UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE



THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES Comue Universite Bretagne Loire

ECOLE DOCTORALE N° 605 *Biologie Santé* Spécialité : « *Biologie des organismes»*

Par Charlotte DEGORRE

La sénescence radio-induite des cellules endothéliales

Voies moléculaires et implication dans la récidive du glioblastome après radiothérapie

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 23 novembre 2018 » Unité de recherche : CRCINA INSERM U1232 Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Professeur Elisabeth Moyal - PU-PH, CRCT - UMR1037, Toulouse, France **Professeur Olivier Feron -** DR FNRS, FATH, IREC, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgique

Composition du Jury :

Professeur Elisabeth Moyal - PU-PH, CRCT - UMR1037, Toulouse, France Professeur Olivier Feron - DR FNRS, FATH, IREC, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgique. Docteur Julie Gavard - DR CNRS, CRCINA - UMR1232, Nantes, France Docteur Vincent Pennaneach - CR INSERM, Institut Curie-Recherche - UMR3348, Orsay, France

Directeur de thèse Docteur François Paris - DR INSERM, CRCINA - UMR1232, Nantes, France Co-directeur de thèse Docteur Claire Pecqueur - CR CNRS, CRCINA - UMR1232, Nantes, France

Président du Jury : Docteur Julie Gavard - DR CNRS, CRCINA - UMR1232, Nantes, France J'adresse ces premiers remerciements aux membres de mon jury pour avoir accepter d'évaluer mon travail de thèse. Un grand merci à mes rapporteurs, le **Pr Elizabeth Moyal** et le **Dr Olivier Feron**. Merci également aux **Dr Julie Gavard** et **Dr Vincent Pennaneach** d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Merci à tous pour votre temps et pour votre expertise.

J'aimerais ensuite remercier mes deux directeurs de thèse, le **Dr Claire Pecqueur** et le **Dr François Paris**, de m'avoir épaulé et guidé pendant ces quatre années. Merci pour votre confiance, votre soutien et votre disponibilité dont j'ai quelque fois abusé ! Travailler ensemble aura permis de mener à bien ce beau projet et je vous en remercie. Merci également de m'avoir permis d'évoluer professionnellement et de développer mes connaissances scientifiques. Je vous souhaite le meilleur pour vos projets futurs.

Je souhaite ensuite remercier **Mme Soizic Dutoit**. Je te remercie de m'avoir épauler depuis le premier jour de ma thèse. Merci pour ton soutien et tes conseils techniques sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui. Je songe sérieusement à écrire un livre intitulé « Le Western Blot pour les nuls » !! Merci pour toutes ces discussions scientifiques (ou pas) que j'apprécie tant. Merci d'être restée à mes cotés après ton départ, de m'avoir toujours apporté une oreille attentive lorsque j'en avais besoin. A Caen, à Lyon ou à Lille, je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite !

Je remercie également le **Dr Isabelle Corre** pour son précieux soutien, ses conseils, sa disponibilité et sa bonne humeur au quotidien. Je te souhaite pleins de bonheur et de réussite.

Merci également à mes chères amies **Cynthia** et **Marion**. Nous avons commencé ensemble il y a plus de quatre ans et une belle amitié en a découlé. Merci pour votre soutien sans faille aussi bien professionnellement que personnellement. Merci pour tous ces bons moments passés à vos cotés et ceux de Julien et Guillaume. Je vous souhaite tout le bonheur du monde avec votre petite famille et on se donne RDV chez nos amis les américains ;).

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes des équipes 9 et 14, en particulier Manon, Hala, Meriem, Sophie, Daniela, Natacha, Sabine, Stéphane, Karen, Vincent, Nolwenn, Catherine et Delphine, pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Un remerciement particulier à Ophélie qui a contribuer à l'avancer de ce travail de thèse. Merci pour ton aide, mais également pour ton humour et ta joie de vivre! Je te souhaite beaucoup de succès pour ta thèse.

Egalement un grand merci à tous mes **amis Bretons, Nantais, Jurassien** et j'en passe... Merci d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir supporté mes histoires de cellules et de pipettes sans rien dire !! Merci pour tous ces moments exceptionnels passés ensemble. J'ai conscience de l'infinie chance que j'ai de vous avoir à mes cotés.

Un immense merci à ma si belle et grande famille sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci à mes parents et mon frère de m'avoir permis de faire ce beau parcours et de m'avoir toujours épaulé et conseillé ! Votre soutien a été déterminant pour moi depuis le début de ce long chemin et c'est en grande partie grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Merci également à mes grands parents, oncles, tantes, cousins et cousines qui malgré la distance ont toujours su rester présents et m'envoyer force et courage lors de mes études. Merci également à ma belle famille pour leur soutien et leur bienveillance.

Enfin, merci à Florian de faire partie de ma vie depuis plus de 10 ans. Merci d'être là au quotidien et de faire de ma vie ce qu'elle est. Merci de m'avoir supporté, épaulé et remonté le moral lorsque j'en avais besoin. Je suis plus qu'impatiente de commencer cette nouvelle vie outre atlantique avec toi.

Je m'excuse par avance des personnes que j'aurais pu oublier. J'exprime ma plus grande reconnaissance à toutes les personnes ayant participé à la réalisation de cette thèse.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	
TABLE DES ILLUSTRATIONS	6
FIGURES	6
TABLEAUX	6
ABREVIATIONS	7

INTRODUCTION 10

I.	LA RADIOBIOLOGIE	11
	A. HISTORIQUE	11
	B. LES RAYONNEMENTS IONISANTS	13
	1. Les rayonnements électromagnétiques : Les rayons X et γ	14
	2. Les rayonnements particulaires	15
	C. EFFETS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DES RADIATIONS IONISANTES.	15
	1. Action directe et indirecte	16
	2. Impact sur les différents compartiments cellulaires	17
	a. Le noyau	17
	b. Les mitochondries	22
	c. Les membranes	24
	3. Mécanismes de survie cellulaire	26
	a. La réponse antioxydante	26
	b. La détection des dommages à l'ADN	
	c. Le blocage du cycle cellulaire	
	d. La réparation de l'ADN	31
	D. DEVENIR DE LA CELLULE	35
	1.L'apoptose radio-induite	35
	2. La sénescence	
	a. Caractéristiques morphologiques et moléculaires	
	b. Caractéristiques sécrétoires	
	i. Les facteurs de signalisation solubles	
	ii. Les protéases extracellulaires	42
	iii. Les facteurs insolubles	43
	iv. Les facteurs non protéiques	43
	c. La sénescence induite par l'irradiation	44
	3. La catastrophe mitotique	

II. LA RADIOTHERAPIE COMME TRAITEMENT ANTICANCEREUX	
A. UTILISATION DE LA RADIOTHERAPIE	49
1. Traitement locorégional curatif	49
2. Combinaison avec d'autres traitements	50
3. Les soins palliatifs	50
B. EFFICACITE DE LA RADIOTHERAPIE	51

51
53
53
53
57
57
58
58
60
60
62
65
66
67
68
69

III.IMPACT DE LA RADIOTHERAPIE SUR LE COMPARTIMENT VASCULAIRE	75
A. LE COMPARTIMENT VASCULAIRE	
1.Structure du compartiment vasculaire	75
2.Fonctions principales de l'endothélium	77
a.L'hémostase	78
b.Le tonus vasculaire	79
c.La perméabilité	79
d.L'inflammation	80
e.La vasculogénèse et l'angiogénèse	80
B. REPONSES DU COMPARTIMENT VASCULAIRE A LA RADIOTHERAPIE	
1. L'activation des cellules endothéliales	84
2. L'apoptose endothéliale radio-induite	85
3. L'angiogénèse	86
4. La sénescence	87
C. ROLE DE L'ENDOTHELIUM DANS LE DEVELOPPEMENT DES DOMMAGES	
TISSULAIRES RADIO-INDUITS	89
D. ROLE DE L'ENDOTHELIUM DANS LA RADIORESISTANCE TUMORALE	
1. Impact de la mort radio-induite des cellules endothéliales	91
2. Impact de la sénescence des cellules endothéliales	91
IV. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE RECHERCHE	95
	07
KESULIAIS	

ARTICLE 1 : LES VOIES MOLECULAIRES IMPLIQUEES DANS LA SENESCENCE RADIO-	
INDUITES DES CELLULES ENDOTHELIALES MICROVASCULAIRES QUIESCENTES	98
ARTICLE 2 : IMPLICATION DU SASP DES CELLULES ENDOTHELIALES SENESCENTES DAI	NS
LA REPONSE DU GLIOBLASTOME A LA RADIOTHERAPIE1	10

DISCUSSION	

BIBLIOGRAPHIE

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Premier cliché radiographique effectué par WC. Röntgen en Décembre 1895	11
Figure 2 : Pénétration des différents types de rayonnements ionisants	15
Figure 3 : Action directe et indirecte des rayonnements ionisants sur l'ADN	16
Figure 4 : Le principe de la radiolyse de l'eau.	16
Figure 5 : Types et caractéristiques des dommages radio-induits de l'ADN	18
Figure 6 : Les anomalies chromosomiques et chromatidiques	20
Figure 7 : La chaine respiratoire mitochondriale	23
Figure 8 : Mécanismes principaux de régulation du stress oxydant	27
Figure 9 : Voie de réparation par excision de base (BER).	32
Figure 10 : Voies de réparation des cassures doubles brins de l'ADN	34
Figure 11 : Observation microscopique de cellules sénescentes	38
Figure 12 : Activation des récepteurs couplés aux protéines G.	40
Figure 13 : Schéma des principales voies moléculaires impliquées dans la sénescence radio-induite	45
Figure 14 : Schéma récapitulatif des différents effets de l'irradiation sur la cellule et des devenirs cellulai	res
associés	48
Figure 15 : Courbes de survie de cellules de hamster chinois irradiées à diverses phases du cycle cellulaire	52
Figure 16 : Planification du plan de traitement radiothérapeutique	54
Figure 17 : Prise en charge thérapeutique des patients atteints de GBM	60
Figure 18 : Les différents types d'hétérogénéité	62
Figure 19 : Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie en fonction des différents sous-types de GBM	63
Figure 20 : Fraction de survie de cellules cultivées en hypoxie ou normoxie	70
Figure 21 : Mécanismes de régulation de HIF1 et les conséquences sur la réponse des vaisseaux sanguins et	de
la tumeur à la radiothérapie	73
Figure 22 : Représentation des différents types de vaisseaux sanguins.	76
Figure 23 : Fonctions des cellules endothéliales et molécules impliquées	78
Figure 24 : Le switch angiogénique	82
Figure 25 : Différences entre les vaisseaux sanguins normaux et tumoraux	83
Figure 26 : Effets pro- et anti-tumoraux du SASP.	92
Figure 27 : Schéma récapitulatif des objectifs du projet de recherche	96
Figure 28 : Profil d'expression des NADPH oxydases 21 jours après irradiation1	.09
Figure 29 : Schéma récapitulatif des résultats du projet de thèse 1	.42
Figure 30 : La voie cGAS/STING pourrait être impliquée dans la récurrence du GBM après radiothérapie 1	50
Figure 31 : Approches thérapeutiques permettant d'inhiber le dialogue entre les cellules endothéliales sénescen	tes
et les cellules de GBM1	53

Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques et applications des différents types de rayonnements ionisants	13
Tableau 2 : Caractéristiques des différents antioxydants enzymatiques.	27

Abréviations

53BP1: p53 Binding Protein 1

AC : Adenylate Cyclase ADN : Acide Désoxyribonucléique ADNmt : Acide Désoxyribonucléique mitochondrial ADP : Adenosine diphosphate AMPK : Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase AP : Apurinique/apyrimidique AP-1 : Activator protein-1 Apaf1: Apoptotic protease activating factor 1 APE : A-Purinic/A-Pyrimidic Endonuclease ARN : Acide Ribonucléique Asmase : Acide sphyngomyelinase ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated ATP : Adénosine Triphosphate ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3related ATRIP : ATR Interacting Protein **BAEC:** Bovine Aortic Endothelial Cells

BAEC: Bovine Aortic Endothelial Cells Bak : Bcl-2 homologous Antagonist Killer Bax : Bcl-2-associated X protein Bcl-2 : B cell lymphoma 2 Bcl-xl : B cell lymphoma extra large BER : Base Excision Repair bFGF : Basic Fibroblast Growth Factor BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

C/EBPβ : CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta CAFs : Cancer Associated Fibroblasts Caspases : Cysteine-dependent aspartatedirected proteases CDB : Cassures Doubles Brins CDK : Cyclin Dependent Kinase CEs : Cellules Endothéliales cGAMP : 2'–5', 3'–5' cyclic GMP–AMP cGAS : Cyclic GMP–AMP synthase CGH : Comparative Genomic Hybridization CGS : Centimètre, Gramme, Seconde CHI3L1 : Chitinase 3 Like 1 Chk1 : CheckPoint Kinase 1 Chk2 : CheckPoint Kinase 2 CL : Classiques COX2 : Cyclo-Oxygénase 2 CS : Citrate Synthase CSB : Cassures Simples Brins CSCs : Cellules souches cancéreuses CSF-1: Colony Stimulating Factor 1 CSF-1R: Colony Stimulating Factor 1 Receptor CtIP : C-terminal binding protein-Interacting Protein CTLA4 : Cytotoxic **T-Lymphocyte** Associated Protein 4 CTV : Clinical Target volume

DDR : DNA Damage Response DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase catalytic subunits DR : Death Receptor Drp1 : Dynamin-related protein 1

EGF : Epidermal Growth Factor EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor EMT : Epithelial Mesenchymal to Transition eNOS : Endothelial Nitric Oxide Synthase ERK1/2: Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 et 2 ET-1: Endothéline-1 eV : Electron Volt EXO1 : Exonucléase1

FADH2 : Flavine Adenine DinucleotideFEN1 :FlapStructure-SpecifiqueEndonucleaseFGF : Fibroblast Growth FactorFISH :FluorescenceInSituHybridization

G1 : Gap 1

G2 : Gap 2

GADD45 : Growth Arrest And DNA Damage Inducible, Alpha GBM : Glioblastome GDP : Guanosine DiPhosphate GPCR : G protein-coupled receptor GPX : Gluthation Peroxidase GTP : Guanosine TriPhosphate GTV : Growth Tumor Volume Gy : Gray

HAEC : Human Aortic Endothelial Cells HGF: Human Growth Factor HIFs : Hypoxia Inducible Factors HMVEC-L: Human Microvascular Endothelial Cells-Lung HP1 : Heterochromatin Protein 1 HREs : Hypoxia Response Elements HSV-TK : Herpes Simplex Virus-Thymidine Kinase HUVEC : Human Umbilical Vein **Endothelial Cells**

Adhesion ICAM-1/2 : Intracellular Molecule 1/2ICRU: International Commission on Radiation Units and measurement IDH : Isocitrate Deshydrogénase IGF : Insulin like Growth Factor IGFBPs : IGF-binding proteins IGFR: Insulin like Growth Factor Receptor IMRT : Intensity Modulated Radiotherapy INC : Institut National du Cancer ITV: Internal Target volume

KRAS: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase MCT1 : Monocarboxylate transporter 1 MEC : Matrice Extracellulaire MES : Mésenchymateux MET : Hepatocyte Growth Factor Receptor MKS : Mètre, Kilogramme, Seconde MMPs : Métalloprotéases Matricielles MN : Micronoyaux MnTBAP: Manganèse 5, 10, 15, 20tetrakis (4 benzoic acid) porphyrin MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation mRFP: Monomeric Red Fluorescent Protein MRN : MRE11, Rad50 et NBS1 mTOR: Mechanistic Target Of Rapamycin

NAC : N-Acétyl Cystéine NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide NBS1 : Nijmegen Breakage Syndrome 1 NCCD: Nomenclature Committee on Cell Death NER : Nucleotide Excision Repair NF1: Neurofibromin 1 NFκB : Nuclear Factor-Kappa B NHEJ: Non Homologous End Joining NO : Nitric oxide NOS : Nitric Oxide Synthase NOX/DUOX: NADPH Oxidase/Dual oxidase

OAR : Organes à risques OER : Oxygen Enhancement Ratio OIS : Oncogene Induced Senescence OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAF : Platelet Activating Factor PAI-1: Plasminagen Activator Inhibitor type-1 PARP1 : Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 PCAM : Platelet endothelial Cell Adhesion Molecule PD-1: Programm Cell Death 1 PDGF: Platelet-Derived Growth Factor PDGFRa: Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha PDL-1: Programmed Death Ligand 1 PGE2 : Prostaglandine 2 PGi2 : Prostaglandine i2 PHD : Prolyl Hydroxylase Domain Protein

Pi : Phosphate inorganique PI3KK : Phosphatidylinositol 3-kinaserelated kinases PLC : Phospho-Lipase-C PN : Proneural PTV : Previsional Target Volume PUMA : p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

RAD : Radiation Absorbed Dose Rb : Retinoblastoma RCPG : Récepteur couplé aux protéines G RE : Réticulum Endoplasmique RH : Recombinaison Homologue RNS : Reactive Nitogen Species ROS : Reactive Oxygen Species RPA : Replication Protein A

S1P: Sphingosine-1-Phosphate
SAHF: Senescence Associated
Heterochromatin Foci
SASP: Senescence Associated Secretory
Phenotype
SDF-1: Stromal Cell-Derived Factor 1
SGI: Syndrome Gastro-Intestinal
SNC: Système Nerveux Central
SOD: Superoxyde Dismutase
STAT3: Signal Transducer and Activator
of Transcription 3
STING: Stimulator of Interferon Genes
Sv: Sievert

TBI : Total Body Irradiation TCF4 : Transcription Factor 4 TF: Tissu Factor TFPI : Tissu Factor Pathway Inhibitor TGF- β : Tumor Growth Factor β TIMPs: Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease TMZ : Temozolomide TN-C: Tenascin-C TNF: Tumor Necrosis Factor **TNF-R1**: Tumor Necrosis Factor Receptor 1 tPA: Tissu Plasminogen Activator TRAIL: Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

uPA : Urokinase type plasminogen activator

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF1: Vascular Endothelial Growth Factor 1

VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

VVO : Vacuolo-vesicular organelle

vWF : Van Willebrand Factor

XIAP1 : X-linked Inhibitor of Apoptosisassociated Factor XLF : XRCC4 Like Factor XRCC1/4 : X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1/4 PGi2

INTRODUCTION

I. La radiobiologie

La radiobiologie est l'étude de l'action des rayonnements ionisants sur la matière vivante. Cette discipline a connu un essor considérable depuis plus de 30 ans grâce aux progrès de nombreuses disciplines telles que la biologie moléculaire ou la physique. Elle a permis d'analyser les mécanismes de réparation des lésions à l'échelle moléculaire, cellulaire et tissulaire, de comprendre la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse ainsi que le système de défense contre la cancérogenèse notamment chez l'homme. Elle est à la base de techniques médicales de pointe telles que la radiobiologie mais également **la radiothérapie** qui représente, avec la chimiothérapie et la chirurgie, l'un des traitements standard du cancer. Environ 60% des patients sont traités par radiothérapie dont plus d'un tiers seront guéris par ce traitement. Nous verrons dans cette partie les principales découvertes en radiobiologie, les différents types de rayonnements ionisants ainsi que leurs effets sur les cellules.

A. Historique

C'est en décembre 1895 que le physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen découvrit un nouveau type de rayon et créa la première radiographie à partir de la main de son épouse Bertha Röentgen (Figure 1) (Reed, 2011).



Figure 1 : Premier cliché radiographique effectué par WC. Röntgen en Décembre 1895.

Il nomma ces rayons « rayons X » de part leur origine inconnue. Il reçut le prix Nobel de physique en 1901 en récompense de ces travaux. En 1896, Henri Becquerel découvrit les rayons γ provenant de l'Uranium. Parallèlement, Marie Curie découvrit le Radium et le Polonium. Ils obtinrent le prix Nobel de Physique en 1903 pour leurs travaux sur la radioactivité.

Les premières tentatives d'utilisations en médecine ne se firent pas attendre. Les premiers centres de radiobiologie ouvrirent en début d'année 1896 et ont permis l'amélioration du diagnostic de certaines maladies. Puis, la découverte de la capacité des rayons à détruire les tissus a été exploitée à des fins thérapeutiques et marque la naissance de la radiothérapie. En effet, moins d'un an après la découverte des rayons X, Emil Grubbe fut le premier américain à utiliser les rayons X comme traitement anticancéreux en traitant une rechute de cancer du sein. En 1896, les médecins Victor Despeignes et Léopold Freund les utilisèrent pour traiter un cancer de l'estomac et une lésion cutanée située sur le thorax d'un enfant. D'autres tentatives thérapeutiques verront le jour, notamment par les docteurs Danlos et Bloch en 1901, pour le traitement d'un lupus par le Radium.

L'utilisation des rayonnements ionisants comme traitement anticancéreux donna des résultats très prometteurs mais aussi quelques déceptions et inquiétudes. En effet, certaines tumeurs ne répondaient pas au traitement de part l'utilisation de rayons peu pénétrants. De plus, les médecins remarquèrent la présence d'effets secondaires aux rayonnements ionisants, notamment Henri Becquerel qui constata une ulcération de sa peau après exposition au Radium ou encore Marie Curie qui décéda en 1934 d'une myélodysplasie. Depuis, des avancées en physique et en radiobiologie ont été effectuées, notamment au niveau des modalités de délivrances des rayons ainsi que sur les réponses cellulaires aux rayonnements ionisants. Claude Regaud montra, en 1927, les bénéfices d'une irradiation fractionnée par rapport à une mono-dose. De plus, Baclesse fut le premier à montrer qu'il est possible de diminuer l'effet des rayons sur les tissus sains en réduisant la dose par fraction. En 1957, Puck et Marcus développèrent une méthode quantitative appelée test de survie cellulaire ou méthode des colonies permettant de mesurer la radiosensibilité des cellules (Puck et al., 1957). Ils montrèrent ainsi que la survie est dépendante de la dose de rayonnements reçue. La révolution des techniques de biologie cellulaire et moléculaire survenue dans les années 80 a ensuite permis une compréhension plus précise des mécanismes d'actions des rayonnements ionisants, aussi bien sur les cellules saines que cancéreuses.

B. Les rayonnements ionisants

L'absorption d'une radiation par la matière vivante peut mener à une **excitation** ou une **ionisation** de celle-ci. Une excitation se produit lorsqu'un électron passe à un état d'énergie supérieur au sein même de l'atome. Cet état n'est pas stable et est très rapidement suivi par une désexcitation associée à un relargage d'énergie sous forme de photons ou de chaleur. L'ionisation, se produit lorsque la radiation a suffisamment d'énergie pour éjecter l'électron de l'atome, c'est ce que l'on appelle une **radiation ionisante**. L'ion formé va alors pouvoir participer à différentes réactions chimiques parfois délétères pour le vivant. Les radiations ionisantes peuvent provenir de la désintégration de noyaux instables de certains éléments radioactifs (Radium, Polonium, etc.) ou de générateurs de radiations comme les générateurs de rayons X. Le pouvoir ionisant d'un rayon dépend de sa nature. Ils sont généralement classés en deux grandes catégories comprenant les **rayonnements électromagnétiques** et **les rayonnements particulaires** avec des natures et des caractéristiques différentes (Tableau 1).

	Types de rayonnements	Nature	Spécificité	Exemple d'émetteurs	Pouvoir pénétrant	Applications
gnétiques	Х	Photons énergétiques	Indirectement ionisants	Générateur électrique de rayons X Iode 125	 Pénétration importante : Parcourent quelques centaines de mètres dans l'air Traversent les vêtements et le corps Arrêtés ou atténués par des écrans protecteurs 	Radiographie, tomographie, radiothérapie externe ou curiethérapie, stérilisation de matériel
Electromag	r	Photons énergétiques	Indirectement ionisants	Césium 137 Iridium 192 Or 198	 Pénétration importante : Parcourent quelques centaines de mètres dans l'air Traversent les vêtements et le corps Arrêtés ou atténués par des écrans protecteurs 	Gammagraphie, radiothérapie externe, curiethérapie ou radio- immunothérapie
Particulaires	β	Positon β + ou électron β -	Directement ionisants	Soufre 35 Tritium Carbone 14	 Pénétration limitée : Parcourent quelques mètres dans l'air Ne pénètrent pas en profondeur dans l'organisme Arrêtés par une feuille d'aluminium 	Tomographie, radio- immunothérapie ou curiethérapie
	α	2 protons et 2 neutrons	Directement ionisants	Plomb 210 Radium 226 Thorium 232	 Faible pénétration : Parcourent quelques centimètres dans l'air Arrêtés par la couche cornée de la peau ou une feuille de papier 	Radio-immunothérapie
	Neutrons	Neutrons	Indirectement ionisants	Accélérateurs de particules	 Pénétration importante : Parcourent quelques centaines de mètre dans l'air Traversent les vêtements et le corps Arrêtés par des écrans de paraffine 	Radiothérapie externe
	Protons	Protons	Directement ionisants	Accélérateurs de particules	Pic de Bragg : Augmentation lente de l'énergie en fonction de la profondeur. Forte augmentation de l'énergie juste avant une diminution brutale.	Radiothérapie externe

Tableau 1 : Caractéristiques et applications des différents types de rayonnements ionisants.(Adaptée de Radiobiology for Radiobilogist, E J. Hall et A J Giaccia, 2006). Nature, spécificité, émetteurs,pouvoir pénétrant et applications principales des différents types de rayonnements ionisants.

Le RAD (*Radiation Absorbed Dose*) est l'unité de mesure de la dose absorbée par quantité de matière dans l'ancien système CGS (Centimètre, Gramme, Seconde). Depuis l'apparition du nouveau système international des unités (Mètre, Kilogramme, Seconde ; MKS), l'unité de mesure de la dose absorbée est le Gray (Gy). Un Gray est égal à un Joule déposé par kilogramme de matière, ce qui équivaut anciennement à 100 Rads. La mesure de l'exposition d'un organe ou d'un tissu aux rayonnements ionisants est exprimée en dose équivalente (notée H). Celle-ci équivaut au produit de la dose d'énergie absorbée, par l'organe ou le tissu, par un facteur de pondération tenant compte de la nocivité du rayonnement (neutrons, rayons X, électrons. etc.). Elle s'exprime en Sievert (Sv) ou Millisievert.

Quelque soit le rayonnement, les particules déposent leur énergie dans le milieu qu'elles traversent en arrachant des électrons aux atomes environnants. C'est la première phase du mode d'action des rayonnements ionisants, elle est dite **phase physique**. Toutes les particules chargées telles que les particules α ou β sont dites **directement ionisantes**. Le dépôt d'énergie est direct et continu, c'est à dire que les particules ont assez d'énergie pour modifier la structure atomique de la matière qu'elles traversent, provoquant ainsi des changements chimiques ou biologiques directs. A l'inverse, les particules neutres (rayons X, γ ou les neutrons) sont **indirectement ionisantes**. Il n'y a pas de dépôt d'énergie tant que le photon n'a pas interagi avec un électron. Il s'en suit le dépôt d'énergie sur la matière associé à des modifications chimiques et biologiques.

1. Les rayonnements électromagnétiques : Les rayons X et y

Ces rayons sont, au même titre que la lumière, une forme d'onde électromagnétique (propagation perpendiculaire d'un champ électrique et d'un champ magnétique) constituée de photons. Ils ont une longueur d'onde faible, non visible par l'œil humain. Les rayons X sont produits de manière extranucléaire, c'est à dire par les électrons de la couche externe des atomes (transition électronique). Au contraire, les rayons γ sont produits de manière intranucléaire (transition nucléaire), c'est à dire par réarrangement interne des nucléons du noyau. Ces rayons sont très pénétrants puisqu'ils traversent la totalité du tissu irradié et ne peuvent être arrêtés que par une forte épaisseur de plomb ou de béton (Figure 2) (Tableur 1).



Figure 2 : Pénétration des différents types de rayonnements ionisants.

