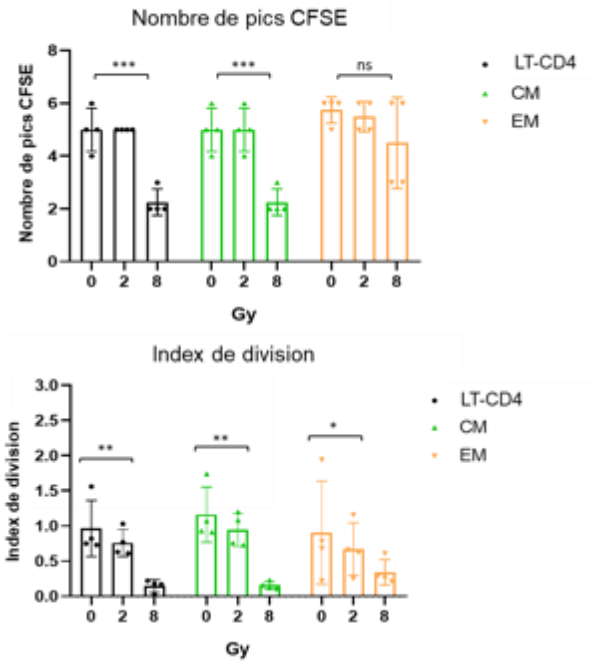
Nous avons recherché une différence dans les effets de l'irradiation à 2 et 8 Gy sur la prolifération des sous-populations de LT-CD4 : CCR6+CD127+, CCR6-CD127+ et CCR6-CD127- (**Figures 25C et 25D**). En condition non irradiée, la population CCR6+CD127+ réalise en moyenne le même nombre de divisions cellulaires mais possède un index de division inférieure aux populations CCR6-CD127+ et CCR6-CD127- (**Figures 25C et 25D**). La majorité des cellules CCR6+CD127+ ne se divisent donc pas ou n'effectuent qu'une division. La proportion de cellules qui progresse d'une division à l'autre est inférieure à celle observée dans les populations CCR6-CD127+ et CCR6-CD127- (**Figure 25E**). Nous émettons l'hypothèse qu'une partie des cellules CCR6+CD127+ ne semble pas sensible à la stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28. Cela pourrait être la raison pour laquelle les cellules CCR6+CD127+ n'ont pas, 7 jours après la stimulation et l'irradiation, été protégées de l'apoptose radio-induite. Notre hypothèse est que les cellules CCR6+CD127+ ne répondant pas à la stimulation *in vitro* et ne se divisent pas sont des cellules qui ne se différencient pas. Nous avons commencé par caractériser les voies de différenciation possibles en analysant les cellules exprimant à leur surface le récepteur de surface CD57 ; un marqueur exprimé par les cellules LT-CD4 à activité lytique ou les LT-CD4 sénescents. Dans une série de 3 échantillons, nous observons que la population CCR6+CD127+ présente, 7 jours après la stimulation,

en condition non irradiée et après irradiation à 2 Gy, en moyenne 35 % de cellules CD57+, soit 2 fois plus que ne présentent les populations CCR6-CD127+ et CCR6-CD127- (**Figure 25F**). Nous avons caractérisé également la proportion de cellules en phase G0 du cycle cellulaire par un marquage KI67. Nous avons étudié, 7 jours après stimulation, les fractions de LT-CD4 CCR6+CD127+ et CCR6- qui ne se sont pas divisées et ayant réalisées une première division cellulaire, en condition contrôle non irradiée et après une irradiation à 2 Gy. Les populations CCR6+CD127+ et CCR6- qui ne se sont pas divisées présentent, en condition non irradiée et après une irradiation à 2 Gy, respectivement 40 % et 50 % des cellules KI67-. Ce résultat ne révèle donc pas une différence significative entre les populations CCR6+ et CCR6-. Par contre, au sein des fractions ayant réalisé une division cellulaire, les CCR6+CD127+ comprennent 60 % de cellules KI67- alors que les CCR6- n'en comprennent que 15 %. Cette différence très marquée suggère que 7 jours après stimulation, en condition non irradiée et irradiée à 2 Gy, les cellules CCR6+CD127+ contrairement aux cellules CCR6-, ne sont majoritairement pas en phase active du cycle cellulaire.

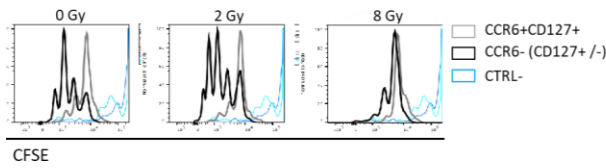
A. Intensité de fluorescence du CFSE dans les LT-CD4, les LT-CD4-CM, les LT-CD4-EM post irradiation 7 jours après activation



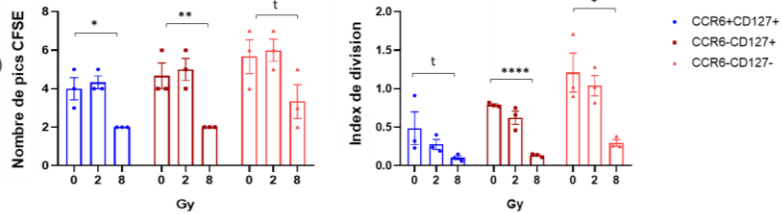
B. Nombre de pics CSE et mesure de l'index de division dans les LT-CD4, les LT-CD4-CM, les LT-CD4-EM post irradiation 7 jours après activation



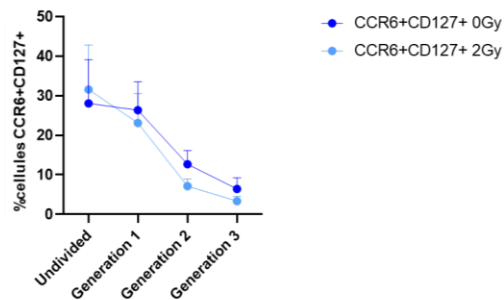
C. Intensité de fluorescence du CFSE dans les sous-populations CCR6+CD127+ et CCR6- post irradiation 7 jours après activation



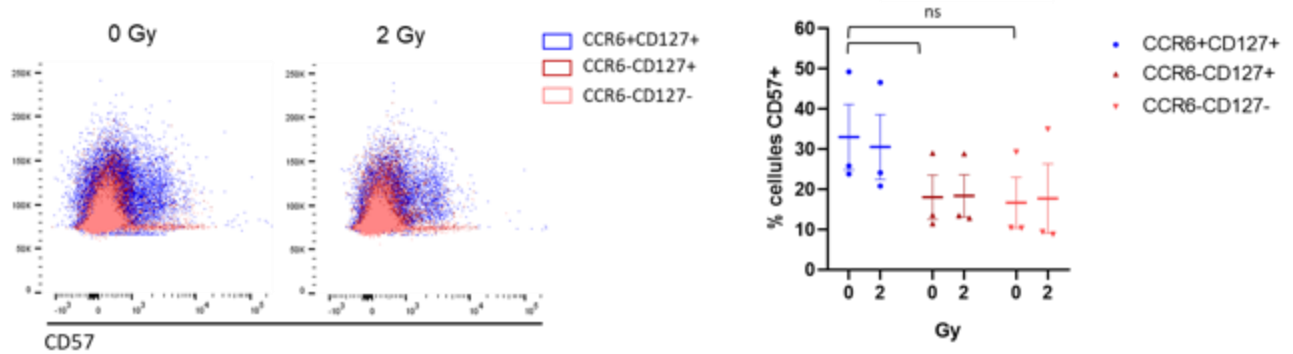
D. Nombre de pics CSE et mesure de l'index de division dans les sous-populations CCR6+CD127+ et CCR6- post irradiation 7 jours après activation



E. Proportion de cellules CCR6+CD127+ par génération cellulaire post irradiation 7 jours après activation



F. Intensité de fluorescence de CD57 et proportion de cellules CD57+ dans les sous-populations CCR6+CD127+ et CCR6- de LT-CD4 post irradiation 7 jours après activation



G. Quantification de cellules Ki67+ dans les sous-populations CCR6+CD127+ et CCR6- de LT-CD4 post irradiation 7 jours après activation

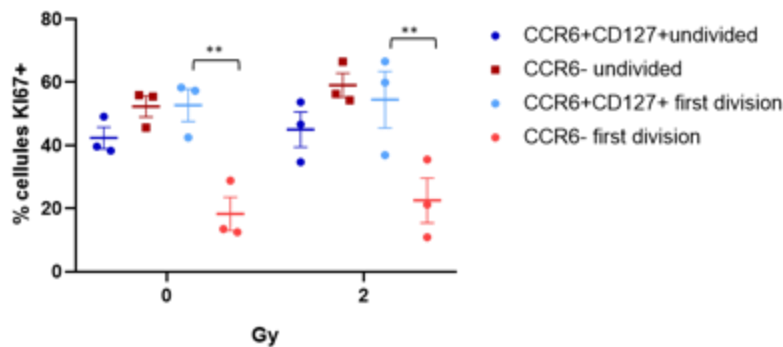


Figure 25 : Une dose d'irradiation à 2 Gy n'interfère pas avec la prolifération des lymphocytes-T-CD4 et des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires ; CCR6+CD127+, CCR6-CD127+ et CCR6-CD127-.

A. Superposition d'histogrammes d'intensité de fluorescence CFSE mesurée dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 : CM et EM, 7 jours après stimulation, en condition contrôle non irradiée (gris) et après irradiation à 2 (rouge) et 8 (noir) Gy, n=4 **B.** Histogramme de distribution du nombre de divisions (gauche) et de l'index de division (droite) en fonction de la dose d'irradiation dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 (noir), CM (vert), et EM (rouge clair) quantifiée 7 jours après stimulation en condition contrôle non irradiée et après irradiation à 2 et 8 Gy, n=4. **C.** Superposition d'histogrammes d'intensité de fluorescence CFSE mesurée dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 : CCR6+CD127+ (gris), CCR6- (incluant les cellules CD127+ et CD127-) (noir), mesurée 7 jours après stimulation en condition contrôle non irradiée (0 Gy) et après irradiation à 2 Gy et 8 Gy, n=1 **D.** Histogramme de distribution du nombre de divisions (gauche) et de l'index de division (droite) en fonction de la dose d'irradiation dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 : CCR6+CD127+ (bleu), CCR6-CD127+ (rouge) et CCR6-CD127- (rouge clair), mesurée 7 jours après stimulation, en condition contrôle non irradiée et après irradiation à 2 et 8 Gy, n=4 **E.** Proportion de cellules CCR6+CD127+ par division cellulaire mesurée 7 jours après stimulation en condition contrôle non irradiée (bleu foncé) et après irradiation à 2 (bleu clair) Gy, n=3 **F.** Superposition d'histogrammes de fluorescences CD57 versus FSC dans les populations de lymphocytes-T-CD4 : CCR6+CD127+ (bleu), CCR6-CD127+ (rouge) et CCR6-CD127- (rouge clair) mesurée 7 jours après stimulation en condition contrôle non irradiée et après irradiation à 2 Gy, n=1 (gauche) et distribution des proportions de cellules CD57+ (avec moyenne et écart type) dans les populations CCR6+CD127+ (bleu), CCR6-CD127+ (rouge) et CCR6-CD127- (rouge clair) mesurée 7 jours après stimulation en condition contrôle non

irradiée et après irradiation à 2 Gy, n=4 **G**. Distribution des proportions de cellules KI67- dans les populations de lymphocytes-T-CD4 : CCR6+CD127+ (bleu) et CCR6- (rouge) dans la fraction non divisée et dans la fraction en première génération (tons clairs) mesurée 7 jours après stimulation en condition contrôle non irradiée et après irradiation à 2 Gy, n=3. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type, * valeur $p < 0.05$, ** valeur $p < 0.01$, *** valeur $p < 0.0001$, **** valeur $p < 0.00001$.

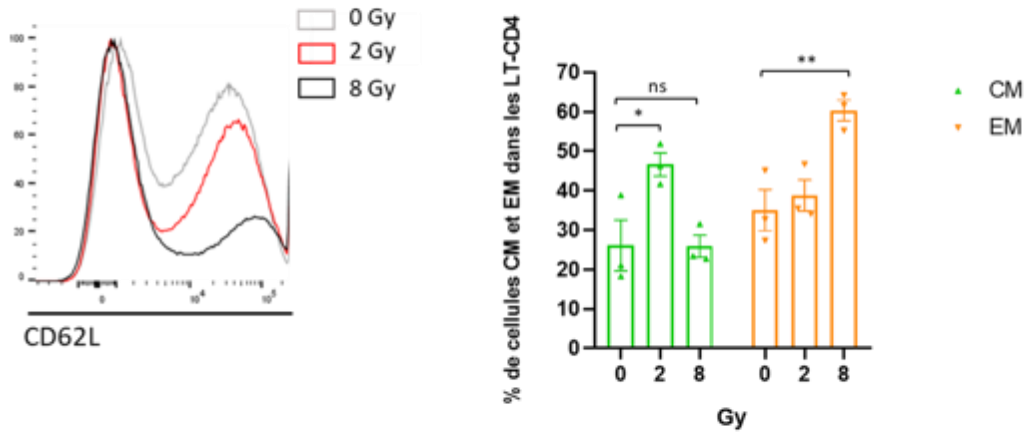
L'irradiation induit dans des LT-CD4 effecteurs mémoires après 6 jours de prolifération l'apoptose et la perte d'expression du récepteur de surface CD62L.

Le second protocole d'irradiation est basé sur une irradiation 6 jours après stimulation. La proportion des sous-populations et la mort cellulaire par apoptose ont été étudiées dans les LT-CD4 et les sous-populations 17 h après irradiation, soit le 7^{ème} jour. Ce protocole a été réfléchi de manière à reproduire les conditions de nos travaux effectués 17 h et 48 h après irradiation sur les cellules quiescentes (**Figure 26A**). L'irradiation au 6^{ème} jour de prolifération induit une augmentation dose dépendante de la proportion de la sous-population EM (CD62L-CD45RA-) et une diminution dose dépendante de la proportion de la population CM (CD62L+CD45RA-). L'irradiation provoque donc une diminution de l'expression du récepteur CD62L dans LT-CD4 dès une dose de 2 Gy, (**Figure 26B**). L'irradiation au 6^{ème} jour de prolifération, induit de manière dose dépendante une augmentation de la proportion de cellules l'AnnV+ dans les LT-CD4 et spécifiquement dans les LT-CD4 EM (**Figure 26C**). Le pourcentage de cellules apoptotiques (AnnV+) confirme une induction de l'apoptose dose dépendante dès une dose de 2 Gy dans les LT-CD4 et spécifiquement dans la population EM. Dans la série d'échantillons étudiés et pour la population EM, l'apoptose est respectivement 1,5 fois et 2 fois plus élevée 17 h après une irradiation à 2 et 8 Gy par rapport à la condition contrôle non irradiée (**Figure 26D**).

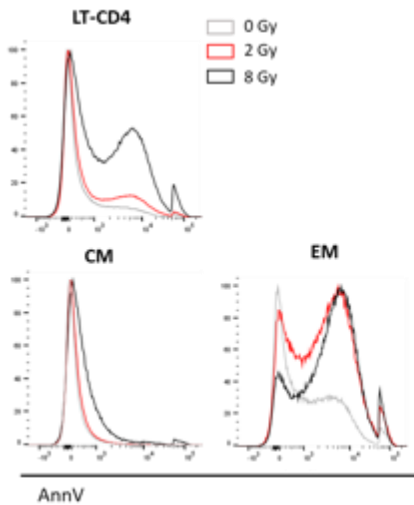
A. Protocole d'activation et d'irradiation *in vitro* des PBMCs



B. Intensité de fluorescence de CD62L et proportion de LT-CD4 CM et EM post irradiation 7 jours après l'activation



C. Intensité de fluorescence de dans les LT-CD4, les LT-CD4-CM et LT-CD4-EM post irradiation 7 jours après activation



D. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les LT-CD4, les LT-CD4-CM et les LT-CD4-EM post irradiation 7 jours après activation

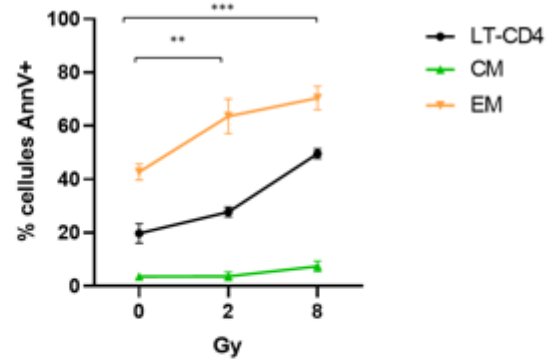


Figure 26 : L'irradiation induit dans des LT-CD4 effecteurs mémoires après 6 jours de prolifération l'apoptose et la perte d'expression du récepteur de surface CD62L. Légende en page 138

Figure 26 : L'irradiation induit dans des LT-CD4 effecteurs mémoires après 6 jours de prolifération l'apoptose et la perte d'expression du récepteur de surface CD62L.

A. Schéma expérimental de stimulation *in vitro* et marquage CFSE des PBMCs, l'irradiation à 2 et 8 Gy a été réalisée 6 jours après la stimulation. Après 7 jours de stimulation, et 17h après irradiation, les caractéristiques de prolifération, les proportions cellulaires et l'apoptose ont été mesurées en condition contrôle non irradiée et après irradiation à 2 et 8 Gy **B.** Superposition d'histogrammes de fluorescence CD62L mesurés dans les lymphocytes-T-CD4 (gauche) quantifiée en condition contrôle non irradiée (gris) et après irradiation à 2 (rouge) et 8 (noir) Gy 7 jours après stimulation n=1 Distribution des proportions de cellules dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 : CM (vert) et EM (orange), quantifiée en condition contrôle non irradiée et 17h après irradiation à 2 et 8 Gy soit 7 jours après stimulation n=3 **C.** Superposition d'histogrammes de fluorescence AnnexineV mesurés dans les lymphocytes-T-CD4, CM et EM quantifié en condition contrôle non irradiée (gris) et après irradiation à 2 (rouge) et 8 (noir) Gy 7 jours après stimulation n=1 **D.** Courbes dose-effet des proportions de cellules AnnexineV+ apoptotiques quantifiées dans les lymphocytes-T-CD4 et des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 ; CM et EM, quantifié en condition contrôle non irradiée et 17h après irradiation à 2 et 8 Gy soit 7 jours après stimulation n=3. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type, * valeur $p < 0.05$, ** valeur $p < 0.01$, *** valeur $p < 0.0001$, **** valeur $p < 0.00001$.

3. Conclusion des résultats de l'axe 1

Dans ce premier axe de thèse, l'objectif était de caractériser les effets de l'irradiation sur les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 quiescents circulants et sortis de l'état de quiescence en réponse à une stimulation.

Ainsi, au sein de la population hétérogène de LT-CD4conv, nous avons démontré que seule la sous-population EM était sensible à l'apoptose radio-induite, et ce, dès une dose 0,5 Gy. Au sein de la population de LT-CD4conv EM, nous avons montré une hétérogénéité de sensibilité à l'apoptose radio-induite entre deux populations. La population CCR6+CD127+EM qui est résistante à l'apoptose radio-induite, et la population CCR6-EM qui est sensible à l'apoptose radio-induite. La résistance à l'apoptose radio-induite semble être médiée par une signalisation interne spécifique et non par des interactions cellulaires. Après irradiation, l'expression génique (mesurée sur des pools de 300 cellules triées) du ligand TRAIL (TNFSF10) et ses deux récepteurs pro-apoptotiques ne diffère pas entre les deux populations de LT-CD4conv CCR6+CD127+EM et CCR6-EM. La résistance à l'apoptose radio-induite de la population de LT-CD4-EM CCR6+CD127+ ne semble donc pas dépendante de la voie de signalisation de l'apoptose radio-induite médiée par TRAIL (TNFSF10) et ses récepteurs pro-apoptotiques. Dans les effecteurs, nous avons démontré aussi une hétérogénéité d'apoptose radio-induite qui distingue deux groupes : les effecteurs Treg, Th1, Th2 et Th-non polarisés, tous négatifs pour le marqueur CCR6 et très sensibles à l'apoptose radio-induite, et les effecteurs Th9, Th17 (CXCR3+), Th22 et Th17 (CXCR3-), tous positifs pour le marqueur CCR6, et moins sensibles à l'apoptose radio-induite.

Dans la population de LT-CD4conv, l'irradiation induit de manière progressive dans le temps et de manière dose dépendante, une diminution de l'expression du récepteur de surface CD62L. Cela se reflète dans l'augmentation radio-induite de la proportion des populations CD62L- : EM et CD62L-CD45RA+, ainsi que dans la baisse radio-induite de la proportion des populations CD62L+ : naïve et CM. De plus, nos résultats démontrent que la diminution radio-induite de l'expression du récepteur CD62L caractérisée dans les LT-CD4conv est présente uniquement dans la sous-population de LT-CD4conv CCR6- qui est sensible à l'apoptose radio-induite. Dans cette sous-population, nous avons démontré une augmentation de la proportion de la population EM (CD62L-CD45RA-) et des cellules CD62L-CD45RA+. La diminution de l'expression de CD62L radio-induite n'est pas présente dans la sous-population de LT-CD4conv CCR6+CD127+ qui est résistante à l'apoptose radio-induite. Nos résultats démontrent que l'irradiation dans les LT-CD4conv EM induit aussi une diminution dose dépendante de l'expression des récepteurs de surface CCR6 et de CD127. La diminution de l'expression de CD127 à la surface des LT-CD4conv EM est spécifique aux LT-CD4conv EM CCR6-, et est absente dans les LT-

CD4conv EM CCR6+. L'irradiation est donc responsable d'un enrichissement, dans les LT-CD4conv, de la proportion de cellules EM CD62L- CCR6- CD127-.

La stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28 et donc la sortie de l'état de quiescence protège, d'une part, les LT-CD4 de la perte d'expression du récepteur de surface CD62L et, d'autre part, de l'induction de l'apoptose dans les LT-CD4 en général et la sous-population EM en particulier. De plus, la stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28, protège les sous-populations de LT-CD4 CCR6-CD127+ et CCR6-CD127- de l'apoptose radio-induite, ce qui ne semble pas être le cas dans la sous-population CCR6+CD127+.

Les deux doses d'irradiation testées 2 et 8 Gy n'impactent pas la prolifération des LT-CD4 et des sous-populations CM, EM, CCR6+CD127+, CCR6-CD127+ et CCR6-CD127- de manière identique. Une irradiation à 2 Gy n'impacte pas la prolifération tandis qu'une dose de 8 Gy empêche les LT-CD4 et l'ensemble des sous-populations d'initier une première division cellulaire et de réaliser autant de divisions qu'en condition non irradiée. Nous avons caractérisé une différence de prolifération constitutionnelle non induite par l'irradiation et spécifique à la population de LT-CD4 CCR6+CD127+ et identifié une hétérogénéité associée. La population CCR6+CD127+ comprend une minorité de cellules qui ont répondu à la stimulation et qui vont réaliser plusieurs divisions cellulaires, et une partie majoritaire de cellules qui ne se sont divisées qu'une seule fois ou qui ne se sont pas divisées du tout. La majorité des cellules CCR6+CD127+ qui ne se divisent pas ou qui sont en première division cellulaire sont KI67- et sont donc en dehors du cycle cellulaire. La population CCR6+CD127+ comprend 35 % de cellules CD57+ empruntant des voies de différenciation vers la sénescence ou vers l'acquisition de fonctions cytotoxiques. Enfin, nous avons montré que dans le cas où l'irradiation est réalisée 6 jours après la stimulation des récepteurs TCR, CD3 et CD28, les LT-CD4 et les LT-CD4-EM sont sensibles à l'irradiation ; la protection liée à la sortie de l'état de quiescence observée, lorsque l'irradiation a lieu simultanément à la stimulation in vitro, est perdue. Ainsi, la sensibilité à l'apoptose radio-induite est similaire à celle décrite dans les LT-CD4conv et les sous-populations de LT-CD4conv CM et EM circulantes non activées.

IV. Résultats de l'axe sur la recherche de polymorphismes génétiques de type SNV associés à la radiosensibilité individuelle reflétée par l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires

1. Association du SNV rs1131532 du gène *TRAIL (TNFSF10)* à la quantification de l'apoptose des lymphocytes-T-CD4-effecteur mémoire et des effecteurs différenciés T-helper (Th)

L'association génétique du SNV rs1131532 sur le gène TRAIL (TNFSF10) à l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires est présente dans les sous-populations d'effecteurs mémoires Th1, Th2, Th non polarisé, Th9 et Th17 (CXCR3+).

La seconde partie du projet a pour objectif d'approfondir l'association des polymorphismes génétiques sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* à l'apoptose radio-induite des effecteurs différenciés Th. L'étude d'association du génotype de rs1131532 à l'apoptose radio-induite a été réalisée dans une cohorte d'individus différente de la cohorte dans laquelle a été démontrée la prédiction des SNVs rs1131532, rs1131535 et rs3815496 (Baijer et al., 2016). Nous avons caractérisé l'effet du polymorphisme de type SNV rs1131532 présent sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* dans la population de LT-CD4-EM les sous-populations d'effecteurs différenciés Th comprises dans la population de LT-CD4-EM.

La proportion de cellules apoptotiques a été évaluée 17 h après irradiation en quantifiant le pourcentage de cellules positives pour le marquage à l'AnnexineV dans la population de LT-CD4-EM et dans les populations d'effecteurs différenciés Th EM, en fonction du génotype CC (homozygote majeur), CT (hétérozygote) et TT (homozygote mineur) de l'individu au locus du SNV rs1131532 (**Figure 27**). L'effectif pour chaque groupe d'individus est de 19 pour le génotype CC, 16 pour le génotype CT et 7 pour le génotype TT.