Représentation de la distance de pénétration des différents types de rayonnements ionisants au travers des couches de la peau (épiderme, derme et hypoderme).

La dose est à son maximum à quelques centimètres de profondeur puis décroit de manière exponentielle. En rentrant en contact avec la matière, les rayons vont être déviés ou absorbés. C'est l'absorption qui provoquera l'ionisation de la matière, déclenchant une succession de réactions physico-chimiques aboutissant à une modification des structures cellulaires puis tissulaires.

2. Les rayonnements particulaires

La stabilité d'un noyau dépend du rapport qui existe entre les nucléons (protons et neutrons) qui le constituent. Les **rayonnements particulaires** sont émis lors des transformations nucléaires qui se produisent dans les noyaux instables. Ils se distinguent par le type de particules auxquels ils sont associés : particules chargées (électrons ou atomes ionisés) ou non chargées (neutrons) (Tableau 1).

C. Effets moléculaires et cellulaires des radiations ionisantes

Les effets moléculaires constituent toutes les réactions chimiques rencontrées suite aux réarrangements moléculaires produits lors de la phase physique. Durant celle-ci se produit par exemple la radiolyse de l'eau ou la formation de radicaux libres menant notamment à des lésions de l'ADN et des membranes. Lors de cette phase, on parle d'action directe ou d'action indirecte de l'irradiation (Figure 3).





(Adaptée de Radiobiology for Radiobilogist, E J. Hall et A J Giaccia, sixième édition, 2006). L'ADN peut être directement lésé par l'électron arraché par le photon ou indirectement via le radical libre formé lors de la radiolyse de l'eau.

1. Action directe et indirecte

L'action directe correspond à l'ionisation ou à l'excitation des molécules d'intérêts biologiques (protéines, ADN, etc.) sans intermédiaire chimique. Ce mécanisme est prépondérant pour les rayonnements de haute énergie. Nous verrons que la cible principale des rayons est l'ADN et que son atteinte conduit à des lésions telles que des cassures doubles brins (CDBs), simples brins (CSBs) ainsi que des altérations de bases.

A l'inverse, le mécanisme d'action **indirecte** passe tout d'abord par une réaction chimique aboutissant à la formation de radicaux libres interagissant ensuite avec d'autres molécules telles que l'ADN. Le plus connu est **la radiolyse de l'eau**, caractérisée par l'ionisation ou l'excitation de la molécule d'eau par le rayonnement ionisant (Figure 3 et 4).



Figure 4 : Le principe de la radiolyse de l'eau.

(Adaptée de Bensasson, 1993). Les rayonnements ionisants vont provoquer très rapidement l'excitation ou l'ionisation de la molécule d'eau entrainant l'apparition de radicaux libres plus ou moins réactifs qui seront ensuite capables de réagir entre eux. Les rayonnements sont capables de décomposer la molécule d'eau mettant en jeu des processus complexes et menant à la production de radicaux libres ($H_2O^{+\bullet}$, H^+ et HO^{\bullet}) appelés espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen species; ROS). Ces atomes ou molécules possédant un électron non apparié (célibataire) sont des espèces très réactives ayant une durée de vie très courte. Ce phénomène est majoritaire puisque les cellules sont composées à 80% d'eau. Ces radicaux vont réagir afin de former d'autres espèces hautement réactives mais plus stables telles que H_2O_2 (Azzam et al., 2012). Ils cherchent en permanence à interagir avec l'électron d'autres molécules (ADN, lipides, protéines, etc.) provoquant ainsi des lésions au sein des atomes et par conséquent l'altération de ces molécules (Collinson et al., 1960).

2. Impact sur les différents compartiments cellulaires

L'irradiation va avoir un impact biologique sur les différentes organelles de la cellule en particulier le noyau, les mitochondries ainsi que les membranes.

a. Le noyau

Il est montré que l'exposition des cellules aux rayonnements ionisants provoque un gonflement du noyau associé à une dilatation de la membrane nucléaire, des modifications de la structure chromatinienne ainsi que l'augmentation du nombre et de la taille des régions nucléolaires (Jordan, 1967) (Gasperin et al., 1992) (Schwint et al., 1993) (Somosy, 2000) (Azzam et al., 2012).

Les lésions prépondérantes de l'irradiation sur le compartiment nucléaire sont les dommages à l'ADN. Cette macromolécule biologique est en forme de double hélice composée de nucléotides, de bases azotées (Adénine (A), Cytosine (C), Guanine (G) ou Thymine (T)), d'un sucre (désoxyribose) et d'un groupement phosphate. Ils existent plusieurs types de dommages selon l'énergie déposée par le rayonnement ionisant (Figure 5). Les plus représentés après l'irradiation sont les CDBs, les CSBs, les altérations de bases ainsi que les aberrations chromosomiques.

	Radiations ionisantes		
	Altérations de bases (Jonisation, déamination, site abasigue)	Cassures simples brins	Cassures doubles brins
Energie	>1 eV/nm3	>10 eV/nm3	>100 eV/nm3
Incidence	~ 10000 / Gy	~ 1000 / Gy	~ 40 / Gy
Médiane de réparation	5-10 min	10-20 min	>50 min
Types de réparation	BER / NER	BER	RH / NHEJ

Figure 5 : Types et caractéristiques des dommages radio-induits de l'ADN.

(Adaptée de Joubert et al. 2007). Selon l'énergie déposée, nous distinguerons trois types de dommages de l'ADN : (i) les altérations de bases, (ii) les cassures simples brins (CSBs) et (iii) les cassures doubles brins (CDBs). Les lésions les plus représentées sont les altérations de bases qui seront les moins délétères et les mieux réparées. A l'inverse, les cassures doubles brins seront les plus rares mais les plus néfastes pour la cellule. (NB : 1eV=1,6x10⁻¹⁹ Joules)

Les altérations de bases : Lors de l'irradiation, environ 10000 modifications de bases par cellules et par Gy peuvent être générées. Ces altérations de l'ADN nécessitent le plus petit dépôt d'énergie. On distingue les délétions, les altérations chimiques (oxydations, déaminations) ou encore les pontages inter-bases (*Cross-link*). Ces dommages vont être rapidement réparés par le processus d'excision-resynthèse d'une base (*Base Excision Repair*; *BER*) ou d'un nucléotide (*Nucleotide Excision Repair*; *NER*) (Azzam et al., 2012). En cas de mauvaise réparation, certains de ces dommages, tels que les pontages, peuvent se transformer en CDBs. Ces dernières sont les plus délétères pour les cellules car elles sont moins facilement réparées et peuvent conduire à des translocations chromosomiques (Bessho, 2003) (Azzam et al., 2012). Ces lésions peuvent également être converties en mutations par défaut de réparation. Ceci est permanent et transmis à la descendance. Selon le gène où se trouve la mutation les conséquences peuvent être plus ou moins néfastes pour la cellule.

Les cassures simples brins (CSBs): Ces dommages ne concernent qu'un seul des deux brins de l'ADN. Ils nécessitent une énergie plus importante que les altérations de bases. Ils se traduisent par la rupture de la liaison phosphate-désoxyribose ou de la liaison base-désoxyribose. L'irradiation induit en moyenne 1000 CSBs/cellules/Gy. Ces lésions sont réparées rapidement par le système BER. Dans le cas d'une mauvaise réparation, elles peuvent, tout comme les altérations de bases, être converties en CDBs (Kuzminov, 2001).

Les cassures doubles brins (CDBs): Ces lésions se traduisent par la rupture des deux chaines d'ADN en même temps et à des endroits qui sont distants de plus de trois nucléotides. Le dépôt d'énergie envoyé afin de créer ces lésions doit être supérieur à 100eV/nm³. Ce sont les lésions les plus délétères et cytotoxiques pour la cellule. Ce sont aussi les plus rares puisque l'on dénombre environ 40 CDBs/cellules/Gy. Il a été montré expérimentalement que le nombre de cassures doubles brins est inversement proportionnel au taux de survie cellulaire (Radford, 1986). La réparation de ces cassures peut se faire par Recombinaison Homologue (RH), permettant une réparation fidèle mais nécessitant la présence de la chromatide sœur (phase S/G2), ou par recombinaison non-homologue (*Non-Homologous End Joining, NHEJ*) intervenant principalement durant la phase G1, permettant la ligature des deux brins rompus mais donnant lieu dans certains cas à des mutations du gène concerné. La réparation de ces cassures et les altérations de bases puisqu'elle nécessite une machinerie plus lourde et complexe. La mauvaise réparation de ces lésions peut conduire à l'apparition d'aberrations chromosomiques et à une perte de patrimoine génétique.

Les anomalies chromosomiques et chromatidiques : Les chromosomes sont composés de molécules d'ADN associées à des protéines histones ou non histones. Les chromatides (bras du chromosome) sont associées entre elles au niveau du centromère et présentent à leurs extrémités des structures appelées télomères. Les chromosomes sont le support du matériel génétique et de l'hérédité. Lors de la radiothérapie, plusieurs anomalies peuvent survenir et être transmises à la descendance cellulaire. On distingue les **anomalies de nombres** ou **aneuploïdie** (nombre anormal de chromosome), ou les **anomalies de structures** impliquant un chromosome (délétions, inversions, duplications), deux chromosomes (translocations, insertions) ou les chromatides (Figure 6).

A. Les anomalies	intra-chromo	osomiques
------------------	--------------	-----------

Normal	Délétion terminale	Délétion Délétion Anneaux Anneaux erminale interstitielle dicentriques acentriques		Inversion	
X					
Chromosome constitué de deux chromatides soeurs et d'un centromère	Paire de fragments de chromatides (sans centromère) provenant des extrémités des chromosomes	Paire de fragments de chromatides (sans centromère) à l'intérieur des deux bras homologues d'un chromosome	Paire de fragments de chromatides en forme d'anneaux pourvus de centromère et accompagné d'une paire de fragments acentriques	Paire de fragments de chromatides en forme d'anneaux dépourvus de centromère	Retournement d'un fragment dépourvu ou non de centromère

B. Les anomalies inter-chromosomiques

	Normaux	Translocation	Aberration dicentrique	Agglutination
	XX	XX		
Chromosomes constitués de deux chromatides soeurs et d'un centromèreEchange symétrique des parties distales de deux 		Liaison des parties proximales de deux chromosomes. Formation d'un fragment acentrique	Epaississement des chromosomes. Augmentation de la viscosité et de l'adhérence. Trouble de la division et de la réparation	

C. Aberrations chromatidiques

Normaux		Fragments	Lacunes	Echanges	
X	X	X.		XX	
Chromoson deux chromat cen	nes constitués de ides soeurs et d'un tromère	Cassure de la partie terminale d'un bras de chromosome	Cassure à l'intérieur du chromosome	Echange entre les chromatides de deux chromosomes	

Figure 6 : Les anomalies chromosomiques et chromatidiques

(Adaptée de Radiobiology for Radiobilogist, E J. Hall et A J Giaccia, sixième édition, 2006). Représentation des différentes anomalies chromosomiques : (A) intra-chromosomiques, (B) inter-chromosomiques et (C) chromatidiques ainsi que leurs caractéristiques.

On distingue plusieurs types d'anomalies chromosomiques pouvant avoir lieu au sein même d'un chromosome (intra-chromosomique) ou entre deux chromosomes différents (inter-chromosomiques). Les anomalies chromatidiques ont lieu sur l'une des chromatides du chromosome. Toutes ces anomalies sont observables lors de la métaphase où les chromosomes sont bien individualisés et donc facilement visibles au microscope.

Les anomalies chromosomiques ou chromatidiques sont la source principale d'instabilités génomiques décrites comme étant une caractéristique du cancer. Elles ne sont pas décrites comme une capacité fonctionnelle de la cellule cancéreuse *per se* mais plutôt comme une propriété permettant l'acquisition des différentes caractéristiques des cellules tumorales (résistance à l'apoptose, angiogénèse, invasion, etc.). Ces instabilités se produisent à des fréquences élevées dans de nombreux types de cancers et sont associées à une maladie agressive, une résistance aux traitements et un mauvais pronostic. Elles peuvent résulter de la présence de médiateurs inflammatoires aboutissant à une mauvaise ségrégation des chromosomes et une aneuploïdie. En effet, ils peuvent être la cause de dommages à l'ADN, d'anomalies des points de contrôles du cycle cellulaire et de réparation incomplète de l'ADN. Les instabilités génomiques sont démontrées comme étant des sources importantes de diversité génétique intra- et inter-tumorale ce qui génère des populations cellulaires différentes pouvant présenter une plus forte agressivité et résistance.

La mesure des anomalies chromosomiques est très largement utilisée pour les études de radioprotection et est un bon indicateur de l'exposition aux rayonnements ionisants. En effet, il est maintenant bien établi que le nombre d'anomalies augmente en fonction de la dose d'exposition. Plusieurs méthodes sont actuellement utilisées pour les détecter telles que **le caryotype**, **l'Hybridation In Situ Fluorescente** (*Fluorescence In Situ Hybridization ; FISH*) ou le **test des micronoyaux (MN)**. Le caryotype permet de visualiser l'ensemble des chromosomes d'une cellule grâce à la coloration Giemsa. Le FISH se fait grâce à des sondes spécifiques de séquences nucléotidiques permettant de repérer la localisation d'un gène ou d'une séquence d'intérêt et donc de mettre en évidence d'éventuelles translocations ou délétions. Enfin, il est maintenant bien établi que le nombre de MN est relié à l'instabilité génomique de la cellule. Un MN est défini dans le « Glossary of Genetics and Cytogenetics » de Rieger et coll (1968) comme « un petit noyau surnuméraire séparé du noyau principal de la cellule, formé pendant la télophase mitotique et constitué de chromosomes entiers ou de

fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales (cassures de l'ADN), spontanées ou expérimentales, des chromosomes ». Ils peuvent être encapsulés dans une membrane nucléaire et sont, mise à part leur taille, similaire au noyau. Ils ont été identifiés et décrits dans des érythrocytes par les hématologistes William Howell et Justin Jolly et associés à une carence en vitamines telles que le folate ou la vitamine B12 (Stopper et al., 2008). L'association entre les MN et l'exposition aux radiations ionisantes a été décrite pour la première fois en 1959 sur des cellules de racines de *Vicia Faba* (Evans et al., 1959). Le test des MN est basé sur la numération d'entités nucléaires (les micronoyaux) présents dans le cytoplasme des cellules et dont le diamètre est inférieur de celui du noyau principal.

b. Les mitochondries

Bien que le noyau soit le compartiment le plus sensible de la cellule aux rayonnements ionisants, l'irradiation du cytoplasme a également un effet mutagène notamment dû à l'altération des différentes organelles comprises dans le cytoplasme, en particulier **les mitochondries**. En effet, l'irradiation va impacter la structure, la fonction et la dynamique de ces organelles.

Les mitochondries occupent 4 à 25% du volume de la cellule et sont le siège de la respiration cellulaire. La principale fonction des mitochondries est sans aucun doute la production d'ATP via la phosphorylation oxydative (Figure 7).

La synthèse d'ATP, couplée à l'activité de la chaine respiratoire, est réalisée par un ensemble de réactions chimiques faisant appel à des réactions d'oxydo-réductions à partir de cofacteurs de haute énergie tels que le NADH, le FADH2 et le Succinate. L'entrée des substrats de la chaine respiratoire se fait au niveau du complexe I et du complexe II puis tous les électrons sont transférés au niveau du complexe III. Ce transfert d'électrons est couplé à un flux de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire créant une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne ainsi qu'un gradient de protons. La différence de potentiel combinée à ce gradient constitue la force protomotrice permettant la synthèse d'ATP à partir d'ADP au niveau du complexe V. Il est connu que la chaine respiratoire est une source permanente de ROS via l'échappement d'électrons célibataires réagissant avec l'oxygène afin de former l'anion superoxyde.

Cytoplasme



Figure 7 : La chaine respiratoire mitochondriale.

(Adaptée de Hamanaka and Chandel, 2010). Elle est formée de 5 complexes multiprotéiques : le complexe I (*NADH-ubiquinone oxydoreductase*), le complexe II (*Succinate déshydrogénase ou Succinate-ubiquinone oxydoreductase*), le complexe III (*Ubiquinol ferricytochrome c oxydoreductase*), le complexe IV (*cytochrome c oxidase*) et le complexe V (*ATP synthase*). Elle fonctionne grâce à des réactions d'oxydo-réductions permettant un transfert d'électrons au sein des différents complexes ainsi qu'un gradient de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. Ces protons repassent ensuite vers la matrice mitochondriale via le complexe V permettant ainsi la synthèse d'ATP. La fuite d'électrons de la chaine respiratoire participe à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, en particulier l'anion superoxyde.

Les mitochondries forment au sein de la cellule un réseau dynamique régi par des phénomènes de fusion et fission mitochondriales. Ces phénomènes sont influencés par la demande en énergie des cellules ainsi que leur environnement. La fission peut contribuer à la biogénèse des mitochondries et est associée à une diminution de la production d'énergie. A l'inverse, la fusion sert de contrôle qualité des mitochondries, en permettant le partage des lipides ou des protéines, ainsi qu'à l'augmentation de la production d'énergie dans la cellule (Azzam et al., 2012) (Westermann, 2012). Les mitochondries ont également la capacité de se déplacer le long des microtubules grâce à des protéines telles que les kinésines et les dynéines afin de se rendre dans les zones très demandeuses en énergie.

L'irradiation entraine une altération de la structure mitochondriale, se traduisant par une augmentation de la taille et du volume, ainsi que de ses fonctions (Kergonou et al., 1981) (Shen et al., 1989) (Nugent et al., 2007) (Dayal et al., 2009). Concernant la chaine respiratoire mitochondriale, Barjaktarovic *et coll* ont démontré qu'une irradiation de 2Gy (rayons X) provoque une inactivation partielle des complexes I et III associée à une augmentation de ROS (Barjaktarovic et al., 2011). De plus, une mutation du complexe II dans des fibroblastes de hamster provoque une augmentation du niveau de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène ainsi qu'une plus forte radiosensibilité des cellules (Azzam et al., 2012). D'autre part, Kobashigawa *et coll* montrent que l'irradiation augmente la fission mitochondriale via l'accumulation de la protéine Drp1 (*Dynamin-related protein 1*) en vu de retarder la production d'anion superoxyde et les dysfonctions mitochondriales radio-induites (Kobashigawa et al., 2011).

Le génome mitochondrial est haploïde, circulaire et code **13 protéines** participant à l'assemblage des différentes sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire. Les sous-unités du complexe II sont codées par l'ADN nucléaire. L'irradiation est capable d'induire des dommages à l'ADNmt tels que des CDBs, de grandes délétions ou encore des mésappariements de bases (Singh et al., 1985) (Guliaeva et al., 2009) (Rogounovitch et al., 2002).

c. Les membranes

Les lipides et les protéines membranaires peuvent également être les cibles des rayonnements ionisants et jouer un rôle dans les effets délétères de l'irradiation.

La membrane plasmique est une bicouche lipidique composée de phospholipides (phosphoglycérides, sphingolipides, phosphatidyle-inositol), de cholestérol, de glycolipides (sphingomyélines, gangliosides) et de protéines transmembranaires ou périphériques telles que des récepteurs ou des enzymes. Les rayonnements ionisants induisent des **altérations structurales** et **fonctionnelles** au niveau des membranes (Benderitter et al., 1999) (Shadyro et al., 2002) (Somosy, 2000).

Les lipides membranaires sont la cible des rayonnements ionisants. L'irradiation provoque en particulier la peroxydation des lipides polyinsaturés de la membrane plasmique. Le radical lipidique formé peut à son tour réagir avec des molécules d'eau formant ainsi un lipide hydroperoxydé capable d'altérer la fluidité et la perméabilité de la membrane plasmique ainsi que de participer aux dommages de l'ADN (Albanese and Dainiak, 2003) (Klaunig et al., 2011). Ces modulations lipidiques radio-induites vont également provoquer le remaniement des plateformes lipidiques de la membrane plasmique (Niaudet et al., 2017). Ces plateformes sont des structures dynamiques riches en sphingomyéline, cholestérol et surtout en sphingolipides. Ce sont des zones d'ancrage pour des protéines transmembranaires (récepteurs ou enzymes) et elles jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal (Simons and Toomre, 2000). Les sphingolipides, composants essentiels de la membrane plasmique, sont des lipides bioactifs impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la mort cellulaire, la prolifération, la différenciation ainsi que la régulation des voies de transduction du signal. Les plus étudiés sont le céramide et la Sphingosine-1-Phosphate (S1P) qui ont des rôles antagonistes. L'irradiation induit très rapidement (quelques minutes) la translocation de l'Asmase (Sphingomyélinase Acide) à la membrane plasmique provoquant la synthèse de céramide à partir de l'hydrolyse de la sphingomyéline (Corre et al., 2013) (Haimovitz-Friedman et al., 1994) (Milhas et al., 2010). Les céramides produits vont ensuite fusionner afin de former de grandes plateformes lipidiques ou rafts et vont être capables de jouer le rôle de second messager en interagissant avec des protéines transmembranaires ou cytoplasmiques et en activant la transduction du signal (Mathias and Kolesnick, 1993) (Haimovitz-Friedman et al., 1994). Ils vont, entre autres, être capable d'activer l'apoptose radio-induite (Gulbins and Kolesnick, 2002).

L'irradiation peut également endommager les protéines cellulaires principalement via la formation de ROS provoquant des oxydations au niveau des acides aminés et par conséquent des changements de conformation secondaire et tertiaire (Davies, 2016). La destruction de certains canaux ioniques va engendrer une perturbation de l'homéostasie cellulaire. De plus, les ionisations et changements de conformation peuvent provoquer des activations ou inactivations de certains récepteurs modulant ainsi les voies de transduction du signal (Valerie et al., 2007). Par ailleurs, il peut également se produire des altérations de certaines protéines de jonction causant des modulations de la perméabilité cellulaire ainsi que de l'équilibre osmotique pouvant causer des dysfonctionnements tissulaires (Somosy, 2000).

Il est à noter que les rayonnements ionisants provoquent également des perturbations au niveau d'autres organelles cellulaires telles qu'une désorganisation du cytosquelette d'actine et des filaments intermédiaires (Friedman et al., 1986) (Anniko et al., 1989) (Somosy et al., 1995), une dilatation, une vésicularisation, une fragmentation et une dégranulation du RE

(Hamberg et al., 1977) (Cammarano et al., 1969) et une fragmentation ainsi qu'une réorganisation de l'appareil de Golgi (Somosy, 2000).

En résumé, les rayonnements ionisants impact la structure et la fonction de différents compartiments cellulaires, notamment le noyau, les mitochondries et les membranes, de manière directe ou indirecte via la production de ROS. Nous verrons dans la partie suivante que ces altérations vont déclencher de nombreux mécanismes de survie cellulaire.

3. Mécanismes de survie cellulaire

a. La réponse antioxydante

Les ROS sont naturellement produit par la cellule en particulier au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale. L'irradiation augmente la formation de ROS notamment via la radiolyse de l'eau. Cependant, d'autres processus peuvent entrainer la formation de ROS après irradiation. Par exemple, les rayonnement ionisants sont capables d'activer des enzymes naturellement producteurs d'anion superoxyde tels que les NOX/DUOX (*NADPH Oxidase/Dual oxidase*), la xanthine oxydase ou encore l'aldéhyde oxydase (Ameziane-El-Hassani et al., 2015). De plus, les dysfonctions mitochondriales radio-induites participent fortement à l'augmentation de ROS dans la cellule. Enfin, l'irradiation peut également activer les enzymes NOS (*Nitric Oxide Synthase*) impliquées dans la production d'autres espèces radicalaires appelées **RNS (***Reactive Nitric Species***)** tel que le NO•.

Afin de pallier à cette production de ROS/RNS, la cellule dispose d'un système complexe de détoxification impliquant des **protéines antioxydantes enzymatiques** et **non enzymatiques** (Figure 8).

En première ligne de défense se trouvent les antioxydants enzymatiques comprenant la Catalase, les Glutathion Peroxydases (GPXs) et les Superoxyde Dismutases (SODs). Ils sont dits antioxydants primaires car ils sont naturellement présents dans toutes les cellules de l'organisme. Ils présentent des isoformes différents de part leur localisation, leurs cofacteurs et leur substrat (Tableau 2).



Figure 8 : Mécanismes principaux de régulation du stress oxydant.

(Adaptée de T.Bahorun et al. 2006). L'O₂ est converti en anion superoxyde ($O_2^{\bullet^-}$) soit par la fuite d'un électron au niveau de la chaine respiratoire, soit par l'activité des enzymes NOX/DUOX, Xanthine oxydase ou Aldéhyde oxydase. L'anion superoxyde est capable de fusionner avec le monoxyde d'azote (NO) afin de former le peroxynitrite (ONOO⁻). Il peut également être converti par les SODs en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui sera transformé en eau (H₂O) et oxygène (O₂) par la Catalase ou en eau par les GPXs. Enfin, il peut donner un radical hydroxyl (OH⁻) qui sera détoxifié par la vitamine C. Les espèces participant à la production de ROS sont en rouge, les antioxydants sont en bleu.

	Catalase	SODs	GPXs
Isoformes		SOD1, 2 et 3	GPX1-8
localisation	Peroxysomes et cytoplasme	SOD1 : Cytoplasme et noyau SOD2 : Mitochondries SOD3 : Espace extracellulaire	GPX1 : Cytoplasme et mitochondries GPX2 : Cytoplasme GPX3 : Cytoplasme et espace extracellulaire GPX4 : Noyau et mitochondries GPX5 : Espace extracellulaire GPX6-8 : ND
Cofacteurs		SOD1 et 3 : Cuivre/Zinc SOD2 : Manganèse	Glutathion réduit (GSH)
Réactions	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2O_2$	$2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$

Tableau 2 : Caractéristiques des différents antioxydants enzymatiques.

Les antioxydants enzymatiques sont la Catalase, les SODs et les GPXs. La Catalase n'a pas d'isoforme alors que l'on en compte 3 pour les SODs et 8 pour les GPXs. Chacune de ces enzymes a une localisation qui lui est propre et nécessite dans certains cas un cofacteur afin de réaliser sa réaction spécifique de détoxification.

Les antioxydants non enzymatiques constituent la deuxième ligne de défense antioxydante et sont dit antioxydants secondaires car la plupart d'entre eux ne sont pas synthétisés par la cellule elle même mais sont apportés lors de l'alimentation. Dans cette catégorie, nous retrouvons, les oligoéléments, les vitamines C et E, les caroténoïdes ainsi que les flavonoïdes. Nous retrouvons également le glutathion qui est synthétisé par la cellule. Les vitamines semblent être les éléments les plus importants dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytoplasme et l'espace extracellulaire et peut capter directement l'O2^{•-} et l'OH[•]. Les oligoéléments tels que le Cuivre, le Zinc, le Manganèse ou encore le Fer sont des métaux essentiels dans les défenses antioxydantes. En effet, ils représentent les cofacteurs nécessaires au maintien de l'activité catalytique des enzymes antioxydantes énoncées précédemment. Le glutathion réduit (GSH) est une molécule formée par la condensation du glutamate, de la cystéine et de la glycine. Il est le cofacteur de la réaction catalysée par les GPXs. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est très utilisé comme marqueur du stress oxydant cellulaire. En effet, plus le taux d'H2O2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé produit. Enfin, les flavonoïdes et caroténoïdes stabilisent les radicaux libres et sont capables de chélater les ions.

b. La détection des dommages à l'ADN

Afin d'adopter la réponse cellulaire appropriée à l'exposition des rayonnements ionisants, la cellule doit en premier lieu détecter les modifications délétères produites dans la molécule d'ADN (lésions et altérations conformationnelles) en émettant un signal d'alarme (phase de signalisation où plusieurs voies moléculaires sont activées parallèlement).

La détection des dommages à l'ADN se fait tout d'abord grâce à des senseurs appartenant à la famille des PI3KK (*Phosphatidylinositol 3-kinase related kinase*) : ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related*), ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) et DNA-PKcs (*DNAdependent protein kinase catalytic subunits*) qui vont induire un arrêt du cycle cellulaire nécessaire pour laisser le temps à la cellule de réparer. Ces trois protéines partagent des domaines communs tels que le domaine HEAT en Nterminal (permettant la jonction avec d'autres protéines), le domaine FAT et le domaine kinase en Cterminal (Bosotti et al., 2000) (Blackford and Jackson, 2017). Elles ont la capacité de s'autophophoryler afin de s'activer. L'autophosphorylation d'ATM se fait sur la sérine 1981 lui permettant de passer de sa forme dimérique inactive à sa forme monomérique active (Azzam et al., 2012). ATR s'autophosphoryle sur la sérine 428 et DNA-PKcs sur la sérine 2056 et la thréonine 2609 (Chan et al., 2002) (Chen et al., 2005) (Liu et al., 2011). Il existe d'autres sites de phosphorylation non identifiés. Beaucoup d'études restent donc encore à faire afin de mieux comprendre leurs rôles et leur importance dans l'activation de ces protéines et leur implication dans la réponse aux dommages de l'ADN (Blackford and Jackson, 2017). Chacune de ces protéines nécessitent la présence de cofacteurs afin d'assurer un recrutement stable sur le site du dommage. Le cofacteur d'ATM est la protéine NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome 1) appartenant au complexe MRN (MRE11, Rad50 et NBS1), celui d'ATR est ATRIP (ATR Interacting protein) et ceux de DNA-PKcs sont les protéines Ku70 et Ku80 (Falck et al., 2005) (Zou and Elledge, 2003) (Singleton et al., 1999). DNA-PKcs est le senseur des CDBs et est activée grâce à son recrutement au site de dommage par les protéines Ku70/80 et par son autophosphorylation formant ainsi la DNA-PK. Une fois activée, ses rôles principaux seront l'inhibition du cycle cellulaire via l'activation de Chk2 (CheckPoint Kinase 2) et l'activation de la voie de réparation NHEJ (Jette and Lees-Miller, 2015). ATM est également senseur des CDBs et permet l'activation d'une centaine de substrats dont certains sont aussi des cibles d'ATR (Matsuoka et al., 2007). Les substrats les plus connus d'ATM sont les protéines Chk2, p53 et l'histone H2AX. La protéine p53 va jouer un rôle central dans l'inhibition du cycle cellulaire puisqu'elle permet notamment la transcription de p21^{WAF1}. La phosphorylation de l'histone H2AX (yH2AX) par ATM permet une amplification du signal de réparation au niveau de la cassure. La détection de cette modification post-traductionnelle est très utilisée afin de repérer et de quantifier les CDBs. ATM est capable d'inhiber le cycle cellulaire et d'activer la réparation de l'ADN par la voie NHEJ ou la RH. Pour finir, la protéine ATR est activée lors du blocage des fourches de réplication ou l'exposition aux UVs (Matsuoka et al., 2007). Contrairement à ATM et DNA-PKcs, ATR est activée par une plus large variété de stress comme les CSBs. Son substrat le plus connu est la protéine Chk1 permettant, tout comme Chk2, l'inhibition de la protéine cdc25 et l'arrêt du cycle cellulaire. Il est important de noter que ces trois protéines peuvent se réguler entre elles ce qui rend l'étude et la compréhension des mécanismes d'activation de la réponse des dommages à l'ADN (*DNA Damage Response*; *DDR*) très compliquée (Blackford and Jackson, 2017)

c. Le blocage du cycle cellulaire

Il est connu que l'irradiation provoque un arrêt du cycle cellulaire suite à la détection des dommages de l'ADN.

Le cycle cellulaire eucaryote est composé de quatre phases successives qui sont : la phase Gap1 (G1), la phase S, la phase Gap2 (G2) et enfin la phase M. Lors de la phase G1 la cellule grossit et sa machinerie de transcription est très active, permettant la production des protéines nécessaires au bon déroulement du début du cycle cellulaire. Lors de la phase S, la cellule réplique son ADN et certaines protéines de réparation de l'ADN sont présentes afin d'éviter l'apparition de mutations lors de la division. Lors de la phase G2 la cellule continue de grossir et de transcrire les protéines nécessaires à la phase M. Cette dernière correspond à la mitose, c'est à dire à la division de la cellule mère en deux cellules filles identiques.

Toutes ces phases s'enchainent de manière successive et coordonnée. Le bon déroulement du cycle est régi par des points de contrôles (*Check points*) veillant au maintien de l'intégrité du génome. Il en existe 3 principaux : (i) lors de la transition G1/S ; (ii) lors de la réplication d'ADN ; (iii) lors de la transition des phases G2/M (Bartek et al., 2004). Ces contrôles sont régis par les complexes Cyclines-Cdks (*Cyclin Dependent Kinase*). La transcription des cyclines varie lors des différentes phases du cycle déterminant ainsi l'activité des Cdks. Ces dernières peuvent également être régulées par d'autres protéines telles que p21^{WAF1}, p16^{INK4a}, p27 ou encore par la phosphatase cdc25 et la kinase Wee1. Les points de contrôle opèrent en empêchant la progression dans le cycle cellulaire si les étapes précédentes n'ont pas été complétées ou si l'ADN est lésé. Ils contrôlent certaines étapes clés comme la synthèse de l'ADN ou encore l'assemblage du fuseau mitotique.

Ces différents points de contrôle sont activés lors de dommages radio-induits de l'ADN ou de modifications de l'intégrité du génome. En particulier, un arrêt en phase G1 est très observé dans les cellules exposées aux rayonnements ionisants de haute et faible énergie. Le nombre de cellules bloquées dans cette phase dépend du type de rayonnement et de la dose reçue. Les protéines p53 et p21^{WAF1} sont principalement impliquées dans cet arrêt en empêchant la transcription de gènes requis pour les étapes suivantes et la progression dans le cycle cellulaire. L'arrêt en phase S est également observé après exposition des cellules aux rayonnements ionisants bien que le mécanisme soit encore mal connu. Il semblerait que le blocage ait lieu avant la synthèse d'ADN, au niveau des fourches de réplication et ferait intervenir la protéine p21^{WAF1}. L'arrêt en G2 se produit lorsque les cellules sont irradiées en fin de phase S ou en phase G2. Cet arrêt est observé particulièrement lorsque les cellules sont irradiées avec des rayons de haute énergie et fait intervenir les protéines telles que p53, p21^{WAF1} ou encore la protéine GADD45 (Passos et al., 2010).

d. La réparation de l'ADN

La détection des dommages suivie par un arrêt du cycle cellulaire permet à la cellule de prendre le temps de réparer afin d'éviter la transmission d'altérations génétiques. Les cellules ont développé plusieurs systèmes de réparation de l'ADN qui agissent en même temps que les points de contrôle.

La réparation par excision de bases (BER) (Figure 9): Ce système de réparation peut avoir lieu dans toutes les phases du cycle et est impliqué dans la réparation des CSBs et des altérations de bases (oxydations, alkylations, déaminations, etc.) (Krokan and Bjørås, 2013). La première étape de cette réparation est l'excision de la base lésée par une glycosylase permettant de rompre la liaison entre la base et le sucre. Le type de glycosylase impliqué dépendra du type de dommage. Le site abasique (AP) résultant sera ensuite reconnu par une endonucléase spécifique : APE1 (A-purinic/A-pyrimidic endonuclease 1) hydrolysant la liaison sucre-phosphate créant ainsi une CSBs avec une extrémité 5'-déoxyribose phosphate. Cette cassure peut ensuite être réparée soit par la voie Long Patch BER (brèche longue - 2 à 10 bases manquantes) soit par la voie Short Patch BER (brèche courte- 1 ou 2 bases manquantes). La voie *Short Patch BER* est le processus majoritaire et met en jeu l'ADN Polymérase β et XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing Protein 1) qui vont remplacer le nucléotide manquant, et l'ADN Ligase III qui ligaturera le brin. La voie Long Patch BER est le processus alternatif et fait intervenir les ADN Polymérases ε ou δ impliquées dans la resynthèse du brin, l'endonucléase FEN1 (Flap Structure-Specifique Endonuclease I) permettant de cliver le brin lésé et la ligase I facilitant la ligature du brin néo-synthétisé (Krokan and Bjørås, 2013).



Figure 9 : Voie de réparation par excision de base (BER). (Adaptée de

. Ce processus intervient lors de CSBs, de l'oxydation, de l'alkylation ou de la déamination de base de l'ADN. Il fait intervenir diverses protéines permettant d'extraire la base lésée, de resynthétiser l'ADN et de reformer le brin de manière identique au brin originel.

La Recombinaison Homologue (RH) (Figure 10) : Cette voie permet la réparation des CDBs et ne peut se réaliser que lorsque la chromatide sœur est présente. Elle a l'avantage de permettre une réparation fidèle sans perte d'information génétique. La RH est initiée par la détection du dommage par le complexe MRN composé des protéines Mre11, Rad50 et NBS1 qui se lient directement à l'ADN. NBS1 permet le recrutement d'ATM au niveau du site de dommage, induisant son activation par autophosphorylation. ATM va ensuite rapidement phosphoryler l'histone H2AX (γ H2AX) afin d'amplifier le signal de réparation. L'initiation de la réparation se fait grâce aux endonucléases MRE11, CtIP (*C-terminal binding protein-interacting protein*) et EXO1 (Exonuclease 1) permettant la résection de l'extrémités 5' au niveau des cassures et la formation de l'extrémités 3' simple brin. Celles-ci sont directement recouvertes et stabilisées par la protéine RPA (*Replication Protein A*) remplacée ensuite par la protéine Rad51 grâce à la protéine Rad52. Rad51 permet la recherche et l'invasion du simple brin dans la région homologue située sur la chromatide sœur, et la formation des jonctions de Holliday (D-loop stabilisée par des jonctions interbrins). Par la suite, les ADN Polymérases ε ou δ vont synthétiser l'ADN manquant à partir du brin matrice de la chromatide sœur. Les jonctions inter-brins vont ensuite se dissoudre ou être clivées engendrant un échange d'information génétique entre les chromatides sœurs (*crossing-over*) (Kanaar et al., 1998) (Iyama and Wilson, 2013) (Hoeijmakers, 2001).

La réparation par recombinaison non homologue (NHEJ) (Figure 10): C'est la voie majoritaire dans la réparation des CDBs. Elle peut avoir lieu dans toutes les phases du cycle mais est prépondérante en phase G1 où la RH n'est pas possible. Contrairement à la RH elle ne nécessite pas la présence de la chromatide sœur et elle est potentiellement mutagène. Elle se déroule en plusieurs étapes successives. La première est la reconnaissance du dommage lors de laquelle, l'hétérodimère Ku70/Ku80 se fixe sur les extrémités libres et permet le recrutement des facteurs de réparations, dont la sous-unité catalytique de la DNA-PK (DNA-PKcs). Ce recrutement au site de dommage va permettre la stabilisation des extrémités libres mais également l'homodimérisation et l'activation de la DNA-PK par autophosphorylation. La seconde étape est le recrutement de l'endonucléase Artémis permettant de rogner les extrémités libres afin de former des extrémités franches. Puis, les ADN Polymérases γ et μ vont ensuite synthétiser le nouveau brin. Enfin, la DNA-PK va permettre le recrutement des protéines du complexe XRCC4 (*X-ray Repair Cross Complementing Protein4*) - ADN Ligase IV-XLF (*XRCC4 Like Factor*) sur le site de cassure afin de ligaturer les deux extrémités franches (Iyama and Wilson, 2013).



Figure 10 : Voies de réparation des cassures doubles brins de l'ADN.

(Adaptée de Iyama and Wilson, 2013). La réparation par la voie NHEJ survient préférentiellement lors de la phase G1 et fait intervenir le complexe Ku70/Ku80/DNA-PKcs/Artemis ainsi que les ADN Polymérases μ et λ et les protéines XRCC4, Ligase4-XLF. Cette réparation est potentiellement mutagène. La recombinaison homologue intervient de manière prépondérante lors des phases S et G2 car elle nécessite la présence de la chromatide sœur. Elle fait intervenir le complexe MRN permettant la reconnaissance de la cassure et les protéines RPA, Rad52, Rad51, les ADN Polymérases ε et δ ainsi que la ligase I. Cette réparation est fidèle et n'est donc pas mutagène.

En résumé, l'activation de ces nombreux mécanismes de réponse cellulaire va permettre à la cellule de réparer ou tolérer les altérations provoquées par les rayonnements ionisants. Nous verrons qu'une mauvaise réparation ou tolérance de ces dommages vont engendrer des devenirs cellulaires pouvant aller de la mort de la cellule jusqu'à la cancérogénèse.

D. Devenir de la cellule

Les rayonnements ionisants induisent donc de nombreux effets délétères au niveau cellulaire : production d'un stress oxydant massif, dommages à l'ADN et altération des membranes. Si, malgré de nombreux mécanismes de défense, la cellule ne parvient pas à réparer ou tolérer ces dommages, ces altérations peuvent aboutir à la mort cellulaire ou la sénescence.

1. L'apoptose radio-induite

Il existe de nos jours une multitude de mort cellulaire classée par le comité de nomenclature de la mort cellulaire (*The Nomenclature Committee on Cell Death*; *NCCD*) selon la morphologie cellulaire observée et les mécanismes moléculaires impliqués (Panganiban et al., 2013) (Galluzzi et al., 2018). Nous nous focaliserons dans cette partie sur l'apoptose radio-induite.

De manière générale, l'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire est caractérisée par une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et du noyau suivie d'un bourgeonnement membranaire (corps apoptotiques) (Kerr et al., 1972). On distingue deux voies moléculaires impliquées dans l'apoptose : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. La première met en jeu des signaux intracellulaires où la mitochondrie joue un rôle central alors que la seconde implique des signaux extracellulaires ainsi que l'activation de récepteurs de mort. La nature et l'origine du signal de mort détermineront l'utilisation de l'une de ces deux voies. Elles ont en commun l'utilisation de Caspases (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*) activatrices et effectrices requises notamment pour la cascade d'activation protéique et la fragmentation de l'ADN (Earnshaw et al., 1999).

La voie intrinsèque est la voie canonique de l'apoptose radio-induite. Elle est caractérisée par une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation*; *MOMP*) ainsi que par le relargage du cytochrome c de la mitochondrie (Panganiban et al., 2013) (Goldar et al., 2015). Ce dernier va ensuite interagir avec les protéines Apaf1 (*Apoptotic protease activating factor 1*) et pro-caspase 9 afin de former l'apoptosome aussi appelé roue de la mort (Azzam et al., 2012). Celui-ci va permettre
l'activation de la caspase 9 initiant une cascade de caspases menant à la mort de la cellule (Srinivasula et al., 1998). La voie apoptotique mitochondriale est régie par les protéines antiet pro-apoptotiques appartenant à la famille Bcl-2 et dont un grand nombre sont des cibles transcriptionnelles de p53 qui est activée en réponse aux dommages à l'ADN (Azzam et al., 2012). La régulation des protéines de la famille Bcl-2 dépendante de p53 passe par différents mécanismes : (i) l'activation de la transcription de certaines protéines comme Bax (*Bcl-2associated X protein*) ou PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) ; (ii) l'inhibition de l'interaction entre les protéines pro-apoptotiques telles que Bax et Bak (*Bcl-A homologous antagonist killer*) et anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xl (*B cell lymphoma extra large*); et (iii) l'oligomérisation de certaines de ces protéines.

La voie extrinsèque est la voie non canonique de l'apoptose. Elle est initiée par l'activation extracellulaire de récepteurs de mort (*Death Receptors*) tels que TRAIL^{*}, CD95/Fas, TNF-R1[†], DR4 et DR5, par leurs ligands correspondants. Suite à leur activation, leurs domaines intracellulaires vont se regrouper formant ainsi des clusters de récepteurs et une amplification du signal de mort. Il s'en suit l'activation de la protéine initiatrice, caspase 8, permettant l'activation des caspases effectrices (caspases 3 et 7) et la mort de la cellule. L'irradiation peut réguler de manière directe l'activation de certains récepteurs de mort comme CD95/Fas et TRAIL par la formation de *clusters* de récepteurs à la membrane, indépendamment de la présence de leurs ligands (Niemöller and Belka, 2009). Leur régulation peut également se faire de manière dépendante ou indépendante de p53 (Bennett et al., 1998) (Wu et al., 1997) (Fei et al., 2002). Il est montré qu'une cellule peut activer de manière simultanée la voie intrinsèque et la voie extrinsèque en réponse à l'irradiation (Eriksson et al., 2009).

Une troisième voie moléculaire impliquée dans l'apoptose radio-induite a été également décrite et met en jeu l'Asmase et le céramide (Haimovitz-Friedman et al., 1994) (Gulbins and Kolesnick, 2002). L'irradiation peut provoquer des réarrangements membranaires ainsi que des altérations lipidiques importantes (Niaudet et al., 2017). En effet, l'activation radio-induite très rapide (quelques minutes post-irradiation) de l'Asmase suivie de sa translocation à la membrane permet l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide (Corre et al., 2013). L'activation de l'Asmase peut être dépendante ou indépendante des caspases (Rotolo et al.,

^{*} Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

[†] Tumor Necrosis Factor Receptor 1

2005). L'agrégation du céramide en clusters va permettre la formation de *rafts* ou plateformes lipidiques. Elles vont être impliquées dans la transduction du signal en activant la translocation de Bax à la membrane mitochondriale, en favorisant le relargage du cytochrome c ou en activant la protéine p38MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (Lee et al., 2011) (Mondal et al., 2010) (Niaudet et al., 2017). Ces processus vont jouer un rôle dans la mort cellulaire radio-induite en particulier au niveau des cellules endothéliales (Haimovitz-Friedman et al., 1994) (Lin et al., 2000) (Kolesnick and Fuks, 2003) (Stancevic and Kolesnick, 2010). La génération du céramide est décrite comme un processus indépendant des dommages à l'ADN et de l'activation de p53. Cependant, il a été démontré, dans des lymphoblastes, que la mort cellulaire provoquée par la génération du céramide peut être due à l'activation de la transcription de la Céramide Synthase (CS) elle même sous le contrôle de p53 (Vit and Rosselli, 2003). Il s'agit dans ce cas d'une seconde vague plus tardive de céramide (quelques heures post-irradiation) dépendante de la première vague précoce (quelques minutes post-irradiation).

2. La sénescence

La sénescence, ou vieillissement cellulaire, a été décrite en 1961 par Leonard Hayflick et Paul Sidney Moorhead comme un arrêt de la prolifération cellulaire. Les auteurs ont mis en évidence une capacité limitée de divisions de fibroblastes humains non-transformés en fonction du nombre de passage en culture (Hayflick and Moorhead, 1961). Après ces expériences nait la notion de « limite de Hayflick » correspondant au nombre de division maximale (50-70 fois) d'une cellule normale en culture. Ce processus de vieillissement cellulaire, dû au dépassement du seuil de réplication, est appelé sénescence réplicative. La sénescence peut également être provoquée de manière prématurée, par des stress tels que l'irradiation ou la surexpression d'oncogènes tels que Ras. Nous développerons dans les parties suivantes les caractéristiques communes à toutes cellules sénescentes puis les spécificités de la sénescence induite par l'irradiation.

a. Caractéristiques morphologiques et moléculaires

La principale caractéristique des cellules sénescentes est leur arrêt dans le cycle cellulaire et leur incapacité à répondre aux stimuli mitogéniques. Cet arrêt du cycle est dû principalement à la surexpression des protéines p53, p21^{WAF1} et/ou p16^{INK4a}. Les cellules sénescentes présentent une morphologie large et étalée ainsi qu'une activité β -galactosidase importante. Cette enzyme est une hydrolase ubiquitaire localisée dans les lysosomes et ayant une activité maximale à pH4. Lors de la sénescence, son activité augmente permettant sa détection à pH6 et entrainant la coloration du cytoplasme des cellules sénescentes en bleu (Figure 11) (Gary and Kindell, 2005) (Debacq-Chainiaux et al., 2009). C'est le marqueur le plus utilisé afin d'identifier les cellules sénescence, la spécificité de ce test a été plusieurs fois remise en cause (Severino et al., 2000) (Yang and Hu, 2005). Néanmoins, il s'agit encore aujourd'hui d'une méthode efficace largement acceptée si elle est couplée à d'autres techniques comme par exemple la détection des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire.



Figure 11 : Observation microscopique de cellules sénescentes. (Tirée de http://www.sci-news.com/medicine/senolytic-drugs-lifespanphysical-function-aging-mice-06191.html). Observation *in vitro* de cellules sénescentes présentant une morphologie large et étalée et positives pour la β -galactosidase (cellules bleues).

Les cellules sénescentes sont également caractérisées par une résistance aux stimuli apoptotiques comme la déprivation en facteurs de croissance ainsi que la persistance de dommages à l'ADN généralement sous formes de **foyer γH2AX** ou **53BP1** (*p53 Binding Protein 1*) (Siddiqui et al., 2015). En effet, les dommages à l'ADN causés par un stress ou par l'attrition des télomères sont la cause principale de l'entrée en sénescence de la majorité des cellules. Comme énoncé précédemment, ces dommages vont causer l'activation de différentes cascades de signalisations, dont la protéine p53 est l'acteur central, aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire. Le maintien d'un niveau seuil de dommage à l'ADN renforce le phénotype sénescent via l'activation de p53 et la sécrétion de cytokines comme l'IL-6 (Rodier et al., 2009) (Rodier et al., 2011). Il est également observé des foyers condensés d'hétérochromatine appelés SAHF (*Senescences Associated Heterochromatin Foci*) contenant notamment des histones H3 modifiés et des protéines d'hétérochromatine comme HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (Narita et al., 2003). Ceux-ci permettent probablement la répression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Adams, 2007).

b. Caractéristiques sécrétoires

Les changements importants d'expression génique des cellules sénescentes sont associés à l'augmentation ou à la diminution de l'expression de nombreuses protéines notamment de protéines sécrétoires. En effet, il est démontré que le milieu conditionné de cellules sénescentes est enrichi en protéines et que certaines d'entre elles sont différentes selon le type cellulaire (Shelton et al., 1999) (Young and Narita, 2009) (Davalos et al., 2010). Ce sécrétome particulier est appelé SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*) ou SMS (*Senescence-Messaging Secretome*) (Young and Narita, 2009) (Kuilman and Peeper, 2009). Le SASP peut différer d'un point de vu quantitatif et qualitatif selon le type de stress ou le type cellulaire. Il est généralement composé de 40 à 80 facteurs solubles et insolubles qui peuvent être décomposés en sous-catégories : (i) les facteurs de signalisation solubles, (ii) les protéases extracellulaires (iii) les facteurs insolubles et (iv) les facteurs non protéiques (Coppé et al., 2010).

i. Les facteurs de signalisation solubles

Les facteurs de signalisation solubles sont les composants majeurs du SASP. Ils comprennent des facteurs de croissance et des cytokines. Ces dernières sont des glycoprotéines comparables aux hormones classées par rapport à leur homologie de structure. Elles ont une fonction de signalisation via l'activation de leur récepteur de manière paracrine, autocrine, endocrine et juxtacrine. Parmi les cytokines se trouvent principalement les interleukines et les chimiokines (facteurs chimiotactiques).

L'une des cytokines les plus présente du SASP est l'interleukine-6 (IL-6). Il est montré dans de nombreux modèles cellulaires que l'expression de cette cytokine pro-inflammatoire augmente fortement lors de la sénescence induite par les dommages à l'ADN ou par un oncogène (*Oncogène Induced Senescence ; OIS*) (Kuilman et al., 2008). Sa sécrétion semble être directement régulée par l'activation persistante des protéines de la DDR (ATM et Chk2)

indépendamment de p53 (Rodier et al., 2009). Elle est impliquée dans le maintien de la sénescence via sa fixation à son récepteur IL-6R gp80/gp130.

Deux autres cytokines prépondérantes du SASP sont les interleukines IL-1 α et IL-1 β . Il est montré que ces protéines sont surexprimées dans les cellules endothéliales, les fibroblastes ainsi que dans les cellules épithéliales sénescentes (Kumar et al., 1992) (Davalos et al., 2010).

La plupart des cellules sénescentes surexpriment des chimiokines à motifs CXCL (CXCL1, -2, -5, -6 et -8) et CCL (CCL-2^{*}, -3, -7, -8, -13, -16, -20 et -26) (Coppé et al., 2010). Toutes les chimiokines exercent leurs effets via l'activation de différentes voies de signalisation lors de leur fixation sur les récepteurs couplés aux protéines G (*G Protein-Coupled Receptor*; *GPCR*) (CXCR1-7). Ces récepteurs ont une structure à 7 domaines transmembranaires (Figure 12).



Figure 12 : Activation des récepteurs couplés aux protéines G. A l'état inactif, la protéine Ga interagit avec le GDP et les protéines G β et G γ . L'activation par un ligand dissocie la sous unité Ga des sous unités Gß et Gy. Le GDP est remplacé par le GTP. Il s'en suit l'activation d'effecteurs, de voies de signalisation et la transcription de différentes protéines impliquées dans divers processus cellulaires.

A l'état inactif, la protéine G est composée de 3 sous-unités (G α , G β et G γ). La sousunité G α est alors liée à une molécule de GDP (*Guanosine DiPhosphate*) au niveau de son domaine GTPase. Lors de l'activation du récepteur par des ligands, des photons, des ions ou encore des lipides, un changement de conformation favorise le couplage du récepteur à la protéine G α . Le GDP est expulsé et remplacé par une molécule de GTP entrainant la dissociation de la sous-unité G α -GTP de la sous unité G $\beta\gamma$. Les sous-unités vont alors

^{*} CCL-2 est plus connue sous le nom de MCP-1

pouvoir activer différents effecteurs membranaires ou cytoplasmiques comme l'Adenylate Cyclase (AC) ou la Phospho-Lipase C (PLC) qui vont à leur tour activer des messagers secondaires. Ceci se conclue par une activation de différentes voies de signalisation (PI3K/Akt/mTOR^{*}, Ras/Raf/MEK/ERK[†], P38MAPK, etc.) ainsi que par l'expression de différents gènes cibles impliqués dans l'angiogénèse (HIF1[‡], NF κ B[§]), la survie (AP-1 (*Activator Protein-1*), NF κ B), la prolifération (STAT3^{**}, AP-1), ou encore l'invasion (STAT3, β -catenin). Toutes les chimiokines ne se fixent pas sur le même récepteur. Par exemple, CXCR1 est le récepteur spécifique de CXCL8 alors que CXCR2 est le récepteur de plusieurs cytokines comme CXCL5 ou CXCL8 (Baggiolini et al., 1997).

Les voies de signalisation activées par les facteurs de croissance de la famille IGFs et leurs récepteurs IGFR (*IGF-binding proteins Receptor*) jouent également un rôle dans la sénescence. En effet, il est démontré que les cellules endothéliales, épithéliales et fibroblastiques sénescentes expriment un niveau très élevé d'IGFBPs (*IGF-binding proteins*) telles que IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, et -6. De plus, il est également observé que le niveau d'IGF est plus élevé dans des chondrocytes de rats âgés (6 à 14 mois) par rapport aux chondrocytes de rats plus jeunes (2 mois) (Rousseau et al., 1998). Enfin, l'inhibition d'IGF-1R prévient la sénescence radio-induite des cellules endothéliales (Panganiban and Day, 2013).

Il existe d'autres facteurs solubles associés au sécrétome des cellules sénescentes. Par exemple, les cytokines inflammatoires appartenant à la famille des CSF (*Colony Stimulating Factor*) sont surexprimées dans des fibroblastes sénescents (Coppé et al., 2008). Les protéines PGE2 (Prostaglandine 2) et COX2 (*Cyclo-Oxygénase 2*) sont également surexprimées dans les cellules sénescentes.

^{*} Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases/ Akt/ mechanistic Target Of Rapamycin

[†] Extracellular Signal-Regulated Kinase

[‡] Hypoxia Inducible Factor 1

[§] Nuclear factor-kappa B

^{**} Signal Transducer and Activator of Transcription 3

ii. Les protéases extracellulaires

Outre la sécrétion de cytokines et facteurs de croissance, les cellules sénescentes sont caractérisées par la production et la sécrétion de protéases telles que les métalloprotéases matricielles (MMPs) ou les protéases à sérine.