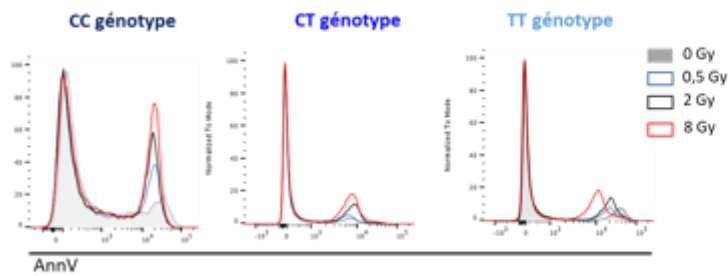
L'analyse des distributions d'intensité de fluorescence révèle que l'irradiation induit une augmentation plus forte de la proportion de cellules présentant une l'intensité de fluorescence de l'AnnV chez les individus de génotype CC et CT et moindre chez les individus de génotype TT (**Figure 27A**). Afin de quantifier cet effet, le pourcentage moyen de cellules apoptotiques (AnnV+) après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy dans les LT-CD4-EM a été évalué dans les 3 groupes de génotype pour rs1131532. Les résultats montrent que la proportion de cellules apoptotiques des individus de génotype CC est croissant 17 h après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy. En comparant le pourcentage de cellules apoptotiques à 0,5, 2 et 8 Gy entre les individus de génotype CC et TT, on observe une différence d'un facteur 2. Chez les individus de génotype CT, l'irradiation induit de l'apoptose dans les LT-CD4-EM, toutefois, les individus CT sont moins sensibles que les individus de génotype CC (**Figure 27B**).

L'analyse de l'apoptose radio-induite dans les LT-CD4-EM en fonction du génotype pour le SNV rs1131532 a aussi été réalisée en prenant compte de la répartition (variance) du pourcentage d'apoptose radio-induite entre les individus de même groupe des 3 génotypes. La représentation en figure 27 permet de faire figurer le pourcentage de cellules apoptotiques dans les LT-CD4-EM, 17 h après une irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy de chaque individu (**Figure 28**). Il a été observé qu'il existe une variabilité importante d'apoptose radio-induite au sein des individus de génotype CC et hétérozygote TT. Les individus de génotype TT ont une variabilité moindre du pourcentage de cellules apoptotiques, comparées aux individus de génotype CC et CT (**Figure 28**). Un test statistique par anova, confirme l'association significative des doses croissantes d'irradiation et du génotype pour le SNV rs1131532 à l'apoptose radio-induite des LT-CD4 EM (**Figure 27K**). Un test de Student comparant le pourcentage d'apoptose après irradiation entre les 3 groupes de génotype, confirme qu'aux doses d'irradiation (0,5, 2 et 8 Gy) que le génotype pour le SNV rs1131532 sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* est associé à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM et est donc prédictif de l'apoptose radio-induite des LT-CD4 EM.

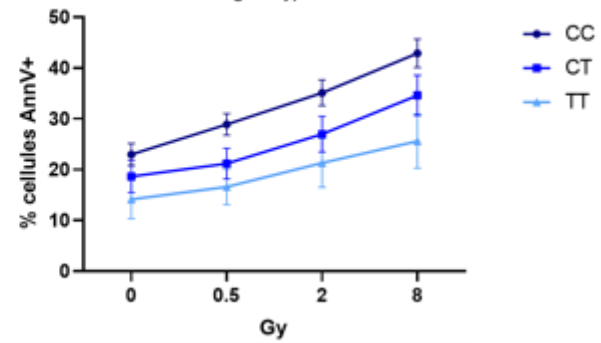
Dans le but de préciser l'association du SNV rs1131532 à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM, l'association du génotype pour rs1131532 a été analysée dans les sous-populations d'effecteurs différenciés de type Th. Deux paramètres ont été étudiés : le pourcentage d'apoptose après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy et la variabilité de pourcentage d'apoptose entre les individus de même groupe de génotype. Au sein même de la population de LT-CD4-EM, il existe une différence d'apoptose intrinsèque au type d'effecteur en condition basale. Dans les effecteurs de LT-CD4-EM Th22 et Th17 (CXCR3-), les résultats ne montrent pas d'effets d'augmentation du pourcentage d'apoptose après irradiation (**Figure 27D**). Ainsi, il est difficile de discriminer l'effet du génotype de rs1131532 sur les effecteurs Th22 et Th17 (CXCR3-). De plus, le test anova permet de conclure que les doses croissantes d'irradiation et le génotype du rs1131532 ne sont pas corrélés à l'apoptose mesurée dans les Th22 et Th17 (CXCR3-) (**Figure 27K**). Dans l'ensemble des autres effecteurs Th9, Th17(CXCR3+), Th17 (CXCR3-), Th2, Th1 et Th-non polarisé, l'irradiation induit une augmentation du pourcentage moyen d'apoptose chez les individus de génotype CC (**Figure 27E, 27F, 27G, 27H, 27I**). Toutefois, ce résultat est à mettre en parallèle avec la forte variabilité de pourcentage d'apoptose radio-induite pour ces mêmes effecteurs Th, au sein des individus CC (**Figure 28B, 28C, 28D, 28F, 28F, 28G**). En analysant les pourcentages de cellules apoptotiques dans les différents effecteurs Th9, Th17 (CXCR3+), Th17 (CXCR3-), Th2, Th1 et Th-non polarisé, il a été observé une différence d'apoptose radio-induite dans les effecteurs Th9 et Th17 (CXCR3+) (CCR6+CCR4-CXCR3+), Th1 (CCR6-CCR4-CXCR3+) et Th2 (CCR6-CCR4+CXCR3-) entre les génotypes CC et TT (**Figure 27E, 27G et 27H**). Les tests statistiques de Student comparant pour chaque dose d'irradiation, le pourcentage de cellules apoptotiques entre les 3 groupes de génotypes, révèlent une différence significative d'apoptose radio-induite entre les

individus CC et TT dans les effecteurs Th17/Th9, Th2 et Th1 (**Figure 27J**). Le test anova confirme un effet significatif du génotype pour le SNV rs1131532 à l'apoptose radio-induite dans les effecteurs Th9, Th17(CXCR3+), Th2, Th1 et Th-non polarisée (**Figure 27K**). La combinaison des tests statistiques confirme avec plus de certitude l'effet de l'irradiation et du génotype de rs1131532 dans les effecteurs de LT-CD4-EM Th2, Th1, Th-non polarisée, Th9 et Th17 (CXCR3+).

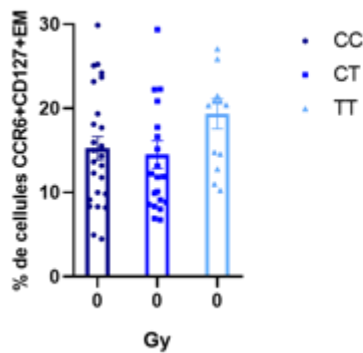
A. Intensité de fluorescence de l'AnnV dans les LT-CD4-EM en fonction de rs1131532



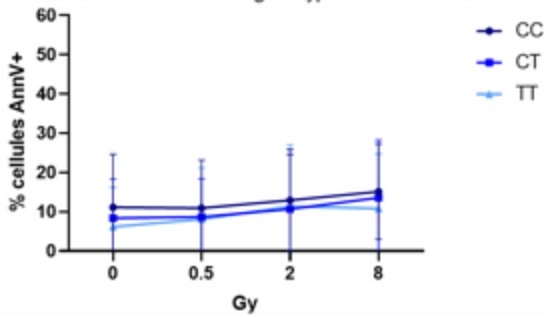
B. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les LT-CD4-EM en fonction du génotype de rs1131532



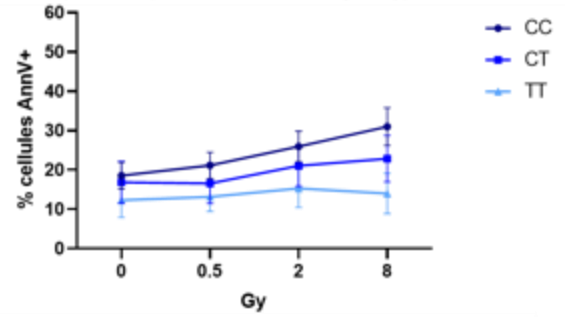
C. Proportion de LT-CD4-EM CCR6+CD127+ en condition non irradiée en fonction du génotype de rs1131532



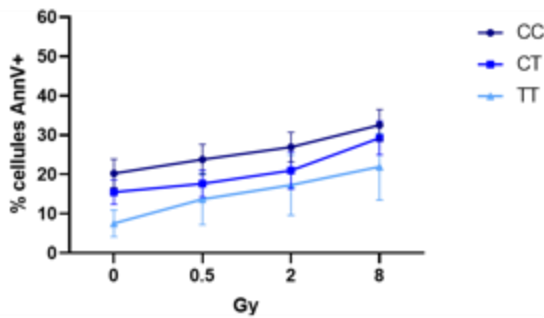
D. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th22-EM en fonction du génotype de rs1131532



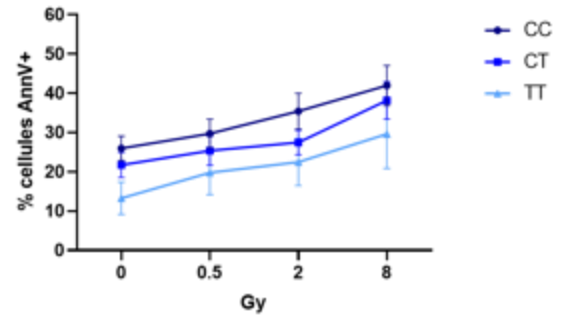
E. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th9/Th17(CXCR3+)-EM en fonction du génotype de rs1131532



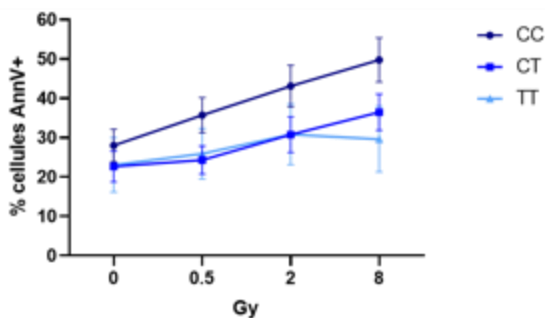
F. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th17(CXCR3-)-EM en fonction du génotype de rs1131532



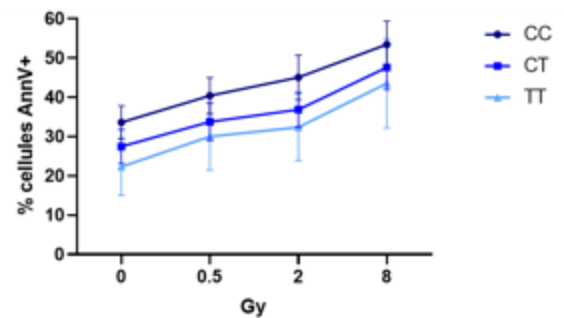
G. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th9-EM en fonction du génotype de rs1131532



H. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th1-EM en fonction du génotype de rs1131532



I. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th non polarisés-EM en fonction du génotype de rs1131532



J. Test statistique de Student

LT-CD4-EM			Th1-EM			Th2-EM			Th non polarisés-EM			Th22-EM			Th9/Th17(CXCR3+)-EM			Th17(CXCR3-)-EM		
CCvsCT	CCvsTT	CTvsTT	CCvsCT	CCvsTT	CTvsTT	CCvsCT	CCvsTT	CTvsTT	CCvsCT	CCvsTT	CTvsTT	CCvsCT	CCvsTT	CTvsTT	CCvsCT	CCvsTT	CTvsTT	CCvsCT	CCvsTT	CTvsTT
0,1265	0,0270	0,2084	0,1156	0,2056	0,4796	0,2679	0,0165	0,0687	0,1592	0,0894	0,2659	0,25958	0,1963	0,3188	0,3909	0,1598	0,2975	0,1704	0,0272	0,0700
0,0195	0,0038	0,1902	0,0235	0,10425	0,4094	0,3053	0,0820	0,2052	0,1638	0,1337	0,3420	0,2847	0,3063	0,4518	0,2202	0,0929	0,3342	0,1263	0,0930	0,2788
0,0309	0,0068	0,1868	0,0303	0,0862	0,4969	0,1557	0,0676	0,2147	0,1403	0,1215	0,3057	0,3170	0,4004	0,4589	0,2266	0,0705	0,2495	0,1626	0,1100	0,3359
0,0427	0,0028	0,1052	0,0345	0,0298	0,2217	0,3921	0,1113	0,1798	0,2448	0,2078	0,3621	0,3736	0,2278	0,3406	0,1454	0,0278	0,1789	0,2861	0,10469	0,2010

K. Test statistique Anova

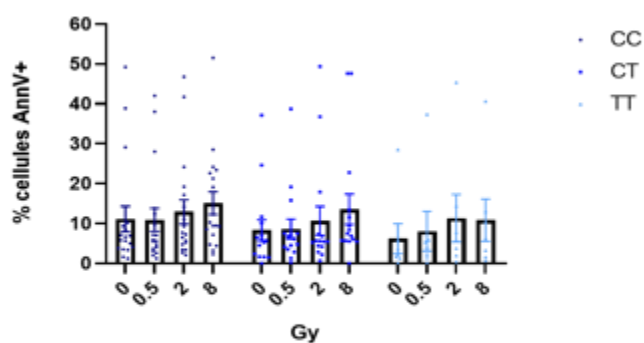
	LT-CD4-EM	Th1-EM	Th2-EM	Th non polarisés-EM	Th22-EM	Th9/Th17(CXCR3+)-EM	Th17(CXCR3-)-EM
Doses irradiation	0,0001	0,1905	0,0328	0,0401	0,6729	0,4661	0,9919
Génotype rs1131532	<0,0001	0,006	0,0029	0,0302	0,239	0,0032	0,0816

Figure 27 : L'association génétique du SNV rs1131532 sur le gène *TRAIL* (*TNFSF10*) à l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 EM est précisée spécifiquement dans les effecteurs mémoires différenciés Th1, Th2, Th non polarisé, Th9 et Th17 (CXCR3+). Légende en page 145

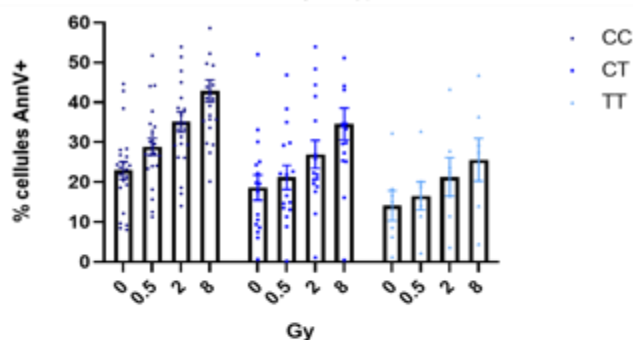
Figure 27 : L'association génétique du SNV rs1131532 sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* à l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 EM est précisée spécifiquement dans les effecteurs mémoires différenciés Th1, Th2, Th non polarisé, Th9 et Th17 (CXCR3+).

A. Superposition d'histogrammes d'intensité de fluorescence AnnexineV mesurée dans la population EM de lymphocytes-T-CD4, mesurée en condition contrôle 17h après irradiation à 0 (gris), 0,5 (bleu) , 2 (noir) et 8 (rouge) Gy, chez les individus de génotype CC, CT et TT pour le rs1131532 du gène *TRAIL (TNFSF10)* **B.** Courbe dose-effet de la proportion (moyenne et écart type) de cellules AnnexineV+ dans la population EM de lymphocytes-T-CD4, en fonction de la dose d'irradiation mesurée 17h après irradiation en condition contrôle et à 0,5, 2 et 8 Gy, par groupes d'individus de génotype CC (bleu foncé), CT (bleu moyen) et TT (bleu clair) pour le rs1131532 du gène *TRAIL (TNFSF10)* **C.** Histogramme des distributions des proportions de lymphocytes-T-CD4 CCR6+CD127+ EM, chez les individus de génotype CC, CT et TT pour le rs1131532 du gène *TRAIL (TNFSF10)* en condition contrôle **D-I.** Courbe dose-effet de la proportion (moyenne et écart type) de cellules AnnexineV+ dans les populations EM des effecteurs Th, en fonction de la dose d'irradiation mesurée 17h après irradiation en condition contrôle et à 0,5, 2 et 8 Gy, par groupes d'individus de génotype CC (bleu foncé), CT (bleu moyen) et TT (bleu clair) pour le rs1131532 du gène *TRAIL (TNFSF10)* **D.** Th22, **E.** Th9 et Th17 (CXCR3+), **F.** Th17 (CXCR3-), **G.** Th2, **H.** Th1 et **I.** Th non polarisé. **J.** Test statistique de Student comparant de pourcentage de cellules apoptotiques quantifiées en condition contrôle et après irradiation, dans les lymphocytes-T-CD4 EM et les effecteurs Th22, Th17 (CXCR3-), Th9, Th17 (CXCR3+), Th2, Th1 et Th non polarisé en fonction génotype CC, CT et TT pour le rs1131532 du gène *TRAIL (TNFSF10)* **K.** Test statistique anova déterminant la contribution des doses d'irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy et du génotype pour le rs1131532 du gène *TRAIL (TNFSF10)* à l'apoptose mesurée chez l'ensemble des individus de l'étude. CC n=19, CT n=14, TT n=7. La variabilité des données est représentée sous forme d'écart-type, * valeur p<0.05, ** valeur p< 0.01, *** valeur p < 0.0001, **** valeur p< 0.00001.

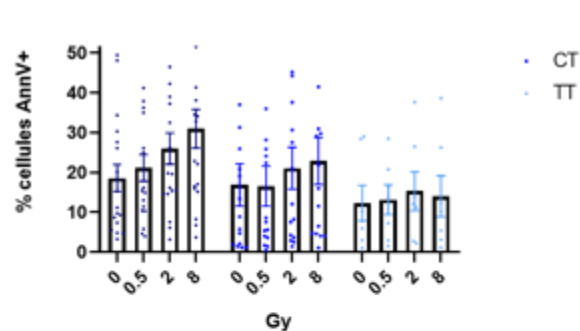
A. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les LT-CD4-EM en fonction du génotype de rs1131532



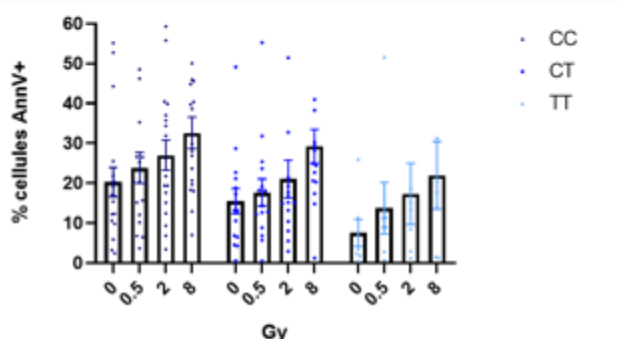
B. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th22-EM en fonction du génotype de rs1131532



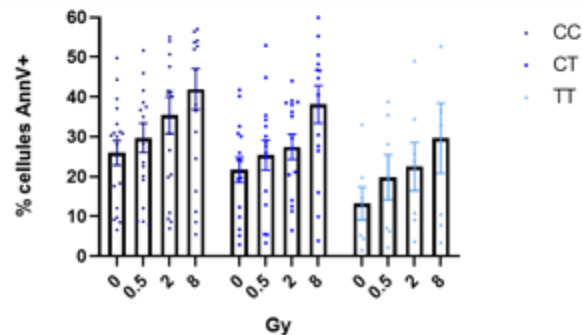
C. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th9/Th17(CXCR3+)-EM en fonction du génotype de rs1131532



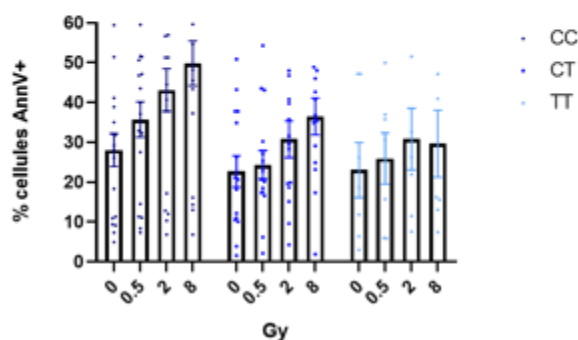
D. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th17(CXCR3-) EM en fonction du génotype de rs1131532



E. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th2-EM en fonction du génotype de rs1131532



F. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th1-EM en fonction du génotype de rs1131532



G. Quantification de la proportion de cellules AnnV+ dans les Th non polarisés-EM en fonction du génotype de rs1131532

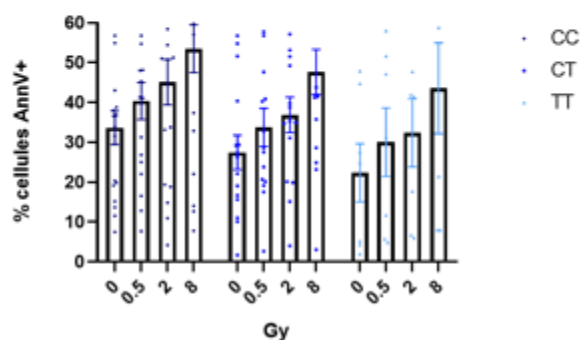


Figure 28 : Données supplémentaires figure 26, étude de la variabilité du pourcentage de cellules apoptotique quantifiée après irradiation en fonction du génotype pour rs1131532. Légende page 147

Figure 28 : Données supplémentaires figure 27, étude de la variabilité du pourcentage de cellules apoptotique quantifiée après irradiation en fonction du génotype pour rs1131532.

A. Histogrammes présentant les proportions de cellules AnnexineV+ dans la population EM de lymphocytes-T-CD4, mesurée en condition contrôle 17h après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, chez les individus de génotype CC, CT et TT pour le rs1131532 du gène *TRAIL (TNFSF10)* **B-G.** Histogrammes présentant les proportions de cellules AnnexineV+ dans la population d'effecteurs Th22 (B), Th17 (CXCR3-) (D), Th9 et Th17 (CXCR3-) (C), Th2 (E), Th1 (F) et Th non polarisé (G) EM, mesurée en condition contrôle 17h après irradiation à 0,5, 2 et 8 Gy, chez les individus de génotype CC, CT et TT pour le rs1131532 du gène *TRAIL (TNFSF10)* CC n=19, CT n=14, TT n=7.

2. Analyse d'association des SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires

a) Rationnel soutenant le choix du gène candidat *TRAIL (TNFSF10)*

Le projet de recherche réalisé précédemment au laboratoire a porté sur le développement du test de radiosensibilité individuelle basé sur la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire (LT-CD4-EM). Les travaux de recherche de polymorphismes génétiques associés à la quantification de l'apoptose radio-induite ont démontrés par un séquençage de régions ciblées obtenues par PCR, que l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM est associée significativement à 3 polymorphismes de type SNV sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* : rs1131532, rs3815496 et rs1131535. À ces locus, le génotype homozygote pour l'allèle majeur est associé à une sensibilité des individus et le génotype homozygote sur l'allèle mineur à une résistance des individus à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM (Schmitz et al., 2007) (Baijer et al., 2016). Une partie du projet de thèse est basée sur la continuité de cette recherche pour améliorer l'identification de polymorphismes génétiques corrélés à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM, qui permettrait de mettre en lumière des tests génétiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle. La continuité du projet a été réalisée en collaboration avec le CNRGH : C.Dandine-Roulland, E. Le Floch, et JF. Deleuze qui nous ont orientés dans l'articulation des questions scientifiques, sur le choix optimal de la puce de génotypage, d'analyses statistiques et sur l'interprétation des résultats. Trois questions scientifiques ont été posées et une analyse d'association pan-génomique (GWAS) après un génotypage par hybridation sur puce GSAMD a été décidée afin d'y répondre :

- Peut-on confirmer les associations génétiques déjà publiées des rs1131532, rs3815496 et rs1131535 du gène *TRAIL (TNFSF10)* à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM après un génotypage par hybridation sur puce.
- Existe-t-il d'autres SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* significativement plus associés à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM ?
- Au niveau du génome entier, existe-t-il d'autres polymorphismes sur d'autres gènes associés à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM ?

Au vu des interrogations scientifiques du projet, deux stratégies ont été retenues dans le but de répondre à ces questions scientifiques. La stratégie d'analyse par gène candidat va permettre de focaliser l'analyse uniquement sur les SNVs du gène *TRAIL (TNFSF10)* et la stratégie d'analyse d'association du génome entier « whole genome » permet d'analyser l'ensemble des 700 000 tag-SNVs tout au long du génome contenu dans la puce GSAMD.