Les MMPs sont une famille d'enzymes protéolytiques (protéases) caractérisées par la présence d'un ion Zn²⁺ lié à 3 résidus histidine au sein de leur site catalytique. Il en existe 23 types chez l'homme et elles sont impliquées, entre autres, dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Elles sont synthétisées et sécrétées sous forme de proenzymes inactives. L'activation se fait par protéolyse de la partie N-terminale dans le milieu extracellulaire ce qui libère le site actif de la protéine. Il existe une multitude de peptidases activatrices des MMPs telles que la plasmine, l'élastase ou encore les MMPs elles mêmes. Parmi les inhibiteurs de MMPs, on retrouve l' α -macroglobuline et les TIMPs (*Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases*) qui forment des complexes non-covalents avec la forme active de l'enzyme. Elles régulent des processus physiologiques, tels que l'embryogénèse ou la cicatrisation cutanée, ou pathologiques comme l'angiogénèse tumorale ou les métastases. Il est démontré que les MMPs (MMP-1, -3 et -10) sont surexprimées dans des fibroblastes murins et humains en sénescence réplicative ou prématurée. Les MMPs sécrétées par les cellules sénescentes sont capables de moduler l'activation d'autres facteurs du SASP comme CXCL8, MCP-1,-2 ou -4 (McQuibban et al., 2002).

Les protéases à sérine font partie d'une autre famille de protéases présentant au sein de leur site actif un résidu sérine. Les plus connues sont la trypsine, l'élastase et la thrombine impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la coagulation, la réponse immunitaire ou encore la digestion. On retrouve également dans cette famille les activateurs du plasminogène tPA (*Tissu Plasminogen Activator*) et l'urokinase (*Urokinase type plasminogen activator*; uPA) jouant un rôle dans la fibrinolyse et la dégradation de la MEC et pouvant être inhibés par PAI-1 (*Plasminagen Activator Inhibitor type-1*). Des études récentes démontrent une sécrétion accrue de PAI-1 par les cellules sénescentes aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Eren et al., 2014) (Özcan et al., 2016).

iii. Les facteurs insolubles

Ces facteurs font référence aux lipides et aux différents composants de la MEC. Il est, par exemple, démontré une augmentation du niveau de céramide dans les fibroblastes sénescents. De plus, le traitement de fibroblastes avec du céramide exogène induit la sénescence (Venable et al., 1995) (Mouton and Venable, 2000). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que la fibronectine est surexprimée dans les cellules sénescentes (Kumazaki et al., 1991) (Kumazaki, 1992). Cette glycoprotéine est un constituant de la MEC et interagit avec une variété de molécules telles que les récepteurs membranaires (intégrines), les composants du cytosquelette ainsi que les autres macromolécules de la MEC permettant la régulation de l'adhésion, la survie, la croissance ainsi que la migration cellulaire. Le profil de sécrétion du collagène et de la laminine (autres composants de la MEC) dans le contexte de la sénescence est également altéré.

iv. Les facteurs non protéiques

Les cellules sénescentes peuvent également sécréter des facteurs non protéiques comme des ROS/RNS ou des ions dont la production augmente en réponse aux changements métaboliques induits lors de la sénescence. Il a été démontré que l'altération des NOS dans les cellules sénescentes provoque la sécrétion de NO et des ROS (Sato et al., 1993) (van der Loo et al., 2000). Ces molécules peuvent être impliquées dans des modulations phénotypiques importantes comme la différenciation des monocytes. Elles peuvent également être impliquées dans l'augmentation de l'agressivité tumorale.

De manière générale, la majorité des composants du SASP sont régulés au niveau transcriptionnel en particulier par les voies NFκB et C/EBPβ (*CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta*). Les protéines p53 et p16^{INK4a} ne sont pas requises pour le SASP. En effet, la surexpression de p16^{INK4a} induit la sénescence des cellules mais celles-ci sécrètent les facteurs du SASP à un taux très faible (Coppé et al., 2011). De plus, l'inactivation de p53 dans des cellules sénescentes accélère le développement du SASP et augmente l'expression et la sécrétion de nombreux facteurs (Coppé et al., 2008) (Coppé et al., 2010). A l'inverse, certaines protéines participant à la DDR (ATM, Chk2, NBS1, etc.) sont requises pour l'expression de nombreux facteurs du SASP comme CXCL8 ou l'IL-6 (Rodier et al., 2009).

Il est notamment montré qu'un niveau chronique de dommages à l'ADN est nécessaire pour maintenir le SASP (d'Adda di Fagagna, 2008). En effet, l'inactivation de certaines protéines participant à la réparation de l'ADN comme ATM prévient l'augmentation d'expression de CXCL8, de l'IL-6 ou encore certains facteurs de croissance. De plus, lorsque la sénescence est induite par simple expression de p16^{INK4a} et de p53 sans activation de la DDR ou si cette activation est faible et transitoire, aucune molécule du sécrétome n'est détectée (Rodier et al., 2009). Ces études montrent donc que le SASP est induit de manière dépendante des dommages à l'ADN mais indépendante de l'arrêt du cycle cellulaire. Néanmoins, la DDR est nécessaire mais non suffisante pour l'expression du SASP, suggérant l'implication d'autres voies moléculaires. Il a par exemple été montré que la protéine p38MAPK est impliquée dans l'activation du SASP de manière indépendante des dommages de l'ADN (Freund et al., 2011).

c. La sénescence induite par l'irradiation

La sénescence induite pas le stress, également appelée sénescence « prématurée » ou « accélérée », peut être induite par différents stress : (i) géniques comme la surexpression d'un oncogène ; (ii) chimiques comme la chimiothérapie ou les pesticides ; (iii) ou physiques tels que les rayonnements ionisants. Différentes voies moléculaires peuvent être mises en jeu.

Les rayonnements ionisants induisent directement ou indirectement une augmentation des dommages à l'ADN activant des voies de signalisation diverses menant à la réparation ou à la mort des cellules. Il est montré que des dommages peuvent **persister** et provoquer la sénescence via un arrêt prolongé du cycle cellulaire dans les phases G1 et G2 (Figure 13). En effet, comme énoncé précédemment, la protéine ATM est capable de s'activer en réponse aux dommages à l'ADN et entraîne la stabilisation et l'activation des protéines Chk2, p53 et AMPK (*Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase*) (Sanli et al., 2010). L'activation de Chk2 va permettre la séquestration de la protéine Cdc25C dans le cytoplasme et par conséquent l'inhibition du complexe CyclineB1/CDK1 impliqué dans la transition G2/M. L'activation de p53 et de l'AMPK est également impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire notamment via l'activation de l'expression de p21^{WAF1}. Cette protéine va inhiber les transitions G2/M et G1/S respectivement via l'activation de la protéine APC/C^{CDH1} et l'inhibition des complexes CyclineD1/CDK4-6 et CyclineE/CDK2. La voie

p53/p21^{WAF1} est montrée comme étant primordiale dans l'initiation de la sénescence. Cependant, la maintenance de la sénescence est due à deux autres acteurs moléculaires, p16^{INK4a} et Rb, exprimés secondairement après p53 et p21^{WAF1} (te Poele et al., 2002). En effet, l'activation de p53/p21^{WAF1} est un processus très précoce dans l'induction de la sénescence qui vient à diminuer au cours du temps, laissant place à l'activation de la voie p16^{INK4a}/Rb. De plus, l'inhibition de p53 avant l'activation de p16^{INK4a} permet de reverser le phénotype sénescent. Ce n'est pas le cas si la protéine p16^{INK4a} est déjà exprimée (Robles and Adami, 1998) (Kim et al., 2014).



Figure 13 : Schéma des principales voies moléculaires impliquées dans la sénescence radio-induite. L'irradiation provoque directement ou indirectement (flèche rouge) via, par exemple, la production de ROS mitochondriaux des dommages à l'ADN déclenchant l'activation de la protéine ATM. Cette dernière permet la stabilisation et l'activation des protéines p53, Chk2 et AMPK responsables de l'activation d'une cascade de signalisation menant à l'inhibition des complexes CyclineB1/CDK1, CyclineD1/CDK4-6 et CyclineE/CDK2 et l'arrêt du cycle cellulaire en phases G2 et G1. L'inhibition prolongée de ces complexes participe à la sénescence cellulaire. L'irradiation provoque également la sénescence via des altérations métaboliques se traduisant par une augmentation de la glycolyse via l'activation de l'AMPK, de l'expression de MCT1 associée à une sécrétion de lactate importante. Les ROS mitochondriaux activent la voie NFκB responsable de la transcription des facteurs du SASP pouvant maintenir l'activation de la sénescence de manière autocrine.

D'autres part, il a été montré que la sénescence radio-induite peut également être associée à des altérations métaboliques telles que l'augmentation de la glycolyse dépendante de l'AMPK et l'augmentation de l'excrétion du lactate via la surexpression de MCT1 (Monocarboxylate transporter 1) (Liao et al., 2014). De plus, la déplétion des mitochondries in vivo prévient l'apparition des cellules sénescentes ainsi que l'expression de certains facteurs du SASP (Correia-Melo et al., 2016). Par ailleurs, comme nous l'avons énoncé précédemment, des modulations radio-induites de l'activité de la chaine respiratoire mitochondriale ou un défaut de la réponse anti-oxydante sont associés à une production de ROS et en particulier de l'anion superoxyde. Ceux-ci jouent un rôle très important dans l'entrée en sénescence des cellules (Moiseeva et al., 2009) (Passos et al., 2010) (Shimura et al., 2016). Par exemple, des souris déficientes en SOD2 ont une activité du complexe II de la chaine respiratoire altérée ce qui engendre des dommages à l'ADN ainsi que la sénescence des cellules (Coppé et al., 2006). Les ROS produits lors de l'irradiation peuvent également, en retour, provoquer des dommages au niveau de la chaine respiratoire ou de l'ADNmt. Il se produirait alors un cercle vicieux entre les altérations mitochondriales et la production de ROS. Celui-ci semble jouer un rôle très important dans le processus de sénescence (Chan, 2006). Cependant, il n'est pas encore démontré quel phénomène survient en premier. Les ROS mitochondriaux vont également activer la voie NFKB permettant l'activation de la transcription de certains facteurs du SASP capables de renforcer la sénescence de manière autocrine.

3. La catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique est décrite comme un mécanisme anti-tumoral non létal précédant ou non la mort cellulaire ou la sénescence (Galluzzi et al., 2018). Ce processus peut survenir après irradiation et se caractérise par l'apparition de cellules géantes composées généralement de plusieurs noyaux (cellules polynucléées) morphologiquement anormaux et d'un ou plusieurs micronoyaux reconnus comme étant des marqueurs de ce processus (Maier et al., 2016). Son étude se fait généralement par microscopie puisqu'aucune voie moléculaire n'est véritablement décrite et que sa définition repose sur des modulations phénotypiques (taille de la cellule, nombre de noyaux et de micronoyaux) (Rello-Varona et al., 2010). Elle résulte d'une combinaison de défauts au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire ou des capacités de réparation des dommages radio-induits de l'ADN provoquant des mitoses

anormales accompagnées d'anomalies de ségrégation des chromosomes ainsi que des aberrations chromosomiques aboutissant dans certains cas à l'activation des voies de mort cellulaire (Galluzzi et al., 2018).

De manière intéressante, certaines cellules vont échapper aux processus de mort qui suivent la catastrophe mitotique et vont pouvoir continuer à se diviser. Toutefois, ces cellules présentent généralement des défauts de cytokinèse (mécanisme de séparation des deux cellules filles à la fin de la mitose) provoquant alors l'apparition de grosses cellules polynucléées. Si les cellules ont une protéine p53 sauvage, elles vont pouvoir entrer en apoptose dépendante de Bax (Castedo et al., 2006). Cependant, les cellules présentant une protéine p53 mutée, comme c'est le cas dans presque 50% des cellules tumorales, vont continuer de se diviser pendant plusieurs cycles et augmenter leur niveau d'aberrations chromosomiques. Ce phénomène d'échappement à la mort cellulaire malgré la présence d'anomalies chromosomiques peut jouer un rôle important dans la tumorigénèse. En effet, les instabilités génomiques, susceptibles de faire perdre à la cellule un fragment de chromosome contenant potentiellement un gène suppresseur de tumeur, pourraient diriger les cellules vers la cancérisation.

Bien que certains mécanismes décrivant les causes de la catastrophe mitotique ont été mis en évidence, le lien entre les aberrations mitotiques observées et la mort de la cellule sont encore très peu connus.

*

Comme résumé en figure 14, la radiobiologie a permis de mettre en évidence que les rayonnements ionisants provoquent, via des effets directs et indirects, des lésions dans les structures cellulaires par altérations des molécules constitutives de la cellule (Figure 14).



Figure 14 : Schéma récapitulatif des différents effets de l'irradiation sur la cellule et des devenirs cellulaires associés.

Les cellules ont mis en place des réponses efficaces afin de contrer ces lésions radioinduites passant, par exemple, par l'arrêt du cycle cellulaire afin de laisser le temps à la cellule d'activer les différents systèmes de réparation de l'ADN. Cependant, la persistance ou la mauvaise réparation de lésions de l'ADN peuvent provoquer des instabilités génomiques importantes qui sont la source de diversités génétiques intra- et inter-tumorale impliquées dans l'apparition de populations cellulaires différentes et pouvant présenter une plus forte agressivité et résistance.

A retenir

- Les rayonnements ionisants agissent directement ou indirectement via la production de ROS.
- La mesure de la radiosensibilité se fait par test clonogénique.
- Les rayonnements ionisants peuvent créer des dommages sur l'ADN, les mitochondries et les membranes.
- La mauvaise réparation des dommages radio-induits peut provoquer la tumorigénèse.
- La persistance des dommages radio-induits peut aboutir à différents devenirs cellulaires dont la sénescence caractérisée par un sécretome particulier (SASP).

II. La radiothérapie comme traitement anticancéreux

La radiobiologie a permis le développement de techniques médicales comme la radiothérapie. Cette technique est utilisée comme traitement anticancéreux depuis la découverte des rayons X. Elle exploite les propriétés des rayonnements ionisants dans le but de tuer les cellules cancéreuses. L'émission de faisceaux focalisée sur la tumeur en fait un traitement locorégional, contrairement à la chimiothérapie qui est un traitement systémique. Un français sur trois développe un cancer au cours de son existence. Selon l'Institut National du Cancer (INC), on récence chaque année 400 000 nouveaux cancers en France. Environ 60% des patients bénéficient, à un moment de leur maladie cancéreuse, d'un traitement par irradiation et plus de la moitié au moment de la phase initiale de leur cancer. La radiothérapie cible préférentiellement les cellules en prolifération ce qui en fait donc un traitement anticancéreux efficace. Elle peut être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres thérapies (chimiothérapie, chirurgie, thérapies ciblées, etc.) et permet de traiter 40% des cancers. Ce traitement possède donc un pouvoir curatif important en cancérologie. Elle joue également un rôle important dans le soulagement des symptômes cancéreux et notamment la douleur. Nous décrirons dans cette partie les différentes utilisations de la radiothérapie, les principes faisant de cette technique un traitement anticancéreux efficace, les différents types d'applications ainsi que ses limites en prenant comme exemple le glioblastome (GBM).

A. Utilisation de la radiothérapie

1. Traitement locorégional curatif

Le premier avantage de la radiothérapie est sans aucun doute son pouvoir curatif. En effet, plus d'un tiers des patients atteints de cancer seront guéris par ce traitement seul ou en combinaison avec d'autres traitements comme la chirurgie ou la chimiothérapie. De plus, la radiothérapie est un traitement locorégional lui permettant d'avoir un effet conservateur. En effet, lors du traitement, seule la tumeur et une minorité de tissus avoisinants sont irradiées. Les organes vitaux à distance seront épargnés par les rayons, maintiendront leurs fonctions et donc la qualité de vie du patient traité.

2. Combinaison avec d'autres traitements

La radiothérapie peut être utilisée seule (radiothérapie exclusive) ou en combinaison avec d'autres traitements tels que la chirurgie ou la chimiothérapie.

On parle de radiothérapie néoadjuvante lorsque celle-ci est utilisée avant la chirurgie dans le but de diminuer la taille de la tumeur afin de faciliter l'intervention. Elle peut également être utilisée au cours de l'intervention chirurgicale. Elle est alors appelée radiothérapie peropératoire ayant pour but d'exposer directement la tumeur résiduelle à une dose unique élevée de rayons, ce qui réduit l'irradiation des tissus sains. Enfin, elle peut être réalisée après la chirurgie et est appelée radiothérapie adjuvante. Elle complète la chirurgie en détruisant les éventuelles cellules cancéreuses restantes afin de diminuer le risque de récidive locale.

La radiothérapie peut également être utilisée en combinaison avec la chimiothérapie (Steel and Peckham, 1979). Ce traitement est appelé radio-chimiothérapie. Il est établi dans beaucoup de cancer que la combinaison de ces deux traitements augmente la survie globale par rapport au traitement seul. Les molécules chimiothérapeutiques utilisées peuvent augmenter l'efficacité de la radiothérapie en radiosensibilisant la tumeur ou en ciblant les cellules tumorales présentes hors du champs d'irradiation. De plus, si de fortes doses de traitement seul doivent être utilisées dans certains protocoles, la combinaison avec la chimiothérapie permet de diminuer les doses et ainsi de réduire les effets secondaires. Par ailleurs, cette combinaison peut, dans certains cas, éviter l'acte chirurgical et ainsi préserver l'organe malade. Dans le cas du cancer du larynx avancé, par exemple, l'un des traitements traditionnels était de pratiquer une laryngectomie complète consistant à retirer le larynx et à créer une ouverture permanente dans la trachée, pouvant altérer la parole et la capacité de respirer par le nez et la bouche. Aujourd'hui, des études montrent que l'utilisation de la radio-chimiothérapie fournit un traitement tout aussi efficace que la chirurgie et permet aux patients de conserver leur larynx (Forastiere et al., 2003) (Lin et al., 2016).

3. Les soins palliatifs

La radiothérapie n'est pas un traitement simplement curatif mais peut également être utilisée dans un but palliatif visant au maintien de la qualité de vie des patients atteints d'une maladie active, progressive et à un stade très avancé. La radiothérapie à visée palliative a été définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme étant « un soin concernant les problèmes physiques, psychosociaux et spirituels des patients, atteints de maladies potentiellement mortelles, et de leurs familles » (Borasio, 2011). Bien que les schémas thérapeutiques curatifs aient été développés pour fournir des fractions quotidiennes de 1,8 à 2Gy pendant 5 semaines et des doses cumulées de 40 à 60Gy (selon le type de tumeur), les soins palliatifs ont pour but de minimiser le temps de traitement. Ainsi, le patient recevra entre 1 et 10 fractions de doses comprises entre 8 et 30Gy. Le choix de la dose dépendra du pronostic vital, du risque de toxicités aiguës, de l'administration d'un traitement systémique et de la volonté du patient. Il faudra attendre quelques semaines voire quelques mois pour observer les effets sur le patient.

Les indications potentielles de la radiothérapie palliative sont nombreuses. Elle peut être utilisée dans le soulagement de douleurs causées par des métastases cérébrales ou osseuses, dans le contrôle des saignements de tumeurs hémorragiques ou encore dans le soulagement d'obstructions (œsophages, bronches ou rectum). Par exemple, plus de 80% des patients atteints de métastases osseuses obtiennent un soulagement de la douleur grâce à la radiothérapie palliative (Blitzer, 1985). Concernant les métastases cérébrales, la radiothérapie palliative procure un soulagement partiel de la douleur dans 60 à 80% des cas et un soulagement complet chez 30 à 50% des patients (Chow et al., 2007).

B. Efficacité de la radiothérapie

Les rayons utilisés lors de la radiothérapie endommagent toutes les cellules qu'ils traversent, aussi bien les cellules cancéreuses que les cellules saines. Cependant, du fait de son action locorégionale la radiothérapie a une action anticancéreuse importante. Les cellules tumorales diffèrent des cellules saines de part de nombreuses propriétés comme la prolifération incontrôlée ou encore les défauts de réparation de l'ADN.

1. Le cycle cellulaire

La radiosensibilité des tissus vivants dépend dans une très large mesure de la prolifération et de la progression dans le cycle cellulaire. Chez la souris par exemple, il existe une très grande variation de la survie des cryptes intestinales en fonction des phases du cycle cellulaire, avec un pic de radiorésistance en phase S (Potten, 1990). Il est également montré que des cellules très proliférantes telles que certains progéniteurs hématopoïétiques sont très sensibles à l'irradiation alors que les cellules peu proliférantes comme les neurones ou les cellules souches sont beaucoup plus résistantes. Ceci est en partie dû à leur répartition dans le cycle cellulaire et à la disponibilité de leur système de réparation. En effet, il a été montré que les phases les plus radiosensibles et radiorésistantes sont respectivement la phase M et la phase S (systèmes de réparation actifs lors de la réplication d'ADN) (Figure 15) (Sinclair, 1968).



Figure 15 : Courbes de survie de cellules de hamster chinois irradiées à diverses phases du cycle cellulaire. (Tirée de Sinclair, 1968). Les cellules de hamster chinois ont été irradiées à différentes doses et à différentes phases du cycle cellulaire. Les résultats présentés sous forme de courbes linéaires quadratiques montrent que les cellules en phase S sont plus radiorésistantes que les cellules en phase G1 et G2/M.

Les tissus normaux régulent de manière précise la production et la libération de signaux de prolifération contrôlant l'entrée et la progression dans le cycle cellulaire et assurant ainsi l'homéostasie des tissus. A contrario, via la dérégulation de ces signaux, les cellules cancéreuses constituant la tumeur sont capables de maintenir un niveau de prolifération élevé et sont donc des cibles préférentielles des rayonnements ionisants. Par exemple, elles ont la capacité de produire leurs propres facteurs de croissance ainsi que les récepteurs associés permettant le maintien d'une boucle de stimulation autocrine. De plus, elles présentent généralement des mutations de certains régulateurs/inhibiteurs du cycle cellulaire comme p53 (Brosh and Rotter, 2009). Le statut de p53 est déterminant dans la prédiction de l'efficacité de la radiothérapie et une perte de p53 est généralement associée à un phénotype radiorésistant (Lee and Bernstein, 1993) (Chiarugi et al., 1998).

Des recherches sont en cours depuis plusieurs années afin de « synchroniser » toutes les cellules cancéreuses dans les phases sensibles du cycle cellulaire (G2/M), dans le but d'augmenter l'efficacité de l'irradiation. Notons que l'irradiation bloque temporairement les cellules en G2, réalisant donc elle-même une certaine synchronisation.

2. La réparation des dommages à l'ADN

La radiothérapie provoque des effets cellulaires délétères notamment via la formation de dommages à l'ADN pouvant aller des altérations de bases à des altérations beaucoup plus délétères comme les CDBs. Elle constitue donc une stratégie thérapeutique anticancéreuse pertinente puisque, à l'inverse des cellules saines, les cellules tumorales présentent des systèmes de réparation imparfaits.

Le gène TP53 est le plus fréquemment muté dans les cancers. Si sa fréquence de mutation varie entre les différents cancers, il est estimé que plus de la moitié d'entre eux présentent une protéine p53 inactivée par des mutations, des délétions ou encore une perte d'hétérozygotie (Brosh and Rotter, 2009). Il existe également des mutations inactivatrices d'autres gènes de réparation tels que ATM, DNA-PKcs, Chk2, Rad52, BRCA1/2 (Hosoya and Miyagawa, 2014). Si ces mutations sont moins fréquentes que celles du gène TP53, elles sont tout de même couramment retrouvées dans les cellules cancéreuses. Il est notamment démontré que des mutations du gène ATM augmentent la radiosensibilité des cellules tumorales (Byrd et al., 2012). Cependant, nous verrons dans les parties suivantes que les cellules cancéreuses ont mis en place des mécanismes alternatifs de défense contre les dommages radio-induits de l'ADN favorisant leur survie et leur radiorésistance.

C. Les différents types de radiothérapie

On distingue différents types de radiothérapie selon le mode d'administration et le type de rayonnement utilisé.

1. La radiothérapie externe

La radiothérapie externe est la forme la plus utilisée. Elle peut être administrée seule ou en association avec la chirurgie ou la chimiothérapie. Par définition, la source d'énergie se trouve à distance du patient et les rayons vont traverser l'air, les tissus sains et déposer leur énergie à la profondeur souhaitée, ceci permettant la destruction des cellules tumorales. Pour chaque patient, l'élaboration du plan de traitement est établie. Elle comprend le choix du rayonnement (généralement les rayons X) qui se fait en fonction de la localisation de la tumeur, la délinéation de la tumeur et des organes à risques^{*} (OAR) comme le cœur ou les poumons, la balistique[†] des faisceaux d'irradiation, la dosimétrie et le temps d'irradiation à chaque séance. L'élaboration de tous ces paramètres permet de cibler de manière la plus efficace possible la tumeur tout en essayant de préserver les OAR avoisinants.

La précision de la radiothérapie externe a été nettement améliorée au cours des dernières décennies en définissant plus précisément les volumes cibles à irradier, les doses à utiliser ainsi que les mouvements tumoraux. Auparavant, le champ d'irradiation était défini en deux dimensions en se référant aux structures osseuses sur les films radiographiques. Il existe maintenant une nomenclature de définition plus précise des volumes d'irradiation basée sur les rapports de la Commission Internationale des Unités et des mesures d'irradiation (*International Commission on Radiation Units and measurement*; ICRU) (Høyer et al., 2011). Le volume tumoral macroscopique (*Gross Tumor Volume*; GTV) est défini comme le volume tumoral visible par toutes techniques d'imagerie (Figure 16).



Figure 16: Planification du plan de traitement radiothérapeutique. (Adaptée de Høyer et al., 2011). Définition des volumes cibles prenant en compte le volume tumoral macroscopique (GTV), l'infiltration tumorale (CTV), les mouvements de la tumeur (ITV) et les incertitudes quotidiennes (PTV). Le volume traité reçoit la dose permettant le contrôle optimal de la tumeur. Le volume irradié correspond à la surface recevant une dose d'irradiation considérée comme significative par rapport à la tolérance des tissus sains.

Le volume cible anatomo-clinique (*Clinical Target volume*; CTV) est formé par l'ajout d'une marge autour du GTV prenant en compte l'infiltration tumorale. Une autre marge est ensuite ajoutée autour du CTV, elle est appelée ITV (*Internal Target Volume*) et prend en compte les mouvements de la tumeur. Enfin, une dernière marge de sécurité est ajoutée

^{*} Organe recevant une dose d'irradiation proche de sa tolérance.

[†] Choix du nombre de faisceaux, de leurs caractéristiques (orientation, énergie, taille des champs), utilisation ou non de modificateurs de faisceaux ou de la modulation d'intensité, etc.

autour de l'ITV et correspond au volume cible prévisionnel (*Previsional Target Volume*; PTV) tenant compte des incertitudes quotidiennes de positionnement du patient, de la mécanique de l'équipement et de la dosimétrie. Le volume traité reçoit la dose permettant le contrôle optimal de la tumeur et le volume irradié correspond à la surface recevant une dose d'irradiation pouvant causer des toxicités.

Les techniques d'imagerie telles que le scanner, l'IRM (Imagerie par Résonnance Magnétique) ou encore le TEP (Tomographie par Émission de Positrons) fournissent des informations anatomiques et fonctionnelles (informations métaboliques) nécessaires à la planification de la radiothérapie. De plus, certains types d'imageries, notamment la spectroscopie par résonnance magnétique, permettent de prédire les sites de rechute chez le patient. En effet, une étude montre que les régions métaboliquement actives seraient prédictives des sites de rechute après traitement des tumeurs de GBM (Laprie et al., 2008).