L'analyse d'association génétique à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM a été mesurée sur une cohorte d'individus apparentés appartenant à 232 familles, incluant 922 individus génotypés et dont on dispose de la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM seulement pour 365 individus.

b) Génération et contrôles qualité des données de la cohorte

Dans un premier temps, les données relatives à la cohorte ont été contrôlées sur plusieurs paramètres, il s'agit des contrôles qualité des données relatives aux individus de la cohorte. La cohorte est constituée d'individus apparentés de type caucasien, les paramètres généraux vérifiés ont été : le sexe des individus et la généalogie, c'est-à-dire, l'appartenance et l'apparentement entre individus d'une même famille et les origines génétiques ancestrales. L'origine ancestrale a été analysée, car même si la majorité des polymorphismes génétiques sont indépendants de l'origine ancestrale de l'individu, il existe des polymorphismes qui diffèrent d'une origine géographique ancestrale à une autre. Le contrôle qualité des données, permet de corriger des erreurs telles que : des individus référencés deux fois, d'identification du sexe pour 10 individus (qui reflètent des erreurs de fichiers informatiques et/ou des inversions de tubes), de relation familiale pour plusieurs individus. Les contrôles des données ont abouti à la création d'une grande famille qui à l'origine a été décrite comme n'ayant pas de relation familiale. À ce stade de l'analyse qualité, la cohorte est composée de 908 individus génotypés. La suite de l'analyse qualité porte sur la comparaison de l'origine génétique des individus de la cohorte, en les comparant aux génomes de référence issus de la base de données 1000 Genomes. Au sein de la cohorte, deux individus ont un génome similaire au génome des populations d'Afrique, un individu présente un génome proche des populations natives d'Amérique, toutefois ces trois individus ont été conservés pour l'analyse d'association phénotypique car étant considérés comme extrêmement minoritaires et donc n'introduisons pas de biais dans l'étude. Le génome de l'ensemble du reste des individus de la cohorte est proche du génome européen (**Figure 29**).

Dans un second temps, le contrôle des données s'effectue sur les variants autosomaux, le taux d'hétérozygotie et les erreurs de transmission mendélienne. Le contrôle de variants autosomaux permet la sélection de 533419 SNVs sur la puce GSAMD et 904 individus. Le contrôle sur l'hétérozygotie a permis d'identifier dans la cohorte 7 individus ayant des hétérozygoties extrêmes, cependant ces individus ont été conservés pour l'analyse d'association phénotypique, car étant considérés comme extrêmement minoritaires et donc n'introduisons pas de biais dans l'étude. Enfin, aucune erreur de transmission mendélienne n'a été détectée dans la cohorte (**Figure 29**). Ainsi l'analyse d'association de polymorphisme a été réalisée sur 365 individus phénotypés pour la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM.

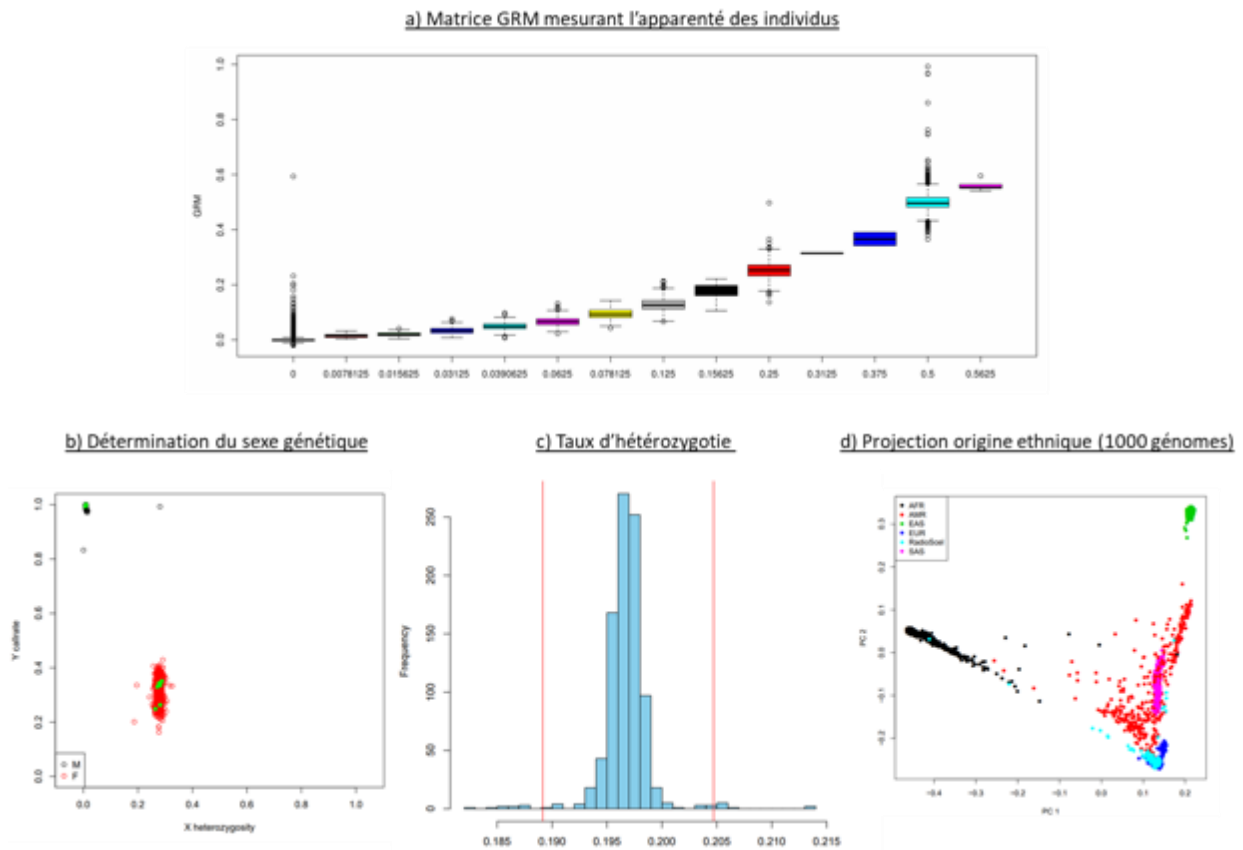


Figure 29 : Contrôles qualité principaux effectués sur la cohorte d'individus génotypés

Résumé de l'analyse de la qualité des données incluant (a) contrôle de l'apparentement des individus de chaque famille, (b) contrôle d'identification du sexe biologique des individus, (c) contrôle d'hétérozygotie extrême dans la cohorte, (d) contrôle de l'origine génétique des individus réalisés par le CNRGH

c) Carte des SNVs du gène *TRAIL (TNFSF10)* et sélection des SNVs étudiés

Dans un premier temps, le nombre de SNVs du gène *TRAIL (TNFSF10)* présents dans la puce GSAMD et particulièrement, la présence de rs1131532 rs113535 et rs3815496 dans la puce a été analysée. La puce GSAMD contient 11 SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)*, 3 en commun avec le séquençage initial fait par PCR dont le SNV rs1131532. Le calcul du déséquilibre de liaison (LD) se mesure par le R^2 et D' qui sont des paramètres évaluant l'association statistique entre des allèles observés à deux sites polymorphes du génome. Le paramètre D' est basé sur le maximum théorique pour faire une normalisation, le paramètre R^2 est basé sur un coefficient de corrélation. Cela permet de « mesurer » l'association de SNVs absents de la puce, mais issus de du même bloc de liaison que les SNVs inclus dans la puce. Les SNVs présents dans les mêmes blocs de liaison, auront la même association génétique avec le phénotype étudié. Par exemple, sur le gène *TRAIL (TNFSF10)*, la puce contient le SNV rs1131532 qui est en déséquilibre de liaison ($R^2=1$) avec plus d'une vingtaine de SNVs dont rs3815496, qui est absent de la puce. Ainsi tous les SNVs en déséquilibre de liaison avec rs1131532 auront donc la même

association avec le phénotype étudié. De cette manière, il est possible d'obtenir l'association génétique de 34 SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* incluant les 3 SNVs rs1131532, rs113535 et rs3815496 dont l'association à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM est déjà connue et publiée.

d) Analyse des résultats d'association des SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* par l'outil FBAT prenant en compte les liens familiaux

La stratégie d'analyse des données par gène candidat a été réalisée par le logiciel FBAT_version205_beta et permet de répondre aux deux questions scientifiques suivantes :

- Peut-on confirmer les associations génétiques déjà publiées des rs1131532, rs3815496 et rs1131535 du gène *TRAIL (TNFSF10)* à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM après un génotypage par hybridation sur puce.
- Existe-t-il d'autres SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* significativement plus associés à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM ?

La stratégie d'analyse réduite au gène candidat *TRAIL (TNFSF10)* limite le nombre de tests et de corrections des tests multiples appliquées. La puce GSAMD contient 11 SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)*, ce qui correspond donc à 11 tests, ainsi le seuil de significativité est fixé à 5% divisé par 11 tests soit 0,004. Ainsi un signal d'association doit avoir une p-valeur égale ou inférieure à 0.004 pour être significativement plus associé que rs1131532. L'analyse d'association de l'ensemble des SNVs de la puce GSAMD sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* a été réalisée par analyse FBAT pour trois modèles génétiques : additif, récessif et dominant. L'analyse d'association a été réalisée après corrections des phénotypes, selon deux covariables qui impactent l'apoptose des LT-CD4-EM des 365 individus : l'âge et le sexe des individus. Les résultats d'association ont été référencés pour les trois modèles génétiques avec ou sans corrections pour l'effet de l'âge et du sexe des individus (**Figure 30**). L'analyse par FBAT démontre que sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* le rs1131532, indépendamment de la correction par les covariables, est associé significativement selon un modèle génétique récessif à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM (p-récessif=0,009, p-récessif-cov = 0,019). Aucun des SNVs que nous avons testés sur le gène *TRAIL* ne présente un niveau d'association supérieur au marqueur génétique précédemment identifié (Baijjer et al., 2016) et confirmé dans les résultats décrits au chapitre précédent. Notre stratégie de génotypage n'a donc pas permis d'identifier d'autres SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* significativement plus associés à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM.

SNP ID	chromosome	position	A1freq	p-additif	p-additif-cov	p-récessif	p-récessif-cov	p-dominant	p-dominant-cov
rs2100143	3	172202876	0.541	0.430441	0.220322	0.436911	0.264288	0.645143	0.454478
rs73169281	3	172206404	0.858	0.069885	0.031251	0.046103	0.020084	-	-
rs9855107	3	172215655	0.795	0.271993	0.236462	0.290898	0.312511	0.600203	0.369673
rs1131532	3	172224303	0.714	0.072957	0.097419	0.009014	0.019399	0.793948	0.904013
rs3136601	3	172226240	0.605	0.052291	0.036375	0.219648	0.196851	0.047409	0.026759
rs3136597	3	172228544	0.795	0.210883	0.182795	0.219883	0.238504	0.600203	0.369673
rs3774315	3	172231986	0.637	0.484311	0.422477	0.31688	0.241987	0.922004	0.881798
rs7643953	3	172232225	0.795	0.192869	0.159707	0.099855	0.101734	0.766082	0.673312
rs2270418	3	172240999	0.843	0.058106	0.060848	0.073129	0.075903	-	-
rs388515	3	172242747	0.847	0.269758	0.224407	0.232228	0.27264	-	-
rs13316580	3	172262053	0.874	0.292809	0.222343	0.180025	0.12879	-	-

Figure 30 : Association génétique de 11 SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM obtenus par FBAT selon modèle additif, dominant et récessif

Résultats de l'analyse d'association de SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires (LT-CD4-EM), réalisée sur 365 individus dont on dispose de la quantification de l'apoptose radio-induite, non corrigés et corrigés pour l'âge et le sexe des individus (cov), avec les p-values obtenus par analyse FBAT. Le tableau référence le nom du SNV (SNV ID), la position sur le chromosome 3 du SNV, la fréquence de l'allèle majeur dans la population (A1freq), la significativité d'association pour l'analyse sans covariables pour les modèles génétiques additif (p_additif), récessif (p_récessif) et dominant (p_dominant) ; et en prenant en compte les covariables pour les modèles génétiques additif (p_additif-cov), récessif (p_récessif-cov) et dominant (p_dominant-cov)

3. Analyse d'association pangénomique (GWAS) à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires

a) Analyse des résultats obtenus par analyse d'association pangénomique GWAS par le modèle FBAT

L'analyse d'association génétique à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM a été étendue à l'ensemble des SNVs de la puce GSAMD, il s'agit de l'analyse pan-génomique (GWAS). De la même manière que l'analyse pour le gène *TRAIL (TNFSF10)*, l'analyse GWAS a été réalisée par le modèle d'analyse des données issues de cohorte d'individus apparentés : Family Based Association Test (FBAT).

L'analyse d'association GWAS a été réalisée par le logiciel FBAT_version205_beta, en prenant en compte l'effet de deux covariables pour la correction des données phénotypiques : l'âge et le sexe des individus ; pour les modèles génétiques : additif, récessif ou dominant. Les p-values sont représentés sous la forme d'un Manhattan plot, qui représente pour chaque chromosome, la p-valeur en fonction de l'ensemble des SNVs contenus dans la puce GSAMD. Sur cette représentation figure le seuil de significativité qui dépend de la correction des tests multiples appliquée. Le seuil de significativité appliqué pour l'analyse pan-génomique fixe le seuil de significativité à 10^{-8} . Ainsi, la significativité d'un signal d'association sera plus robuste si la p-valeur est autour ou au-dessus de ce seuil. Les signaux les

plus significatifs sont obtenus en utilisant le modèle additif (**Figure 31**). Suite à l'étude des signaux obtenus par l'analyse FBAT avec un modèle additif, aucun SNV sur l'ensemble de la puce ne possède une p-valeur d'association à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM au-dessous de 10^{-5} . Ainsi l'ensemble des signaux sont en-dessous du seuil de significativité fixé à 10^{-8} . Cependant, des signaux incluant plusieurs SNVs sur les chromosomes 2,7,21 et 22 émergent sous la forme spécifique de signaux contigus ou « trainée » et ont des p-valeurs d'association à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM autour de 10^{-5} (**Figure 31**). La caractérisation de ces signaux et notamment l'identification de SNVs sur ces chromosomes a été partiellement réalisée. Cependant, la significativité de ces signaux étant sous le seuil de significativité, un génotypage et une quantification de l'apoptose des LT-CD4-EM sur un plus grand nombre d'individus, sera à réaliser dans la suite du projet de thèse.

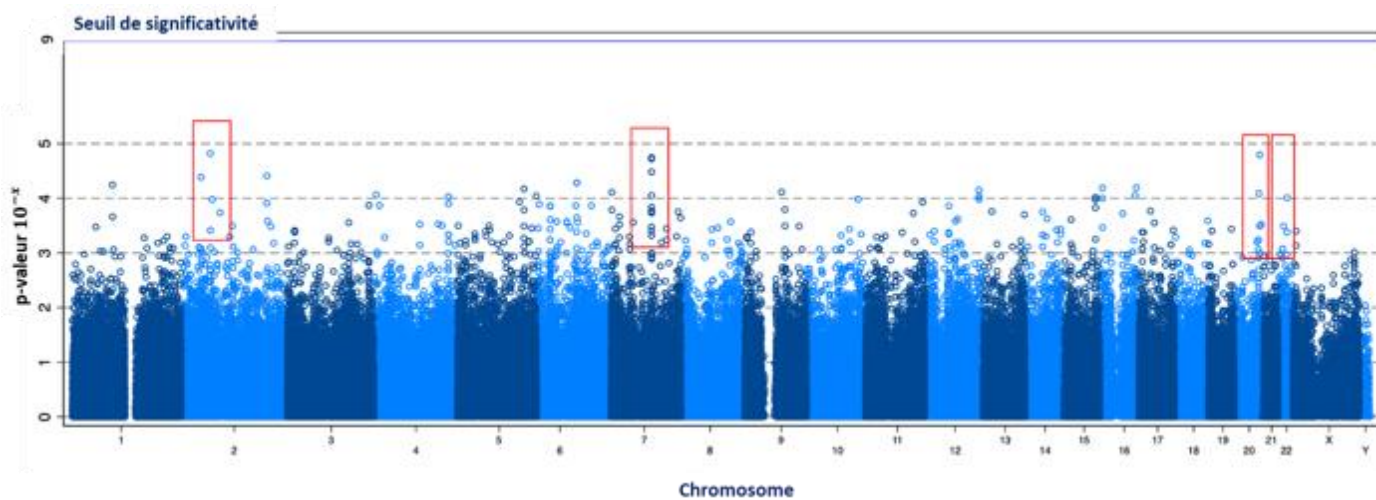


Figure 31 : Représentation par Manhattan plot de l'analyse d'association pangénomique GWAS à la quantification de l'apoptose des LT-CD4-EM par FBAT selon un modèle additif

Résultats de l'analyse d'association pangénomique (GWAS) à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM corrigés pour les covariables âge et sexe réalisée sur 365 individus. Manhattan plot représentant les p-valeurs d'association obtenue par analyse FBAT selon un modèle génétique additif en fonction de la localisation génomique des marqueurs.

4. Conclusion des résultats de l'axe 2

Dans cet axe du projet de thèse, nos résultats valident, sur une cohorte d'individus non apparentés distincts de la cohorte de découverte, l'association génétique du SNV rs1131532 sur le gène *TRAIL* (*TNFSF10*) à l'apoptose radio-induite dans la population de LT-CD4-EM. Nous avons identifié les effecteurs différenciés pour lesquels l'apoptose radio-induite présente une association significative au SNV rs1131532 : les effecteurs Th9-EM (CCR6+), Th17 (CXCR3+)-EM (CCR6+), Th1-EM (CCR6-) et Th2-EM (CCR6-). Les sensibilités à l'apoptose radio-induite des effecteurs Th22 (CCR6+) et Th17 (CXCR3 CCR6+), qui par ailleurs sont peu radio-sensibles, ne présentent pas d'association avec rs1131532. Notre étude montre donc que le génotype au rs1131532 est prédictif de la sensibilité à l'apoptose radio-induite y compris dans certains effecteurs Th CCR6+. L'apoptose TRAIL dépendante ne semble donc pas impliquée dans la différence de radiosensibilité entre effecteurs Th CCR6+ et CCR6-. La variabilité phénotypique observée souligne qu'un agrandissement de l'effectif d'individus par groupe de génotype au rs1131532, permettrait de renforcer les analyses statistiques d'association de rs1131532 à l'apoptose radio-induite des effecteurs Th9-EM (CCR6+), Th17(CXCR3+)-EM (CCR6+), Th1-EM (CCR6-) et Th2-EM (CCR6-). La quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM de 365 individus apparentés de la cohorte GCS et le génotypage complet de 900 individus de la cohorte, nous ont permis d'effectuer une analyse d'association pangénomique (GWAS). Notre stratégie d'analyse ciblant l'ensemble des SNVs du gène *TRAIL* (*TNFSF10*) n'a pas permis d'identifier dans la zone de test de SNVs atteignant une significativité meilleure que rs1131532. Le SNV rs1131532 est le plus associé à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM. Ce résultat obtenu sur des données génotypiques renouvelées et validées pour la généalogie et les origines ethniques est en cohérence avec les résultats antérieurs (Baijer et al., 2016). Mais n'identifiant pas d'association plus significative que rs1131532, nos résultats ne sont pas en faveur d'une contribution majeure dans la région génomique de *TRAIL* (*TNFSF10*) en relation avec la précédente analyse de ségrégation (Schmitz et al., 2007).

Le second objectif de l'analyse pangénomique (GWAS) était d'explorer sur l'ensemble du génome de nouveaux polymorphismes génétiques associés à la quantification de l'apoptose des LT-CD4-EM. L'analyse, réalisée selon un modèle génétique additif, identifie plusieurs signaux suggestifs sur les chromosomes 2, 7, 20 et 21. Ces signaux sont considérés comme suggestifs ou candidats, car leur p-valeur d'association est au-dessus du seuil de significativité fixé à 10^{-8} . La caractérisation de ces signaux : position des SNVs candidats, gènes associés au SNVs candidats, localisation des SNVs candidats sur le gène, étude des déséquilibres de liaison des SNVs candidats, ont été partiellement réalisées, mais nécessite d'être approfondie. De plus, un agrandissement du nombre d'individus

phénotypés pour l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM a été réfléchi et permettrait dans le cas d'une réelle association de ces SNVs candidats, de renforcer la significativité de ces signaux candidats.

Conclusion, discussion et perspectives

I. Conclusion et discussion des éléments de résultats du premier axe du projet de thèse

1. Conclusion de l'étude d'apoptose radio-induite des sous-populations de LT-CD4

L'un des objectifs de la thèse a été de caractériser les effets des rayonnements ionisants sur les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 circulantes contenant les effecteurs différenciés Th et les populations naïves, effecteur mémoire et centrale mémoire, dans leur état de quiescence et après une stimulation/activation. Les résultats de l'étude sur les cellules circulantes et quiescentes ont mis en lumière que seules les populations de lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire sont sensibles à l'apoptose radio-induite, et qu'il existe une hétérogénéité au sein des lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire entre les populations cellulaires CCR6+CD127+EM et CCR6-EM. En effet, la population cellulaire CCR6+CD127+ effecteur mémoire est résistante à l'apoptose radio-induite et ce 17 h et 48 heures après irradiation à toutes les doses d'irradiation testées 0,5, 2 et 8 Gy. Nous avons démontré que la résistance à l'apoptose radio-induite n'est pas en rapport avec une baisse d'expression génique du ligand *TRAIL* (*TNFSF10*) et de ses récepteurs pro-apoptotiques *DR-4* (*TNFRSF10A*) et *DR-5* (*TNFRSF10B*). Notamment, l'expression génique de *DR-5* (*TNFSF10B*) est induite 6 h après irradiation dans les deux populations CCR6+CD127+EM et CCR6-EM. Dans les effecteurs différenciés, nous démontrons aussi une hétérogénéité d'apoptose radio-induite, entre d'une part les populations négatives pour le CCR6 : Th1, Th2 et Th non polarisée qui présentent une sensibilité et d'autre part les populations positives pour CCR6 : Th17 (CXCR3+), Th17 (CXCR3-) et Th9 qui présentent une résistance à l'apoptose radio-induite. Nous avons mis en lumière une diminution radio-induite dans les lymphocytes-T-CD4, de l'expression des récepteurs de surface CD62L, CCR6 et CD127, observable 17 h après irradiation à 2 et 8 Gy, mais qui est massive 48 h après irradiation. La diminution de l'expression de CD62L se reflète directement dans l'augmentation de la population effecteur mémoire et des cellules CD62L-CD45RA+, qui ont été décrites comme sensibles à l'apoptose radio-induite. Plus précisément, la diminution radio-induite de l'expression de CD62L est présente dans la sous-population effecteur mémoire CCR6-, dont on sait qu'elles sont plus sensibles à l'apoptose radio-induite; et est absente dans la population CCR6+CD127+ plus résistante à l'apoptose radio-induite. Nos résultats caractérisent que simultanément à l'apoptose radio-induite a lieu un enrichissement des proportions de cellules CD62L-, CCR6- et CD127- qui sont sensibles à l'apoptose radio-induite. Toutefois, nous n'avons pas caractérisé la corrélation directe entre la perte d'expression radio-induite de ces récepteurs de surface et l'induction de l'apoptose par l'irradiation. Aussi, dans nos conditions expérimentales, il n'est pas possible de démontrer dans les lymphocytes-T-CD4, la nature des cellules qui perdent l'expression des récepteurs de surface CD62L, CCR6 et CD127, la raison est approfondie dans la partie discussion du manuscrit.

Dans la seconde partie a été caractérisé l'effet de l'irradiation après une stimulation *in vitro* réalisée sur la totalité des cellules du sang périphérique (PBMC). Nos résultats démontrent que lorsque l'irradiation est réalisée simultanément à la stimulation *in vitro*, elle protège les lymphocytes-T-CD4 et l'ensemble des sous-populations de l'apoptose radio-induite. Nos résultats démontrent que lorsque l'irradiation est réalisée simultanément à la stimulation *in vitro*, aucune modification de l'expression du récepteur de surface CD62L, ni des proportions des sous-populations effecteur mémoire et central mémoire, n'a été observée après 7 jours. Nous démontrons que la stimulation protège aussi les lymphocytes-T-CD4 de la diminution radio-induite du récepteur de surface CD62L. L'étude de la prolifération, 7 jours après stimulation et irradiation, démontre que l'irradiation à 2 Gy et l'irradiation à 8 Gy n'ont pas les mêmes effets sur la prolifération des lymphocytes-T-CD4 et des sous-populations effecteur mémoire, central mémoire, CCR6+CD127+, CCR6-CD127+ et CCR6-CD127-. En effet seule, et de façon inattendue l'irradiation à 2 Gy permet aux cellules de réaliser plusieurs divisions, tandis que l'irradiation à 8 Gy empêche les cellules de réaliser plusieurs divisions successives. Enfin, nous avons caractérisé que de manière constitutionnelle (non induite par l'irradiation), après stimulation, la population CCR6+CD127+ contient une majorité de cellules qui ne se divisent pas, ou effectuent une seule division. De plus, ces cellules sont majoritairement en quiescence cellulaire. Enfin, la population CCR6+CD127+ après stimulation est hétérogène et comprend des cellules CD57+. Nos résultats suggèrent que la population CCR6+CD127+ observée après stimulation *in vitro* contient principalement des cellules qui s'orientent vers de la différenciation, dont il serait intéressant d'en explorer la nature.

Dans le second protocole d'irradiation, les PBMCs ont été irradiés 6 jours après la stimulation et l'apoptose a été analysée 17 h après l'irradiation, soit 7 jours après la stimulation. L'irradiation à 2 et 8 Gy sur des cellules en prolifération induit une augmentation de la proportion de cellules effecteur mémoire (CD62L- CD45RA-) et des cellules CD62L-CD45RA+, qui est due à une baisse d'expression du récepteur de surface CD62L. Dans ces conditions, l'irradiation à 2 et 8 Gy induisent l'apoptose des lymphocytes-T-CD4 et plus particulièrement des populations effecteur mémoire et CD62L-CD45RA+. On retrouve alors le même profil d'apoptose radio-induite que celui caractérisé dans les mêmes populations lorsqu'elles sont quiescentes. Ainsi, la stimulation *in vitro* protège de l'apoptose radio-induite et de la diminution de l'expression du récepteur CD62L radio-induite, uniquement lorsqu'elle a lieu simultanément à l'irradiation.

2. Discussion et analyses des résultats sur l'apoptose radio-induite des populations de LT-CD4

a) Le choix du modèle d'irradiation *in vitro*

L'étude des effets de l'irradiation a été réalisée à partir de PBMC de donneurs sains. Le sang circule à travers l'ensemble des organes et comporte les lymphocytes naïfs et mémoires circulant qui sont mobilisables et peuvent migrer jusqu'aux tissus (Zhang and Lakkis, 2015). Il est donc nécessaire de comprendre les effets des rayonnements et du traitement de radiothérapie sur le nombre et la physiologie des lymphocytes à court et long terme. Dans notre étude, les PBMCs ont été irradiés à des doses croissantes dans un irradiateur à source césium (GSRD1) diffusant des rayonnements ionisants de type γ . Cependant, les techniques de radiothérapie modernes utilisent des accélérateurs linéaires médicaux qui diffusent des rayonnements ionisants X. Dans le but de comprendre les effets de l'application de radiothérapie sur les LT-CD4 et pour rechercher des tests de radiosensibilité prédisant les effets radiotoxiques, l'utilisation d'un irradiateur expérimental basé sur des rayons X tel que le LINAC permettrait de mimer les conditions de radiothérapie (Bregues et al., 2014). Ainsi, il serait intéressant de confirmer nos résultats sur des irradiateurs à rayon X, en utilisant des débits de doses et des fractionnements similaires aux traitements de radiothérapie conventionnel ; ainsi qu'aux nouveaux protocoles de radiothérapies par hypofractionnement et FLASH.

b) L'irradiation de PBMCs de donneurs sains vs issus de patients traités par radiothérapie

La radiothérapie est réalisée sur des patients atteints de cancer. Le cancer module l'inflammation et l'activité lymphocytaires, notamment en stimulant le recrutement des cellules infiltrant la tumeur impliquées dans la réponse anti-tumorale LT-CD8 et LT-CD4-CTL (Gun et al., 2019). Pour mimer au mieux un contexte de traitement par radiothérapie, il serait intéressant de confirmer nos résultats sur des PBMCs issus de patients, avant radiothérapie, pendant le traitement et plusieurs semaines après le traitement par radiothérapie. Dans leur étude *Tabi et al* ont quantifiés le nombre et l'apoptose des LT mémoires et naïfs chez des patients atteints de cancer de la prostate, un jour avant le traitement, pendant le traitement et 4 semaines après le traitement et démontre que l'apoptose radio-induite est plus importante dans les lymphocytes naïfs et ce même 4 semaines après la radiothérapie (Tabi et al., 2010). Les études caractérisant la quantification de la lymphopénie permettent d'appréhender les effets de la radiothérapie sur des patients et d'étudier des effets de l'irradiation à plus long terme. Par exemple, il a été démontré sur des cohortes de patients atteintes de carcinome utérin, que le nombre de LT-CD4 revient à la normale 24 semaines après le traitement; mais pas chez les patients atteints de carcinome de la tête et du cou (Verastegui et al., 2003). De la même façon, il est plausible de penser

que les effets des rayonnements ionisants sur l'apoptose sont dynamiques et pourraient varier en fonction du type de cancer et seraient affectés différemment à court et long terme après le traitement.

c) Identification des sous-populations de LT-CD4

La littérature scientifique référence des articles permettant l'identification de population d'effecteur T-helper différencié (Th) effecteur mémoire par expression de récepteurs de surface uniquement, car ces cellules n'expriment pas les gènes spécifiques des cytokines (Wei et al., 2009) (Youngblood et al., 2013). Or, il est difficile de trouver un consensus sur les panels de récepteurs de surface suffisant pour identifier des populations d'effecteurs Th. La caractérisation des cellules LT-CD4 EM CCR6⁺ varie en fonction des études et est caractérisée comme Th17 (Nguyen et al., 2020) (Stadhouders et al., 2018), mais aussi comme Th9 (Staser et al., 2018). Les Th17 sont aussi identifiés comme CCR6⁺CCR4⁺ dans trois études (Pandya et al., 2016) (Staser et al., 2018) (Lintermans et al., 2017). De plus en fonction des études, les panels de récepteurs de surface pour l'immunophénotypage sont différents. Par exemple, l'étude de Steiser et al intègre le CCR10 et le CXCR5 pour identifier les effecteurs folliculaires Tfh. L'expression du récepteur de surface CD161 permet d'identifier les Th1-Th17. Ainsi, le panel utilisé pour l'identification des effecteurs Th pourrait être amélioré en ajoutant au panel d'anticorps, des anticorps ciblant CXCR5, CCR10, CRTH2, CCR5 et CD161.

d) Limites liées à l'irradiation de PBMCs totaux

Nous avons étudié les effets de l'irradiation sur les différentes sous-populations de LT-CD4 en irradiant la totalité des PBMCs. Or ce protocole ne permet pas de différencier les effets qui dépendent spécifiquement d'une signalisation autonome du type cellulaire étudié, des effets induits par l'environnement cellulaire. Cette question s'est posée dans l'analyse de la baisse d'expression radio-induite dans les lymphocytes-T-CD4 des récepteurs de surface CD62L, CCR6 et CD127. Dans des conditions d'irradiation totale du PBMC, il est inenvisageable de suivre ce processus dans les sous-populations. En irradiant les PBMC, nous n'avons pu analyser qu'une image finale de l'état des cellules. En revanche, il serait pertinent de trier les populations de LT-CD4 et de les irradier après de manière indépendante et d'analyser l'apoptose, l'expression des récepteurs de surface et la prolifération en réponse à une stimulation. Une seconde possibilité, est de trier les populations d'intérêt, de les marquer CFSE fluorescent, et de les réintégrer à l'environnement cellulaire PBMC, puis d'irradier le PBMC, cela permettrait de tracer les cellules dans leur environnement et de suivre avec précision l'expression des récepteurs de surface après irradiation. Le traçage des lymphocytes par un marquage CFSE a auparavant été réalisé dans le but de suivre leur migration vers les organes lymphoïdes (Parish and Warren, 2002).

e) Qu'apportent les résultats du projet sur la réponse CD4 suite à une irradiation clinique (radiothérapie) ?

Notre travail possède plusieurs limites, que j'ai exposées en amont. Toutefois, notre travail est l'un des seuls à référencer les effets de l'irradiation à différentes doses (allant de 0,5 à 8 Gy) sur les LT-CD4 effecteurs mémoires et sur les effecteurs différenciés (Th). Malgré le fait que notre travail ne soit pas directement relié aux effets secondaires induits par la radiothérapie, il est possible d'émettre des hypothèses sur l'apport de notre travail dans la compréhension des effets radiotoxiques induits par la radiothérapie. Il est déjà connu, qu'une diminution du nombre de LT-CD4 induite par la radiothérapie peut être associée à un mauvais pronostic de survie chez les patients. Il est donc logique, de penser que la mort des LT-CD4 effecteurs mémoires va avoir un impact sur le processus de mémoire immunologique des patients ayant subi une radiothérapie. La fonction des cellules mémoires est de pouvoir être réactivées par le même antigène. Lors de la seconde activation, la réponse du LT-CD4 effecteur mémoire sera spécifique, rapide, intense et plus efficace. De plus, il est connu que les LT-CD4 ont des fonctions immunorégulatrices sur les autres cellules du système immunitaire, dont les LT-CD8, les LB, ainsi que les cellules de l'immunité innée. La mort des LT-CD4 effecteurs mémoires va donc impacter l'environnement cytokinique de toutes les autres cellules qui sont régulées par les cytokines produites par les LT-CD4.

3. Perspectives du projet de thèse radiosensibilités des sous-populations de LT-CD4

a) Étude du transcriptome et sénescence dans les populations de LT-CD4

Nous avons démontré une différence d'apoptose radio-induite entre les populations EM CD62L⁻ et CM et naïves CD62L⁺. L'étude de *Tabi et al* basé sur l'irradiation γ *in vitro* de PBMCs de patients ayant des cancers de la prostate, démontre que les populations naïves sont plus radiosensibles que les EM ([Tabi et al., 2010](#)). L'étude de *Tabi et al* et celle du projet de thèse sont toutes deux réalisées sans les mêmes conditions de culture et d'irradiation. Ainsi, la différence de résultat pourrait être expliquée par le type de donneurs/patients irradiés. Dans la continuité du projet, il faudrait déterminer si ces différences sont médiées par des signalisations autonomes à la cellule et de comprendre par quelles voies biologiques s'effectuent les différences de sensibilité à l'apoptose. L'analyse du transcriptome par puce ou par séquençage ARN est une hypothèse qui permettrait d'identifier des gènes et voies cellulaires impliqués dans les différences. L'étude du transcriptome permettrait aussi de comprendre les gènes et voies cellulaires impliqués dans les différences de sensibilité cellulaires à l'apoptose radio-induite entre les populations CCR6⁺CD127⁺EM et CCR6⁻CD127⁺EM. Dans leur étude *Nguyen et al*, sur un modèle d'irradiation de PBMCs ont démontrés que les cellules CCR6⁺ ont une augmentation radio-

induite de l'expression de gènes et de la protéine p16 et de l'activité bêta-galactosidase suggérant une sénescence radio-induite plus importante dans les cellules CCR6⁺ (Nguyen et al., 2020). Dans nos conditions d'étude, nous avons tenté de quantifier l'expression de p16 par q-PCR 6h et 24h après irradiation et n'avons rien pu détecter. La sénescence est un processus qui se développe après irradiation après plusieurs jours de culture (7 et 10 jours selon le modèle cellulaire) (Hernandez-Segura et al., 2018). L'apoptose liée au maintien des cellules en culture peut être inhibée par des inhibiteurs de caspases à ajouter au milieu de culture des PBMCs ou des cellules triées, ce qui permet de cultiver les cellules sur plusieurs jours (Sauerwald et al., 2002). En prenant en compte ces indications issues de la littérature (temps de culture et l'inhibition de l'apoptose basale), les conditions seraient plus optimales pour analyser le processus de sénescence dans les cellules CCR6⁺CD127⁺.

b) Dans quels contextes est décrite la baisse d'expression de récepteurs ?

La baisse d'expression a déjà été décrite dans un contexte d'irradiation de lymphocytes/sang/PBMC à faibles doses (100-200msSv), mais cette étude ne démontre pas de signalisation associée à leur résultat (Gyuleva et al., 2018). La baisse d'expression de récepteurs de surface, principalement la baisse d'expression du récepteur CD62L et CD127 est décrite dans le contexte d'infections virales et bactériennes et est associée à une dérégulation de l'immunité antivirale des LT-CD4-EM (Vassena et al., 2016) (Kononchik et al., 2018) (Richards et al., 2008) (Benito et al., 2008) (Mojumdar et al., 2011). Une étude expérimentale démontre un lien entre l'infection bactérienne par *Listeria monocytogenes* et l'apoptose des cellules qui n'expriment pas le récepteur CD62L (Mannering et al., 2002). La stimulation des cellules naïves est associée à une perte de l'expression des récepteurs de surface CD62L et CD127 (Zhang et al., 2005). L'étude des mécanismes de perte d'expression de CD62L dans les contextes d'activation et d'infections pourrait nous orienter vers des hypothèses pour comprendre les mêmes processus induits par l'irradiation. La régulation de l'expression du récepteur CD62L semble médiée, d'une part, via le facteur de transcription FOXO1 (Trinité et al., 2014) et d'autre part via la signalisation ATP produit par la respiration cellulaire (Foster et al., 2013). Ces deux formes de régulations sont une perspective pour comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la baisse radio-induite du récepteur CD62L.

c) Comment corréler l'apoptose et la baisse d'expression des récepteurs de surface ?

Nos résultats démontrent que l'irradiation de PBMCs induit au sein des LT-CD4 une baisse d'expression des récepteurs de surface CD62L, CCR6 et CD127. Toutefois, des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour comprendre : 1) le lien de causalité entre la perte d'expression des récepteurs et l'induction de l'apoptose 2) Si l'induction radio-induite de la baisse d'expressions des récepteurs et de l'apoptose dépend d'une signalisation cellulaire interne ou de l'environnement cellulaire. Pour

démontrer une corrélation directe entre la diminution de l'expression des récepteurs de surface et l'apoptose radio-induite, il faut d'une part irradier les populations de LT-CD4 (LT-CD4, CCR6⁺CD127⁺, CCR6⁻CD127⁺, EM, CM, naïve) isolées après tri cellulaire, puis analyser l'apoptose et l'expression des récepteurs de surface par cytométrie. Comme perspective du projet de thèse, il serait possible de réaliser des inhibitions des récepteurs de surfaces par transfection cellulaire d'ARN non-codant de type si-RNA. Cela permettrait d'étudier après inhibition d'un ou plusieurs récepteurs de surface, l'effet sur l'apoptose radio-induite dans les populations de LT-CD4. La transfection de si-RNA ciblant un récepteur de surface, en l'occurrence le récepteur de surface CD4, a déjà été réalisée dans des LT-CD4 (Mantei et al., 2008). Cette étude démontre qu'il est possible d'inhiber l'expression de molécules de surface exprimée à la surface des LT-CD4. Nous pourrions, dans le cadre de notre étude, tenter d'utiliser le même protocole que Mantei et al pour inhiber l'expression des molécules de surface CD62L, CCR6 et CD127. L'objectif de l'expérience d'inhibition de CD62L, CCR6 et de CD127 serait de comprendre quelles voies cellulaires sont impactées par la diminution de ces molécules de surface. L'inhibition en dehors du cadre d'irradiation permettrait de prouver un lien entre l'apoptose et la diminution de l'expression d'une molécule de surface.

d) Caractérisation des effets de l'irradiation dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 quiescents et stimulés dans un contexte tumoral

La compréhension du microenvironnement tumoral et des fonctions des lymphocytes-T infiltrant (TIL) qu'il contient a permis le développement de thérapie innovante dont l'immunothérapie. L'immunothérapie a pour objectif de stimuler la réponse anti-tumorale des lymphocytes-T-CD8 (CTL-CD8) à activité cytotoxique. Dans l'introduction du manuscrit, je décris que l'environnement tumoral comprend des lymphocytes-T-CD4 et notamment des effecteurs différenciés Th activés qui arrivent par la circulation sanguine. Les effecteurs Treg inhibent l'activité des CTL-CD8, ainsi l'immunothérapie permet via le blocage du récepteur PD-1, l'inhibition de l'action des Treg. De plus, les traitements d'immunothérapies sont combinés à la radiothérapie, cela fait donc émerger la nécessité de comprendre le rôle des effecteurs différenciés dans ce contexte-là. Une perspective de ce projet de thèse pourrait être de caractériser les différences de sensibilité à l'apoptose radio-induite déjà décrites dans les cellules quiescentes et après stimulations *in vitro*, dans les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 du microenvironnement tumoral, dans un contexte d'irradiation tumoral. Un des points essentiels du projet de thèse est que la caractérisation de l'effet de l'irradiation sur les lymphocytes-T-CD4 a été réalisée chez l'homme et non pas sur un modèle animal. Cette même caractérisation sur les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 dans le microenvironnement tumoral doit donc être réalisée chez l'homme, pour cela il serait intéressant de développer une collaboration avec un service d'oncologie radiothérapie pour obtenir des biopsies tumorales humaines. Nous avons démontré que

les sous-populations d'effecteurs mémoires CCR6-CD127- quiescents comprenant les effecteurs Th1 sont sensible à l'apoptose radio-induite, et les Th1 produisant de l'IFN-gamma ont un rôle anti-tumoral et favorisent l'action des lymphocytes-T-CD8 du microenvironnement tumoral (Castro et al., 2018). Il est donc intéressant d'étudier particulièrement l'effet de l'irradiation des Th1 dans un contexte d'irradiation *in vitro* de biopsie de tumeur. L'irradiation *ex vivo* a déjà été réalisée sur des biopsies de tumeur cultivées en milieu RPMI complété de 10% de SVF, dans le cadre d'une étude de la radiosensibilité de tumeurs de carcinome pulmonaire (NSCLC) (Willers et al., 2015).

La seconde façon d'analyser l'effet de l'irradiation sur les sous-populations de lymphocytes-T-CD4 dans un contexte d'irradiation tumorale, serait de réaliser des co-cultures de cellules tumorales et des effecteurs différenciés activés et triés, puis d'irradier *in vitro* les co-cultures à des doses croissantes d'irradiation. Une étude démontre la faisabilité d'une co-culture de PBMC humain avec des lignées de carcinome ovarien et démontre une régulation des Th1 et Th2 sur le développement de la lignée (Mielczarek-Palacz et al., 2016). Alzoubi et al démontre la faisabilité et la fonction anti-tumorale des Th1 dans un modèle de co-culture de Th1 isolés et des cellules MCF7 (lignée carcinome du sein) (AlZoubi et al., 2015).

II. Conclusion et discussion des éléments de résultats du second axe du projet de thèse

1. Conclusion de l'analyse d'association GWAS à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM

Les précédents travaux réalisés au sein du laboratoire ont mis en évidence une contribution génétique de 3 polymorphismes de type SNVs : rs1131532, rs3815496 et rs1131535 sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM qui varie entre les individus. À l'issue de ces résultats, ces SNVs sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* ont été proposés comme marqueurs génétiques prédictifs de l'apoptose radio-induite et donc de la radiosensibilité individuelle. Ainsi, un des objectifs du projet de thèse, a été d'étudier l'association du génotype du SNV rs1131532 sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* à l'apoptose radio-induite dans les effecteurs différenciés Th, de manière à comprendre si l'association du SNV rs1131532 à l'apoptose des lymphocytes-T-CD4-EM était portée par un type d'effecteur Th particulier. Nos résultats démontrent, sur une cohorte indépendante à celle utilisée dans l'étude de Baijer et al, que le génotype de rs1131532 est associé significativement à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM et dans les effecteurs différenciés dans lesquels l'irradiation induit de l'apoptose : Th1, Th2, Th non polarisé, Th9 et Th17 (CXCR3+) ; où le génotype homozygote pour l'allèle majeur (CC) est associé à une sensibilité de l'individu à l'irradiation, le génotype homozygote pour l'allèle mineur (TT) est associé à une résistance de l'individu à l'irradiation. Dans cette partie nous montrons donc une association génétique avec le marqueur rs1131532 pour les phénotypes de sensibilité à l'apoptose

mesurés dans des effecteurs différenciés CCR6+ et CCR6-. Ce résultat est cohérent avec les données d'expressions géniques mesurées sur les LT-CD4 effecteurs CCR6+ et CCR6-. Les analyses statistiques comparant la proportion de cellules apoptotiques à chaque dose d'irradiation 0.5 et 8 Gy, démontrent une différence significative d'apoptose mesurée à 0.5, 2 et 8 Gy dans les effecteurs Th1, Th9 et Th17 (CXCR3+) entre les individus homozygotes pour l'allèle majeur (CC) et homozygote pour l'allèle mineur (TT). Nous avons aussi observé une variabilité dans le pourcentage de cellules apoptotiques radio-induites au sein des d'individus de génotype homozygote pour l'allèle majeur. Ainsi, il faut inclure un nombre d'individus supérieure par génotype pour étudier les origines de ces variabilité (génétiques ou phénotypique/expérimentale).

L'un des deux axes du projet a été de confirmer ces associations génétiques par une technique de séquençage sur puce GSA (700.000 SNVs) et de rechercher des associations avec l'ensemble des SNVs du génome. Pour répondre à ces objectifs, une analyse de l'association des SNVs sur le gène *TRAIL* (*TNFSF10*) et d'association pangénomique GWAS à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM ont été réalisées. La cartographie de la majorité (39 SNVs) des SNVs sur le gène *TRAIL* (*TNFSF10*) a été faite par imputation des SNVs présents sur la puce GSA (11 SNVs). L'analyse a démontré qu'il n'existe pas de SNV sur le gène *TRAIL* (*TNFSF10*) corrélé à la quantification de l'apoptose radio-induite avec une meilleure significativité que rs1131532.

La stratégie pan-génomique a pour but d'élargir l'étude d'association à tous les SNVs de la puce GSAMD, cela a été fait selon deux modèles d'analyse FBAT suivant les modèles génétiques additif, dominant et récessif et le modèle mixte linéaire. L'analyse d'association de l'ensemble des SNVs de la puce à la quantification de l'apoptose radio-induite de 365 individus ne démontre pas de signaux d'association au niveau du seuil de significativité (10^{-8}). Cependant, nous identifions des signaux contigus qui sont considérés comme suggestifs, sur les chromosomes 2, 7, 21 et 22. La p-valeur de ces signaux étant bien inférieur au seuil de significativité, nous ne pouvons pas de conclure à une association robuste à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM. Ces signaux sont plutôt à considérer comme des SNVs candidats dont l'association à l'apoptose des LT-CD4-EM doit être confirmée. Les perspectives de l'analyse d'association pangénomique (GWAS) à la quantification de l'apoptose des LT-CD4-EM sont décrites, dans la partie discussion du manuscrit.

2. Discussion et perspectives de l'étude de polymorphismes génétiques prédictifs de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM

a) Limites dues à la diversité de tests cellulaires et génétiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle

Le chapitre 2 de l'introduction reprend les principaux tests de radiosensibilité. Il existe deux types de tests de radiosensibilité : les tests cellulaires *in vitro* et les tests génétiques. Les tests cellulaires prédictifs de la radiosensibilité individuelle ont d'une part été développés sur différents types cellulaires : les fibroblastes et les LT-CD8. De plus, sur chaque type cellulaire, le test repose sur la quantification de différents processus cellulaires : la survie clonogénique, les cassures ADN double brin, la réparation des cassures, les aberrations cytogénétiques et l'apoptose. Or à ce jour, il n'a pas été démontré de corrélation entre l'ensemble des tests cellulaires mesurant la radiosensibilité individuelle. En effet, il n'existe pas d'étude qui au sein d'un même individu, compare et établit une corrélation ou non entre les principaux tests cellulaires prédisant des effets. Le second point discutable est la diversité d'effets prédits par tous ces tests de radiosensibilités, car là aussi, il n'y a pas de corrélation. Le test RILA est associé principalement à l'apparition d'effets radiotoxiques tardifs et principalement la fibrose radio-induite (Ozshahin et al., 2005) (Azria et al., 2008) (Azria et al., 2015), tandis que le test basé sur la quantification de la translocation d'ATM phosphorylée ou de la quantification des cassures ADN doubles brins dans les fibroblastes ne sont pas associée à un ou des effets secondaires de la radiothérapie, mais catégorise des groupes de sensibilités (Bodgi et al., 2013) (Joubert et al., 2008) (Viau et al., 2015).

La comparaison des marqueurs génétiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle aboutit au même constat. En effet, les stratégies d'étude des polymorphismes issus de gènes candidats ou d'analyse pangénomique, pointent sur plusieurs SNPs prédictifs de la radiosensibilité individuelle, sur une liste large de gènes *ATM*, *XRCC1*, *XRCC3*, *TGF-beta*, *SOD2* (cf **Tableau**) *TRAIL (TNFSF10)* (Baijer et al., 2016), *FSHR* (Kerns et al., 2010), *PRDM1* (Best et al., 2011), *TANC1* (Fachal et al., 2014), *CCRNAL* (Barnett et al., 2014), *PROX1* (Morton et al., 2017). De plus, ces polymorphismes ne prédisent pas l'ensemble des effets radiotoxiques de la radiothérapie. Certains prédisent spécifiquement les effets précoces (aiguës) et d'autres les effets tardifs induits par la radiothérapie. Cependant, en comparant l'ensemble des analyses, l'association du SNV rs1801516 situé sur le gène *ATM* a été démontrée dans plusieurs études indépendantes, sur différentes cohortes de patients atteints de cancer du sein et de la prostate, et est prédictif des effets précoces et tardifs induits par la radiothérapie (Christian N. Andreassen et al., 2006) (Edvardsen et al., 2007) (Rosenstein et al., 2007) (Ho et al., 2007). Il existe donc une diversité d'approche pour mesurer la radiosensibilité individuelle, une diversité de tests cellulaires et de marqueurs prédictifs, qui ne sont pas toujours corrélés. Il n'existe pas actuellement,

un test cellulaire ou génétique suffisant pour prédire la radiosensibilité individuelle. Ce constat indique que pour prédire la radiosensibilité individuelle en clinique, il faudrait avoir une approche combinant plusieurs tests, soit à la fois les tests cellulaires et séquencer un large panel de marqueurs génétique. Une application en clinique de marqueurs génétiques et les tests cellulaires prédictifs de la radiosensibilité individuelle, permettrait de quantifier la sensibilité de tous les patients et de permettre une adaptation personnalisée du traitement de radiothérapie en fonction de la sensibilité du patient.

b) Association du SNVs rs1131532 à la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-effecteur mémoire ou des effecteurs différenciés Th ?