Les patients traités par radiothérapie externe reçoivent le plus souvent des doses fractionnées d'irradiation (2Gy/fraction sur 5 jours) et non une dose unique. Ceci permet d'obtenir un effet différenciel important entre le tissu tumoral et le tissu sain permettant ainsi une meilleure destruction de la tumeur et une diminution des toxicités. En effet, le fractionnement permet la modulation de nombreux paramètres cellulaires, décrivant le principe des 5R (Steel et al., 1989). Tout d'abord, il permet aux tissus sains de prendre le temps de Réparer leurs dommages radio-induits avant de recevoir une nouvelle dose d'irradiation. Ceci est moins le cas pour les cellules tumorales puisque la majorité des tumeurs présentent des mécanismes de réparation de l'ADN imparfaits. Le fractionnement favorise également la Redistribution des cellules proliférantes dans les phases du cycle cellulaire. Ceci permet aux cellules tumorales se trouvant en phase radiorésistante (phase S) de poursuivre leur cycle, de changer de phase et de devenir plus radiosensibles. Il facilite aussi la Réoxygénation des zones hypoxiques de la tumeur, via notamment une normalisation vasculaire, et par conséquent l'augmentation de la radiosensibilité des cellules tumorales comprises dans ces zones. De plus, il favorise la Repopulation des tissus sains afin de maintenir la bonne fonction de l'organe irradié. Ce phénomène est plus rapide dans les tissus sains que dans la tumeur car les mécanismes d'homéostasie cellulaire, qui maintiennent constant le nombre de cellules dans le tissu, y fonctionnent beaucoup plus efficacement. Les cellules saines reprennent donc un rythme normal de prolifération à un moment où les cellules malignes ont encore un rythme de prolifération élevé, ce qui les rend donc plus radiosensibles. Enfin, la **Radiosensibilité** constitue le dernier « R » admis par les radiobiologistes et correspond à la radiosensibilité intrinsèque de chaque tissu. Cette notion n'est actuellement pas encore modulable mais elle se doit d'être connue avec le plus de précision possible afin d'optimiser les effets de la radiothérapie. Les doses de tolérance sont variables en fonction du volume et du tissu irradié. Par exemple, quelques Grays suffisent pour entrainer une aplasie médullaire si la totalité de la moelle osseuse est irradiée alors que la dose seuil pour les poumons et le rein est de 20Gy et de l'ordre de 50Gy pour le système nerveux central. Pour les tissus tumoraux, une irradiation de quelques Gray suffit à tuer les cellules de lymphome contre 70Gy pour éliminer une quantité significative d'adénocarcinome. Par ailleurs, certaines tumeurs comme les glioblastomes sont connues pour être très radiorésistantes et difficilement curables dans l'état actuel des connaissances.

Aujourd'hui nous assistons aux développements de nouveaux types de radiothérapie externes moins conventionnelles telles que : la TBI (Total Body Irradiation) qui permet de préparer l'organisme à une allogreffe de moelle osseuse pour traiter certaines hémopathies; la radiothérapie per-opératoire qui consiste à envoyer une dose unique d'électrons sur une tumeur profonde pendant l'opération chirurgicale après avoir éloigné les OAR; la radiothérapie stéréotaxique (Gamma ou Cyber knife), qui est utilisée pour les lésions intra- ou extra-crâniennes, vise à envoyer une fraction de forte dose composée de multiples faisceaux convergents de manière très précise (au millimètre près) vers la cible ; l'hadronthérapie qui comprend les irradiations par protons, neutrons et ions ayant des caractéristiques balistiques particulières ou des efficacités biologiques supérieures aux photons. La protonthérapie est, par exemple, très utilisée dans le cadre de tumeurs cérébrales puisque la profondeur de pénétration des protons peut être pilotée individuellement et au millimètre près. Ces rayons vont déposés la quasi totalité de leur énergie en un point donné (Pic de Bragg) épargnant ainsi les OAR situés en aval. ; La radiothérapie par modulation d'intensité (Intensity Modulated Radiotherapy; IMRT) permettant de moduler l'intensité des faisceaux d'irradiation au cours du traitement et ainsi de concentrer les rayons sur la tumeur et de diminuer l'irradiation des tissus sains. Elle présente un avantage certain pour les tumeurs de forme complexe.

2. La curiethérapie ou brachythérapie

La curiethérapie, également appelée brachythérapie, est caractérisée par l'implémentation précise de la source radioactive (le radio-isotope) sous forme de tube dans une zone très proche de la tumeur. Elle est très fonctionnelle pour les organes mouvants comme la prostate ou les tumeurs cutanées (lèvres, paupières, etc.). On distingue la curiethérapie interstitielle où la source de rayonnement est placée directement dans le tissu à traiter (sein, prostate, etc.) et la curiethérapie cavitaire où la source est placée dans une cavité du corps (trachée, utérus, etc.). Le débit de dose se mesure en Gy/heure et peut aller de 2Gy/h (bas débit) jusqu'à des doses supérieures de 12Gy/h (haut débit). La dose peut être délivrée de manière continue ou pulsée, généralement une dose par heure. L'implémentation peut être temporaire ou permanente selon le débit de dose et la localisation de la tumeur. Les radioéléments les plus utilisés sont le Césium 137, l'Iridium 192 et l'Iode 125. Cette technique peut être employée seule ou en combinaison avec la radiothérapie externe, la chirurgie ou encore la chimiothérapie. A la différence de la radiothérapie externe, le volume à irradier est très localisé permettant ainsi d'épargner les tissus sains péritumoraux. Cette technique permet donc de traiter les patients avec de fortes doses d'irradiation localisées puisque la probabilité de dommages aux tissus sains reste très faible.

3. La radiothérapie métabolique ou vectorisée

Elle repose sur l'administration, locale ou systémique, de radio-pharmaceutiques marqués avec un radioélément, généralement émetteur de beta-moins, allant préférentiellement se fixer sur les cellules cancéreuses. La fixation sur les cellules cibles est possible grâce à un tropisme spécifique du radioélément pour un organe ou grâce à l'utilisation de vecteurs spécifiques d'épitopes tumoraux.

Par exemple, l'Iode 131 est beaucoup utilisé afin de traiter les patients atteints du cancer de la thyroïde car ce radioélément a la capacité de se loger préférentiellement dans le compartiment thyroïdien. Un autre exemple de radiothérapie métabolique est la radioimmunothérapie. Son principe repose sur l'utilisation d'anticorps radio-marqués capables d'aller cibler spécifiquement les cellules cancéreuses (Larson et al., 2015). Une fois sur la cible, le radio-isotope émet des quantités thérapeutiques de radiations ionisantes alpha ou beta conduisant à la mort de la cellule cible tout en préservant les tissus sains avoisinants. Cette technique est très utilisée pour les tumeurs les plus radiosensibles telles que les leucémies ou les lymphomes.

La radiothérapie métabolique présente de multiples avantages tels que la fixation spécifique sur les cellules tumorales, la rétention prolongée sur la cible ainsi qu'une forte clairance par les tissus sains. Elle permet également d'identifier de potentiels sites métastatiques grâce à l'imagerie médicale comme la scintigraphie à l'Iode 131.

D. Les limites de la radiothérapie : Exemple du glioblastome

Bien qu'étant toujours un outil efficace de contrôle tumoral, la radiothérapie entraine le développement de réponses adaptatives des cellules tumorales qui deviennent résistantes (plus agressives et invasives). Les paramètres impliqués dans la radiorésistance des cellules tumorales sont multiples. Nous décrirons dans cette partie les mécanismes principaux impliqués dans l'acquisition de la radiorésistance en prenant comme exemple le glioblastome.

1. Le glioblastome

Le glioblastome, aussi appelé gliome de grade IV, est la tumeur du système nerveux central (SNC) la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Toutefois, cette tumeur reste rare puisque son incidence est d'environ 4 cas pour 100000 habitants en France. Elle est caractérisée par (i) une masse tumorale volumineuse comprenant en son centre une zone nécrotique, (ii) une forte hétérogénéité inter- et intra-tumorale, (iii) une infiltration importante du parenchyme cérébral sain (iv) et la présence de zones hypoxiques et de zones hautement vascularisées. D'après plusieurs études, les GBM peuvent être regroupés en trois grands sous-types moléculaires : mésenchymateux (MES), proneuraux (PN) et classiques (CL) (Phillips et al., 2006a) (Verhaak et al., 2010). Une mutation du gène IDH1 (Isocitrate Deshydrogénase 1), une amplification du PDGFRa (Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha) et l'expression de certains marqueurs tels que SOX et TCF4 (Transcription Factor 4) sont retrouvés dans les GBM de sous-types proneuraux. Les glioblastomes classiques se distinguent notamment par une surexpression du récepteur à l'EGF, la perte de PTEN et CDKN2a et par une activation de la voie Notch. Enfin, les glioblastomes mésenchymateux montrent une perte de NF1 (Neurofibromin 1), une activation forte des voies NFKB et TNF (Tumor Necrosis Factor) et une surexpression des marqueurs CHI3L1 (Chitinase 3 Like 1),

CD44 et MET (*Hepatocyte Growth Factor Receptor*). Il a été montré que les tumeurs de soustype mésenchymateux sont plus agressives, répondent moins bien aux traitements et sont retrouvées préférentiellement lors de la rechute tumorale (Wang et al., 2017). Ces résultats décrivent l'importance de certains marqueurs spécifiques dans la définition des différentes classes de glioblastomes et suggèrent leur prise en compte pour la stratification des patients dans les études à venir. Toutefois, cette classification reste à nuancer en raison de l'existence d'une hétérogénéité moléculaire intra-tumorale. En effet, plusieurs sous-types moléculaires peuvent être retrouvés au sein d'une même tumeur et certains traitements comme la radiothérapie peuvent provoquer des modifications des signatures moléculaires (Verhaak et al., 2010) (Patel et al., 2014).

Aujourd'hui, la prise en charge thérapeutique reste la même pour tous les patients atteints de GBM et se fait selon le protocole de Stupp combinant la chirurgie suivie d'une radiothérapie (2Gy/fraction 5 jours par semaine pendant 6 semaines) en concomitance avec une chimiothérapie par utilisation du TMZ puis d'une chimiothérapie adjuvante (Stupp et al., 2005) (Figure 17). Le TMZ a un effet radiosensibilisant de part la formation de dommages à l'ADN (alkylation de la guanine en position O⁶ et N⁷) et a permis d'augmenter significativement la médiane de survie des patients par rapport à la radiothérapie seule. Les marges utilisées lors de la radiothérapie peuvent atteindre 1/3 du cerveau impliquant donc l'irradiation d'une partie non négligeable des tissus sains adjacent.

Malgré ces traitements lourds, cette tumeur très agressive et invasive rechute dans 90% des cas dans le champ d'irradiation initial et la médiane de survie à 5 ans n'est que de 5% (Ostrom et al., 2015) (Gebhardt et al., 2014). L'efficacité des traitements, notamment de la radiothérapie, est limitée par l'acquisition de résistances via différents paramètres que nous développerons dans les parties suivantes.



Figure 17 : Prise en charge thérapeutique des patients atteints de GBM.

(Adaptée de Stupp et al., 2005 et Preusser et al., 2011). Selon le protocole de Stupp, les patients subissent tout d'abord une résection chirurgicale suivie d'une radiothérapie (*bleue*) (2Gy/fraction 5 jours par semaine pendant 6 semaines) et d'une chimiothérapie (*jaune*) concomitante (tous les jours pendant 6 semaines) puis adjuvante (6 cycles de cinq jours pendant 28 jours). La survie globale des patients traités par radiothérapie combinée au radiosensibilisant TMZ est significativement augmentée par rapport à la radiothérapie seule. Lors de la radiothérapie, les champs d'irradiation sont larges afin de cibler le maximum de cellules tumorales infiltrantes. Les marges peuvent atteindre 1/3 du cerveau impliquant donc l'irradiation d'une partie non négligeable des tissus sains adjacents.

2. La radiorésistance

a. Mécanismes moléculaires

L'activation de grandes voies de signalisation telles que les voies de réparation de l'ADN, jouent des rôles critiques dans la radiorésistance. En effet, si nous avons vu dans la partie précédente que les cellules tumorales présentent généralement des mécanismes de réparation de l'ADN inefficaces, certaines d'entre elles sont capables de mettre en place des mécanismes alternatifs afin de réparer les dommages radio-induits et ainsi de résister aux traitements. Il est par exemple démontré que les protéines DNA-PKcs, Rad51 et PARP1 (*Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*; protéine impliquée dans la réparation des CSBs et CDBs) sont surexprimées dans les tumeurs radio-résistantes de GBM et sont associées à un mauvais pronostic (Kase et al., 2011) (Cesarini et al., 2017). De plus, l'irradiation de cellules de GBM, en particulier les cellules souches, active la protéine ATM et augmente donc la capacité de réparation des dommages à l'ADN et la radiorésistance (Carruthers et al., 2015). La

description des mécanismes de résistance liés à la réparation de l'ADN a permis de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer de nouvelles stratégies afin de diminuer la radiorésistance et d'augmenter la survie des patients. Par exemple, l'inhibition de la protéine PARP1 en combinaison avec la radiothérapie augmente la radiosensibilité des cellules de GBM *in vitro* et *in vivo* (Venere et al., 2014) (Russo et al., 2009) (Dungey et al., 2008) (Lesueur et al., 2018).

De plus, la voie PI3K/Akt/mTOR est très souvent dérégulée dans de nombreux cancers (mutations, amplifications, délétions ou modifications post-traductionnelles). Cette voie régule de manière physiologique l'homéostasie, la mort cellulaire ainsi que la prolifération. Son activation dans les cellules tumorales va donc avoir un impact important dans la progression tumorale, le processus métastatique et la radiorésistance (Skvortsova et al., 2008) (Li et al., 2009a) (Chang et al., 2013) (Datta et al., 2014). Dans le cas du GBM, on retrouve très souvent une activation constitutive de cette voie via l'amplification de l'EGFR, des mutations activatrices d'Akt ou encore la perte du gène PTEN (Narayan et al., 2013). De nombreuses preuves sont en faveur d'un lien entre l'activation de cette voie et la radiorésistance des cellules de GBM. En effet, son activation dans les cellules de GBM stimule la réparation des dommages de l'ADN et contribue donc à la résistance des cellules tumorales (Golding et al., 2009). De plus, des études montrent que son inhibition dans les cellules de GBM maintien un niveau élevé de dommages à l'ADN et augmente leur radiosensibilité (Chautard et al., 2010). D'autres protéines impliquées dans cette voie peuvent être des cibles pharmacologiques potentielles. Par exemple, il est montré que l'inhibition concomitante des protéines PI3K et mTOR grâce à l'inhibiteur NVP-BEZ235, permet de radiosensibiliser les cellules de GBM (Kuger et al., 2013). Des essais cliniques étudient actuellement l'association d'inhibiteur de PI3K en combinaison ou non avec la radiothérapie ou d'autres agents chimiothérapeutiques (Wen et al., 2015) (Rodon et al., 2018).

La voie de signalisation MEK/ERK, impliquée dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire des cellules normales, est également dérégulée dans de nombreux cancers et impliquée dans la radiorésistance des cellules de GBM (Marampon et al., 2014) (Fedrigo et al., 2011). Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que l'inhibition de cette voie moléculaire permet d'augmenter la radiosensibilité des cellules de GBM montrant son implication dans la réponse des tumeurs à l'irradiation (Fedrigo et al., 2011) (Marampon et al., 2011).

Pour finir, une forte activation des voies Notch et Wnt, deux voies impliquées dans le développement et le maintien des cellules souches normales, est associée à une augmentation de la radiorésistance et un mauvais pronostic du GBM (Taylor et al., 2015) (Kim et al., 2012). Par exemple, l'inhibition de la voie Notch après irradiation diminue la prolifération, augmente la mort et la radiosensiblité de cellules de GBM alors que son activation augmente la radiorésistance (Wang et al., 2010) (Taylor et al., 2015).

En conclusion, plusieurs voies de signalisation importantes sont associées à la radiorésistance des cellules de GBM. Ces voies constituent donc des cibles primordiales pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses adjuvantes à la radiothérapie, dont le but serait de réduire le nombre de cellules résiduelles résistantes et ainsi les rechutes tumorales.

b. Hétérogénéité tumorale et cellules souches cancéreuses

L'échec des traitements actuels peut être en partie expliqué par l'hétérogénéité des tumeurs. (Figure 18) (M. Frame et al., 2017).

Types d'hétérogénéité					
Patients	Localisation	Tumeur	Cellule	Génome	Epigénétique
					Méthylation Deméthylation
Sous types différents entre les patients	Métastases et tumeur primaire différentes	Différentes tumeurs dans un même organe	Degré de différenciation	Différentes altérations génomiques	Profils épigénétiques différents

Figure 18 : Les différents types d'hétérogénéité.

(Adaptée de M. Frame et al., 2017). Lorsque l'on envisage d'améliorer les traitements actuels du cancer ou de mettre au point de nouveaux traitements, il faut tenir compte de plusieurs types d'hétérogénéité. Ceux-ci comprennent l'hétérogénéité tumorale inter-patient, entre la tumeur primaire et les métastases à distance, la maladie multifocale (différentes tumeurs dans un même organe d'un même patient), l'hétérogénéité cellulaire intra-tumorale, l'hétérogénéité génomique incluant les mutations et les fusions géniques et enfin l'hétérogénéité épigénétique avec des différences inhérentes entre les populations cellulaires mais aussi la possibilité de modifications épigénétiques induites par la thérapie.

Il est maintenant bien établi que les patients atteints d'un même cancer ne répondent pas de la même manière aux traitements. Les progrès considérables des technologies moléculaires telles que le séquençage de nouvelle génération ont permis d'identifier différents sous-types moléculaires de tumeurs qui, associées à des données cliniques, fournissent des informations pronostics et prédictives importantes. Cette hétérogénéité inter-tumorale a fourni une base rationnelle en faveur d'une médecine personnalisée pour le traitement des cancers. En effet, la présence de mutations oncogéniques est souvent utilisée pour guider les décisions de traitement et prédire la probabilité de réponse à un traitement particulier. L'exemple le plus connu est celui du cancer colorectal métastatique pour lequel le traitement anti-EGFR est relativement efficace dans les sous-types de cancer KRAS non muté, mais n'est pas efficace dans les tumeurs mutées pour ce gène. Dans le cas du GBM, les différents sous-types moléculaires identifiés ne présentent pas la même réponse aux traitements. En effet, le soustype proneural du GBM répondra mieux aux traitements que le sous-type mésenchymateux (Figure 19) (Wang et al., 2017). Les sous types mésenchymateux présentent des caractéristiques moléculaires et métaboliques différentes des autres sous-types telles que la pertes des gènes NF1, TP53 et PTEN, une surexpression des gènes MET, Chi3L1, CD44 et MERTK, l'activation des voies TNF et NFkB ainsi qu'une forte dépendance à la glutamine (Verhaak et al., 2010) (Oizel et al., 2017). Aujourd'hui, les patients atteints de GBM sont traités dans leur globalité. La prise en compte des signatures moléculaires définissant les différents sous-types permettrait l'établissement d'un diagnostic et d'un pronostic plus précis et serait d'une aide précieuse pour le développement de la médecine personnalisée.



Figure 19 : Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie en fonction des différents sous-types de GBM.

(Adaptée de Wang et al., 2017). Courbe de survie de patients atteints de GBM IDH sauvage (95% des GBM primaires) de sous-types mésenchymateux (MES, vert), classique (CL, bleu) ou proneural (PN, violet).

L'hétérogénéité intra-tumorale est une notion plus récente. Les divergences entre les différentes cellules de la tumeur se font au niveau morphologique, biologique comme leur capacité de prolifération, génétique dans l'expression de marqueurs moléculaires tels que des protéines exprimées à la surface des cellules tumorales et épigénétique. En effet, en 2012, Gerlinger et coll ont constaté qu'environ 66% des mutations présentes dans les biopsies de patients atteints de cancer du rein n'étaient pas détectées de manière uniforme dans toutes les régions de l'échantillon d'une même tumeur (Gerlinger et al., 2012). De la même manière, différents sous-types moléculaires ont été identifiés au sein d'une même tumeur de GBM de manière dépendante de la localisation (Jin et al., 2017). En effet, les cellules tumorales de sous-type proneural sont préférentiellement retrouvées dans les zones périvasculaires alors que celles de sous-type mésenchymateux sont retrouvées dans les zones plutôt hypoxiques (Jin et al., 2017). Il est donc important de considérer qu'une biopsie ne fournit qu'un aperçu limité des altérations génétiques présentes dans la tumeur. Cette diversité a longtemps été expliquée par la présence de différents clones acquérant, au fur et à mesure de la progression tumorale, des mutations dans des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur (Shlush and Hershkovitz, 2015). La conséquence de ce phénomène est une sélection progressive des clones les plus agressifs et les plus à même de survivre dans l'environnement tumoral ainsi qu'à différents traitements. Dans ce modèle classique, il n'existe peu ou pas de hiérarchie entre les différents clones et toutes les cellules peuvent contribuer de manière équivalente à la croissance de la tumeur. Cependant, depuis quelques années, une autre hypothèse a changé notre vision du cancer. Cette hypothèse explique l'hétérogénéité tumorale comme le résultat d'un gradient de différenciation (Reya et al., 2001). Certaines cellules tumorales sont dites différenciées et expriment des marqueurs cellulaires et moléculaires associés à la différenciation, alors que d'autres cellules se trouvent par opposition à un stade immature/dédifférencié et expriment des marqueurs spécifiques de ce stade. Ces dernières sont appelées cellules souches cancéreuses (CSCs) et sont à la base de cette hypothèse. Elles sont présentes en très faible nombre dans la tumeur et sont définies comme des cellules ayant la capacité de s'autorenouveller et de reproduire l'hétérogénéité de la tumeur d'origine. Malgré un débat constant sur l'origine et l'abondance des CSCs, il est admis que le traitement du cancer doit passer par leur éradication. Des preuves de plus en plus nombreuses indiquent que les CSCs contribuent à la radiorésistance (Rycaj and Tang, 2014). Les CSCs sont décrites dans le GBM et sont caractérisées par la présence de certains marqueurs moléculaires tels que le CD133, le CD44, le CD90, SOX2, la Nestine, NANOG, Olig2 ou encore OCT4 (*Octamer-Binding Transcription factor 4*) (Bradshaw et al., 2016) (Abou-Antoun et al., 2017). La radiorésistance des CSCs de GBM semble être associée à (i) une faible prolifération, (ii) une capacité accrue à éliminer les radicaux libres formés en réponse aux rayonnements ionisants, (iii) une forte capacité à réparer leurs dommages à l'ADN (vi) et à leur faculté d'autorenouvellement (Bao et al., 2006) (Phillips et al., 2006b). L'irradiation peut également réguler la dédifférenciation des cellules de GBM via la surexpression de la protéine anti-apoptotique survivine (Dahan et al., 2014). Les CSCs seraient probablement à l'origine des difficultés d'éradication de la tumeur. Le ciblage de ces cellules est aujourd'hui une stratégie thérapeutique majeure afin d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie.

La radiothérapie ajoute une ligne de complexité à cette hétérogénéité puisqu'elle présente un pouvoir mutagène important. L'acquisition de mutations ou d'aberrations génomiques par les cellules cancéreuses irradiées peut participer à l'augmentation de l'hétérogénéité tumorale via l'émergence de clones hautement résistants participant à la rechute de la tumeur. Il est donc primordial de mieux comprendre l'émergence de ces clones radiorésistants dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de diminuer les rechutes tumorales et ainsi d'augmenter la survie des patients.

c. Le microenvironnement

La tumeur est un tissu complexe composé de cellules tumorales mais également de cellules telles que les Fibroblastes Associés aux Cancers (*Cancers Associated Fibroblasts*; CAFs), les cellules endothéliales ou encore les cellules du système immunitaire entourées d'une matrice extracellulaire (MEC). Les recherches visant à améliorer les résultats de la radiothérapie se sont concentrées presque entièrement sur la cellule cancéreuse elle-même, ignorant les interactions biologiques complexes entre la tumeur et le microenvironnement. Ainsi, les tentatives visant à combiner la radiothérapie avec de nouvelles cibles thérapeutiques reposent souvent sur l'augmentation de la radio-sensibilisation des cellules cancéreuses plutôt que sur leur capacité à moduler le dialogue entre les cellules tumorales résiduelles et les cellules du microenvironnement. Or, il est montré que des cellules de GBM implantées puis

irradiées dans un modèle othotopique murin sont beaucoup plus radiorésistantes que les cellules de GBM irradiées *in vitro*, suggérant l'implication des tissus adjacents dans la radiorésistance de cette tumeur (Jamal et al., 2010). La compréhension des mécanismes impliqués dans la radiorésistance médiée par le microenvironnement semble donc primordiale afin de prévenir les rechutes et d'augmenter la survie des patients.

i. Les CAFs

Les CAFs sont des cellules du microenvironnement tumoral qui participent à la tumorigénèse, via la dégradation de la MEC ou la sécrétion des cytokines et de facteurs de croissance, et influencent la réponse de la tumeur aux traitements anticancéreux. Beaucoup d'études sont faites sur l'influence des CAFs dans la réponse de la tumeur aux traitements. Il est maintenant clairement établi que l'irradiation permet l'activation des CAFs. Cette activation augmente la prolifération, l'instabilité génomique, la croissance, l'invasion, la radiorésistance et la motilité des cellules cancéreuses via des interactions tumeur/stroma impliquant la sécrétion de facteurs comme CXCL1, la Tenascin-C (TN-C), le HGF (Human Growth Factor) ou encore le TGF- β (Tumor Growth Factor β) (Ohuchida et al., 2004) (Kamochi et al., 2008). (Barker et al., 2015) (Zhang et al., 2017). Cependant, un nombre très limité d'études est fait sur le dialogue entre le GBM et les CAFs. En effet, ce n'est que récemment que Clavreul et coll ont isolé une nouvelle population cellulaire du tissu peritumoral de patients atteints de GBM et partageant des propriétés phénotypiques et fonctionnelles avec les CAFs (Clavreul et al., 2012) (Clavreul et al., 2014). Les résultats de ces études mettent en lumière une existence probable de « cellules de types CAFs » dans les gliomes. Depuis, une étude démontre (i) la présence de cellules exprimant les marqueurs des CAFs sur des coupes de patients atteints de GBM (ii) ainsi que leur rôle dans l'augmentation de la migration des cellules de GBM in vitro (Trylcova et al., 2015). Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre le dialogue entre les CAFs et les cellules de GBM.

ii. Le système immunitaire

Le microenvironnement immunitaire est également connu pour jouer un rôle dans la réponse de la tumeur au traitement. Par exemple, il est montré que le recrutement de cellules myéloïdes, en particulier les macrophages, se fait via le facteur SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor 1) et permet de créer un microenvironnement favorable à la survie des cellules tumorales et endothéliales favorisant la rechute de la tumeur (Kozin et al., 2010). Il est également montré que les cellules myéloïdes exprimant le marqueur CD11b favorisent la croissance tumorale et l'angiogénèse après irradiation via la sécrétion de la protéine MMP-9 (Ahn and Brown, 2008) (Yang et al., 2004). L'administration post-irradiation d'un anticorps anti-CD11b inhibe le recrutement de cellules myéloïdes exprimant MMP-9 et augmente la réponse de la tumeur à la radiothérapie (Ahn et al., 2010). Les macrophages, représentent environ 35% du microenvironnement cellulaires du GBM (Chen and Hambardzumyan, tendent vers un sous-type M2, favorisant un microenvironnement 2018). Ils immunosuppresseur (Komohara et al., 2008). De plus, les macrophages augmentent la croissance et la progression tumorale ainsi que la résistance des GBM à la radiothérapie (Hu et al., 2015) (De Palma and Lewis, 2013). Des stratégies thérapeutiques ont donc été mises en place afin d'éliminer les macrophages, de les polariser vers un phénotype M1 (plus immunostimulateurs) ou d'inhiber leur infiltration au site tumorale. Il est par exemple montré in vivo que l'inhibition des facteurs SDF-1 ou CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1), ou de leurs récepteurs respectifs CXCR4 et CSF-1R (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) bloque le recrutement des monocytes (précurseurs des macrophages) et augmente la réponse du GBM à l'irradiation (Stafford et al., 2016) (Liu et al., 2014). Cependant, l'utilisation en clinique d'un inhibiteur de CSF-1R (PLX3397) ne permet pas d'augmenter la survie des patients atteints de GBM (Butowski et al., 2016).