Dans la seconde partie du projet de thèse, nous démontrons sur une cohorte différente de la publication *Baijer et al*, que le SNV rs1131532 sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* est significativement associé à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM circulants, mais aussi à l'apoptose radio-induite des sous-populations effecteurs mémoires Th1, Th2, Th non polarisé, Th9 et Th17 (CXCR3+) circulants. En effet, les individus homozygotes pour l'allèle mineur présentent une résistance à l'apoptose radio-induite, contrairement aux individus de génotype homozygote sur l'allèle majeur qui présentent une sensibilité à l'apoptose radio-induite. Dans le cadre d'une application en clinique de la radiosensibilité des patients, il faudrait réaliser un génotypage de rs1131532 et quantifier *in vitro* l'apoptose radio-induite. La question, qui pourrait se poser est de savoir, dans quelle population faudrait-il réaliser la quantification de l'apoptose radio-induite : effecteur mémoire ou effecteurs différenciés Th. Même si nous précisons, l'association du SNV rs1131532 à l'apoptose radio-induite d'effecteurs Th, celle-ci ne permet pas de caractériser avec une meilleure précision que la prédiction obtenue avec l'association à l'apoptose dans les LT-CD4-EM. De plus, l'identification des effecteurs différenciés Th est plus complexe, car elle implique un plus grand nombre de marquages de molécules de surface. C'est pourquoi, cliniquement chez les patients, pour prédire la radiosensibilité individuelle, il serait plus évident de quantifier l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM et en parallèle de réaliser le génotypage pour rs1131532, juste avant le traitement par radiothérapie.

c) Les limites dans l'analyse pangénomique (GWAS) du projet de thèse

L'analyse d'association pangénomique étendue à l'ensemble des SNVs de la puce GSAMD à la quantification de l'apoptose des LT-CD4-EM a permis d'identifier des signaux suggestifs sur les chromosomes 2, 7, 21 et 22. Cependant leurs p-values sont en dessous du seuil de significativité, qui en prenant la correction multitest est calculée à 10^{-8} . Ces significativités peu robustes peuvent être expliquées par deux paramètres : la puissance statistiques et l'effet génique. L'effet en génétique prend en compte l'explication d'un phénotype par l'implication d'un ou plusieurs gènes (monogénique, polygénique) et par la fréquence du ou des variants impliqués. Un effet est fort si le phénotype est

expliqué par un variant monogénique de faible fréquence. Un effet est faible si le phénotype est expliqué par plusieurs variants (polygénique) qui sont fréquents. La puissance statistique d'un test est en statistique la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle (dans notre étude, un polymorphisme ayant une faible association) sachant que l'hypothèse nulle est incorrecte (en réalité que le polymorphisme à une association réelle). Un des paramètres qui impacte la puissance statistique est la taille de l'échantillon. Dans notre étude, l'analyse a été réalisée sur 900 individus génotypés mais seulement 365 individus dont on disposait de la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM. C'est cet effectif qui a pu être limitant dans l'analyse d'association pangénomique qui a été effectuée dans notre étude. Ainsi, comme perspective il serait intéressant d'augmenter le nombre d'individus pour lesquels on dispose de la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4 EM. Cependant, le travail de phénotypage d'individus nécessite des expérimentations cellulaires conséquentes, qui peuvent s'étaler sur plusieurs mois et qui seront réalisées en plusieurs expériences, ce qui sera à l'origine de variabilité expérimentale. À la suite du phénotypage, il y a aussi un travail d'analyses conséquentes sur la normalisation des données et sur la quantification de l'apoptose radio-induite.

3. Les perspectives de l'axe d'étude sur la recherche de polymorphismes génétiques associés à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM

Dans la continuité, du projet de thèse, il serait intéressant d'approfondir le pouvoir prédictif du SNV rs1131532 sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* à la radiosensibilité individuelle des patients atteints de cancer. Dans un premier temps, il faudrait démontrer une corrélation entre la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM et le développement d'effets radiotoxiques aigus et tardifs induits par la radiothérapie. Cela nécessite de quantifier l'apoptose après irradiation *in vitro* sur des PBMCs isolés de patients prélevés avant le traitement par radiothérapie. Il a été démontré que les SNVs rs1131532, rs1131535 et rs3815496 sur le gène *TRAIL (TNFSF10)* est associé chez les patientes atteintes de cancer du sein, à l'apparition de la dermatite radio-induite. Il serait intéressant d'approfondir la prédiction de ces marqueurs aux effets secondaires de la radiothérapie, dans des cohortes de patients atteints de différents types de cancer. Cela permettrait d'associer ou non ces marqueurs génétiques à des effets secondaires spécifiques des différentes zones irradiées ou d'effets secondaires au niveau sanguin. Un des effets présents chez les patients après la radiothérapie est la lymphopénie. Ainsi, comme perspective de ce projet, nous pourrions tenter d'établir un lien entre le génotype pour rs1131532 et la lymphopénie radio-induite.

L'analyse d'association pangénomique (GWAS) à la quantification de l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM identifie des signaux suggestifs sur les chromosomes : 2, 7, 20 et 21, mais ceux-ci sont en dessous du seuil de significativité, et sont donc considérés comme des marqueurs candidats. À court

terme, dans la continuité du projet, il est nécessaire de caractériser ces signaux, de caractériser leur déséquilibre de liaison et l'influence de ces polymorphismes sur l'expression génique des lymphocytes T CD4. Cela pourrait être réalisé par q-PCR. Il serait intéressant comme perspective à court terme du projet, de restreindre l'analyse pan-génomique aux SNVs situés sur des gènes et des séquences régulatrices contrôlant des gènes exclusivement exprimés dans les lymphocytes-T-CD4. La recherche de marqueurs prédictifs étant associée à la quantification de l'apoptose radio-induite, il est possible d'envisager de restreindre l'analyse d'association aux gènes impliqués dans le processus de mort cellulaire par apoptose et aux gènes impliqués dans la réponse à l'irradiation.

Enfin, à long terme, il serait intéressant de comprendre le lien biologique entre ces polymorphismes candidats et l'apoptose des lymphocytes-T-CD4-EM. Comme perspective à long terme, il serait intéressant de quantifier l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM sur un grand nombre d'individus pour les ajouter aux quantifications des 365 individus utilisées pour l'analyse d'association pangénomique de notre étude. Cela permettra de confirmer ou non, l'association des signaux suggestifs sur les chromosomes : 2, 7, 20 et 21.

Pour conclure, notre étude démontre que des sensibilités à l'apoptose radio-induites différentes co-existent au sein des sous-populations de lymphocytes-T-CD4 et de lymphocytes-T-CD4 effecteur mémoire. Nous avons caractérisé dans les lymphocytes-T-CD4 une baisse radio-induite de l'expression des récepteurs de surface CD62L, CCR6 et CD127 et une augmentation radio-induite de la proportion de populations de lymphocytes-T-CD4 sensibles à l'apoptose radio-induite : CD62L-, CCR6- et CD127-. Cependant, nos résultats ne mettent pas en lumière le lien entre la sensibilité à l'apoptose radio-induite et la diminution radio-induite de l'expression de CD62L, CCR6- et CD127. La recherche de ce lien est une des perspectives principales de la suite de ce projet. Nos résultats démontrent que l'activation protège les lymphocytes-T-CD4 et les sous-populations de l'apoptose radio-induite et de la diminution de l'expression du récepteur CD62L. Nous avons caractérisé un effet différentiel des doses d'irradiation sur la prolifération des lymphocytes-T-CD4 et des sous-populations. Nous avons démontré l'association du polymorphisme rs1131532 à l'apoptose radio-induite des LT-CD4-EM et avons précisé l'association génétique de ce polymorphisme à l'apoptose radio-induite des effecteurs Th1, Th2, Th non polarisé, Th9 et Th17 (CXCR3+). Enfin l'analyse d'associations pangénomique visant à rechercher des marqueurs génétiques de la radiosensibilité individuelle sur l'ensemble du génome, identifie des signaux suggestifs sur les chromosomes 2, 7, 21 et 22.

Références bibliographiques

- Aerts, N.E., Dombrecht, E.J., Ebo, D.G., Bridts, C.H., Stevens, W.J., De Clerck, L.S., 2008. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.* 251, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.04.008>
- Alsbeih, G., Al-Harbi, N., Al-Hadyan, K., El-Sebaie, M., Al-Rajhi, N., 2010. Association between Normal Tissue Complications after Radiotherapy and Polymorphic Variations in TGFB1 and XRCC1 Genes. *Radiat. Res.* 173, 505–511. <https://doi.org/10.1667/RR1769.1>
- AlZoubi, A., AlZoubi, R., AlSheyab, F., Khalifeh, F., -Khateeb, M.E., 2015. Purification of IFN γ -secreting, effector T lymphocytes that induce apoptosis in cancer cells. *Integr. Mol. Med.* 2. <https://doi.org/10.15761/IMM.1000160>
- Andreassen, C.N., 2010. Searching for genetic determinants of normal tissue radiosensitivity--are we on the right track? *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 97, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2010.07.018>
- Andreassen, C.N., Alsner, J., Overgaard, J., Herskind, C., Haviland, J., Owen, R., Homewood, J., Bliss, J., Yarnold, J., 2005. TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer. *Radiother. Oncol.* 75, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2004.12.012>
- Andreassen, C.N., Alsner, J., Overgaard, M., Overgaard, J., 2003. Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother. Oncol.* 69, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2003.09.010>
- Andreassen, C. N., Alsner, J., Overgaard, M., Sørensen, F.B., Overgaard, J., 2006. Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGFB1, SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM; a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Int. J. Radiat. Biol.* 82, 577–586. <https://doi.org/10.1080/09553000600876637>
- Andreassen, Christian N., Overgaard, J., Alsner, J., Overgaard, M., Herskind, C., Cesaretti, J.A., Atencio, D.P., Green, S., Formenti, S.C., Stock, R.G., Rosenstein, B.S., 2006. ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 64, 776–783. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.09.014>
- Andreassen, C.N., Rosenstein, B.S., Kerns, S.L., Ostrer, H., De Ruyscher, D., Cesaretti, J.A., Barnett, G.C., Dunning, A.M., Dorling, L., West, C.M.L., Burnet, N.G., Elliott, R., Coles, C., Hall, E., Fachal, L., Vega, A., Gómez-Caamaño, A., Talbot, C.J., Symonds, R.P., De Ruyck, K., Thierens, H., Ost, P., Chang-Claude,

J., Seibold, P., Popanda, O., Overgaard, M., Dearnaley, D., Sydes, M.R., Azria, D., Koch, C.A., Parliament, M., Blackshaw, M., Sia, M., Fuentes-Raspall, M.J., Ramon Y Cajal, T., Barnadas, A., Vesprini, D., Gutiérrez-Enríquez, S., Mollà, M., Díez, O., Yarnold, J.R., Overgaard, J., Bentzen, S.M., Alsner, J., International Radiogenomics Consortium (RgC), 2016. Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 121, 431–439. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2016.06.017>

Andrievski, A., Wilkins, R.C., 2009. The response of gamma-H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. *Int. J. Radiat. Biol.* 85, 369–376. <https://doi.org/10.1080/09553000902781147>

Angèle, S., Romestaing, P., Moullan, N., Vuillaume, M., Chapot, B., Friesen, M., Jongmans, W., Cox, D.G., Pisani, P., Gérard, J.-P., Hall, J., 2003. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res.* 63, 8717–8725.

Ann, A., 2012. ADAMs and Ectodomain Proteolytic Shedding in Leucocyte Migration: Focus on L-Selectin and ADAM17. *Curr. Immunol. Rev. Discontin.* 8, 103–117.

Anscher, M.S., Kong, F.M., Andrews, K., Clough, R., Marks, L.B., Bentel, G., Jirtle, R.L., 1998. Plasma transforming growth factor beta1 as a predictor of radiation pneumonitis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 41, 1029–1035. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(98\)00154-0](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(98)00154-0)

Appay, V., Zaunders, J.J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A.J., Cooper, D.A., Rowland-Jones, S.L., Kelleher, A.D., 2002. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 168, 5954–5958. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5954>

Arase, N., Takeuchi, A., Unno, M., Hirano, S., Yokosuka, T., Arase, H., Saito, T., 2005. Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int. Immunol.* 17, 1227–1237. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh299>

Arpin, D., Perol, D., Blay, J.-Y., Falchero, L., Claude, L., Vuillermoz-Blas, S., Martel-Lafay, I., Ginestet, C., Alberti, L., Nosov, D., Etienne-Mastroianni, B., Cottin, V., Perol, M., Guerin, J.-C., Cordier, J.-F., Carrie, C., 2005. Early Variations of Circulating Interleukin-6 and Interleukin-10 Levels During Thoracic Radiotherapy Are Predictive for Radiation Pneumonitis. *J. Clin. Oncol.* 23, 8748–8756. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.7145>

Ash, D., 2007. Lessons from Epinal. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* 19, 614–615. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2007.06.011>

Aslan, N., Yurdaydin, C., Wiegand, J., Greten, T., Ciner, A., Meyer, M.F., Heiken, H., Kuhlmann, B., Kaiser, T., Bozkaya, H., Tillmann, H.L., Bozdayi, A.M., Manns, M.P., Wedemeyer, H., 2006. Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis. *J. Viral Hepat.* 13, 505–514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2006.00723.x>

Asna, N., Livoff, A., Batash, R., Debbi, R., Schaffer, P., Rivkind, T., Schaffer, M., 2018. Radiation therapy and immunotherapy—a potential combination in cancer treatment. *Curr. Oncol.* 25, e454–e460. <https://doi.org/10.3747/co.25.4002>

Ayoub, N., Al-Shami, K., Yaghan, R., 2019. Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: Recent advances and combination therapeutic approaches. *Breast Cancer Targets Ther.* Volume 11, 53–69. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S175360>

Azria, D., Ozsahin, M., Kramar, A., Peters, S., Atencio, D.P., Crompton, N.E.A., Mornex, F., Pèlegri, A., Dubois, J.-B., Mirimanoff, R.-O., Rosenstein, B.S., 2008. Single nucleotide polymorphisms, apoptosis, and the development of severe late adverse effects after radiotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 6284–6288. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0700>

Azria, D., Riou, O., Castan, F., Nguyen, T.D., Peignaux, K., Lemanski, C., Lagrange, J.-L., Kirova, Y., Lartigau, E., Belkacemi, Y., Bourgier, C., Rivera, S., Noël, G., Clippe, S., Mornex, F., Hennequin, C., Kramar, A., Gourgou, S., Pèlegri, A., Fenoglietto, P., Ozsahin, E.M., 2015. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine* 2, 1965–1973. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.024>

Badie, C., Dziwura, S., Raffy, C., Tsigani, T., Alsbeih, G., Moody, J., Finnon, P., Levine, E., Scott, D., Bouffler, S., 2008. Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment. *Br. J. Cancer* 98, 1845–1851. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604381>

Baijer, J., Déchamps, N., Perdry, H., Morales, P., Kerns, S., Vasilescu, A., Baulande, S., Azria, D., Roméo, P.H., Schmitz, A., 2016. TNFSF10/TRAIL regulates human T4 effector memory lymphocyte radiosensitivity and predicts radiation-induced acute and subacute dermatitis. *Oncotarget* 7, 21416–21427. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7893>

Bakhshi, S., Cerosaletti, K.M., Concannon, P., Bawle, E.V., Fontanesi, J., Gatti, R.A., Bhamhani, K., 2003. Medulloblastoma with adverse reaction to radiation therapy in nijmegen breakage syndrome. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 25, 248–251. <https://doi.org/10.1097/00043426-200303000-00013>

Barazzuol, L., Coppes, R.P., Luijk, P. van, 2020. Prevention and treatment of radiotherapy-induced side effects. *Mol. Oncol.* 14, 1538–1554. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12750>

Barnett, G.C., Thompson, D., Fachal, L., Kerns, S., Talbot, C., Elliott, R.M., Dorling, L., Coles, C.E., Dearnaley, D.P., Rosenstein, B.S., Vega, A., Symonds, P., Yarnold, J., Baynes, C., Michailidou, K., Dennis, J., Tyrer, J.P., Wilkinson, J.S., Gómez-Caamaño, A., Tanteles, G.A., Platte, R., Mayes, R., Conroy, D., Maranian, M., Luccarini, C., Gulliford, S.L., Sydes, M.R., Hall, E., Haviland, J., Misra, V., Titley, J., Bentzen, S.M., Pharoah, P.D.P., Burnet, N.G., Dunning, A.M., West, C.M.L., 2014. A genome wide association study (GWAS) providing evidence of an association between common genetic variants and late radiotherapy toxicity. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 111, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2014.02.012>

Bartek, J., Lukas, J., 2001. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* 490, 117–122. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02114-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02114-7)

Beauford, S.S., Kumari, A., Garnett-Benson, C., 2020. Ionizing radiation modulates the phenotype and function of human CD4⁺ induced regulatory T cells. *BMC Immunol.* 21, 18. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00349-w>

Belka, C., Ottinger, H., Kreuzfelder, E., Weinmann, M., Lindemann, M., Lepple-Wienhues, A., Budach, W., Grosse-Wilde, H., Bamberg, M., 1999. Impact of localized radiotherapy on blood immune cells counts and function in humans. *Radiother. Oncol.* 50, 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(98\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(98)00130-3)

Benito, J.M., López, M., Lozano, S., González-Lahoz, J., Soriano, V., 2008. Down-regulation of interleukin-7 receptor (CD127) in HIV infection is associated with T cell activation and is a main factor influencing restoration of CD4(+) cells after antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 198, 1466–1473. <https://doi.org/10.1086/592716>

Berenson, R.J., Andrews, R.G., Bensinger, W.I., Kalamasz, D., Knitter, G., Buckner, C.D., Bernstein, I.D., 1988. Antigen CD34⁺ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J. Clin. Invest.* 81, 951–955. <https://doi.org/10.1172/JCI113409>

Best, T., Li, D., Skol, A.D., Kirchoff, T., Jackson, S.A., Yasui, Y., Bhatia, S., Strong, L.C., Domchek, S.M., Nathanson, K.L., Olopade, O.I., Huang, R.S., Mack, T.M., Conti, D.V., Offit, K., Cozen, W., Robison, L.L., Onel, K., 2011. Variants at 6q21 implicate PRDM1 in the etiology of therapy-induced second malignancies after Hodgkin's lymphoma. *Nat. Med.* 17, 941–943. <https://doi.org/10.1038/nm.2407>

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., Kuchroo, V.K., 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238. <https://doi.org/10.1038/nature04753>

Bodgi, L., Granzotto, A., Devic, C., Vogin, G., Lesne, A., Bottollier-Depois, J.-F., Victor, J.-M., Maalouf, M., Fares, G., Foray, N., 2013. A single formula to describe radiation-induced protein relocalization: towards a mathematical definition of individual radiosensitivity. *J. Theor. Biol.* 333, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2013.05.020>

Bonvalot, S., Rutkowski, P.L., Thariat, J., Carrère, S., Ducassou, A., Sunyach, M.-P., Agoston, P., Hong, A., Mervoyer, A., Rastrelli, M., Moreno, V., Li, R.K., Tiangco, B., Herraiz, A.C., Gronchi, A., Mangel, L., Sy-Ortin, T., Hohenberger, P., de Baère, T., Le Cesne, A., Helfre, S., Saada-Bouزيد, E., Borkowska, A., Anghel, R., Co, A., Gebhart, M., Kantor, G., Montero, A., Loong, H.H., Vergés, R., Lapeire, L., Dema, S., Kacso, G., Austen, L., Moureau-Zabotto, L., Servois, V., Wardelmann, E., Terrier, P., Lazar, A.J., Bovée, J.V.M.G., Le Péchoux, C., Papai, Z., 2019. NBTXR3, a first-in-class radioenhancer hafnium oxide nanoparticle, plus radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with locally advanced soft-tissue sarcoma (Act.In.Sarc): a multicentre, phase 2-3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* 20, 1148–1159. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30326-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30326-2)

Bordón, E., Henríquez Hernández, L.A., Lara, P.C., Pinar, B., Fontes, F., Rodríguez Gallego, C., Lloret, M., 2009. Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 4, 58. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-58>

Bortfeld, T., 2006. IMRT: a review and preview. *Phys. Med. Biol.* 51, R363–R379. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/51/13/R21>

Boschetti, G., Nancey, S., Kanjarawi, R., Almeras, T., Ruel, K., Kaiserlian, D., Flourie, B., 2012. Réponses immunitaires au cours des MICI : implication de l'axe IL-23/Th17. *Hépatogastro Oncol. Dig.* 19, 446–454. <https://doi.org/10.1684/hpg.2012.0742>

Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., 2000. Detection of apoptosis by annexin V labeling. *Methods Enzymol.* 322, 15–18. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)22004-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)22004-1)

Bottomly, K., 1988. A functional dichotomy in CD4+ T lymphocytes. *Immunol. Today* 9, 268–274. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(88\)91308-4](https://doi.org/10.1016/0167-5699(88)91308-4)

Bourgier, C., Kerns, S., Gourgou, S., Lemanski, C., Gutowski, M., Fenoglio, P., Romieu, G., Crompton, N., Lacombe, J., Pèlerin, A., Ozsahin, M., Rosenstein, B., Azria, D., 2016. Concurrent or sequential

letrozole with adjuvant breast radiotherapy: final results of the CO-HO-RT phase II randomized trial†. *Ann. Oncol.* 27, 474–480. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv602>

Brem, R., Cox, D.G., Chapot, B., Moullan, N., Romestaing, P., Gérard, J.-P., Pisani, P., Hall, J., 2006. The XRCC1 –77T→C variant: haplotypes, breast cancer risk, response to radiotherapy and the cellular response to DNA damage. *Carcinogenesis* 27, 2469–2474. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl114>

Bremer, M., Schindler, D., Gross, M., Dörk, T., Morlot, S., Karstens, J.H., 2003. Fanconi's anemia and clinical radiosensitivity report on two adult patients with locally advanced solid tumors treated by radiotherapy. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Rontgengesellschaft* 179, 748–753. <https://doi.org/10.1007/s00066-003-1099-8>

Bregues, M., Liu, D., Korn, R., Zenhausern, F., 2014. Method for validating radiobiological samples using a linear accelerator. *EPJ Tech. Instrum.* 1, 1–13. <https://doi.org/10.1140/epjti2>

Brothwell, M.R.S., West, C.M., Dunning, A.M., Burnet, N.G., Barnett, G.C., 2019. Radiogenomics in the Era of Advanced Radiotherapy. *Clin. Oncol., Radiobiology* 31, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2019.02.006>

Burri, R.J., Stock, R.G., Cesaretti, J.A., Atencio, D.P., Peters, S., Peters, C.A., Fan, G., Stone, N.N., Ostrer, H., Rosenstein, B.S., 2008. Association of single nucleotide polymorphisms in SOD2, XRCC1 and XRCC3 with susceptibility for the development of adverse effects resulting from radiotherapy for prostate cancer. *Radiat. Res.* 170, 49–59. <https://doi.org/10.1667/RR1219.1>

Caccamo, N., Joosten, S.A., Ottenhoff, T.H.M., Dieli, F., 2018. Atypical Human Effector/Memory CD4+ T Cells With a Naive-Like Phenotype. *Front. Immunol.* 9.

Cancer Treatments: What Is IMRT? | Memorial Sloan Kettering Cancer Center [WWW Document], n.d. URL <https://www.mskcc.org/cancer-care/diagnosis-treatment/cancer-treatments/radiation-therapy/what-imrt> (accessed 1.10.22).

Cao, M., Cabrera, R., Xu, Y., Liu, C., Nelson, D., 2011. Different radiosensitivity of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and effector T cells to low dose gamma irradiation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 87, 71–80. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.518208>

Carty, S.A., Riese, M.J., Koretzky, G.A., 2018. Chapter 21 - T-Cell Immunity, in: Hoffman, R., Benz, E.J., Silberstein, L.E., Heslop, H.E., Weitz, J.I., Anastasi, J., Salama, M.E., Abutalib, S.A. (Eds.), *Hematology (Seventh Edition)*. Elsevier, pp. 221–239. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00021-4>

Casazza, J.P., Betts, M.R., Price, D.A., Precopio, M.L., Ruff, L.E., Brenchley, J.M., Hill, B.J., Roederer, M., Douek, D.C., Koup, R.A., 2006. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J. Exp. Med.* 203, 2865–2877. <https://doi.org/10.1084/jem.20052246>

Castro, F., Cardoso, A.P., Gonçalves, R.M., Serre, K., Oliveira, M.J., 2018. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front. Immunol.* 0. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>

Cesaretti, J.A., Stock, R.G., Lehrer, S., Atencio, D.A., Bernstein, J.L., Stone, N.N., Wallenstein, S., Green, S., Loeb, K., Kollmeier, M., Smith, M., Rosenstein, B.S., 2005. ATM sequence variants are predictive of adverse radiotherapy response among patients treated for prostate cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.09.031>

Chang-Claude, J., Popanda, O., Tan, X.-L., Kropp, S., Helmbold, I., Fournier, D. von, Haase, W., Sautter-Bihl, M.L., Wenz, F., Schmezer, P., Ambrosone, C.B., 2005. Association between Polymorphisms in the DNA Repair Genes, XRCC1, APE1, and XPD and Acute Side Effects of Radiotherapy in Breast Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 11, 4802–4809. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2657>

Chapman, N.M., Boothby, M.R., Chi, H., 2020. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 55–70. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0203-y>

Chaturvedi, A., Jain, V., 2019. Effect of Ionizing Radiation on Human Health. *Int. J. Plant Environ.* 5. <https://doi.org/10.18811/ijpen.v5i03.8>

Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., Weiner, H.L., 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265, 1237–1240. <https://doi.org/10.1126/science.7520605>

Cheroutre, H., Husain, M.M., 2013. CD4 CTL: Living up to the challenge. *Semin. Immunol.* 25, 10.1016/j.smim.2013.10.022. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.10.022>

Chetoui, N., Boisvert, M., Gendron, S., Aoudjit, F., 2010. Interleukin-7 promotes the survival of human CD4+ effector/memory T cells by up-regulating Bcl-2 proteins and activating the JAK/STAT signalling pathway. *Immunology* 130, 418–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03244.x>

Choudhary, S., 2018. Deterministic and Stochastic Effects of Radiation. *Cancer Ther. Oncol. Int. J.* 12. <https://doi.org/10.19080/CTOIJ.2018.12.555834>

CIPR commission, n.d. Recommandations 1990 De LA Commission Internationale De Protection Radiologique.

Cogdill, A.P., Andrews, M.C., Wargo, J.A., 2017. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *Br. J. Cancer* 117, 1–7. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.136>

Cohn, L., Hawrylowicz, C., Ray, A., 2014. 12 - Biology of Lymphocytes, in: Adkinson, N.F., Bochner, B.S., Burks, A.W., Busse, W.W., Holgate, S.T., Lemanske, R.F., O’Hehir, R.E. (Eds.), *Middleton’s Allergy* (Eighth Edition). W.B. Saunders, London, pp. 203–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08593-9.00013-9>

Comité scientifique des Nations Unies pour l’étude des effets des rayonnements ionisants, Rapport à l’Assemblée générale, avec annexes scientifiques, 2000. RAPPORT UNSCEAR 2000 Vol. I" SOURCES AND EFFECTS OF IONIZING RADIATION".