Les lymphocytes T constituent un autre composant du microenvironnement immunitaire des GBM mais sont beaucoup moins représentés que les macrophages (Han et al., 2016) (Chen and Hambardzumyan, 2018). Ces cellules sont essentielles pour la mort des cellules tumorales. Cependant, il est montré que les lymphocytes T isolés de patients atteints de GBM sont moins sensibles aux stimuli d'activation comparées aux cellules de sujet sain, indiquant un profil d'immunosuppression (Han et al., 2016). De plus, il existe des points de contrôle immunitaire médiés entre autres par les protéines PD-1 (*Programm Cell Death 1*) et CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4). Ces protéines exprimées à la surface des lymphocytes T interagissent respectivement avec les protéines CD80/86 et PDL-1 (Programmed Death Ligand 1) exprimées à la surface des cellules tumorales. Cette interaction provoque l'anergie des lymphocytes T et la survie des cellules tumorales. Il a récemment été montré une expression significative des marqueurs PD-1 et PDL-1 respectivement sur les lymphocytes T infiltrants et sur les cellules de GBM (Berghoff et al., 2015). De manière intéressante, la radiothérapie augmente l'immunogénicité tumorale en favorisant (i) l'expression et la présentation d'antigènes, (ii) un environnement immunostimulateur via les cytokines (iii) et le recrutement des cellules présentatrices d'antigènes et des effecteurs du système immunitaire tels que les lymphocytes. L'activation des points de contrôle du système immunitaire diminue l'effet immunostimulateur de la radiothérapie et limite donc son efficacité. Les stratégies thérapeutiques combinant la radiothérapie et l'utilisation d'anticorps bloquant PD-1 (Nivolumab) ou CTLA4 (Ipilimumab) a montré un bénéfice thérapeutique important pour le traitement de nombreux cancers notamment le mélanome métastatique (Dovedi et al., 2014) (Aliru et al., 2018) (Simeone et al., 2015). Cependant, des essais cliniques de phases III montrent que, dans le cas du GBM, que ce soit en monothérapie ou en thérapie combinée, l'utilisation de ces anticorps bloquant n'apporte pas de bénéfice thérapeutique (Reardon et al., 2017). Des études complémentaires sont donc nécessaires afin d'optimiser les traitements d'immuno-radiothérapie pour les patients atteints de GBM.

iii. La matrice extracellulaire

La MEC, réseau de macromolécules et de protéines associées, est un acteur clé du microenvironnement tumoral. Elle joue le rôle de support pour les cellules tumorales et représentent une source importante de molécules de signalisation. Les récepteurs principaux des composants de la MEC sont les intégrines représentant des protéines d'adhésion transmembranaires composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . La liaison des protéines de la MEC aux intégrines influence l'expression génique ainsi que des phénomènes comme la prolifération, la migration, l'invasion ou encore la maintenance des CSCs (D'Abaco and Kaye, 2007) (Hynes, 2002) (Bosman and Stamenkovic, 2003) (Calderwood, 2004). Il est montré que l'irradiation des cellules de GBM augmente l'expression des intégrines et participe à la radiorésistance de la tumeur (Desgrosellier and Cheresh, 2010) (Monferran et

al., 2008) (Cordes et al., 2003). Le traitement par un antagoniste des intégrines, le Cilengitide, augmente de manière significative la radiosensibilité des cellules de GBM en empêchant la liaison des intégrines aux ligands de la MEC (Cohen-Jonathan Moyal, 2012).

iv. Le microenvironnement vasculaire et hypoxique

Toute cellule a besoin d'un apport continu en nutriments afin d'assurer sa fonction, son développement ainsi que sa prolifération. Les cellules tumorales ont acquis la capacité de promouvoir le développement de leurs propres vaisseaux sanguins par détournement des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins normaux adjacents, c'est l'angiogénèse tumorale. Cependant, malgré cette capacité, les cellules tumorales prolifèrent plus rapidement que les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux ce qui mène à une irrigation insuffisante de la tumeur et donc à l'apparition de zones pauvres en oxygène appelées zones hypoxiques. L'hypoxie intratumorale va initier des réponses biologiques complexes impliquant une multitude de facteurs et de voies de signalisation intracellulaires influençant des propriétés tumorales telles que la prolifération, l'angiogénèse, la mort cellulaire ou encore le processus métastatique. Les cellules en hypoxie sont plus radiorésistantes que les cellules en normoxie (Oike et al., 2012) (Rockwell et al., 2009). Ceci s'explique par le fait que l'O₂ participe à la cascade de réactions impliquées dans la formation de ROS après irradiation, provoquant des dommages cellulaires parfois létaux pour la cellule. L'Oxygen Enhancement Ratio (OER) permet de quantifier le pouvoir sensibilisateur de l'oxygène. Il représente le rapport des doses nécessaires pour obtenir un même effet biologique pour un système irradié en absence ou en présence d'oxygène (Figure 20). Ce ratio se trouve généralement entre 2 et 3 pour les rayonnements de faible énergie et tend vers 1 pour les rayonnements de forte énergie.



Figure 20 : Fraction de survie de cellules cultivées en hypoxie ou normoxie.

(Adaptée de Rockwell et al., 2009). Courbes linéaires quadratiques représentant la fraction de survie de cellules cultivées en normoxie ou hypoxie en fonction de la dose d'irradiation. L'OER représente le rapport des doses d'irradiation en hypoxie et normoxie permettant d'obtenir un même effet biologique.

Des analyses microscopiques de coupes de tumeur de GBM montrent la présence de niches vasculaires et de nombreuses zones hypoxiques associées à l'expression de HIF1a (Kaur et al., 2005). Il est montré que les cellules endothéliales présentes dans la niche vasculaire jouent un rôle dans le maintien des CSCs de GBM via l'activation de la voie mTOR et participeraient donc potentiellement à la radiorésistance des cellules de GBM (Galan-Moya et al., 2011). Dans les zones hypoxiques, le facteur HIF1 α est classiquement stabilisé en condition hypoxique via l'inactivation des Prolyl Hydroxylases (Prolyl Hydroxylase Domain Protein; PHD) et du facteur d'inhibition de HIF1 (Factor Inhibiting HIF1; FIH). Il permet la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'angiogénèse, la vasculogénèse ainsi que la survie. Les zones hypoxiques surviennent en raison d'une prolifération accrue des cellules de GBM et d'une néovascularisation tumorale irrégulière entrainant une mauvaise diffusion de l'oxygène. De nombreuses études montrent un lien étroit entre la niche hypoxique et la résistance tumorale (Li et al., 2009b) (Marampon et al., 2014) (Kessler et al., 2010). En effet, il est montré que le microenvironnement hypoxique favorise la prolifération, l'autorenouvellement ainsi que la maintenance des CSCs de GBM (Heddleston et al., 2009) (Bar et al., 2010). L'hypoxie ainsi que le facteur pro-angiogénique FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2 ou bFGF) sont également associés à la radiorésistance tumorale via le facteur RhoB (Skuli et al., 2006) (Cohen-Jonathan Moyal, 2012). Plus

précisément, il est montré que c'est la forme farnésylée de RhoB qui est impliquée dans la radiorésistance des cellules tumorales via le contrôle de la sur-duplication radio-induite des centrosomes et la stabilisation du facteur HIF1 α (Milia et al., 2005) (Skuli et al., 2006).

Afin de palier à toutes ces résistances, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées et font appel à des inhibiteurs de HIF1a, de la voie FGF2/RhoB ou à l'utilisation d'anti-angiogéniques. Il est par exemple montré que l'inhibition pharmacologique de HIF1a dans les cellules tumorales de GBM après irradiation conduit à la destruction des vaisseaux sanguins tumoraux, un retard de la croissance tumorale et l'augmentation de la radiosensibilité (Moeller et al., 2004) (Jin et al., 2015) (Kessler et al., 2010). Le ciblage in vitro ou in vivo de la voie FGF2/RhoB via l'inhibiteur de la farnésylation (R115777) de RhoB mène également à l'augmentation de la radiosensibilité des cellules de GBM (Delmas et al., 2002) (Delmas et al., 2003). Un essai clinique démontre que la combinaison du Tipifarnib (inhibiteur de farnésyltransférases) et de la radiothérapie augmente la survie globale des patients atteints de GBM (Moyal et al., 2007) (Nghiemphu et al., 2011) (Ducassou et al., 2013). Les thérapies anti-angiogéniques avaient comme but premier d'inhiber la progression tumorale et les processus métastatiques en privant la tumeur de son apport en oxygène et en nutriment via la destruction des vaisseaux sanguins tumoraux. Plusieurs stratégies ont été développées : (i) le blocage des facteurs pro-angiogéniques comme le VEFG, (ii) le blocage des récepteurs des pro-angiogéniques comme le VEGFR2, (iii) le ciblage de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales avec par exemple l'endostatine ou (iv) l'inhibition de la dégradation de la MEC ou de la membrane basale avec, par exemple, des inhibiteurs de MMP-9. Cependant, les résultats ne furent pas à la hauteur des attentes. En effet, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-VEGF (le Bévacizumab) ne montre aucune augmentation de la survie des patients atteints de GBM seule ou en association avec la radiothérapie (Chinot et al., 2014) (Gilbert et al., 2014) (Hundsberger et al., 2017) (Liao et al., 2018). Ceci semble paradoxal puisque certains anti-angiogéniques comme le VEGF ou VEGFR2 sont connus pour provoquer une normalisation vasculaire (Jain, 2005). Durant ce processus, les vaisseaux sanguins deviennent moins perméables, plus matures, présentent une meilleure couverture péricytaire, la perfusion augmente et l'hypoxie diminue (Alaoui-Lasmaili and Faivre, 2018). Ces phénomènes devraient permettre une meilleure distribution de la chimiothérapie au sein de la tumeur ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à la radiothérapie. Cependant, des études montrent que ces effets bénéfiques ne
sont que de courte durée et qu'ils sont relayés par des effets délétères plus tardifs comme l'augmentation de la prolifération et de l'invasion tumorales (Lamszus et al., 2003).

Un autre processus important de résistance a été identifié dans d'autres types de tumeurs. En effet, il est montré une réoxygénation de la zone tumorale hypoxique primaire après irradiation par normalisation et exposition des cellules hypoxiques aux vaisseaux sanguins. Cette phase de réoxygénation après radiothérapie participe à la stabilisation et à la régulation de la transcription de HIF1 α via la production de ROS et la désagrégation des granules de stress des cellules tumorales hypoxiques contenant les transcrits de HIF1a (Figure 21) (Moeller et al., 2004) (Moeller et al., 2005) (Dewhirst et al., 2008). L'activation de HIF1a et des voies de signalisation induites par l'irradiation (PI3K/AkT, MEK/Erk et NFKB) se traduit par la sécrétion de facteurs de croissance radioprotecteurs (VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor). De plus, il est démontré que l'infiltration et l'activation des macrophages après l'irradiation engendrent la production de NO provoquant la S-nitrosylation de la cystéine 533 de HIF1a et par conséquent sa stabilisation (Li et al., 2007). Tous ces phénomènes permettent la protection des cellules endothéliales face aux dommages radio-induits ainsi que la radiorésistance des cellules tumorales. La stabilisation de HIF1a, l'augmentation du VEGF et la radiorésistance de certaines cellules tumorales sont inhibées par la Catalase, la GPX, la vitamine C ou un taux moyen de MnSOD, ce qui montre l'implication des ROS dans la régulation de l'hypoxie ainsi que dans la radiorésistance tumorale (BelAiba et al., 2004) (Wang et al., 2005) (Hsieh et al., 2010).

En résumé, l'une des limites de la radiothérapie est sans aucun doute l'acquisition de la radiorésistance par les cellules tumorales. Le glioblastome est une tumeur hautement résistante à la radiothérapie et nous avons vu que celle-ci peut être provoquée par différents processus dont l'interaction avec le microenvironnement.



Figure 21 : Mécanismes de régulation de HIF1 α et les conséquences sur la réponse des vaisseaux sanguins et de la tumeur à la radiothérapie.

(Adaptée de Correia-Melo et al., 2016). Une tumeur solide est constituée de cellules tumorales entourées notamment de vaisseaux sanguins tumoraux. Les cellules tumorales proches de ces vaisseaux se trouveront en zone normoxique alors que les cellules tumorales les plus éloignées se trouveront en zone hypoxique, c'est à dire dans des zones où le niveau d'oxygène est faible. Ces cellules en hypoxie comportent des granules de stress contenant les transcrits de HIF1 α . Les cellules tumorales en normoxie sont plus radiosensibles que celles en hypoxie et vont donc préférentiellement mourir après radiothérapie. Il s'en suit une réoxygénation de la tumeur conduisant à une production de ROS (*Reactive Oxygen Species*), une dégranulation des granules de stress ainsi qu'une infiltration de macrophages produisant du monoxyde d'azote (NO). Tous ces phénomènes mènent à la stabilisation de HIF1 α et à la survie des cellules endothéliales qui vont en retour sécréter des facteurs de survie et pro-angiogéniques participant à la croissance ainsi qu'à la radiorésistance des cellules tumorales survivantes. Il est possible d'empêcher la stabilisation de HIF1 α et la survie des cellules endothéliales par de nombreuses approches telles que les antioxydants ou les thérapies anti-angiogéniques. En conclusion, la radiothérapie est une méthode de traitement ancienne des cancers puisqu'elle existe depuis plus d'un siècle. Elle ne cesse de progresser grâce à une meilleure connaissance des tumeurs et de leur sensibilité aux radiations ionisantes, au développement de nouvelles technologies notamment dans le domaine de l'imagerie permettant des traitements de plus en plus précis. Elle présente de nombreux avantages de part ses propriétés locorégionales et conservatrices, son utilisation en combinaison avec d'autres traitements ainsi que son pouvoir palliatif. Cependant, l'efficacité de la radiothérapie présente également des limites notamment l'acquisition de la radiorésistance des cellules tumorales comme dans le cas du GBM. Les mécanismes de radiorésistances sont nombreux et ne sont pas seulement intrinsèques aux cellules cancéreuses mais également dus au microenvironnement.

A retenir

• La radiothérapie est un traitement anticancéreux efficace présentant des limites telles que l'acquisition de résistance par les cellules tumorales.

• Le glioblastome est une tumeur du SNC très agressive et infiltrante traitée par radiothérapie.

• De part le caractère infiltrant des GBM, les marges d'irradiation sont larges et peuvent atteindre 1/3 du cerveau.

• Les récidives sont systématiques et dans la grande majorité des cas dans le champs d'irradiation.

• La radiorésistance des cellules de GBM peut être due à de nombreux paramètres dont le dialogue avec les cellules du microenvironnement.

III. Impact de la radiothérapie sur le compartiment vasculaire

La radiothérapie est un traitement anticancéreux locorégional. Ses buts principaux sont d'envoyer une dose maximale de rayons sur la tumeur afin de tuer la majorité des cellules tumorales et une dose minimale sur les tissus sains et OAR péritumoraux afin d'éviter certains effets secondaires délétères. Cependant, l'irradiation va provoquer des lésions au niveau des tissus sains provoquant chez certains patients traités le développement d'effets secondaires aigus et tardifs. Le compartiment vasculaire constitue une cible préférentielle des rayonnements ionisants, en particulier lors de l'irradiation de tumeur invasive telle que le GBM. L'irradiation de ce compartiment engendre des dysfonctions importantes impliquées dans l'apparition d'effets secondaires aigus et tardifs ainsi que dans la réponse de la tumeur au traitement. Il semble donc très important de comprendre les modifications radio-induites de ce compartiment ainsi que leurs conséquences afin de mieux les contrôler. Nous décrirons dans cette partie la structure et les fonctions du compartiment vasculaire ainsi que les modulations radio-induites et leurs conséquences sur le développement d'effets secondaires et la réponse de la tumeur à la radiothérapie.

A. Le compartiment vasculaire

1. Structure du compartiment vasculaire

Le réseau vasculaire joue des rôles importants dans l'irrigation des tissus en favorisant les échanges gazeux, le drainage de déchets métaboliques ainsi que les apports essentiels en nutriments et facteurs de croissance. Il a également un rôle de barrière entre les composants du sang et les tissus environnants. On distingue deux types de vaisseaux sanguins : (i) les macrovaisseaux (artères et veines) et (ii) les microvaisseaux (capillaires). Les macrovaisseaux permettent la répartition du sang vers l'ensemble des organes. Les microvaisseaux assurent l'irrigation au sein des tissus et le maintien de leur homéostasie. Ces deux types de vaisseaux diffèrent de part leur structure. Les artères et veines sont composées de l'endothélium et de couches cellulaires supérieures, en particulier de cellules musculaires régulant la dilatation et la

constriction de ces vaisseaux. Les capillaires sont quant à eux beaucoup plus petits et formés uniquement d'une couche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale (Figure 22).



Figure 22 : Représentation des différents types de vaisseaux sanguins.

(Adaptée de Nussenbaum and Herman, 2010). On distingue deux types de vaisseaux sanguins : (i) les macrovaisseaux (artères et veines) et (iii) microvaisseaux (capillaires). Les artères et les veines sont composées de l'endothélium, d'une membrane élastique, de la média, de la lamina et de l'adventice. Les capillaires sont uniquement composés d'une couche de cellules endothéliales.

Il est important de noter que la majorité des tissus de l'organisme est composée de microvaisseaux. Il en existe 3 types dont le diamètre peut varier de 3 à 10 µm :

- Les capillaires continus : Ils sont composés de cellules endothéliales jointives, reposant sur une lame basale continue. On les retrouve dans les poumons, les muscles ou encore l'intestin. Le système nerveux central (SNC) est également composé de capillaires continus associés à des astrocytes. Cette structure particulière forme la barrière hématoencéphalique (BHE) qui représente un filtre très sélectif de molécules permettant ainsi la protection du cerveau.
- les capillaires fenestrés : Ils présentent des pores (environ 70nm) dans la paroi

endothéliale et reposent sur une lame basale continue. On les retrouve dans les zones de hauts échanges moléculaires telles que l'intestin, les reins et les glandes endocrines.

 les capillaires discontinus : Ils présentent des orifices de taille variable et reposent sur une lame basale discontinue. On les retrouve par exemple dans la moelle osseuse, la rate, et le foie. Ils permettent un ralentissement du flux sanguin.

L'endothélium est un tissu ubiquitaire tapissant l'ensemble des vaisseaux de l'organisme ainsi que l'intérieur des cavités cardiaques. Il est constitué de cellules endothéliales se trouvant à l'interface entre le sang et les tissus. Ces cellules dérivent du mésoderme qui se différencie rapidement en angioblastes lors de l'embryogénèse pour donner naissance à un réseau vasculaire primaire immature : c'est la vasculogénèse. Ce réseau primaire va ensuite continuer son développement et évoluer en un réseau vasculaire mature grâce au processus d'angiogenèse. Les cellules endothéliales sont aplaties, polarisées et reliées par des jonctions intercellulaires (desmosomes et jonctions serrées). Leur durée de vie est comprise entre 1 et 3 ans et elles sont décrites comme étant très peu proliférantes puisqu'elles ne se divisent en moyenne que 1 à 2 fois par an. Elles peuvent toutefois être soumises à des proliférations physiologiques lors du processus de cicatrisation, ou pathologiques lors de l'angiogenèse tumorale. Elles sont soumises à un stress permanent dû au flux sanguin exerçant des forces de cisaillement importantes, et aux molécules circulantes comme les facteurs de croissance ou les molécules inflammatoires. Elles participent grandement au maintien de l'homéostasie tissulaire grâce à la présence de nombreux récepteurs membranaires permettant une réponse très rapide aux stimuli extérieurs.

2. Fonctions principales de l'endothélium

L'endothélium est un tissu connu pour réguler une multitude de fonctions (Figure 23). Nous décrirons dans cette partie ses fonctions les plus importantes.



Angiogenèse et vasculogénèse Formation de vaisseaux sanguins

Figure 23 : Fonctions des cellules endothéliales et molécules impliquées.

(Adaptée de Galley and Webster, 2004). Les cellules endothéliales régulent l'homéostasie des vaisseaux sanguins. Elles sont impliquées dans la régulation de la perméabilité vasculaire via le processus de VVO (Vacuolo-vesicular organelle; VVO) ou la régulation de la E-cadhérine impliquée dans les jonctions cellules-cellules. Elles régulent également l'hémostase et la coagulation via la sécrétion de facteurs pro-coagulants (TF (Tissu Factor) et vWF (Von Willebrand Factor)) ou anti-coagulants comme l'héparane sulfate la thrombomoduline et le TFPI (Tissu Factor Pathway Inhibitor). Le tonus vasculaire est régulé par les vasodilatateurs comme le NO (Nitric Oxyde) ou PGi2 (Prostaglandine i2) ou les vasoconstricteurs tels que ET-1 (Endothelin-1) et PAF (Platelet Activating Factor). Les processus d'angiogénèse et de vasculogénèse sont régulés via la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2). Enfin le processus d'inflammation est régulé par les molécules ICAM1/2 (Intracellular Adhesion Molecule 1 et 2), VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule), PCAM (Platelet endothelial Cell Adhesion Molecule) et la E-cadhérine.

a. L'hémostase

L'hémostase définit l'ensemble des mécanismes assurant le maintien du sang à l'intérieur des vaisseaux ainsi que les phénomènes déterminants l'arrêt du saignement lorsqu'un vaisseau est endommagé. En absence de lésion, les cellules endothéliales participent au maintien de la fluidité sanguine en empêchent l'agrégation plaquettaire et la coagulation grâce à la sécrétion d'anticoagulants ou de facteurs anti-thrombotiques comme la thrombomoduline, PGi2 (Prostaglandine i2), le NO ou le TFPI (*Tissu Factor Pathway Inhibitor*) (Cines et al., 1998) (Rosenberg, 1989) (Dahlbäck, 2017). Cependant, en cas de lésions de l'endothélium, les

cellules endothéliales vont s'activer, modifier leur profil d'expression génique et favoriser les processus pro-thrombotiques et pro-coagulants via la sécrétion de facteurs tels que le TF (*Tissu Factor*) et le facteur Von Willebrand (*van Willebrand Factor*; *vWF*) permettant l'hémostase et la réparation du tissu (Cines et al., 1998).

b. Le tonus vasculaire

L'endothélium a également pour rôle de réguler le tonus vasculaire en favorisant des phénomènes de vasoconstriction ou de vasodilatation permettant la régulation du flux et de la pression sanguine. Cette régulation se fait via la sécrétion de facteurs de contraction ou de relaxation agissant sur les cellules musculaires lisses entourant les macrovaisseaux. Les molécules vasodilatatrices les plus connues sont le NO, qui est produit par la NO-synthase endothéliale (*endothelial Nitric Oxyde Synthase*; *eNOS*), et PGi2. A l'inverse, les médiateurs vasoconstricteurs sont l'endothéline-1 (ET-1) ou le facteur activateur des plaquettes (*Platelet Activating Factor*; *PAF*). Il est à noter que la production de NO par les cellules endothéliales est constitutive et peut être régulée par différents stimuli alors que la synthèse des autres médiateurs est inductible.

c. La perméabilité

L'endothélium constitue une barrière semi perméable entre le sang et les tissus, régulant les échanges de gaz, d'ions, de molécules et de protéines. La perméabilité de cette barrière diffère selon le type de capillaire présent dans l'organe irrigué. Les molécules de moins de 40kDa peuvent traverser l'endothélium de manière spontanée. En revanche, pour les molécules plus importantes, deux grands mécanismes principaux ont été décrits : (i) la formation d'organelles vesiculo-vacuolaires (*Vacuolo-vesicular organelle*; *VVO*) et (ii) la désintégration des jonctions intercellulaires (Dvorak and Feng, 2001) (Claesson-Welsh, 2015). Le premier mécanisme fait appel à la formation de vacuoles qui vont passer d'un site à un autre via l'intérieur de la cellule endothéliale et vont décharger leur contenu dans l'espace périvasculaire. C'est le cas de la BHE qui est formée de jonctions très serrées et résistantes empêchant le transport passif de solutés. Le second mécanisme implique la désintégration des jonctions intercellulaires et peut être activé par différents stimuli comme le VEGF ou encore l'inflammation médiée par les cytokines. Ces signaux vont provoquer la phosphorylation de la VE-cadhérine, responsable des jonctions intercellulaires, et mener à sa désintégration. La dissolution de ces jonctions peut être transitoire et elles peuvent être très rapidement reformées par recyclage de la VE-cadhérine intracellulaire.

d. L'inflammation

Les cellules endothéliales sont connues pour exprimer à leur surface une multitude de molécules d'adhésion régulant la circulation des cellules sanguines. En réponse à un stimulus pro-inflammatoire, ces molécules permettent l'infiltration de certaines cellules du système immunitaire (comme les leucocytes) présentes dans le sang vers le site inflammatoire. Ce recrutement au site inflammatoire nécessite l'expression coordonnée des molécules d'adhésion ainsi qu'une signalisation spécifique.

En condition normale, les cellules endothéliales non activées expriment faiblement mais de manière constitutive la protéine ICAM-2 (*Intracellular Adhesion Molecule-2*) sur laquelle va se fixer la L-selectine exprimée à la surface des leucocytes. En condition inflammatoire, trois étapes sont nécessaires afin de mener les leucocytes sur le site de l'inflammation (Cines et al., 1998). La première étape consiste en l'activation des cellules endothéliales par les cytokines. Ces cellules activées vont en retour sécréter des cytokines et chimiokines et exprimer à leur surface la E-cadhérine pouvant se lier aux oligosaccharides présents à la surface des leucocytes. Cette interaction est faible et transitoire. Elle permet aux leucocytes de rouler sur l'endothélium (*rolling*). La deuxième étape repose sur l'expression d'intégrines par les leucocytes leur permettant d'interagir fortement avec les molécules d'adhésion ICAM1/2, VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) et PCAM (*Platelet endothelial Cell Adhesion Molecule*) présentent à la surface des cellules endothéliales. Enfin, la dernière étape consiste au passage trans-endothéliale des leucocytes vers le site pro-inflammatoire, c'est l'extravasation. La dilatation des vaisseaux et la contraction des cellules endothéliales permettent de favoriser le passage des leucocytes.

e. La vasculogénèse et l'angiogénèse

La vasculogénèse est un processus ayant lieu lors de l'embryogénèse où les angioblastes dérivés du mésoderme vont donner naissance à un réseau vasculaire primaire immature. Lorsque le cœur commence à battre, une morphogénèse est initiée. Il en résultera la

maturation du réseau primaire et la formation des artères et des veines formant alors le réseau vasculaire mature. Les phases précoces de la vasculogénèse nécessitent le facteur de croissance VEGF1 et son récepteur VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*).

Le processus angiogénique correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants pour répondre principalement à un besoin accru des tissus en oxygène. Ce processus se déroule en plusieurs étapes successives. La première étape consiste en la dégradation de la MEC par les protéases produites par les cellules endothéliales ainsi qu'à l'augmentation de la perméabilité facilitant leur prolifération et leur migration à travers le tissu. La seconde étape est le recrutement des péricytes qui sont des cellules permettant la maturation des vaisseaux néoformés. L'angiogenèse est finement régulée par l'équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques (VEGF, PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), etc.) et anti-angiogéniques (Endostatine, thrombospondine 1 et 2, etc.). L'hypoxie définit le manque d'oxygène et induit la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor-1*) et ainsi la production et la sécrétion du VEGF. Cette molécule va ensuite diffuser dans le tissu et se fixer sur ses récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales adjacentes conduisant à leur activation, leur prolifération et ainsi la formation d'un nouveau vaisseau sanguin.

Le réseau vasculaire adulte étant mature et quiescent, le processus d'angiogenèse physiologique n'intervient que dans certains cas particuliers tels que la cicatrisation. Cependant, dans le cas du développement tumoral, une tumeur solide atteignant le volume de 1mm³ nécessite un apport en oxygène afin de poursuivre sa croissance. Il se produit alors un déséquilibre de la balance pro- et anti-angiogénique de l'environnement tumoral en faveur des pro-angiogéniques (Figure 24).



Figure 24 : Le switch angiogénique.

(Adaptée de Yue et al., 2007). Afin de continuer sa croissance, une tumeur de plus d'1mm³ nécessite un apport supplémentaire en oxygène et en nutriments. Les cellules tumorales vont pour cela sécréter des facteurs pro-angiogéniques (FGF, VEGF, Angiopoiétine, etc.) afin d'activer le processus d'angiogénèse tumoral. Le déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques en faveur des proangiogéniques définit le Switch angiogénique.

Cet évènement clé de la progression tumorale est appelé Switch angiogénique. Dans ce cas, l'angiogenèse est pathologique et permet de détourner le réseau vasculaire normal afin de favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et ainsi de promouvoir la croissance tumorale. Les cellules tumorales en condition d'hypoxie synthétisent des facteurs proangiogéniques, des chimiokines, des enzymes de dégradation de la MEC, favorisant la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Cines et al., 1998).



Les vaisseaux tumoraux formés lors de l'angiogenèse présentent des différences

structurales et fonctionnelles par rapport aux vaisseaux sanguins normaux (Figure 25).

Figure 25 : Différences entre les vaisseaux sanguins normaux et tumoraux.

Les vaisseaux sanguins normaux présentent une architecture bien organisée. Leurs cellules endothéliales (CEs) sont quiescentes, polarisées, reposent sur une membrane basale continue et sont recouvertes d'une forte couverture péricytaire. Ces vaisseaux sont matures, non dilatés, peu perméables et assurent un flux sanguin normal. A l'inverse, les cellules endothéliales composant les vaisseaux tumoraux sont en prolifération et ont un métabolisme plus glycolytique. La couverture péricytaire est faible et la membrane basale est incomplète. Ces vaisseaux sont immatures, dilatés, perméables et le flux sanguin est anormal.

Ces vaisseaux sont instables, déstructurés, plus dilatés et plus perméables. La membrane basale et la couverture péricytaire sont anormales et les cellules endothéliales présentent des caractéristiques particulières comme leur morphologie, leur prolifération, leur migration ou encore leur expression génique (Hida et al., 2013). Plusieurs mécanismes peuvent être

impliqués dans la formation de vaisseaux tumoraux. Il a été démontré que des progéniteurs circulants des cellules vasculaires existaient dans le sang (Takakura et al., 2000). Ces progéniteurs peuvent contribuer au développement de nouveaux vaisseaux sanguins et participer à la vascularisation de la tumeur. Un autre phénomène décrit en 1999 met en évidence la transdifférenciation des cellules tumorales en cellules de phénotype endothéliales (Maniotis et al., 1999). En d'autres termes, les cellules cancéreuses miment les cellules endothéliales jusqu'à former un nouveau vaisseau sanguin. On appelle ce phénomène le mimétisme vasculaire. Le vaisseau néoformé peut être totalement composé de cellules tumorales transdifférenciées en cellules endothéliales normales. Il est également montré que les cellules endothéliales composant les vaisseaux tumoraux ont un métabolisme différent des cellules endothéliales normales de part leur prolifération plus importante (Cantelmo et al., 2016). La structure anormale de ces vaisseaux sanguins peut jouer un rôle dans la résistance aux traitements en entravant la distribution d'agents chimiothérapeutiques au sein de la tumeur.

B. Réponses du compartiment vasculaire à la radiothérapie

L'atteinte vasculaire est très fréquente et est considérée comme la cause majeure de la morbidité radio-induite à long terme chez les survivants de cancers traités par radiothérapie. Nous développerons dans cette partie les différentes réponses de l'endothélium aux rayonnements ionisants.

1. L'activation des cellules endothéliales

L'activation des cellules endothéliales après irradiation se traduit par l'augmentation d'expression des protéines d'adhésion à leur surface telles que VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1 et la E-sélectine (Heckmann et al., 1998) (Gaugler et al., 2004) (Nübel et al., 2004). Une étude *in vivo* met en évidence que l'irradiation induit l'expression de ICAM-1 dans les cellules endothéliales et que celle-ci est associée à une augmentation de la capacité d'adhésion des neutrophiles et est conservée jusque 10 jours après irradiation. De plus, une étude de microscopie intravitale montre une baisse d'adhésion des leucocytes à l'endothélium dans les souris ICAM-1^{-/-} 24 heures après irradiation de la zone abdominale à 10Gy (Mollà et al., 2003). Ces résultats suggèrent un phénotype pro-inflammatoire chronique des cellules endothéliales irradiées (Gaugler et al., 1997).

Une autre conséquence de l'irradiation de l'endothélium est l'augmentation de la coagulation. Il est démontré, chez l'homme, une déficience en thrombomoduline qui survient rapidement après irradiation, qui perdure dans le temps et qui est associée à la surexpression de la thrombine traduisant un perte de thromborésistance (Cines et al., 1998) (Wang et al., 2002). De plus, l'irradiation induit une augmentation d'expression des facteurs TF et vWF impliqués dans l'induction de la fibrinogénèse et l'inhibition de la fibrinolyse (Verheij et al., 1995) (van Kleef et al., 2000). Par ailleurs, l'inhibiteur des activateurs du plasminogène PAI-1 est impliqué dans des effets secondaires radio-induits tels que les entéropathies (Milliat et al., 2008a). En effet, cette protéine joue le rôle d'anti-fibrinolytique via l'inhibition des facteurs tPA et urokinase impliqués dans l'activation du plasminogène et par conséquent de la fibrinolyse. Il a été mis en évidence in vivo que l'inhibition de PAI-1 dans les cellules endothéliales augmente la survie des souris et diminue la sévérité de l'entérite aiguë ainsi que la fibrose tardive (Rannou et al., 2015). Ces résultats suggèrent que l'irradiation induit des modulations au niveau des cellules endothéliales leur conférant des phénotypes antifibrinolytiques et pro-coagulants impliqués dans des atteintes tissulaires radio-induites sévères.

2. L'apoptose endothéliale radio-induite

De nombreuses études démontrent que la mort préférentielle des cellules endothéliales après irradiation est l'apoptose dépendante de l'activation de l'Asmase et de la génération de céramide à la membrane. Ce second messager va ensuite activer des voies de signalisation impliquant des protéines telles que p38/MAPK, RAS/RAF/MEK/ERK provoquant des modifications membranaires ainsi qu'une cascade d'évènements conduisant à l'apoptose de la cellule (Sánchez et al., 1994) (Niaudet et al., 2017). Il a été montré que l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales est inhibée dans des souris Asmase^{-/-} (Paris et al., 2001) (Garcia-Barros et al., 2003). De plus, l'inhibition du céramide par un anticorps bloquant ou son antagoniste (S1P) permet également de prévenir l'apoptose des cellules endothéliales après irradiation (Bonnaud et al., 2010) (Rotolo et al., 2012). A l'inverse, la surexpression de

l'Asmase augmente la mort cellulaire radio-induite *in vivo* (Smith and Schuchman, 2008) (Stancevic et al., 2013).

3. L'angiogénèse

L'irradiation peut activer l'angiogénèse de la tumeur de manière dépendante de la dose et du temps. En effet, l'expression du VEGF (facteur primordial dans l'angiogénèse) peut être influencée par l'irradiation, l'hypoxie ou tout autre stress environnemental. De plus, l'expression de certaines protéines impliquées dans la dégradation de la MEC telles que MMP-2 ou MMP-9 augmente en réponse à l'irradiation (Nirmala et al., 2000). Par ailleurs, la stimulation de l'expression et de l'activité de la protéine eNOS par l'irradiation permet l'augmentation du NO ainsi que la migration et la prolifération de cellules endothéliales dans un modèle d'angiogénèse in vivo (Sonveaux et al., 2003). Il est également montré dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris qu'une irradiation de 2Gy stimule la migration des progéniteurs endothéliaux (via l'activation du VEGF et de MMP-9) de la moelle osseuse vers la circulation périphérique, induisant alors le processus de vasculogénèse (Heissig et al., 2005). Enfin, une étude in vivo montre que des faibles doses d'irradiations (0,3Gy) augmentent l'angiogénèse des cellules endothéliales microvasculaires de poumons (Vala et al., 2010). Si les faibles doses d'irradiation ont été décrites comme augmentant l'angiogénèse des tissus sains, une étude démontre que ceci n'est pas le cas pour le tissu tumoral. En effet, les travaux du groupe de Park et coll visent à comparer les différences entre les processus angiogéniques des tissus tumoraux et des tissus normaux en réponse à l'irradiation. Ils ont montré qu'une irradiation de 4Gy de cellules endothéliales dérivées de tissus normaux augmente la formation de capillaire via l'activation de la voie ERK/MMP-2. En revanche, l'irradiation de 4Gy de cellules endothéliales dérivées de tumeur du sein inhibe la formation de capillaires via la sécrétion d'IL-6 et la génération d'angiostatine (Oh et al., 2014). Les cellules endothéliales normales et tumorales diffèrent donc de part leur morphologie et leur structure mais également de part leur réponse à l'irradiation.

Il est important de noter que l'effet pro-angiogénique de l'irradiation se fait à de faibles doses. A l'inverse, des fortes doses d'irradiation ont des effets délétères sur les processus de vascularisation en particulier la cicatrisation. Par exemple, une étude montre qu'une dose d'irradiation de 20Gy provoque une diminution du VEGF plasmatique associée à une diminution de la perfusion cutanée et du nombre de capillaire dans un modèle de cicatrisation cutanée chez la souris (Ebrahimian et al., 2009). Cependant, les mécanismes moléculaires associés à une diminution des processus angiogénique après de fortes doses d'irradiation restent encore peu connus.

4. La sénescence

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* et chez le patients montrent que les cellules endothéliales sont capables d'entrée en sénescence après différentes doses d'irradiation (Dong et al., 2014) (Panganiban and Day, 2013) (Ungvari et al., 2013) (Park et al., 2016) (Azimzadeh et al., 2015) (Borovski et al., 2013). Cependant, les mécanismes moléculaires ne sont pas complétement établis et semblent être dépendant de plusieurs paramètres tels que le types de cellules endothéliales et la dose d'irradiation (Mendonca et al., 2011).

Nous avons précédemment énoncé que les protéines p53 et p16^{INK4a} sont impliquées respectivement dans l'initiation et le maintien de la sénescence. Cependant, ceci n'est pas avéré dans tous les types cellulaires puisqu'il est montré que, dans les cellules endothéliales, la voie p53/p21^{WAF1} semble être plus importante que la voie p16^{INK4a}/Rb. En effet, l'augmentation d'expression de la protéine p53 est observée dès les premières heures suivant l'irradiation de manière dépendante de la dose et du temps (Gajdusek et al., 2001). De plus, la simple inhibition de p53, mais pas de p16^{INK4a}, permet de réduire la sénescence des cellules endothéliales induite par différents stimuli (Chen et al., 2006) (Kim et al., 2014).

L'expression de p53 peut être stimulée par la persistance d'activation des voies de signalisation des dommages de l'ADN. Par exemple, il est montré que la sénescence prématurée des cellules endothéliales macrovasculaires proliférantes (HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)) est dépendante de l'activation de p53 via la protéine ATM (Zhan et al., 2010). De plus, le traitement des cellules avec un inhibiteur d'ATM permet la réduction du niveau de sénescence endothéliale *in vitro*. Cependant, si beaucoup d'études indiquent que la sénescence est dépendante de l'activation des voies de réparation des dommages à l'ADN, d'autres montrent que des cellules déficientes en protéines de réparation de l'ADN sont capables de rentrer en sénescence prématurée (Park et al., 2013). L'implication des mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN dans la sénescence radio-

induite demande donc à être éclaircie.

La protéine p53 peut également être stimulée par un stress oxydant chronique, l'expression de la protéines XIAP1 (*X-linked Inhibitor of Apoptosis-associated Factor 1*) ou la voie IGF1/IGF1R/PI3KK/Akt/mTOR connue comme étant des voies modulatrices de la sénescence radio-induite des cellules endothéliales (Panganiban et al., 2013) (Yentrapalli et al., 2013). (Heo et al., 2016) (Zhan et al., 2010).

Les mitochondries et les ROS occupent une place importante dans la sénescence des cellules. En effet, il existe une théorie (Free radical theory of aging) associant le stress oxydatif et les mitochondries dans la cellule et beaucoup d'études sont faites à partir de ce postulat (Harman, 1956). En effet, les cellules endothéliales sénescentes sont décrites comme ayant un niveau de ROS intracellulaire élevé. Le prétraitement par des antioxydants comme le NAC (N-Acétyl Cystéine), la Catalase, la vitamine D ou le MnTBAP* permet de réduire le niveau de sénescence endothéliale, ce qui suggère que la sénescence peut être régie par un stress oxydant chronique (Zhan et al., 2010) (Li et al., 2011b) (Marampon et al., 2016). L'augmentation des ROS après irradiation peut être due à la surexpression des NOX ou encore un « découplage » de la protéine eNOS de son cofacteur BH4 favorisant la production d'anion superoxyde (Frey et al., 2009) (Valerio and Nisoli, 2015). De plus, certaines études montrent que des dysfonctions mitochondriales peuvent être associées à une augmentation de ROS, à un phénotype sénescent et à des dysfonctions vasculaires parfois importantes (Yoon et al., 2003) (Wiley et al., 2016). En effet, les souris âgées déficientes en MnSOD (haploinsuffisance) présentent des dysfonctions vasculaires et un niveau de superoxyde plus important que les souris âgées sauvages (Brown et al., 2007). Le traitement oral avec l'anti-oxydant MitoQ restaure les dysfonctions endothéliales chez des souris âgées grâce à la réduction du stress oxydant mitochondrial (Gioscia-Ryan et al., 2014). Toutes ces études démontrent donc l'implication du stress oxydant mitochondrial dans le vieillissement des cellules endothéliales et les dysfonctions associées. Toutefois, si les altérations des fonctions mitochondriales après irradiation peuvent favoriser l'augmentation du stress oxydant, il n'a jamais été démontré leur rôle dans la sénescence radio-induite des cellules endothéliales. Or, nous pouvons penser que les mitochondries altérées par la première vague de stress oxydant radio-induite, pourraient être responsables d'une seconde vague oxydative permettant un maintien chronique du stress

^{*} Manganèse 5, 10, 15, 20-tetrakis (4 benzoic acid) porphyrin

oxydant dans la cellule et jouant un rôle dans le vieillissement cellulaire prématuré.

En résumé, l'endothélium est un tissu ubiquitaire présentant des fonctions diverses participant au maintien du bon fonctionnement des organes. Ces fonctions peuvent être modulées par les rayonnements ionisants et il est admis que les atteintes vasculaires sont une des causes majeures des effets secondaires précoces et tardifs des patients.

C. Rôle de l'endothélium dans le développement des dommages tissulaires radio-induits

L'irradiation des tissus sains induit des lésions classées selon la cinétique d'apparition des symptômes : aigus, subaigus et tardifs. La plupart des patients traités par radiothérapie vont développer des effets aigus tels que des nausées ou des radiodermites et environ 10% présenteront des complications tardives telles que les fibroses radiques. L'incidence et la sévérité des effets secondaires observés dépendent de multiples facteurs comme la dose totale reçue, le type d'organe irradié, le fractionnement utilisé ainsi que la radiosensibilité individuelle du patient. La réponse de l'endothélium à l'irradiation participe grandement à l'initiation et la progression des dommages tissulaires radio-induits (Milliat et al., 2008b) (Supiot and Paris, 2012). Les effets tissulaires précoces sont, dans la majorité des cas, la conséquence de la mort radio-induite des cellules endothéliales provoquant ainsi la dysfonction de l'organe. Les effets plus tardifs impliquent les cellules survivantes et se traduisent par : une détérioration des capillaires, une augmentation de la perméabilité, un épaississement de la membrane basale, une augmentation du volume du capillaire et des cellules, une activité pro-inflammatoire, une activité thrombotique et une activité profibrotique. Tout ceci pouvant favoriser une dérégulation chronique de l'homéostasie du tissu environnant.

Il est montré que l'apoptose précoce des cellules endothéliales dépendante de la voie du céramide est retrouvée dans de nombreux tissus tels que le cerveau, l'intestin, les poumons ou encore le cœur (Fuks et al., 1994) (Paris et al., 2001) (Burrell et al., 2012) (Lee et al., 2012). La protection des cellules endothéliales de cette apoptose précoce a permis de diminuer les signes de toxicité. Par exemple, l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales est inhibée

par le facteurs bFGF *in vitro* et *in vivo* et permet d'améliorer la survie des souris atteintes de pneumopathie radique (Haimovitz-Friedman et al., 1991) (Peña et al., 2000). (Fuks et al., 1994). De manière similaire, des études montrent que le traitement par le bFGF, une déficience en Asmase ou encore l'utilisation d'un anticorps anti-céramide diminue l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales et améliore la survie des souris en réduisant le Syndrome Gastro-Intestinal (SGI) (Paris et al., 2001) (Rotolo et al., 2012).

Les dommages tissulaires tardifs peuvent être caractérisés, entre autres, par une fibrose qui est définie par une diminution de l'élasticité, de la souplesse et de la structure des tissus. Elle est principalement due à une sclérose vasculaire et une accumulation progressive de MEC, notamment du collagène, dû à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des constituants de la MEC. Elle est décrite dans de nombreux tissus et organes irradiés tels que la peau, les poumons, le cœur, les reins ainsi que l'intestin. La fibrose peut, dans les cas les moins sévères, altérer la qualité de vie du patient mais peut également engager le pronostic vital dans les cas les plus sévères. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu sont comparables au processus de cicatrisation pathologique, médié par les cellules endothéliales, inflammatoires, fibroblastiques et épithéliales, et caractérisé par la sécrétion rapide de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1, IL-6) pro-fibrosantes (TGF-β, IL-13, PAI-1), de facteurs de croissance, d'enzymes protéolytiques (thrombine) et de chimiokines. Cet environnement pro-inflammatoire chronique engendre l'augmentation de la perméabilité endothéliale, la formation d'un œdème et une altération de la barrière endothéliale favorable à l'activation du système de coagulation. L'augmentation des facteurs pro-coagulants et prothrombotiques, comme la thrombine et le TGF- β , ainsi que les macrophages activés vont favoriser la production de collagène et de MEC en favorisant la prolifération, le recrutement et l'activation des fibroblastes. Les fibroblastes activés vont se différencier en myofibroblastes et participer au déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la MEC dû à une diminution de l'expression de métalloprotéinases et une augmentation de l'expression d'inhibiteur des collagénases (Delanian and Lefaix, 2004) (Straub et al., 2015). Tous ces phénomènes participent à l'accumulation de la MEC et ainsi à l'apparition de la fibrose tissulaire.

En résumé, l'endothélium joue un rôle dans l'apparition de complications radio-induites aiguës ou tardives pouvant être très délétères pour le patient. La compréhension des mécanismes impliqués semble donc primordial afin d'améliorer la qualité de vie ainsi que la survie à long terme des patients traités par radiothérapie.

D. Rôle de l'endothélium dans la radiorésistance tumorale

1. Impact de la mort radio-induite des cellules endothéliales

Si la mort radio-induite des cellules endothéliales est impliquée dans l'apparition d'effets secondaires précoces, elle est également impliquée dans la réponse de la tumeur à la radiothérapie. En effet, l'inhibition de l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales via l'inactivation du gène de l'Asmase ou le prétraitement avec les facteurs angiogéniques bFGF ou VEGF, réprimant la production de céramide par l'Asmase, diminue la réponse de la tumeur à la radiothérapie (Garcia-Barros et al., 2003) (Paris et al., 2001) (Truman et al., 2010) (Haimovitz-Friedman et al., 1997). De plus, le traitement *in vitro* des cellules endothéliales avec un anticorps monoclonal antagoniste du récepteur VEGFR2 (DC101) ou un anti-VEGF (G6-31) induit une augmentation rapide de l'activité de l'Asmase et par conséquent une production de céramide et une radiosensibilisation des cellules tumorale (Truman et al., 2010). Ces études démontrent donc que l'apoptose des cellules endothéliales est impliquée dans la radiosensibilisation de la tumeur et que l'action des anti-angiogéniques permet d'accentuer ce phénomène via l'augmentation de la génération du céramide par la voie Asmase.

2. Impact de la sénescence des cellules endothéliales

Les cellules sénescentes sont généralement connues pour jouer des rôles anti- et protumoraux importants notamment via la sécrétion de facteurs du SASP telles que les cytokines ou les protéases (Figure 26)



Figure 26 : Effets pro- et anti-tumoraux du SASP.

(Adaptée de Di Mitri and Alimonti, 2016). Le SASP correspond au sécrétome des cellules sénescentes et peut avoir des effets antagonistes pro- et anti-tumoraux. Par exemple, les molécules CXCL1 et CXCL2 sont capables d'activer le système immunitaire permettant la clairance de la tumeur. Les ROS ainsi que l'IL-1 α permettent le maintien de la sénescence via leur action autocrine, ou provoquent la sénescence des cellules adjacentes via une action paracrine. A contrario, les métalloprotéases Matricielles (MMPs), l'IL-6, CXCL8 et le HGF permettent d'augmenter les phénomènes d'invasion tumorale. L'IL-1 β provoque la Transition Epithelio-Mesenchymateuse (EMT) impliquée dans les phénomènes de migration et d'invasion. L'angiogénèse est activée par les facteurs VEGF et PDGF. Enfin, la prolifération cellulaire peut être augmentée grâce à la sécrétion des facteurs tels que CXCL1 et EGF.

Les expériences menées *in vitro* suggèrent que la sénescence agit comme une barrière anti-tumorale, et de nombreux résultats valident cette hypothèse *in vivo* (Collado and Serrano, 2010). Par exemple, des cellules sénescentes sont observées dans des foyers de tumeurs bénignes mélanocytaires ou dans de nombreuses lésions précancéreuses, mais elles sont généralement absentes dans les tumeurs malignes où les voies p53 et pRb ont été inactivées (Michaloglou et al., 2005). De plus, le SASP peut avoir des effets paracrines ou juxtacrines et activer la sénescence des cellules adjacentes régulant ainsi la prolifération tumorale (Nelson et al., 2012). Il a récemment été montré que les effets du SASP passent par la production de ROS provoquée par des dysfonctions mitochondriales permettent l'activation de la voie NfkB et ainsi la sénescence des cellules avoisinantes (Nelson et al., 2018). Le ou les facteur(s) sécrété(s) engagé(s) dans ce processus reste(nt) encore inconnu(s) mais il s'avèrerait que CXCL8 et l'IL-6 ne seraient pas impliqués. Les facteurs du SASP coopèrent également avec les voies p53 et pRb, impliquées dans le processus de sénescence, et permettent de réduire le risque de transformation maligne. De plus, la réactivation *in vivo* de p53 dans des cellules de carcinomes hépatiques provoque la sénescence de ces cellules et la sécrétion de facteurs du SASP permettant l'activation du système immunitaire, la clairance des cellules tumorales sénescentes et la régression de la tumeur (Xue et al., 2007).

Cependant, les résultats de l'équipe de Judith Campisi suggèrent que, paradoxalement, certains aspects de la sénescence, comme l'inflammation et la sécrétion de facteurs de remodelage de la MEC, pourraient également favoriser la cancérogenèse, la progression tumorale et jouer un rôle dans la réponse des tumeurs aux traitements (Campisi, 2005). L'effet le plus pro-tumorigénique du SASP est sa capacité à augmenter la prolifération tumorale. Il est démontré que la sécrétion de certains facteurs du SASP par les cellules sénescentes peut augmenter la prolifération in vitro et in vivo des cellules épithéliales prémalignes et malignes (Krtolica et al., 2001) (Liu and Hornsby, 2007). Le SASP peut également avoir des effets pro-angiogéniques via la production de VEGF permettant la prolifération des cellules endothéliales. Il est montré que la densité des vaisseaux sanguins est plus importante lorsque la tumeur se développe en présence de fibroblastes sénescents (Coppé et al., 2006). Un autre effet pro-tumoral du SASP est sa capacité à créer un gradient favorisant la migration et l'invasion tumorale. Par exemple, le SASP de fibroblastes sénescents induit une Transition Epithelio-Mésenchymateuse (Epithelial to Mesenchymal Transition; EMT) dans deux lignées de cancer du sein non agressives (T47D et ZR75.1) ainsi que l'invasion de la membrane basale (Coppé et al., 2008) (Laberge et al., 2012).

Une multitude d'études décrit donc l'implication de la sénescence et du SASP dans des effets anti- et pro-tumoraux. Cependant, très peu d'études décrivent l'impact des cellules sénescentes et du SASP dans la réponse de la tumeur à la radiothérapie. Des études, *in vitro*, *in vivo* ou chez le patient, montrent la présence de cellules endothéliales sénescentes après irradiation (Borovski et al., 2013) (Kim et al., 2014) (Dong et al., 2014) (Correia-Melo et al., 2016) (Nagane et al., 2018). Cependant, aucune étude ne démontre l'impact de ces cellules dans le devenir de la tumeur après radiothérapie. Par ailleurs, il est montré que les fibroblastes sénescents peuvent induire une croissance inappropriée ainsi que la radiorésistance des cellules épithéliales mammaires et de leucémies (Tsai et al., 2005) (Tsai et al., 2009) (Habiel et al., 2016). Au vu de ces résultats, il paraît essentiel de mieux comprendre l'implication de la sénescence radio-induite des cellules endothéliales dans la réponse des tumeurs à la radiothérapie.

*

En résumé, bien que la radiothérapie soit un traitement locorégional, les tissus sains avoisinants la tumeur ne sont jamais totalement épargnés par les rayons. C'est le cas de l'endothélium qui est le constituant majeur des vaisseaux sanguins. Les modulations radioinduites des cellules endothéliales composants ce tissu participent à l'apparition d'effets secondaires aigus et tardifs ainsi qu'à la réponse de la tumeur à la radiothérapie. Si l'acquisition du phénotype sénescent par ces cellules a été décrite après irradiation dans de nombreuses études, son implication dans la réponse de la tumeur à la radiothérapie n'est pas connue. Il est donc primordial d'étudier le dialogue entre les cellules endothéliales sénescentes et les cellules tumorales dans le but de comprendre son implication dans le devenir de la tumeur afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie.

A retenir

• Le compartiment vasculaire constitue une cible préférentielle des rayonnements ionisants, en particulier lors de l'irradiation de tumeurs invasives telles que le GBM.

o Les cellules endothéliales sont très peu proliférantes et la majorité des tissus est composée de microvaisseaux.

 Les cellules endothéliales jouent un rôle dans le développement d'effets secondaires radio-induits aigus et tardifs ainsi que dans la réponse de la tumeur à la radiothérapie.

• Des cellules endothéliales sénescentes sont retrouvées après irradiation *in vitro*, *in vivo* et sur des coupes de tumeur de patients atteints de GBM.

IV. Objectifs des travaux de recherche

La radiothérapie représente avec la chimiothérapie et la chirurgie, l'un des traitements standard du cancer, avec plus de la moitié des patients traités par radiothérapie. Contrairement à la chimiothérapie, qui est un traitement systémique, la radiothérapie est un traitement locorégional basé sur l'émission de rayons focalisés sur la tumeur. L'efficacité de la radiothérapie dépend du choix de la technique de traitement tenant compte de la dose nécessaire au contrôle tumoral, de la dose de tolérance aux tissus sains contenus dans le volume irradié, de la nature des complications qui peuvent survenir et de leurs conséquences. Ses objectifs principaux sont d'envoyer une dose maximale de rayons sur la tumeur afin de tuer la majorité des cellules tumorales tout en minimisant la dose reçue par les tissus sains et OAR péritumoraux afin d'éviter certains effets secondaires délétères. Cependant, l'irradiation va provoquer des lésions au niveau des tissus sains provoquant chez la majorité des patients traités le développement d'effets aigus et dans 10% des cas des complications tardives. De plus, l'acquisition de résistance par les cellules tumorales va participer à l'échec de la radiothérapie en favorisant la rechute de la tumeur. La compréhension des mécanismes associés à cette radio-résistance est aujourd'hui un enjeu majeur en cancérologie afin de prévenir les rechutes et d'augmenter la survie des patients.