Commission internationale de protection contre les radiations, Nénot, J.-C., Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (France), 2009. Recommandations 2007. Éd. Tec & doc ; [Lavoisier, Paris; [Cachan.

Conditions Treated with Radiation Therapy | Stanford Health Care [WWW Document], n.d. URL <https://stanfordhealthcare.org/medical-treatments/r/radiation-therapy/about-this-treatment/conditions-treated.html> (accessed 1.10.22).

COPERNIC project investigators, Granzotto, A., Benadjaoud, M.A., Vogin, G., Devic, C., Ferlazzo, M.L., Bodgi, L., Pereira, S., Sonzogni, L., Forcheron, F., Viau, M., Etaix, A., Malek, K., Mengue-Bindjeme, L., Escoffier, C., Rouvet, I., Zabot, M.-T., Joubert, A., Vincent, A., Dalla Venezia, N., Bourguignon, M., Canat, E.-P., d’Hombres, A., Thébaud, E., Orbach, D., Stoppa-Lyonnet, D., Radji, A., Doré, E., Pointreau, Y., Bourgier, C., Leblond, P., Defachelles, A.-S., Lervat, C., Guey, S., Feuvret, L., Gilsoul, F., Berger, C., Moncharmont, C., de Laroche, G., Moreau-Claeys, M.-V., Chavaudra, N., Combemale, P., Biston, M.-C., Malet, C., Martel-Lafay, I., Laude, C., Hau-Desbat, N.-H., Ziouéche, A., Tanguy, R., Sunyach, M.-P., Racadot, S., Pommier, P., Claude, L., Baleyrier, F., Fleury, B., de Crevoisier, R., Simon, J.-M., Verrelle, P., Peiffert, D., Belkacemi, Y., Bourhis, J., Lartigau, E., Carrie, C., De Vathaire, F., Eschwege, F., Puisieux, A., Lagrange, J.-L., Balosso, J., Foray, N., 2016. Influence of Nucleoshuttling of the ATM Protein in the Healthy Tissues Response to Radiation Therapy: Toward a Molecular Classification of Human Radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 94, 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.11.013>

Correia-Melo, C., Marques, F.D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B.M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., Rushton, M.D., Charles, M., Jurk, D., Tait, S.W., Czapiewski, R., Greaves, L., Nelson, 176

G., Bohlooly-Y, M., Rodriguez-Cuenca, S., Vidal-Puig, A., Mann, D., Saretzki, G., Quarato, G., Green, D.R., Adams, P.D., Zglinicki, T. von, Korolchuk, V.I., Passos, J.F., 2016. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *EMBO J.* 35, 724. <https://doi.org/10.15252/embj.201592862>

Crawley, A.M., Angel, J.B., 2012. The influence of HIV on CD127 expression and its potential implications for IL-7 therapy. *Semin. Immunol.* 24, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.006>

Crompton, N.E., Miralbell, R., Rutz, H.P., Ersoy, F., Sanal, O., Wellmann, D., Bieri, S., Coucke, P.A., Emery, G.C., Shi, Y.Q., Blattmann, H., Ozsahin, M., 1999. Altered apoptotic profiles in irradiated patients with increased toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 45, 707–714. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(99\)00256-4](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(99)00256-4)

Crowley, L.C., Marfell, B.J., Waterhouse, N.J., 2016. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087205>

Cyster, J.G., 2000. Leukocyte migration: scent of the T zone. *Curr. Biol.* CB 10, R30-33. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)00253-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)00253-5)

Dabadghao, S., Bergenbrant, S., Anton, D., He, W., Holm, G., Yi, Q., 1998. Anti-idiotypic T-cell activation in multiple myeloma induced by M-component fragments presented by dendritic cells. *Br. J. Haematol.* 100, 647–654. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00633.x>

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.-C., Khoury, S., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2008. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat. Immunol.* 9, 1347–1355. <https://doi.org/10.1038/ni.1677>

De Ruyck, K., Van Eijkeren, M., Claes, K., Morthier, R., De Paepe, A., Vral, A., De Ridder, L., Thierens, H., 2005. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: Association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int. J. Radiat. Oncol.* 62, 1140–1149. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.12.027>

Deckbar, D., Jeggo, P.A., Löbrich, M., 2011. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 46, 271–283. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.575764>

- Deng, L., Liang, H., Xu, M., Yang, X., Burnette, B., Arina, A., Li, X.-D., Mauceri, H., Beckett, M., Darga, T., Huang, X., Gajewski, T.F., Chen, Z.J., Fu, Y.-X., Weichselbaum, R.R., 2014. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* 41, 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.019>
- Deschavanne, P.J., Fertil, B., 1996. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34, 251–266. [https://doi.org/10.1016/0360-3016\(95\)02029-2](https://doi.org/10.1016/0360-3016(95)02029-2)
- Diehl, S., Rincón, M., 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.* 39, 531–536. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(02)00210-9)
- Dillensege, J.-P., Moerschel, E., Zorn, C., 2021. Guide des technologies de l'imagerie médicale et de la radiothérapie.
- Dovšak, T., Ihan, A., Didanovič, V., Kansky, A., Verdenik, M., Hren, N.I., 2018. Effect of surgery and radiotherapy on complete blood count, lymphocyte subsets and inflammatory response in patients with advanced oral cancer. *BMC Cancer* 18, 235. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4136-9>
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10, 857–863. <https://doi.org/10.1038/ni.1767>
- Ebert, L.M., McColl, S.R., 2002. Up-Regulation of CCR5 and CCR6 on Distinct Subpopulations of Antigen-Activated CD4+ T Lymphocytes. *J. Immunol.* 168, 65–72. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.1.65>
- Eckert, F., Schaedle, P., Zips, D., Schmid-Horch, B., Rammensee, H.-G., Gani, C., Gouttefangeas, C., 2018. Impact of curative radiotherapy on the immune status of patients with localized prostate cancer. *Oncoimmunology* 7. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1496881>
- Edvardsen, H., Tefre, T., Jansen, L., Vu, P., Haffty, B.G., Fosså, S.D., Kristensen, V.N., Børresen-Dale, A.-L., 2007. Linkage disequilibrium pattern of the ATM gene in breast cancer patients and controls; association of SNPs and haplotypes to radio-sensitivity and post-lumpectomy local recurrence. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 2, 25. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-2-25>
- Ellyard, J.I., Simson, L., Parish, C.R., 2007. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* 70, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2007.00869.x>
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

El-Nachef, L., Al-Choboq, J., Restier-Verlet, J., Granzotto, A., Berthel, E., Sonzogni, L., Ferlazzo, M.L., Bouchet, A., Leblond, P., Combemale, P., Pinson, S., Bourguignon, M., Foray, N., 2021. Human Radiosensitivity and Radiosusceptibility: What Are the Differences? *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7158. <https://doi.org/10.3390/ijms22137158>

Eriksson, D., Stigbrand, T., 2010. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biol.* 31, 363–372. <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0042-8>

Fachal, L., Gómez-Caamaño, A., Barnett, G.C., Peleteiro, P., Carballo, A.M., Calvo-Crespo, P., Kerns, S.L., Sánchez-García, M., Lobato-Busto, R., Dorling, L., Elliott, R.M., Dearnaley, D.P., Sydes, M.R., Hall, E., Burnet, N.G., Carracedo, Á., Rosenstein, B.S., West, C.M.L., Dunning, A.M., Vega, A., 2014. A three-stage genome-wide association study identifies a susceptibility locus for late radiotherapy toxicity at 2q24.1. *Nat. Genet.* 46, 891–894. <https://doi.org/10.1038/ng.3020>

Fajgelj, A., Horvat, D., Skrk, J., 1997. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by U-235 fission neutrons. Part III: Evaluation of the effect of the induced alpha and beta activity on the chromosomal aberration yield. *Strahlenther. Onkol. Organ Dtsch. Röntgenges.* 173, 91–7.

Falcke, S.E., Rühle, P.F., Deloch, L., Fietkau, R., Frey, B., Gaipl, U.S., 2018. Clinically Relevant Radiation Exposure Differentially Impacts Forms of Cell Death in Human Cells of the Innate and Adaptive Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113574>

Fang, Y., Chen, X., Bai, Q., Qin, C., Mohamud, A.O., Zhu, Z., Ball, T.W., Ruth, C.M., Newcomer, D.R., Herrick, E.J., Nicholl, M.B., 2015. IL-9 inhibits HTB-72 melanoma cell growth through upregulation of p21 and TRAIL. *J. Surg. Oncol.* 111, 969–974. <https://doi.org/10.1002/jso.23930>

Favaudon, V., 2019. Radiothérapie flash à très haut débit de dose : point sur les avancées récentes. *Cancer/Radiothérapie*, 30e Congrès national de la Société française de radiothérapie oncologique 23, 674–676. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2019.07.127>

Favaudon, V., 2000. Régulation du cycle cellulaire et de la mort cellulaire radio-induite. *Cancer/Radiothérapie* 4, 355–368. [https://doi.org/10.1016/S1278-3218\(00\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S1278-3218(00)00009-3)

Fertil, B., Dertinger, H., Courdi, A., Malaise, E.P., 2012. Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. 1984. *Radiat. Res.* 178, AV237-243. <https://doi.org/10.1667/rrav20.1>

Fleischer, B., 1984. Acquisition of specific cytotoxic activity by human T4+ T lymphocytes in culture. *Nature* 308, 365–367. <https://doi.org/10.1038/308365a0>

Foray, N., Monroco, C., Marples, B., Hendry, J.H., Fertil, B., Goodhead, D.T., Arlett, C.F., Malaise, E.P., 1998. Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts is consistent with a continuous spectrum of repair probability. *Int. J. Radiat. Biol.* 74, 551–560. <https://doi.org/10.1080/095530098141122>

Foro, P., Algara, M., Lozano, J., Rodriguez, N., Sanz, X., Torres, E., Carles, J., Reig, A., Membrive, I., Quera, J., Fernandez-Velilla, E., Pera, O., Lacruz, M., Bellosillo, B., 2014. Relationship Between Radiation-Induced Apoptosis of T Lymphocytes and Chronic Toxicity in Patients With Prostate Cancer Treated by Radiation Therapy: A Prospective Study. *Int. J. Radiat. Oncol.* 88, 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.01.002>

Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., Lipp, M., 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99, 23–33. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80059-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80059-8)

Foster, J.G., Carter, E., Kilty, I., MacKenzie, A.B., Ward, S.G., 2013. Mitochondrial superoxide generation enhances P2X7R-mediated loss of cell surface CD62L on naive human CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 1551–1559. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201510>

Fry, T.J., Mackall, C.L., 2005. The Many Faces of IL-7: From Lymphopoiesis to Peripheral T Cell Maintenance. *J. Immunol.* 174, 6571–6576. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.6571>

Fuentes-Raspall, M.J., Caragol, I., Alonso, C., Ramón y Cajal, T., Fisas, D., Seoane, A., Carvajal, N., Bonache, S., Díez, O., Gutiérrez-Enríquez, S., 2015. Apoptosis for prediction of radiotherapy late toxicity: lymphocyte subset sensitivity and potential effect of TP53 Arg72Pro polymorphism. *Apoptosis* 20, 371–382. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-1056-2>

Galaine, J., Godet, Y., Adotévi, O., 2016. Pour comprendre : l'activation lymphocytaire T. *Bull. Cancer (Paris), Immunothérapie des cancers en 2016* 103, S127–S131. [https://doi.org/10.1016/S0007-4551\(16\)30369-1](https://doi.org/10.1016/S0007-4551(16)30369-1)

Gianfaldoni, S., Gianfaldoni, R., Wollina, U., Lotti, J., Tchernev, G., Lotti, T., 2017. An Overview on Radiotherapy: From Its History to Its Current Applications in Dermatology. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 5, 521–525. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.122>

Giotopoulos, G., Symonds, R.P., Foweraker, K., Griffin, M., Peat, I., Osman, A., Plumb, M., 2007. The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of telangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes. *Br. J. Cancer* 96, 1001–1007. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603637>

- Givan, A.L., 2011. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 699, 1–29. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-950-5_1
- Glimcher, L.H., Townsend, M.J., Sullivan, B.M., Lord, G.M., 2004. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 900–911. <https://doi.org/10.1038/nri1490>
- Golden, E.B., Pellicciotta, I., Demaria, S., Barcellos-Hoff, M.H., Formenti, S.C., 2012. The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Front. Oncol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00088>
- Gómez-Gavero, M., Domínguez-Luis, M., Canchado, J., Calafat, J., Janssen, H., Lara-Pezzi, E., Fourie, A., Tugores, A., Valenzuela-Fernández, A., Mollinedo, F., Sánchez-Madrid, F., Díaz-González, F., 2007. Expression and Regulation of the Metalloproteinase ADAM-8 during Human Neutrophil Pathophysiological Activation and Its Catalytic Activity on L-Selectin Shedding. *J. Immunol.* 178, 8053–8063. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.8053>
- Gomolka, M., Blyth, B., Bourguignon, M., Badie, C., Schmitz, A., Talbot, C., Hoeschen, C., Salomaa, S., 2020. Potential screening assays for individual radiation sensitivity and susceptibility and their current validation state. *Int. J. Radiat. Biol.* 96, 280–296. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1642544>
- Gomolka, M., Blyth, B., Bourguignon, M., Badie, C., Schmitz, A., Talbot, C., Hoeschen, C., Salomaa, S., 2019. Potential screening assays for individual radiation sensitivity and susceptibility and their current validation state. *Int. J. Radiat. Biol.* 96, 1–17. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1642544>
- Goodman, T.R., 2010. Ionizing Radiation Effects and Their Risk to Humans 4.
- Gotoff, S.P., Amirmokri, E., Liebner, E.J., 1967. Ataxia telangiectasia. Neoplasia, untoward response to x-irradiation, and tuberous sclerosis. *Am. J. Dis. Child.* 1960 114, 617–625. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1967.02090270073006>
- Graham, C.M., Christensen, J.R., Thomas, D.B., 2007. Differential induction of CD94 and NKG2 in CD4 helper T cells. A consequence of influenza virus infection and interferon-gamma? *Immunology* 121, 238–247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02563.x>
- Granzotto, A., Joubert, A., Viau, M., Devic, C., Maalouf, M., Thomas, C., Vogin, G., Malek, K., Colin, C., Balosso, J., Foray, N., 2011. [Individual response to ionising radiation: What predictive assay(s) to choose?]. *C. R. Biol.* 334, 140–157. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.018>

Gregor, C.E., Foeng, J., Comerford, I., McColl, S.R., 2017. Chapter Four - Chemokine-Driven CD4+ T Cell Homing: New Concepts and Recent Advances, in: Alt, F.W. (Ed.), *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 119–181. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.03.001>

Grossberg, A.J., Lei, X., Xu, T., Shaitelman, S.F., Hoffman, K.E., Bloom, E.S., Stauder, M.C., Tereffe, W., Schlembach, P.J., Woodward, W.A., Buchholz, T.A., Smith, B.D., 2018. Association of Transforming Growth Factor β Polymorphism C-509T With Radiation-Induced Fibrosis Among Patients With Early-Stage Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 4, 1751–1757. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2583>

Gruel, G., Voisin, Pascale, Vaurijoux, A., Roch-Lefevre, S., Grégoire, E., Maltere, P., Petat, C., Gidrol, X., Voisin, Philippe, Roy, L., 2008. Broad Modulation of Gene Expression in CD4+ Lymphocyte Subpopulations in Response to Low Doses of Ionizing Radiation. *Radiat. Res.* 170, 335–344. <https://doi.org/10.1667/RR1147.1>

Guéry, L., Hugues, S., 2015. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Res. Int.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/314620>

Gun, S.Y., Lee, S.W.L., Sieow, J.L., Wong, S.C., 2019. Targeting immune cells for cancer therapy. *Redox Biol.* 25, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101174>

Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., Williams, L.T., 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 258–263. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.258>

Gyuleva, I., Djounova, J., Rupova, I., 2018. Impact of Low-Dose Occupational Exposure to Ionizing Radiation on T-Cell Populations and Subpopulations and Humoral Factors Included in the Immune Response. *Dose-Response* 16. <https://doi.org/10.1177/1559325818785564>

Haddad, R., Guardiola, P., Izac, B., Thibault, C., Radich, J., Delezoide, A.-L., Baillou, C., Lemoine, F.M., Gluckman, J.C., Pflumio, F., Canque, B., 2004. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. *Blood* 104, 3918–3926. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-1845>

Hagan, C.T., Mi, Y., Knape, N.M., Wang, A.Z., 2020. Enhancing Combined Immunotherapy and Radiotherapy through Nanomedicine. *Bioconjug. Chem.* 31, 2668–2678. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00520>

Haimovitz-Friedman, A., Kolesnick, R.N., Fuks, Z., n.d. Ceramide signaling in apoptosis 15.

Hajj, C., Goodman, K.A., 2015. Role of Radiotherapy and Newer Techniques in the Treatment of GI Cancers. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 33, 1737–1744. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.9787>

Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.-J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., Dronca, R., Gangadhar, T.C., Patnaik, A., Zarour, H., Joshua, A.M., Gergich, K., Elassaiss-Schaap, J., Algazi, A., Mateus, C., Boasberg, P., Tume, P.C., Chmielowski, B., Ebbinghaus, S.W., Li, X.N., Kang, S.P., Ribas, A., 2013. Safety and Tumor Responses with Pembrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369, 134–144. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1305133>

Hart, J.P., Broadwater, G., Rabbani, Z., Moeller, B.J., Clough, R., Huang, D., Sempowski, G.A., Dewhirst, M., Pizzo, S.V., Vujaskovic, Z., Anscher, M.S., 2005. Cytokine profiling for prediction of symptomatic radiation-induced lung injury. *Int. J. Radiat. Oncol.* 63, 1448–1454. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2005.05.032>

Hashimoto, K., Kouno, T., Ikawa, T., Hayatsu, N., Miyajima, Y., Yabukami, H., Teruoate, T., Sasaki, T., Suzuki, T., Valentine, M., Pascarella, G., Okazaki, Y., Suzuki, H., Shin, J.W., Minoda, A., Taniuchi, I., Okano, H., Arai, Y., Hirose, N., Carninci, P., 2019. Single-cell transcriptomics reveals expansion of cytotoxic CD4 T cells in supercentenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 24242–24251. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907883116>

Hayes, B., 2013. Overview of Statistical Methods for Genome-Wide Association Studies (GWAS), in: Gondro, C., van der Werf, J., Hayes, B. (Eds.), *Genome-Wide Association Studies and Genomic Prediction, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 149–169. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-447-0_6

Hennequin, C., Dubray, B., 2013. [Alpha/beta ratio revisited in the era of hypofractionation]. *Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol.* 17, 344–348. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2013.06.035>

Henríquez Hernández, L.A., Lara, P.C., Pinar, B., Bordón, E., Gallego, C.R., Bilbao, C., Pérez, L.F., Morales, A.F., 2009. Constitutive gene expression profile segregates toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 4, 17. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-17>

Hernandez-Segura, A., Brandenburg, S., Demaria, M., 2018. Induction and Validation of Cellular Senescence in Primary Human Cells. *J. Vis. Exp. JoVE* 57782. <https://doi.org/10.3791/57782>

- Herskind, C., Talbot, C.J., Kerns, S.L., Veldwijk, M.R., Rosenstein, B.S., West, C.M.L., 2016. Radiogenomics: a systems biology approach to understanding genetic risk factors for radiotherapy toxicity? *Cancer Lett.* 382, 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.035>
- Herzenberg, Leonard A., Herzenberg, Leonore A., 2004. Genetics, FACS, immunology, and redox: a tale of two lives intertwined. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 1–31. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104727>
- Heylmann, D., Ponath, V., Kindler, T., Kaina, B., 2021. Comparison of DNA repair and radiosensitivity of different blood cell populations. *Sci. Rep.* 11, 2478. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81058-1>
- Ho, A.Y., Fan, G., Atencio, D.P., Green, S., Formenti, S.C., Haffty, B.G., Iyengar, P., Bernstein, J.L., Stock, R.G., Cesaretti, J.A., Rosenstein, B.S., 2007. Possession of ATM Sequence Variants as Predictor for Late Normal Tissue Responses in Breast Cancer Patients Treated With Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol.* 69, 677–684. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.04.012>
- Hohl, T.M., 2015. 6 - Cell-Mediated Defense against Infection, in: Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J. (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 50-69.e6. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00006-0>
- Hoos, A., Ibrahim, R., Korman, A., Abdallah, K., Berman, D., Shahabi, V., Chin, K., Canetta, R., Humphrey, R., 2010. Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin. Oncol.* 37, 533–546. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.09.015>
- Horn, S., Barnard, S., Brady, D., Prise, K.M., Rothkamm, K., 2013. Combined analysis of gamma-H2AX/53BP1 foci and caspase activation in lymphocyte subsets detects recent and more remote radiation exposures. *Radiat. Res.* 180, 603–609. <https://doi.org/10.1667/RR13342.1>
- Hoskin, P., 2002. The price of anticancer intervention. Secondary malignancies after radiotherapy. *Lancet Oncol.* 3, 577–578.
- Hsieh, C.S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A., Murphy, K.M., 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547–549. <https://doi.org/10.1126/science.8097338>
- Hussen, K.A., Chabaane, E., Canque, B., 2018. Organisation bipartite de la lymphopoïèse humaine. *médecine/sciences* 34, 665–670. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183408012>

- Idziorek, T., Cazareth, J., Blanc, C., Jouy, N., Bourdely, P., Corneau, A., 2018. Que la lumière soit. Et si ce n'était plus seulement vrai ! - Évolution de la cytométrie : du conventionnel à la masse (en passant par le spectre). *médecine/sciences* 34, 439–447. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183405017>
- Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Itano, A., Pape, K.A., 2001. In Vivo Activation of Antigen-Specific CD4 T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 23–45. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.23>
- Jiang, Q., Li, W.Q., Aiello, F.B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A.R., Durum, S.K., 2005. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 513–533. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.05.004>
- Josefowicz, S.Z., Lu, L.-F., Rudensky, A.Y., 2012. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
- Joubert, A., Zimmerman, K.M., Bencokova, Z., Gastaldo, J., Chavaudra, N., Favaudon, V., Arlett, C.F., Foray, N., 2008. DNA double-strand break repair defects in syndromes associated with acute radiation response: at least two different assays to predict intrinsic radiosensitivity? *Int. J. Radiat. Biol.* 84, 107–125. <https://doi.org/10.1080/09553000701797039>
- Kang, C.-M., Park, K.-P., Song, J.-E., Jeoung, D.-I., Cho, C.-K., Kim, T.-H., Bae, S., Lee, S.-J., Lee, Y.-S., 2003. Possible biomarkers for ionizing radiation exposure in human peripheral blood lymphocytes. *Radiat. Res.* 159, 312–319. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2003\)159\[0312:pbfire\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2003)159[0312:pbfire]2.0.co;2)
- Kaplan, M.H., 2017. The Transcription factor network in Th9 cells. *Semin. Immunopathol.* 39, 11–20. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0600-2>
- Kaplan, M.H., 2013. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol. Rev.* 252, 104–115. <https://doi.org/10.1111/imr.12028>
- Keith, S., Faroon, O., Roney, N., Scinicariello, F., Wilbur, S., Ingerman, L., Lladós, F., Plewak, D., Wohlers, D., Diamond, G., 2013. OVERVIEW OF BASIC RADIATION PHYSICS, CHEMISTRY, AND BIOLOGY, Toxicological Profile for Uranium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US).
- Kelsey, C.R., Jackson, I.L., Langdon, S., Owzar, K., Hubbs, J., Vujaskovic, Z., Das, S., Marks, L.B., 2013. Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms and Radiation Sensitivity of the Lung Assessed With an Objective Radiologic Endpoint. *Clin. Lung Cancer* 14, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.clc.2012.10.006>

Kerdiles, Y.M., Beisner, D.R., Tinoco, R., Dejean, A.S., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., Hedrick, S.M., 2009. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat. Immunol.* 10, 176–184. <https://doi.org/10.1038/ni.1689>

Kerns, S.L., Ostrer, H., Stock, R., Li, W., Moore, J., Pearlman, A., Campbell, C., Shao, Y., Stone, N., Kusnetz, L., Rosenstein, B.S., 2010. Genome-Wide Association Study to Identify Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Associated With the Development of Erectile Dysfunction in African-American Men After Radiotherapy for Prostate Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol.* 78, 1292–1300. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.07.036>

Kerns, S.L., Stone, N.N., Stock, R.G., Rath, L., Ostrer, H., Rosenstein, B.S., 2013. A 2-stage genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms associated with development of urinary symptoms after radiotherapy for prostate cancer. *J. Urol.* 190, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.01.096>

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

Kim, H.-J., Cantor, H., 2014. CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. *Cancer Immunol. Res.* 2, 91–98. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0216>

Kohn, L.A., Hao, Q.-L., Sasidharan, R., Parekh, C., Ge, S., Zhu, Y., Mikkola, H.K.A., Crooks, G.M., 2012. Lymphoid priming in human bone marrow begins before expression of CD10 with upregulation of L-selectin. *Nat. Immunol.* 13, 963–971. <https://doi.org/10.1038/ni.2405>

Koizumi, S., Ishikawa, H., 2019. Transcriptional Regulation of Differentiation and Functions of Effector T Regulatory Cells. *Cells* 8, 939. <https://doi.org/10.3390/cells8080939>

Kolesnick, R., Fuks, Z., 2003. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22, 5897–5906. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206702>

Kondrack, R.M., Harbertson, J., Tan, J.T., McBreen, M.E., Surh, C.D., Bradley, L.M., 2003. Interleukin 7 Regulates the Survival and Generation of Memory CD4 Cells. *J. Exp. Med.* 198, 1797–1806. <https://doi.org/10.1084/jem.20030735>

Kondrashova, T.V., Ivanova, T.I., Katsalap, S.N., 1997. Chromosome aberrations in cultured peripheral lymphocytes from persons with elevated skin radiosensitivity. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 6, 1437–1439. <https://doi.org/10.1289/ehp.97105s61437>

Kononchik, J., Ireland, J., Zou, Z., Segura, J., Holzapfel, G., Chastain, A., Wang, R., Spencer, M., He, B., Stutzman, N., Kano, D., Arthos, J., Fischer, E., Chun, T.-W., Moir, S., Sun, P., 2018. HIV-1 targets L-selectin for adhesion and induces its shedding for viral release. *Nat. Commun.* 9, 2825. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05197-2>

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 485–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>

Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294–298. <https://doi.org/10.1126/science.278.5336.294>

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., Blagosklonny, M., El-Deiry, W., Golstein, P., Green, D., Hengartner, M., Knight, R., Kumar, S., Lipton, S., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovskiy, B., Melino, G., 2009. Classification of cell death. *Cell Death Differ.* 16, 3–11. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>

Kusunoki, Y., Kyoizumi, S., Yamaoka, M., Kasagi, F., Kodama, K., Seyama, T., 1999. Decreased proportion of CD4 T cells in the blood of atomic bomb survivors with myocardial infarction. *Radiat. Res.* 152, 539–543.

Kusunoki, Y., Yamaoka, M., Kasagi, F., Hayashi, T., MacPhee, D.G., Kyoizumi, S., 2003. Long-lasting changes in the T-cell receptor V beta repertoires of CD4 memory T-cell populations in the peripheral blood of radiation-exposed people. *Br. J. Haematol.* 122, 975–984. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04520.x>

Lacombe, J., Brengues, M., Mangé, A., Bourgier, C., Gourgou, S., Pèlegri, A., Ozsahin, M., Solassol, J., Azria, D., 2019. Quantitative proteomic analysis reveals AK2 as potential biomarker for late normal tissue radiotoxicity. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 14, 142. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1351-8>

Laird, N.M., Horvath, S., Xu, X., 2000. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet. Epidemiol.* 19 Suppl 1, S36-42. [https://doi.org/10.1002/1098-2272\(2000\)19:1+<::AID-GEPI6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1098-2272(2000)19:1+<::AID-GEPI6>3.0.CO;2-M)

Lanier, L.L., 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 9, 495–502. <https://doi.org/10.1038/ni1581>

Lankoff, A., Banasik, A., Duma, A., Ochniak, E., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gózdź, S., Wojcik, A., 2006. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-

induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol. Lett.* 161, 27–36.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.012>

Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290, 92–97. <https://doi.org/10.1126/science.290.5489.92>

Larsen, A.K., Mikkelsen, D.B., Hertz, J.M., Bygum, A., 2014. Manifestations of Gorlin-Goltz syndrome 5.

Larsson, J., Karlsson, S., 2005. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24, 5676–5692.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208920>

LaSalle, J.M., Hafler, D.A., 1991. The coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms on T cells during the S/G2/M stages of cell cycle. *Cell. Immunol.* 138, 197–206. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90144-Z](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90144-Z)

Lasky-Su, J., Lange, C., 2010. Statistical challenges for genome-wide association studies of suicidality using family data. *Eur. Psychiatry J. Assoc. Eur. Psychiatr.* 25, 307–309.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2009.12.019>

Lazzari, G., Natalicchio, M.I., Terlizzi, A., Perri, F., Silvano, G., 2017. Single nucleotide polymorphisms and unacceptable late toxicity in breast cancer adjuvant radiotherapy: a case report. *Breast Cancer Targets Ther.* 9, 401–406. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S136048>

Le Gros, G., 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4- producing cells. *J. Exp. Med.* 172, 921–929.

Li, M., You, L., Xue, J., Lu, Y., 2018. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front. Pharmacol.* 9.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00522>

Liao, F., Rabin, R.L., Smith, C.S., Sharma, G., Nutman, T.B., Farber, J.M., 1999. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 186–194.

Lin, A.J., Rao, Y.J., Chin, R.-I., Campian, J., Mullen, D., Thotala, D., Daly, M., Gay, H., Oppelt, P., Hallahan, D., Adkins, D., Thorstad, W., 2018. Post-operative radiation effects on lymphopenia, neutrophil to lymphocyte ratio, and clinical outcomes in palatine tonsil cancers. *Oral Oncol.* 86, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.08.008>

Lin, S.H., Wang, L., Myles, B., Thall, P.F., Hofstetter, W.L., Swisher, S.G., Ajani, J.A., Cox, J.D., Komaki, R., Liao, Z., 2012. Propensity Score-based Comparison of Long-term Outcomes With 3-Dimensional

Conformal Radiotherapy vs Intensity-Modulated Radiotherapy for Esophageal Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol.* 84, 1078–1085. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.02.015>

Lin, X., Fuks, Z., Kolesnick, R., 2000. Ceramide mediates radiation-induced death of endothelium. *Crit. Care Med.* 28, N87-93. <https://doi.org/10.1097/00003246-200004001-00010>

Lintermans, L.L., Rutgers, A., Stegeman, C.A., Heeringa, P., Abdulahad, W.H., 2017. Chemokine receptor co-expression reveals aberrantly distributed TH effector memory cells in GPA patients. *Arthritis Res. Ther.* 19, 136. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1343-8>

Lipson, E.J., Drake, C.G., 2011. Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 6958–6962. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1595>

Little, M., 2003. Risks associated with ionizing radiation: Environmental pollution and health. *Br. Med. Bull.* 68, 259–275. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg031>

Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., Xia, B., 2012. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/925135>

Lv, Y., Song, M., Tian, X., Yv, X., Liang, N., Zhang, J., 2020. Impact of radiotherapy on circulating lymphocyte subsets in patients with esophageal cancer. *Medicine (Baltimore)* 99, e20993. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000020993>

MacDermid, D., 2015. Genetic Basis of Normal Tissue Radiosensitivity and Late Toxicity in Breast Cancer, in: Strauss, J., Small, W., Woloschak, G.E. (Eds.), *Breast Cancer Biology for the Radiation Oncologist, Medical Radiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 59–70. https://doi.org/10.1007/174_2014_1045

MacGregor, H.L., Ohashi, P.S., 2017. Molecular Pathways: Evaluating the Potential for B7-H4 as an Immunoregulatory Target. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 2934–2941. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2440>

Mackay, C.R., Marston, W.L., Dudler, L., 1990. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171, 801–817. <https://doi.org/10.1084/jem.171.3.801>

Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., Herskind, C., 2016. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.* 17. <https://doi.org/10.3390/ijms17010102>

Maj, T., Wang, Wei, Crespo, J., Zhang, H., Wang, Weimin, Wei, S., Zhao, L., Vatan, L., Shao, I., Szeliga, W., Lyssiotis, C., Liu, J.R., Kryczek, I., Zou, W., 2017. Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nat. Immunol.* 18, 1332–1341. <https://doi.org/10.1038/ni.3868>

Majeed, H., Gupta, V., 2021. Adverse Effects Of Radiation Therapy, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Mannering, S.I., Zhong, J., Cheers, C., 2002. T-cell activation, proliferation and apoptosis in primary *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* 106, 87–95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01408.x>

Manori, I., Kushilevsky, A., Segal, S., Weinstein, Y., 1984. Radiosensitivity of isolated subsets of human lymphocytes (E+, OKT4+, OKT8+): protective role of monocytes and monokines. *Clin. Exp. Immunol.* 58, 453–461.

Mantei, A., Rutz, S., Janke, M., Kirchhoff, D., Jung, U., Patzel, V., Vogel, U., Rudel, T., Andreou, I., Weber, M., Scheffold, A., 2008. siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 38, 2616–2625. <https://doi.org/10.1002/eji.200738075>

Marshall, H.D., Chandele, A., Jung, Y.W., Meng, H., Poholek, A.C., Parish, I.A., Rutishauser, R., Cui, W., Kleinstein, S.H., Craft, J., Kaech, S.M., 2011. Differential expression of Ly6C and T-bet distinguish effector and memory Th1 CD4(+) cell properties during viral infection. *Immunity* 35, 633–646. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.08.016>

McKinnon, K.M., 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Curr. Protoc. Immunol.* 120, 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>

McKinstry, K.K., Strutt, T.M., Bautista, B., Zhang, W., Kuang, Y., Cooper, A.M., Swain, S.L., 2014. Effector CD4 T-cell transition to memory requires late cognate interactions that induce autocrine IL-2. *Nat. Commun.* 5, 5377. <https://doi.org/10.1038/ncomms6377>

Mellman, I., Coukos, G., Dranoff, G., 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480–489. <https://doi.org/10.1038/nature10673>

Mielczarek-Palacz, A., Sikora, J., Kondera-Anasz, Z., Mickiewicz, P., Mickiewicz, A., 2016. Effect of Th1/Th2 cytokine administration on proinflammatory SKOV-3 cell activation. *Arch. Med. Sci. AMS* 12, 1337–1347. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.53143>

Migden, M.R., Rischin, D., Schmults, C.D., Guminski, A., Hauschild, A., Lewis, K.D., Chung, C.H., Hernandez-Aya, L., Lim, A.M., Chang, A.L.S., Rabinowits, G., Thai, A.A., Dunn, L.A., Hughes, B.G.M., Khushalani, N.I., Modi, B., Schadendorf, D., Gao, B., Seebach, F., Li, S., Li, J., Mathias, M., Booth, J., Mohan, K., Stankevich, E., Babiker, H.M., Brana, I., Gil-Martin, M., Homsí, J., Johnson, M.L., Moreno, V., Niu, J., Owonikoko, T.K., Papadopoulos, K.P., Yancopoulos, G.D., Lowy, I., Fury, M.G., 2018. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 379, 341–351. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805131>

Ministry of environment, J.G., n.d. BOOKLET to Provide Basic Information Regarding Health Effects of Radiation.

Mitchell, G., Farndon, P.A., Brayden, P., Murday, V.A., Eeles, R.A., 2005. Genetic Predisposition to Cancer: The Consequences of a Delayed Diagnosis of Gorlin Syndrome. *Clin. Oncol.* 17, 650–654. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2005.07.014>

Mojumdar, K., Vajpayee, M., Chauhan, N.K., Singh, A., Singh, R., Kurapati, S., 2011. Loss of CD127 & increased immunosenescence of T cell subsets in HIV infected individuals. *Indian J. Med. Res.* 134, 972. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.92645>

Moniuszko, M., Glowinska-Olszewska, B., Rusak, M., Jeznach, M., Grubczak, K., Lipinska, D., Milewski, R., Milewska, A.J., Dabrowska, M., Jablonska, E., Kretowski, A., Gorska, M., Bodzenta-Lukaszyk, A., Bossowski, A., 2013a. Decreased CD127 Expression on CD4+ T-Cells and Elevated Frequencies of CD4+CD25+CD127- T-Cells in Children with Long-Lasting Type 1 Diabetes. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 459210. <https://doi.org/10.1155/2013/459210>

Moniuszko, M., Kowal, K., Jeznach, M., Rusak, M., Dabrowska, M., Bodzenta-Lukaszyk, A., 2013b. Phenotypic correlations between monocytes and CD4+ T cells in allergic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161, 131–141. <https://doi.org/10.1159/000343687>

Morton, L.M., Sampson, J.N., Armstrong, G.T., Chen, T.-H., Hudson, M.M., Karlins, E., Dagnall, C.L., Li, S.A., Wilson, C.L., Srivastava, D.K., Liu, W., Kang, G., Oeffinger, K.C., Henderson, T.O., Moskowitz, C.S., Gibson, T.M., Merino, D.M., Wong, J.R., Hammond, S., Neglia, J.P., Turcotte, L.M., Miller, J., Bowen, L., Wheeler, W.A., Leisenring, W.M., Whitton, J.A., Burdette, L., Chung, C., Hicks, B.D., Jones, K., Machiela, M.J., Vogt, A., Wang, Z., Yeager, M., Neale, G., Lear, M., Strong, L.C., Yasui, Y., Stovall, M., Weathers, R.E., Smith, S.A., Howell, R., Davies, S.M., Radloff, G.A., Onel, K., Berrington de González, A., Inskip, P.D., Rajaraman, P., Fraumeni, J.F., Bhatia, S., Chanock, S.J., Tucker, M.A., Robison, L.L., 2017. Genome-Wide Association Study to Identify Susceptibility Loci That Modify Radiation-Related Risk for Breast Cancer After Childhood Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 109. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx058>

- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 136, 2348–2357.
- Moullan, N., Cox, D.G., Angèle, S., Romestaing, P., Gérard, J.-P., Hall, J., 2003. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 12, 1168–1174.
- Mousset, C.M., Hobo, W., Woestenenk, R., Preijers, F., Dolstra, H., Waart, A.B. van der, 2019. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry A* 95, 647–654. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23724>
- Muthna, D., Soukup, T., Vavrova, J., Mokry, J., Cmielova, J., Visek, B., Jiroutova, A., Havelek, R., Suchanek, J., Filip, S., English, D., Rezacova, M., 2010. Irradiation of Adult Human Dental Pulp Stem Cells Provokes Activation of p53, Cell Cycle Arrest, and Senescence but Not Apoptosis. *Stem Cells Dev.* 19, 1855–1862. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0449>
- Nachtrab, U., Oppitz, U., Flentje, M., Stopper, H., 1998. Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 73, 279–287. <https://doi.org/10.1080/095530098142374>
- Nakamura, N., Kusunoki, Y., Akiyama, M., 1990. Radiosensitivity of CD4 or CD8 positive human T-lymphocytes by an in vitro colony formation assay. *Radiat. Res.* 123, 224–227.
- Nguyen, H.Q., Belkacemi, Y., Mann, C., Hoffschir, F., Kerbrat, S., Surenaud, M., Zadigue, P., de La Taille, A., Romeo, P.-H., Le Gouvello, S., 2020. Human CCR6+ Th17 Lymphocytes Are Highly Sensitive to Radiation-Induced Senescence and Are a Potential Target for Prevention of Radiation-Induced Toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol., Radiation Therapy and the Immune Response* 108, 314–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.10.045>
- Nguyen, Q.P., Deng, T.Z., Witherden, D.A., Goldrath, A.W., 2019. Origins of CD4+ circulating and tissue-resident memory T-cells. *Immunology* 157, 3–12. <https://doi.org/10.1111/imm.13059>
- Nk, D., Lv, D., 1989. Stimulation via the CD3 and CD28 molecules induces responsiveness to IL-4 in CD4+CD29+CD45R- memory T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 143.
- Nutting, C.M., Bedford, J.L., Cosgrove, V.P., Tait, D.M., Dearnaley, D.P., Webb, S., 2001. A comparison of conformal and intensity-modulated techniques for oesophageal radiotherapy. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 61, 157–163. [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(01\)00438-8](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(01)00438-8)

O'Driscoll, M., Cerosaletti, K.M., Girard, P.M., Dai, Y., Stumm, M., Kysela, B., Hirsch, B., Gennery, A., Palmer, S.E., Seidel, J., Gatti, R.A., Varon, R., Oettinger, M.A., Neitzel, H., Jeggo, P.A., Concannon, P., 2001. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell* 8, 1175–1185. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00408-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00408-7)

O'Driscoll, M., Scott, D., Orton, J., Kiltie, A., Davidson, S., Hunter, R., West, C., 1999. Radiation-induced micronuclei in human fibroblasts in relation to clonogenic radiosensitivity. *Br. J. Cancer* 78, 1559–63. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.723>

Oh, J.H., Craft, J.M., Townsend, R., Deasy, J.O., Bradley, J.D., El Naqa, I., 2011. A bioinformatics approach for biomarker identification in radiation-induced lung inflammation from limited proteomics data. *J. Proteome Res.* 10, 1406–1415. <https://doi.org/10.1021/pr101226q>

Orjalo, A.V., Bhaumik, D., Gengler, B.K., Scott, G.K., Campisi, J., 2009. Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17031–17036. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905299106>

Ozsahin, M., Crompton, N.E.A., Gourgou, S., Kramar, A., Li, L., Shi, Y., Sozzi, W.J., Zouhair, A., Mirimanoff, R.O., Azria, D., 2005. CD4 and CD8 T-lymphocyte apoptosis can predict radiation-induced late toxicity: a prospective study in 399 patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 7426–7433. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2634>

Ozsahin, M., Ozsahin, H., Shi, Y., Larsson, B., Würgler, F.E., Crompton, N.E., 1997. Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 38, 429–440. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(97\)00038-2](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(97)00038-2)

Pandya, J.M., Lundell, A.-C., Hallström, M., Andersson, K., Nordström, I., Rudin, A., 2016. Circulating T helper and T regulatory subsets in untreated early rheumatoid arthritis and healthy control subjects. *J. Leukoc. Biol.* 100, 823–833. <https://doi.org/10.1189/jlb.5A0116-025R>

Parish, C., Warren, H., 2002. Use of the Intracellular Fluorescent Dye CFSE to Monitor Lymphocyte Migration and Proliferation. *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan AI Chapter 4, Unit 4.9. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0409s49>

Patnaik, A., Kang, S.P., Rasco, D., Papadopoulos, K.P., Elassaiss-Schaap, J., Beeram, M., Drengher, R., Chen, C., Smith, L., Espino, G., Gergich, K., Delgado, L., Daud, A., Lindia, J.A., Li, X.N., Pierce, R.H., Yearley, J.H., Wu, D., Laterza, O., Lehnert, M., Iannone, R., Tolcher, A.W., 2015. Phase I Study of Pembrolizumab (MK-3475; Anti-PD-1 Monoclonal Antibody) in Patients with Advanced Solid Tumors.

Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 21, 4286–4293. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2607>

Pawlik, T.M., Keyomarsi, K., 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol.* 59, 928–942. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005>

Pepper, M., Pagán, A.J., Igyártó, B.Z., Taylor, J.J., Jenkins, M.K., 2011. Opposing signals from the Bcl6 transcription factor and the interleukin-2 receptor generate T helper 1 central and effector memory cells. *Immunity* 35, 583–595. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.009>

Pereira, S., Bodgi, L., Duclos, M., Canet, A., Ferlazzo, M.L., Devic, C., Granzotto, A., Deneuve, S., Vogin, G., Foray, N., 2018. Fast and Binary Assay for Predicting Radiosensitivity Based on the Theory of ATM Nucleo-Shuttling: Development, Validation, and Performance. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 100, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.10.029>

Perkel, J., 2008. SNP genotyping: six technologies that keyed a revolution. *Nat. Methods* 5, 447–453. <https://doi.org/10.1038/nmeth0508-447>

Petcu, I., Savu, D., Thierens, H., Nagels, G., Vral, D.A., 2006. In vitro radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis patients. *Int. J. Radiat. Biol.* 82, 793–803. <https://doi.org/10.1080/09553000600932976>

Peters, C.A., Stock, R.G., Cesaretti, J.A., Atencio, D.P., Peters, S., Burri, R.J., Stone, N.N., Ostrer, H., Rosenstein, B.S., 2008. TGFB1 Single Nucleotide Polymorphisms Are Associated With Adverse Quality of Life in Prostate Cancer Patients Treated With Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol.* 70, 752–759. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.05.023>

Phetsouphanh, C., Aldridge, D., Marchi, E., Munier, C.M.L., Meyerowitz, J., Murray, L., Van Vuuren, C., Goedhals, D., Fidler, S., Kelleher, A., Klenerman, P., Frater, J., 2019. Maintenance of Functional CD57+ Cytolytic CD4+ T Cells in HIV+ Elite Controllers. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01844>

Philippé, J., Louagie, H., Thierens, H., Vral, A., Cornelissen, M., De Ridder, L., 1997. Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens. *Cytometry* 29, 242–249.

Picker, L.J., Treer, J.R., Ferguson-Darnell, B., Collins, P.A., Buck, D., Terstappen, L.W., 1993. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 150, 1105–1121.

Plank, M.W., Kaiko, G.E., Maltby, S., Weaver, J., Tay, H.L., Shen, W., Wilson, M.S., Durum, S.K., Foster, P.S., 2017. Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 198, 2182–2190. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601480>

Plum, J., Smedt, M.D., Verhasselt, B., Kerre, T., Vanhecke, D., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., 2000. Human T Lymphopoiesis: In Vitro and In Vivo Study Models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917, 724–731. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05436.x>

Puck, T.T., Marcus, P.I., 1956. Action of x-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* 103, 653–666. <https://doi.org/10.1084/jem.103.5.653>

Qian, X., Chen, H., Wu, X., Hu, L., Huang, Q., Jin, Y., 2017. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine* 89, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.09.011>

Quarmby, S., Fakhoury, H., Levine, E., Barber, J., Wylie, J., Hajeer, A.H., West, C., Stewart, A., Magee, B., Kumar, S., 2003. Association of transforming growth factor beta-1 single nucleotide polymorphisms with radiation-induced damage to normal tissues in breast cancer patients. *Int. J. Radiat. Biol.* 79, 137–143.

Quezada, S.A., Simpson, T.R., Peggs, K.S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P.A., Restifo, N.P., Allison, J.P., 2010. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* 207, 637–650. <https://doi.org/10.1084/jem.20091918>

Radiation Therapy [WWW Document], n.d. . CancerQuest. URL <https://www.cancerquest.org/patients/treatments/radiation-therapy> (accessed 1.10.22).

Rahmanian, N., Hosseinimehr, S.J., Khalaj, A., 2016. The paradox role of caspase cascade in ionizing radiation therapy. *J. Biomed. Sci.* 23, 88. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0306-8>

Ribas, A., Hanson, D.C., Noe, D.A., Millham, R., Guyot, D.J., Bernstein, S.H., Canniff, P.C., Sharma, A., Gomez-Navarro, J., 2007. Tremelimumab (CP-675,206), a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 blocking monoclonal antibody in clinical development for patients with cancer. *The Oncologist* 12, 873–883. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-7-873>

Ricardi, U., Badellino, S., Filippi, A.R., 2016. Clinical applications of stereotactic radiation therapy for oligometastatic cancer patients: a disease-oriented approach. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 57, i58–i68. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw006>

Richards, H., Longhi, M.P., Wright, K., Gallimore, A., Ager, A., 2008. CD62L (L-selectin) down-regulation does not affect memory T cell distribution but failure to shed compromises anti-viral immunity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 198–206. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.198>

Riou, C., Yassine-Diab, B., Van grevenynghe, J., Somogyi, R., Greller, L.D., Gagnon, D., Gimmig, S., Wilkinson, P., Shi, Y., Cameron, M.J., Campos-Gonzalez, R., Balderas, R.S., Kelvin, D., Sekaly, R.-P., Haddad, E.K., 2007. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J. Exp. Med.* 204, 79–91. <https://doi.org/10.1084/jem.20061681>

Rivino, L., Messi, M., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., Geginat, J., 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J. Exp. Med.* 200, 725–735. <https://doi.org/10.1084/jem.20040774>

Rosenstein, B.S., Cesaretti, J.A., Stock, R.G., Stone, N.N., Atencio, D.P., Peters, C.A., Burri, R., Peters, S., 2007. A Validation Study to Examine the Correlation Between Possession of Variants in the ATM Gene With the Development of Erectile Dysfunction in Prostate Cancer Patients Treated With Radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 69, S29. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.07.2240>

Saito, H., Tsujitani, S., Oka, S., Kondo, A., Ikeguchi, M., Maeta, M., Kaibara, N., 2000. An elevated serum level of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) significantly correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 20, 4489–4493.

Sak, A., Stuschke, M., 2010. Use of γ H2AX and Other Biomarkers of Double-Strand Breaks During Radiotherapy. *Semin. Radiat. Oncol., Harnessing DNA Repair to Improve Radiotherapy Outcome* 20, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2010.05.004>

Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S., 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96–99. <https://doi.org/10.1038/34214>

Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A., 2004. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745–763. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>

Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712. <https://doi.org/10.1038/44385>

Samuel, T., Weber, H.O., Funk, J.O., 2002. Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. *Cell Cycle Georget. Tex* 1, 162–168.

Sauerwald, T.M., Betenbaugh, M.J., Oyler, G.A., 2002. Inhibiting apoptosis in mammalian cell culture using the caspase inhibitor XIAP and deletion mutants. *Biotechnol. Bioeng.* 77, 704–716. <https://doi.org/10.1002/bit.10154>

Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., Kühn, R., Müller, W., Palm, N., Rüde, E., 1994. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md* 153, 3989–3996.

Schmitt, N., Ueno, H., 2015. Regulation of Human Helper T Cell Subset Differentiation by Cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* 34, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.03.007>

Schmitz, A., Bayer, J., Dechamps, N., Goldin, L., Thomas, G., 2007. Heritability of susceptibility to ionizing radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 68, 1169–1177. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.03.050>

Schmitz, A., Bayer, J., Déchamps, N., Thomas, G., 2003. Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int. J. Radiat. Oncol.* 57, 769–778. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(03\)00637-0](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(03)00637-0)

Schnarr, K., Boreham, D., Sathya, J., Julian, J., Dayes, I.S., 2009. Radiation-Induced Lymphocyte Apoptosis to Predict Radiation Therapy Late Toxicity in Prostate Cancer Patients. *Int. J. Radiat. Oncol.* 74, 1424–1430. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.10.039>

Schutysse, E., Struyf, S., Van Damme, J., 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 409–426. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00049-2)

Seibold, P., Behrens, S., Schmezer, P., Helmbold, I., Barnett, G., Coles, C., Yarnold, J., Talbot, C.J., Imai, T., Azria, D., Koch, C.A., Dunning, A.M., Burnet, N., Bliss, J.M., Symonds, R.P., Rattay, T., Suga, T., Kerns, S.L., Bourcier, C., Vallis, K.A., Sautter-Bihl, M.-L., Claßen, J., Debus, J., Schnabel, T., Rosenstein, B.S., Wenz, F., West, C.M., Popanda, O., Chang-Claude, J., 2015. XRCC1 Polymorphism Associated With Late Toxicity After Radiation Therapy in Breast Cancer Patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 92, 1084–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.04.011>

Seliger, B., 2019. Combinatorial Approaches With Checkpoint Inhibitors to Enhance Anti-tumor Immunity. *Front. Immunol.* 10, 999. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00999>

Shakya, A., Goren, A., Shalek, A., German, C.N., Snook, J., Kuchroo, V.K., Yosef, N., Chan, R.C., Regev, A., Williams, M.A., Tantin, D., 2015. Oct1 and OCA-B are selectively required for CD4 memory T cell function. *J. Exp. Med.* 212, 2115–2131. <https://doi.org/10.1084/jem.20150363>

Sharabi, A.B., Nirschl, C.J., Kochel, C.M., Nirschl, T.R., Francica, B.J., Velarde, E., Dewese, T.L., Drake, C.G., 2015. Stereotactic radiation therapy augments antigen-specific PD-1-mediated antitumor immune responses via cross-presentation of tumor antigen. *Cancer Immunol. Res.* 3, 345–355. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0196>

Shatrova, A., Mityushova, E., Vassilieva, I., Aksenov, N., Zenin, V., Nikolsky, N., Marakhova, I., 2016. Time-Dependent Regulation of IL-2R α -Chain (CD25) Expression by TCR Signal Strength and IL-2-Induced STAT5 Signaling in Activated Human Blood T Lymphocytes. *PLOS ONE* 11, e0167215. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167215>

Sia, J., Szmyd, R., Hau, E., Gee, H.E., 2020. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: À Primer. *Front. Cell Dev. Biol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00041>

Siri, A., Boysson, H. de, Boursier, G., 2012. Actualité sur les lymphocytes T régulateurs CD4+. *médecine/sciences* 28, 646–651. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012286019>

Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., Colombini, M., 2002. Ceramide Channels Increase the Permeability of the Mitochondrial Outer Membrane to Small Proteins *. *J. Biol. Chem.* 277, 26796–26803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200754200>

Ślonina, D., Gasińska, A., 1997. Intrinsic radiosensitivity of healthy donors and cancer patients as determined by the lymphocyte micronucleus assay. *Int. J. Radiat. Biol.* 72, 693–701. <https://doi.org/10.1080/095530097142852>

Smalley, D.M., Ley, K., 2005. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 255–266. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00354.x>

Smart, V., Curwen, G.B., Whitehouse, C.A., Edwards, A., Tawn, E.J., 2003. Chromosomal radiosensitivity: a study of the chromosomal G(2) assay in human blood lymphocytes indicating significant inter-individual variability. *Mutat. Res.* 528, 105–110. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(03\)00076-9](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(03)00076-9)

Snook, J.P., Kim, C., Williams, M.A., 2018. TCR signal strength controls the differentiation of CD4+ effector and memory T cells. *Sci. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aas9103>

Someya, M., Yamamoto, H., Nojima, M., Hori, M., Tateoka, K., Nakata, K., Takagi, M., Saito, M., Hirokawa, N., Tokino, T., Sakata, K., 2015. Relation between Ku80 and microRNA-99a expression and late rectal bleeding after radiotherapy for prostate cancer. *Radiother. Oncol.* 115, 235–239. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2015.04.008>

Song, K., Rabin, R.L., Hill, B.J., De Rosa, S.C., Perfetto, S.P., Zhang, H.H., Foley, J.F., Reiner, J.S., Liu, J., Mattapallil, J.J., Douek, D.C., Roederer, M., Farber, J.M., 2005. Characterization of subsets of CD4+ memory T cells reveals early branched pathways of T cell differentiation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7916–7921. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409720102>

Soon, M.S., Engel, J.A., Lee, H.J., Haque, A., 2019. Development of circulating CD4+ T-cell memory. *Immunol. Cell Biol.* 97, 617–624. <https://doi.org/10.1111/imcb.12272>

Stadhouders, R., Lubberts, E., Hendriks, R.W., 2018. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J. Autoimmun.* 87, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.007>

Stark, J.M., Tibbitt, C.A., Coquet, J.M., 2019. The Metabolic Requirements of Th2 Cell Differentiation. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02318>

Staser, K.W., Eades, W., Choi, J., Karpova, D., DiPersio, J.F., 2018. OMIP-042: 21-color flow cytometry to comprehensively immunophenotype major lymphocyte and myeloid subsets in human peripheral blood. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 93, 186–189. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23303>

Stassen, M., Arnold, M., Hültner, L., Müller, C., Neudörfl, C., Reineke, T., Schmitt, E., 2000. Murine bone marrow-derived mast cells as potent producers of IL-9: costimulatory function of IL-10 and kit ligand in the presence of IL-1. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 5549–5555. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5549>

Steinfeldt, S., Floess, S., Engelbert, D., Haeringer, B., Baron, U., Rivino, L., Steckel, B., Gruetzkau, A., Olek, S., Geginat, J., Huehn, J., Hamann, A., 2011. Epigenetic modification of the human CCR6 gene is associated with stable CCR6 expression in T cells. *Blood* 117, 2839–2846. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-293027>

Steinmeier, T., Schulze Schleithoff, S., Timmermann, B., 2019. Evolving Radiotherapy Techniques in Paediatric Oncology. *Clin. Oncol., Paediatric Radiation Oncology* 31, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2018.12.005>

Stereotactic radiosurgery - Mayo Clinic [WWW Document], n.d. URL <https://www.mayoclinic.org/tests-procedures/stereotactic-radiosurgery/about/pac-20384526> (accessed 1.10.22).

Stereotactic radiotherapy | Cancer treatment | Cancer Research UK [WWW Document], n.d. URL <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/radiotherapy/external/types/stereotactic-body-radiotherapy-sbrt> (accessed 1.10.22).

Suzuki, K., Yamauchi, M., Suzuki, M., Oka, Y., Yamashita, S., 2011. Involvement of Non-Homologous End-Joining in Radiation-Induced Genomic Instability. <https://doi.org/10.5772/22679>

Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G., 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 145, 3796–3806.

Tabi, Z., Spary, L.K., Coleman, S., Clayton, A., Mason, M.D., Staffurth, J., 2010. Resistance of CD45RA- T cells to apoptosis and functional impairment, and activation of tumor-antigen specific T cells during radiation therapy of prostate cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 1330–1339. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000488>

Takeuchi, A., Saito, T., 2017. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00194>

Talbot, C.J., Tanteles, G.A., Barnett, G.C., Burnet, N.G., Chang-Claude, J., Coles, C.E., Davidson, S., Dunning, A.M., Mills, J., Murray, R.J.S., Popanda, O., Seibold, P., West, C.M.L., Yarnold, J.R., Symonds, R.P., 2012. A replicated association between polymorphisms near TNF α and risk for adverse reactions to radiotherapy. *Br. J. Cancer* 107, 748–753. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.290>

Talbot, C.J., Veldwijk, M.R., Azria, D., Batini, C., Bierbaum, M., Brengues, M., Chang-Claude, J., Johnson, K., Keller, A., Smith, S., Sperk, E., Symonds, R.P., Wenz, F., West, C.M.L., Herskind, C., Bourcier, C., 2019. Multi-centre technical evaluation of the radiation-induced lymphocyte apoptosis assay as a predictive test for radiotherapy toxicity. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* 18, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2019.06.001>

Taniuchi, I., 2018. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 579–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053411>

Terrones-Campos, C., Ledergerber, B., Vogelius, I.R., Specht, L., Helleberg, M., Lundgren, J., 2019. Lymphocyte Count Kinetics, Factors Associated with the End-of-Radiation-Therapy Lymphocyte Count, and Risk of Infection in Patients with Solid Malignant Tumors Treated with Curative-Intent Radiation Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol.* 105, 812–823. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.07.013>

Thewissen, M., Somers, V., Hellings, N., Fraussen, J., Damoiseaux, J., Stinissen, P., 2007. CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 6514–6523. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.6514>

Thiault, N., Husain, M., Chen, A., Larange, A., Cheroutre, H., 2020. CD4 Cytotoxic T cells play a critical role in anti-tumor protection. *J. Immunol.* 204, 241.20-241.20.

- Tichy, A., Kabacik, S., O'Brien, G., Pejchal, J., Sinkorova, Z., Kmochova, A., Sirak, I., Malkova, A., Beltran, C.G., Gonzalez, J.R., Grepl, J., Majewski, M., Ainsbury, E., Zarybnicka, L., Vachelova, J., Zavrelova, A., Davidkova, M., Markova Stastna, M., Abend, M., Pernot, E., Cardis, E., Badie, C., 2018. The first in vivo multiparametric comparison of different radiation exposure biomarkers in human blood. *PLoS ONE* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193412>
- Tonnessen, B.H., Pounds, L., 2011. Radiation physics. *J. Vasc. Surg., Radiation Safety in Vascular Surgery* 53, 6S-8S. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2010.05.138>
- Trinité, B., Chan, C.N., Lee, C.S., Mahajan, S., Luo, Y., Muesing, M.A., Folkvord, J.M., Pham, M., Connick, E., Levy, D.N., 2014. Suppression of Foxo1 Activity and Down-Modulation of CD62L (L-Selectin) in HIV-1 Infected Resting CD4 T Cells. *PLOS ONE* 9, e110719. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110719>
- Tubo, N.J., Pagán, A.J., Taylor, J.J., Nelson, R.W., Linehan, J.L., Ertelt, J.M., Huseby, E.S., Way, S.S., Jenkins, M.K., 2013. Single naive CD4+ T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. *Cell* 153, 785–796. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.007>
- Types de rayonnements ionisants [WWW Document], 2017. . AFCN - Agence Fédérale Contrô Nucl. URL <https://www.afcn.fgov.be/fr/dossiers-dinformation/la-radioactive/les-differents-types-de-rayonnements-ionisants> (accessed 10.19.21).
- United Nations Scientific Committee, on the Effects of Atomic Radiation, 1982. UNSCEAR_1982_GA-Report.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Zhivotovsky, B., 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 15, 1153–1162. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.47>
- van Leeuwen, E.M.M., Remmerswaal, E.B.M., Vossen, M.T.M., Rowshani, A.T., Wertheim-van Dillen, P.M.E., van Lier, R.A.W., ten Berge, I.J.M., 2004. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 1834–1841. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1834>
- van Meir, H., Nout, R.A., Welters, M.J.P., Loof, N.M., de Kam, M.L., van Ham, J.J., Samuels, S., Kenter, G.G., Cohen, A.F., Melief, C.J.M., Burggraaf, J., van Poelgeest, M.I.E., van der Burg, S.H., 2016. Impact of (chemo)radiotherapy on immune cell composition and function in cervical cancer patients. *Oncoimmunology* 6. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1267095>
- Vassena, L., Giuliani, E., Buonomini, A.R., Malagnino, V., Andreoni, M., Doria, M., 2016. Brief Report: L-Selectin (CD62L) Is Downregulated on CD4+ and CD8+ T Lymphocytes of HIV-1-Infected Individuals

Naive for ART. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 72, 492–497.
<https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000999>

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmbj, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., Stockinger, B., 2008. Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 9, 1341–1346.
<https://doi.org/10.1038/ni.1659>

Venkatesulu, B.P., Mallick, S., Lin, S.H., Krishnan, S., 2018. A systematic review of the influence of radiation-induced lymphopenia on survival outcomes in solid tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 123, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.01.003>

Verastegui, E.L., Morales, R.B., Barrera-Franco, J.L., Poitevin, A.C., Hadden, J., 2003. Long-term immune dysfunction after radiotherapy to the head and neck area. *Int. Immunopharmacol., Combination immunotherapy* 3, 1093–1104. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00013-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00013-4)

Vial, N., Vallard, A., Jmour, O., Rehailia-Blanchard, A., Ben Mrad, M., Trone, J.-C., Daguinet, E., Guy, J.-B., Magné, N., 2019. Innovations en radiothérapie : un regard sur 2018. *Bull. Cancer (Paris)* 106, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.12.006>

Viau, M., Testard, I., Shim, G., Morat, L., Normil, M.D., Hempel, W.M., Sabatier, L., 2015. Global quantification of γ H2AX as a triage tool for the rapid estimation of received dose in the event of accidental radiation exposure. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen., Insights into formation and consequences of chromosome aberrations: Report on the 11th International Symposium on Chromosomal Aberrations (ISCA 11), Rhodes , Greece, September 12-14, 2014* 793, 123–131.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.05.009>

Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., Eggen, A., 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol. GSE* 34, 275–305.
<https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>

Virsik-Peuckert, P., Rave-Fränk, M., Langebrake, U., Schmidberger, H., 1997. Differences in the Yields of Dicentrics and Reciprocal Translocations Observed in the Chromosomes of Irradiated Human Skin Fibroblasts and Blood Lymphocytes from the Same Healthy Individuals. *Radiat. Res.* 148, 209–215.
<https://doi.org/10.2307/3579604>

Vit, J.-P., Rosselli, F., 2003. Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* 22, 8645–8652. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207087>

- Vulin, A., Sedkaoui, M., Moratille, S., Sevenet, N., Soularue, P., Rigaud, O., Guibbal, L., Dulong, J., Jeggo, P., Deleuze, J.-F., Lamartine, J., Martin, M.T., 2018. Severe PATCHED1 Deficiency in Cancer-Prone Gorlin Patient Cells Results in Intrinsic Radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 102, 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.05.057>
- Wang, X.-B., Wu, D.-J., Chen, W.-P., Liu, J., Ju, Y.-J., 2019. Impact of radiotherapy on immunological parameters, levels of inflammatory factors, and clinical prognosis in patients with esophageal cancer. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 60, 353–363. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz006>
- Wasilko, D.J., Johnson, Z.L., Ammirati, M., Che, Y., Griffor, M.C., Han, S., Wu, H., 2020. Structural basis for chemokine receptor CCR6 activation by the endogenous protein ligand CCL20. *Nat. Commun.* 11, 3031. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16820-6>
- Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Harrington, L.E., 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 821–852. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557>
- Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.-Y., Watford, W.T., Schones, D.E., Peng, W., Sun, H., Paul, W.E., O’Shea, J.J., Zhao, K., 2009. Global Mapping of H3K4me3 and H3K27me3 Reveals Specificity and Plasticity in Lineage Fate Determination of Differentiating CD4+ T Cells. *Immunity* 30, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.12.009>
- Werfel, T., Boeker, M., Kapp, A., 1997. Rapid expression of the CD69 antigen on T cells and natural killer cells upon antigenic stimulation of peripheral blood mononuclear cell suspensions. *Allergy* 52, 465–469. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1997.tb01031.x>
- Wilkins, R.C., Kutzner, B.C., Truong, M., McLean, J.R.N., 2002. The effect of the ratio of CD4+ to CD8+ T-cells on radiation-induced apoptosis in human lymphocyte subpopulations. *Int. J. Radiat. Biol.* 78, 681–688. <https://doi.org/10.1080/09553000210144475>
- Willers, H., Gheorghiu, L., Liu, Q., Efstathiou, J.A., Wirth, L.J., Krause, M., von Neubeck, C., 2015. DNA Damage Response Assessments in Human Tumor Samples Provide Functional Biomarkers of Radiosensitivity. *Semin. Radiat. Oncol.* 25, 237–250. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2015.05.007>
- Wonsey, D.R., Follettie, M.T., 2005. Loss of the Forkhead Transcription Factor FoxM1 Causes Centrosome Amplification and Mitotic Catastrophe. *Cancer Res.* 65, 5181–5189. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4059>

- Xu, H., Timares, L., Elmets, C.A., 2019. 19 - Host Defenses in Skin, in: Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Schroeder, H.W., Frew, A.J., Weyand, C.M. (Eds.), *Clinical Immunology* (Fifth Edition). Elsevier, London, pp. 273-283.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00019-3>
- Yamaoka, M., Kusunoki, Y., Kasagi, F., Hayashi, T., Nakachi, K., Kyoizumi, S., 2004. Decreases in percentages of naïve CD4 and CD8 T cells and increases in percentages of memory CD8 T-cell subsets in the peripheral blood lymphocyte populations of A-bomb survivors. *Radiat. Res.* 161, 290–298. <https://doi.org/10.1667/rr3143>
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J.M., Wang, J.M., Howard, O.M., Oppenheim, J.J., 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286, 525–528. <https://doi.org/10.1126/science.286.5439.525>
- Youngblood, B., Hale, J.S., Ahmed, R., 2013. T-cell memory differentiation: insights from transcriptional signatures and epigenetics. *Immunology* 139, 277–284. <https://doi.org/10.1111/imm.12074>
- Yuan, X., Liao, Z., Liu, Z., Wang, L-E., Tucker, S.L., Mao, L., Wang, X.S., Martel, M., Komaki, R., Cox, J.D., Milas, L., Wei, Q., 2009. Single Nucleotide Polymorphism at rs1982073:T869C of the TGFβ1 Gene Is Associated With the Risk of Radiation Pneumonitis in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Treated With Definitive Radiotherapy. *J. Clin. Oncol.* 27, 3370–3378. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6763>
- Zaunders, J.J., Dyer, W.B., Wang, B., Munier, M.L., Miranda-Saksena, M., Newton, R., Moore, J., Mackay, C.R., Cooper, D.A., Saksena, N.K., Kelleher, A.D., 2004. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. *Blood* 103, 2238–2247. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2765>
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., Korsmeyer, S.J., 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87, 619–628. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81382-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81382-3)
- Zhang, L., Yang, M., Bi, N., Fang, M., Sun, T., Ji, W., Tan, W., Zhao, L., Yu, D., Lin, D., Wang, L., 2010. ATM Polymorphisms Are Associated With Risk of Radiation-Induced Pneumonitis. *Int. J. Radiat. Oncol.* 77, 1360–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2009.07.1675>
- Zhang, M., Byrne, S., Liu, N., Wang, Y., Oxenius, A., Ashton-Rickardt, P.G., 2007. Differential Survival of Cytotoxic T Cells and Memory Cell Precursors. *J. Immunol.* 178, 3483–3491. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3483>

Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., Draper, D., He, Y.W., 2005. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res.* 15, 749–769. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290345>

Zhang, Q., Lakkis, F.G., 2015. Memory T Cell Migration. *Front. Immunol.* 6, 504. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00504>

Zhen, H.-N., Li, L.-W., Zhang, W., Fei, Z., Shi, C.-H., Yang, T.-T., Bai, W.-T., Zhang, X., 2007. Short hairpin RNA targeting survivin inhibits growth and angiogenesis of glioma U251 cells. *Int. J. Oncol.* 31, 1111–1117. <https://doi.org/10.3892/ijo.31.5.1111>

Zheng, N., Lu, Y., 2020. Targeting the IL-9 pathway in cancer immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* 16, 2333. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1710413>

Zhu, J., Paul, W.E., 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>

Titre : Effets des rayonnements ionisants sur les Lymphocytes-T-CD4 et Recherche de biomarqueurs génétiques prédictifs de la radiosensibilité individuelle

Mots clés : radiobiologie, rayonnements ionisants, lymphocytes-T-CD4, radiosensibilité individuelle, apoptose

Résumé : En France, 380 000 nouveaux diagnostics de cancer sont posés chaque année, et 60 % de ces cancers sont traités par radiothérapie. La radiothérapie utilise les rayonnements ionisants pour détruire les cellules tumorales. La radiothérapie engendre des effets radiotoxiques indésirables sur les tissus sains situés dans le champ d'irradiation. Cependant, seulement 5 à 15% des patients développent ces complications radio-induites ce qui suggère l'existence d'une radiosensibilité individuelle des tissus sains. Il est donc important de rechercher les bases génétiques de cette radiosensibilité individuelle et de caractériser des marqueurs et des tests biologiques prédictifs de cette radiosensibilité individuelle. Les recherches pionnières réalisées par le laboratoire d'accueil ont montré que la quantification de l'apoptose radio-induite des lymphocytes-T-CD4 conventionnel effecteurs mémoires (LT-CD4conv EM) à partir du sang périphérique humain irradié permettait de stratifier la population. Plus récemment, le laboratoire d'accueil a montré une association génétique de plusieurs polymorphismes du gène *TRAIL (TNFSF10)* avec l'apoptose des LT-CD4conv EM (Schmitz et al, Baijer et al). Toutefois, la population de lymphocytes-T-CD4 effecteurs mémoires contient des sous-populations d'effecteurs Th, identifiables par cytométrie en flux, dont la sensibilité aux rayonnements ionisants n'est pas caractérisée et qui pourrait préciser une base cellulaire de la radiosensibilité individuelle. Le premier objectif de mon travail de thèse est de comprendre les effets des rayonnements ionisants sur les sous-populations de

LT-CD4conv circulantes et après une activation. Le second objectif est d'une part, de préciser l'association génétique des polymorphismes du gène *TRAIL* à l'apoptose radio-induite des sous-populations de LT-CD4conv EM et, d'autre part, de rechercher d'autres polymorphismes génétiques sur l'ensemble du génome qui seraient associés à l'apoptose radio-induite des LT-CD4conv EM.

Les résultats présentés de ma thèse montrent que la population LT-CD4conv EM présente, en réponse à l'irradiation, une hétérogénéité de sensibilité d'apoptose radio-induite et mettent en évidence chez tous les individus, une population de LT-CD4conv CCR6+CD127+ EM et CCR6-EM, respectivement résistante et sensible à l'apoptose radio-induite. L'irradiation induit dans les LT-CD4conv une diminution de l'expression des récepteurs de surface CD62L, CCR6 et CD127. Nous démontrons que la stimulation *in vitro* protège les LT-CD4 de l'apoptose radio-induite, et qu'une dose d'irradiation de 2 Gy n'impacte pas la prolifération des LT-CD4. Au niveau génétique, l'étude de l'association du polymorphisme (rs1131532) du gène *TRAIL (TNFSF10)* a été précisée dans les sous-populations de LT-CD4conv EM: Th1, Th2, Th non polarisé, Th9, et Th17 (CXCR3+). Enfin, l'étude d'association pan-génomique (GWAS) à l'apoptose radio-induite des LT-CD4conv EM identifie un signal suggestif sur les chromosomes 2, 7, 20 et 22, mais n'atteignant pas le seuil de significativité.

Title : Ionizing radiations effects on T4-lymphocytes and Research of genetic markers of individual radiosensitivity

Keywords : radiobiology, ionizing radiations, T4-lymphocytes, individual radiosensitivity, apoptosis

Abstract :

In France, 380,000 new cancer diagnoses are made each year and 60% of these cancers are treated by radiotherapy, which uses ionizing radiation to destroy tumor cells. Radiation therapy causes undesirable radiotoxic effects on healthy tissues located in the radiation field. However, only 5 to 15% of patients develop these radiation-induced complications, which suggests the existence of individual radiosensitivity of healthy tissues. It is therefore important to investigate the genetic basis of this individual radiosensitivity and to characterize markers and biological tests predictive of this individual radiosensitivity. Pioneering research in the host laboratory has shown that quantification of radiation-induced apoptosis of conventional effector memory T4-lymphocytes (convT4-lymphocytes EM) from irradiated human peripheral blood allows population stratification. More recently, the host laboratory showed a genetic association of several polymorphisms in the *TRAIL* gene (*TNFSF10*) with apoptosis of convT4-lymphocytes EM (Schmitz et al, Baijer et al). However, the population of effector memory T-CD4 lymphocytes contains subpopulations of Th effectors, identifiable by flow cytometry, whose sensitivity to ionizing radiation is uncharacterized and which could specify a cellular basis for individual radiosensitivity. The first objective of my thesis work is to understand the effects of ionizing radiation on circulating and post-activation convT4-lymphocytes subpopulations. The second objective is to clarify the genetic association of *TRAIL* gene polymorphisms with radiation-induced apoptosis of convT4-lymphocytes EM subpopulations and to search for other genome-wide genetic polymorphisms

associated with the radiation-induced apoptosis of convT4-lymphocytes EM. The results presented in my thesis show that the convT4-lymphocytes EM population exhibits heterogeneity in the radiation-induced apoptosis responses in response to irradiation and reveal in all individuals, a CCR6+CD127+ EM convT4-lymphocytes population that is resistant to radiation-induced apoptosis and a CCR6-EM population that is sensitive to radiation-induced apoptosis. Irradiation induces in convT4-lymphocytes a decrease in the expression of surface receptors CD62L, CCR6 and CD127 which is responsible for an increase in the proportion of radiosensitive convT4-lymphocytes populations: CD62L-CCR6-CD127-. We demonstrate that *in vitro* stimulation protects LT-CD4 from radiation-induced apoptosis, and that an irradiation dose of 2 Gy does not impact LT-CD4 proliferation. At the genetic level, the study of the association of the polymorphism (rs1131532) of the *TRAIL* gene (*TNFSF10*) was specified in the subpopulations of convT4-lymphocytes EM: Th1, Th2, non-polarized Th, Th9, Th17 and Th1-Th17. The presented results demonstrate the association of rs1131532 with the radiation-induced apoptosis of convT4-lymphocytes EM and show that this association is significant in the Th1, Th2 and Th9/Th17 effector population. Finally, the genome-wide association study (GWAS) with the radiation-induced apoptosis of convT4-lymphocytes EM identifies a suggestive signal on chromosomes 2, 7, 20 and 22, but does not reach the significance threshold.