Parmi les tissus sains, le compartiment vasculaire composé de cellules endothéliales n'est jamais totalement épargné par les rayons surtout dans le cas de tumeurs infiltrantes telles que le glioblastome. Cette tumeur du système nerveux central très agressive et traitée, entre autres, par radiothérapie, récidive dans 90% des cas dans le champ d'irradiation initial (Gebhardt et al., 2014). Il est montré sur des coupes de biopsies de patients atteints de GBM et traités par radiothérapie qu'un tiers des cellules endothéliales comprises dans le champ d'irradiation sont sénescentes (Borovski et al., 2013). Cependant, les mécanismes moléculaires ainsi que l'implication de ces cellules sénescentes dans la réponse du GBM à la radiothérapie sont peu connus. Les objectifs de cette thèse ont donc été de mieux définir les voies moléculaires impliquées dans la sénescence radio-induite des cellules endothéliales ainsi que d'étudier leur rôle dans la réponse du GBM à la radiothérapie (Figure 27). Ce projet se décline en cinq grande parties comprenant l'étude des voies moléculaires impliquées dans la sénescence radioinduite des cellules endothéliales ainsi que la caractérisation de leur sécrétome (SASP), les modulations phénotypiques induites par ce SASP après irradiation des cellules de GBM, l'identification du couple ligand/récepteur impliqué dans ces modulations et l'étude de l'agressivité des cellules de GBM irradiées en présence de SASP dans un modèle orthotopique murin.

S'il s'avère que la sénescence des cellules endothéliales a un effet néfaste sur la réponse du GBM à la radiothérapie, la compréhension des mécanismes impliqués dans le dialogue entre ces deux compartiments nous permettra de mettre en évidence de potentielles cibles thérapeutiques afin d'améliorer l'efficacité du traitement et par conséquent la survie des patients.





Mon projet de thèse se divise en différentes parties comprenant la caractérisation des voies moléculaires impliquées dans la sénescence radio-induite des cellules endothéliales, la caractérisation du SASP de ces cellules, l'étude des modulations phénotypiques induites par ce SASP après irradiation des cellules de GBM, l'identification du couple ligand/récepteur impliqué dans ces modulations et l'étude de l'agressivité des cellules de GBM irradiées en présence de SASP dans un modèle orthotopique murin.

RESULTATS

<u>Article 1</u>: Les voies moléculaires impliquées dans la sénescence radio-induites des cellules endothéliales microvasculaires quiescentes

« Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation » Publié dans : *Free Radical Biology and Medicine* en Avril 2017

Audrey Lafargue^{*}, <u>Charlotte Degorre^{*}</u>, Isabelle Corre, Marie-Clotilde Alves-Guerra, Marie-Hélène Gaugler, François Vallette, Claire Pecqueur, François Paris **Co-auteurs*

Lors de la radiothérapie, les tissus sains adjacents à la tumeur, en particulier les cellules endothéliales ne sont jamais totalement épargnées. L'irradiation de ces cellules peut mener à des effets secondaires précoces et tardifs pouvant être très délétères pour le patient. Il y a quelques années, notre équipe de recherche a montré que l'irradiation des cellules endothéliales provoque une apoptose précoce dépendante de la voie Asmase/Céramide, impliquées dans l'apparition d'effets secondaires aigus et pouvant être inhibée par un traitement à la S1P. Notre intérêt c'est par la suite porté sur les effets tardifs de l'irradiation des cellules endothéliales, en particulier à la sénescence.

De nombreuses expériences concernant l'étude de la sénescence radio-induites des cellules endothéliales sont réalisées avec des cellules macrovasculaires en prolifération alors que la majorité des tissus est composé de microvaisseaux et que la plupart des cellules endothéliales sont quiescentes. Très peu d'études sont faites avec des cellules endothéliales microvasculaires quiescentes, bien que ce soit le modèle le plus représentatif de la physiologie. De ce fait, nous avons développé dans cette étude un nouveau modèle de cellules endothéliales primaires microvasculaires quiescentes (HMVEC-L (*Human Microvascular Endothélial Cells-Lung*)). A partir de ce modèle, le but de cette étude à été dans un premier temps de comprendre le lien entre les effets précoces et tardifs de l'irradiation sur les cellules endothéliales et dans un second temps de mieux caractériser les voies moléculaires impliquées dans la sénescence radio-induite de ces cellules.

Contents lists available at ScienceDirect

ELSEVIER





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

Original article

Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation



Audrey Lafargue^{a,1}, Charlotte Degorre^{a,1}, Isabelle Corre^a, Marie-Clotilde Alves-Guerra^{b,c,d}, Marie-Hélène Gaugler^a, François Vallette^{a,e}, Claire Pecqueur^a, François Paris^{a,e,*}

^a CRCINA, INSERM, CNRS, Université de Nantes, Nantes, France

^b Inserm UMR1016, Paris F-75014, France

^c CNRS UMR8104, Paris F-75014, France

^d Université Paris Descartes, Paris F-75014, France

^e Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain F-44800, France

ARTICLE INFO

Keywords: Senescence Endothelial cell Mitochondrial oxidative stress Ionizing radiation

ABSTRACT

Ionizing radiation causes oxidative stress, leading to acute and late cellular responses. We previously demonstrated that irradiation of non-proliferating endothelial cells, as observed in normal tissues, induces early apoptosis, which can be inhibited by pretreatment with Sphingosine-1-Phosphate. We now propose to better characterize the long-term radiation response of endothelial cells by studying the molecular pathways associated with senescence and its link with acute apoptosis. First, senescence was validated in irradiated quiescent microvascular HMVEC-L in a dose- and time-dependent manner by SA β-galactosidase staining, p16^{Ink4a} and p21^{Waf1} expression, pro-inflammatory IL-8 secretion and DNA damage response activation. This premature aging was induced independently of Sphingosine 1-Phosphate treatment, supporting its nonconnection with acute IR-induced apoptosis. Then, senescence under these conditions showed persistent activation of p53 pathway and mitochondrial dysfunctions, characterized by O2- generation, inhibition of respiratory complex II activity and over-expression of SOD2 and GPX1 detoxification enzymes. Senescence was significantly inhibited by treatment with pifithrin-a, a p53 inhibitor, or by MnTBAP, a superoxide dismutase mimetic, validating those molecular actors in IR-induced endothelial cell aging. However, MnTBAP, but not pifithrin- α , was able to limit superoxide generation and to rescue the respiratory complex II activity. Furthermore, MnTBAP was not modulating p53 up-regulation, suggesting that IR-induced senescence in quiescent endothelial cells is provided by at least 2 different pathways dependent of the mitochondrial oxidative stress response and the p53 activation. Further characterization of the actors involved in the respiratory complex II dysfunction will open new pharmacological strategies to modulate late radiation toxicity.

1. Introduction

Radiotherapy is a foremost weapon to fight cancer progression through the promotion of deadly oxidative stress in the tumor cells. However, it is also known to potentially induce major acute and chronic side-effects in irradiated normal tissues in the periphery of the tumor, leading to pathogenesis including tissue necrosis, fibrosis, atrophy, atherosclerosis, or heart failure [1]. Deciphering the multicellular and molecular mechanisms in normal tissue radiation response will permit new pharmacological strategies to limit those radiation toxicities.

Within the complexity of molecular and cellular mechanisms,

endothelium network is regarded as a major player in radiation toxicities [2,3]. The response of the vasculature to radiation can be defined as early and late effects, according to the appearance of the tissular damage. Microvascular endothelial cell apoptosis after high dose of radiation constitutes a primary lesion involved in acute organ failure, including gastrointestinal syndrome [4], blood-spinal cord brain barrier breakdown [5], central nervous syndrome [6], and parotid gland hypo-salivation [7]. Cell death is triggered by the sphingolipid ceramide generated upon hydrolysis of sphingomyelin by acid sphingomyelinase [4]. Pharmacological treatment with Sphingosine 1-phosphate (S1P), a ceramide metabolite with antagonist proper-

E-mail address: francois.paris@inserm.fr (F. Paris).

http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.019 Received 21 November 2016: Received in revised form 1 April

Received 21 November 2016; Received in revised form 1 April 2017; Accepted 16 April 2017 Available online 19 April 2017 0891-5849/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: IR, irradiation; ROS, reactive oxygen species; DDR, DNA damage response; SASP, senescence-associated secretory phenotype; O/N, overnight

^{*} Correspondence to: Centre de Recherche en Cancérologie Immunologie Nantes-Angers, UMR Inserm 1232 CNRS 6299, IRS-UN 8 quai Moncousu BP 70721, 44007 Nantes Cedex 01, France.

¹ Co-authorship.

ties, blocks irradiation (IR)-induced microvascular endothelial cell apoptosis, inhibiting small intestine necrosis [4,8]. On the other hand, IR induces late persistent endothelial dysfunctions, including microvessel collapse and activated phenotype, and ultimately premature aging and senescence [2]. These effects impact normal tissue homeostasis leading to ischemia or fibrosis through increase of hypoxia and inflammation [1].

Senescence, a notable long-term cell dysfunction induced by ionizing radiation, contributes to age-related diseases [9]. Senescent cells are characterized by their inability to cycle and the up-regulation of senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) staining. Two types of senescence have been described: the replicative senescence, occurring after high number of cell division leading to mitosis exhaustion and the premature senescence appearing in response to genotoxic or oncogenic stress [9]. Several molecular pathways are ubiquitously triggered during aging process. DNA damage and its signaling response generated by a high level of intracellular reactive oxygen species (ROS) remain activated during senescence. DNA damage response (DDR) is initiated by the phosphorylation of the phosphatidylinositol 3-kinaserelated protein kinases (ATM, ATR and DNA-PKcs), activating a stress response signaling involving yH2AX histone, cell cycle modulator Chk1 and Chk2 proteins and p53 [10]. Then, senescence-induced cell cycle arrest is under the control of p53 and/or p16Ink4a activities leading respectively to p21^{Waf1} over-expression and to retinoblastoma hypophosphorylation. Finally, the maintenance of a senescence-associated secretory phenotype (SASP) also represents a hallmark of senescence. This secretome includes pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL) – 1, 6, 8 and TNF- α , and occurs after the establishment of the persistent DDR signaling [11].

After exposure to various stresses, endothelial cells may undergo senescence that leads to vascular dysfunctions. Premature aging in macrovascular HUVEC impairs angiogenesis after alteration of mitochondrial redox state, through the repression of pro-survival Bcl-2 removing antioxidant glutathione from the mitochondrial membrane and leading to ROS generation [12]. Ionizing radiation or oxidative stress induces a premature senescence in macrovascular HUVEC, BAEC and cerebromicrovascular CMVEC models with a long-term persistence of DDR and SASP [13-15]. Proteomic analysis of senescent HUVEC after low dose irradiation showed an up-regulation of the p53/p21^{Waf1} pathway [16]. Furthermore, invalidation of p53 by siRNA also inhibited senescence in microvascular HMVEC-L after exposure to 4 Gy [17]. However, proliferating status of those endothelial cell models have limited significance to physiopathology since cell division in normal vessels occurs rarely, every 1–3 years [18]. Senescence, in those studies, was observed within the first weeks after IR while vascular dysfunctions appeared after weeks or even months later. Furthermore, molecular mechanisms inducing IR-induced senescence in quiescent microvascular endothelial cells, predominant in normal tissues, remains totally unknown and may involve actors different from those previously described in proliferative macrovascular endothelial cells [12].

The present manuscript aims at better characterizing IR-induced long-term senescence in non-proliferating endothelial cells. The link between acute death and long-term premature aging will be defined after blocking apoptosis by S1P pretreatment. Then, senescence will be deciphered through the characterization of some foremost actors of the molecular cascade, comprising p53 overexpression, dysfunction of the respiratory chain complex II (Cplx II) of the mitochondria and the generation of O₂-. Finally, pharmacological inhibition of those actors will permit to validate and order the signaling pathways involved in the IR-induced quiescent endothelial cell senescence.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and treatments

Primary Human Lung Microvascular Endothelial Cell, HMVEC-L

(primary human cells, female, Caucasian, 34 years old) were seeded at 5000 cells/cm² in EBM-2 with 5% FBS and EGM-2 supplement (all products, Lonza Bioscience) until reaching complete confluence. Medium was changed for low serum EBM-2 with 0.1% FBS 18 h before IR. One μ M S1P (Aventi polar Lipids) or its vehicle (PET; prepared as described [19]) was added 2 h before IR ranging to 15 Gy with a CP-160 irradiator (Faxitron X-ray Corp.). Low-serum medium was replaced by complete EBM-2 2 h after IR, and then weekly. Cell cultures were maintained for 28 days. Non-toxic concentration of pifithrin- α (PFT- α ; 10 μ M; Sigma-Aldrich), KU55933 (5 μ M; Selleckchem), N-acetyl-cystein (NAC; 1 mM; Sigma-Aldrich), or Manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP; 1 μ M; Merck) were added at day 4, 7, 10, 13, 16, 19, and 21 post-IR.

2.2. Cellular death assay

As described [20], death fraction was estimated on Malassez slides by the ratio of floating cell number to total cell number (floating +adherent). Floating cell population represented the non-adherent cells in the culture medium and the loosely adherent cells issued from PBS washes of the monolayer.

2.3. Senescence-associated β -Galactosidase assay

As described [21], 4% paraformaldehyde (PFA)-fixed cells in 6-well plates were incubated O/N without CO₂ at 37 °C with SA β -galactosidase staining solution (1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside or X-gal; 5 mM potassium ferrocyanide; 2 mM MgCl2; 150 mM NaCl; 40 mM citric acid; 12 mM NaH2PO4; Sigma-Aldrich. Images were captured under optical microscopy (DM IRB; Leica; x200 magnification). SA β -gal-positive cells (blue staining) were reported on the total cell number per field representing a mean of 150 cells (3 independent wells per experiment).

2.4. Western blot analysis and quantification

Twenty µg of HMVEC-L proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF Immobilon-P membranes (Millipore). Milk 5% or WBR (Roche) saturated membranes were hybridized O/N at 4 °C with a primary antibody, and with a HRP-coupled secondary antibody. Proteins of interest were revealed by Clarity Western Blot ECL substrate (Biorad). Primary antibodies were directed against p21^{Waf1} and p16^{Ink4a} (respectively 556430, 554079; BD); p53 and Bcl-2 (M7001, mo897; Dako); actin (05-636, MAB1501; Millipore); MDM2 (AF1244; R & D); ATM (GTX70103, GenTex); phospho-Ser1981 ATM (DR1002; Calbiochem); total and phospho-Ser2056 DNA-PKcs, SOD2, GPX1 and catalase (ab1832, ab18192, ab13533, ab22604 and ab16731; Abcam); total and phospho-Thr68 Chk2, Bax, Bcl-xl (CS3440 2661, 2774, 2764; Cell Signal.). Mitochondrial complex subunits are detected using Total OXPHOS Human WB antibody Cocktail (ab110411, Abcam) containing antibodies against CplxI subunit NDUFB8 (ab110242), Cplx II subunit 30 kDa (ab14714), Cplx III subunit Core 2 (ab14745), Cplx IV subunit II (ab110258), and ATP synthase subunit α (ab14748). Densitometric analyses were performed with Biorad software.

2.5. Interleukin-8 quantification

Human Interleukin-8 (IL-8) dosages were performed weekly by ELISA on HMVEC-L supernatants following the company's protocol (Quantikine ELISA kits, R & D).

2.6. Total ROS and superoxide anions quantification

Total ROS and superoxide anions were measured respectively with chloromethyl derivative of 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) and MitoSOX[™] Red (C6827, M36008, Invitrogen)

molecular probes. As described by the company's protocol, the fluorescence released by probes oxidation was measured by FacsCalibur (BD) in live cells then analyzed with CellQuest (BD).

2.7. Mitochondrial respiration analysis

HMVEC-L were seeded at 5000 cells/cm² in 24-well XF microplate and cultured until reaching confluency. Cells were irradiated in XF microplates and oxygen consumption rate (OCR) was measured 7 days later using XF24 Analyzer (Seahorse), as described in Oizel et al. [22]. Briefly, after cell equilibration in bicarbonate-free DMEM medium supplemented with 25 mM glucose, 1 mM pyruvate and 2 mM glutamine (all Sigma-Aldrich), OCR was measured at baseline and after addition of respectively oligomycin, CCCP, rotenone and antimycin-A (each 0.6 μ M). Basal OCR was calculated as the mean of the first 4 measures of OCR, before any drug injection, minus OCR after antimycin A corresponding to non-mitochondrial respiration. Cplx I activity was calculated by the subtraction of OCR after rotenone to basal OCR and Cplx II activity by the difference between OCR after rotenone and OCR after antimycin A. All measurements were done in 5 wells per condition per experiment and repeated at least 3 times.

2.8. Mitochondrial morphology and mass quantification

HMVEC-L were incubated with Mitotracker[™] Red CMXRos (Invitrogen) for 30 min at 37 °C before 4% PFA fixation. Mitochondria morphology was examined on slides counterstained with Prolong Gold DAPI (Sigma) under confocal microscope (Nikon A1 630x magnification). Mitochondrial mass per cell were assessed on 15,000 cells by FacsCalibur and CellQuest analysis.

2.9. yH2AX immunostaining

 γ H2AX immunostaining was performed as described [23]. Briefly, HMVEC-L were seeded at 5000 cells/cm² on glass coverslips coated with 1% gelatin and grown to confluence. One hour, 7 days and 14 days post-15 Gy, cells were fixed in 4% PFA, and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Cells were incubated with γ H2AX antibody (9718, Cell Signaling) O/N at 4 °C, then with anti-IgG-Alexa568 (A11036, Invitrogen) 1 h, at RT and counterstained with Prolong Gold DAPI (Sigma). γ H2AX foci number in nucleus section were observed under confocal microscope (Nikon A1 630x magnification) and count was processed using ImageJ (NIH). Number of foci per cell was reported on the total cell number per field representing a mean of 350 cells from 9 fields (3 independent experiments).

2.10. Statistical analysis

Three independent experiments were performed per study. Student's *t*-test and ANOVA with 95% confidence estimation were performed with Prism 6 software.

3. Results

3.1. IR induces senescence in quiescent microvascular endothelial cells, independently of apoptosis modulation by S1P

In this study, microvascular HMVEC-L were used because of their ability to remain in a quiescence phase for several weeks, as observed in normal physiology. We first summarized IR-induced acute apoptosis in this primary endothelial cell model, as previously described in other endothelial cell models [20]. Exposure to 15 Gy induced an early wave of apoptosis within 24 h with no further death event in the next 72 h (Fig. 1). Acute apoptosis was inhibited by 40% with a unique pretreatment of 1 μ M S1P.

Then, long-term senescence was investigated in irradiated HMVEC-L



Fig. 1. *IR-induced acute apoptosis in quiescent HMVEC-L is inhibited by S1P pretreatment.* Percentage of dead cells after irradiation at 15 Gy, assessed by floating cells assay, 24 and 72 h after pretreatment with S1P or the vehicle (mean $\% \pm$ SD, *P < 0.01, n = 3).

by 4 independent hallmarks: SA β -gal activity, p21^{Waf1} and p16^{Ink4a} expression, IL-8 SASP secretion and persistent DDR activation (Fig. 2). The percentage of senescent HMVEC-L expressing SA β-gal (blue staining; Fig. 2A) increased in a dose- and time-dependent manner and reached $63.9\% \pm 3.5$, day 28 after 15 Gy (vs. 0 Gy; mean % \pm SEM, P < 0.01; Fig. 2B). $p16^{Ink4a}$ and $p21^{Waf1}$ expression increased progressively, day 21 after IR (Fig. 2C). Pro-inflammatory IL-8 secretion was significantly increased in HMVEC-L medium in a dosedependent manner all along the experiment (Fig. 2D). Senescence was finally confirmed by the persistence of DNA damage and the activation of DNA damage response (DDR). Fourteen days after exposure to 15 Gy, cells exhibited a low but significant amount of YH2AX foci (median number of foci per cell: 4 after 15 Gy vs. 0 after 0 Gy; Fig. 2E-F). Because of those residual DNA damages, we then studied the DDR signaling pathway by analyzing expression of both the total and the phosphorylated forms of ATM, DNA-PKcs, and Chk2 (Fig. 2G). All 3 proteins were phosphorylated day 21 after 15 Gy, proving the persistent DDR activation. Altogether, the 4 hallmarks of senescence (SA β -gal assay, $p16^{Ink4a}$ and $p21^{Waf1}$ expression and IL-8 secretion, $\gamma H2AX$ and DDR activation) demonstrated the long-term senescence outcome of quiescent HMVEC-L at a dose ranging from 1 to 15 Gy. Interestingly, anti-apoptotic S1P did not modulate the expression of these senescent markers in irradiated HMVEC-L (Fig. 2).

3.2. IR induces long-term p53 pathway activation combined with expression of mitochondrial detoxification enzymes and mitochondrial ROS production

Because of its involvement in radiation stress response and the senescence fate, we studied long-term p53 response [24]. Persistent activation of this pathway was confirmed by the concomitant expression of p53 and its related regulator MDM2 and effector p21^{Waf1}, in a dose dependent manner by Western blot from day 7 to day 28, regardless to S1P pretreatment (Fig. 3A). DDR involvement in p53 activation was validated by treatment with ATM inhibitor, KU55933, which blocked strongly the expression of p53 and MDM2 and moderately the one of p21^{Waf1}, in irradiated HMVEC-L (Fig. 3B). Since p53 is involved in oxidative stress response, we investigated whether ROS could be implicated in IR-induced endothelial cell senescence. In fact, chronic treatment with antioxidant N-acetylcysteine (NAC) after 15 Gy significantly decreased senescence by 37.4% \pm 8.3 (vs. IR+vehicle; mean $\% \pm$ SD, P < 0.01; Fig. 3C). Then, expression of several important intracellular anti-oxidant proteins was studied by Western blot (Fig. 3D). Interestingly, expression of mitochondrial proteins superoxide dismutase-2 (SOD2) and glutathione peroxidase 1 (GPX1) was increased in a dose-dependent manner from day 7 to day 28, whereas expression of the cytoplasmic catalase did not change. In agreement with our previous results, S1P did not affect anti-oxidant protein expression. Because of its inability to modulate senescence and long-



Fig. 2. *IR induces long-term senescence in quiescent HMVEC-L, independently of S1P pretreatment.* A) Senescent cells (blue cells) assessed by SA β -gal assay by optical microscopy, day 28 after 15 Gy and S1P pretreatment. Scale Bar: 20 μ m. B) Senescent cell percentage from SA β -gal assay counted in function of dose, time and S1P pretreatment (mean $\% \pm$ SD, \ast P < 0.01, n = 3). C) p16^{Ink4a} and p21^{Waf1} proteins expression evaluated by Western blot in function of dose and S1P pretreatment, day 21 post-IR (n = 3, representative blot). D) Cumulative IL-8 secretion in cellular medium in function of dose, time and S1P pretreatment (mean $\% \pm$ SEM, \ast P < 0.01, n = 3). E) γ H2AX foci (red staining) observed under fluorescent microscopy, day 14 after 15 Gy and S1P pretreatment. Cells were counterstained with DAPI (blue). Scale Bar: 20 μ m. F) Number of γ H2AX foci per cell, day 14 post-15 Gy and S1P (mean \pm SD, n = 3). G) Total and phosphorylated forms of DNA damage response members ATM, DNA-PKcs and Chk-2, evaluated by Western blot, day 14 post-15 Gy and S1P (n = 3, representative blot).

term molecular pathways induced by IR, studies using S1P pretreatment were excluded to the following experiments. Since mitochondrial antioxidant proteins were up-regulated during IR-induced endothelial cells senescence, total and mitochondrial ROS production were measured day 21 post-15 Gy, using respectively CM-H2DCFDA and Mito-SOXTM Red probes. Total ROS were not modulated by IR, whereas mitochondrial superoxide anions (O₂-) were significantly increased by more than 67.8% ± 5.2 (vs. 0 Gy; mean % ± SD, P < 0.01; Fig. 3E).

Altogether, IR induces long-term p53 activation and mitochondrial oxidative stress in senescent endothelial cells.

3.3. IR-induced persistent mitochondria dysfunctions

Since our results suggest that IR induced mitochondrial dysfunctions, we evaluated the oxygen consumption rate (OCR) after irradiation. Basal OCR was similar in control and in 15 Gy-irradiated HMVEC-



Fig. 3. *IR induces long-term p53 pathway activation and mitochondrial oxidative stress response in quiescent HMVEC-L.* A) p53, MDM2 and p21^{WAF1} expression, assessed by Western blot in function of dose, time and S1P pretreatment (n=5, representative blot). B) p53, MDM2 and p21^{WAF1} expression assessed by Western blot, day 21 post-15 Gy and KU55933 (n=3, representative blot). C) Percentage of senescent cells chronically treated with NAC after 15 Gy. Senescence was assessed by SA β -gal assay, day 21 post-irradiation (mean $\% \pm$ SD, * P < 0.01, n = 3). D) Detoxification enzymes SOD2, GPX1 and catalase expression assessed by Western blot in function of dose, time and S1P (n=5, representative blot). E) Quantification of total reactive oxygen species and mitochondrial superoxide, assessed respectively with CM-H2-DCFDA and MitoSOXTM Red by FACS analysis, day 21 post-15 Gy (mean of fluorescence \pm SD, *P < 0.01, n=3).

L at day 7 (Fig. 4A). Oligomycin and CCCP addition showed that IR did not modify mitochondrial respiration dedicated to ATP production and maximal mitochondrial respiration capacity. To determine the relative contribution of the mitochondrial respiratory chain complexes (Cplx) I and II activities to OCR, oxygen consumption was recorded after sequential addition of rotenone and antimycin A, which inhibit respectively Cplx I and Cplx III. First, addition of rotenone in unirradiated cells showed that nearly 90% of OCR was dependent of complex I, the remaining 10% of OCR relies on Cplx II (Fig. 4B). IR did not significantly affect Cplx I contribution, but decreased Cplx II activity to a barely non-detectable level (15 Gy: $4.4\% \pm 1.1$ vs. 0 Gy; $13.4\% \pm 3.5$; mean \pm SEM; P < 0.01). Western blot against the labile subunits required for the correct folding of the 5 respiratory chains of the complexes, demonstrated that all complexes were correctly expressed. These results suggest that the decrease of Cplx II activity in senescent cells was not related to a down-regulation or an abnormal structural conformation (Fig. 4C).

Members of Bcl-2 family are related to mitochondrial homeostasis and senescence [12]. In quiescent HMVEC-L 21 days after IR, Bax and Bcl-xL proteins were up-regulated in a dose-dependent manner whereas expression of Bcl-2 was down-regulated all along the experiment (Fig. 4D). Finally, mitochondrial network disturbance was assessed by observation of the mitochondria morphology using the MitotrackerTM Red CMXRos probe. Quiescent unirradiated cells exhibited a similar mitochondrial network at day 0 and day 21 (Fig. 4E). However, this network was spread out in irradiated cells. This microscopic observation was validated by quantitative FACS analysis showing a 30% increase of the mitochondrial mass 21 days after exposure to 15 Gy (vs. 0 Gy; P < 0.01; Fig. 4F).



Fig. 4. *IR induces persistent mitochondrial dysfunctions in quiescent HMVEC-L.* A) Oxygen consumption rate (OCR) in control and irradiated HMVEC-L, day 7 post-15 Gy. Basal OCR as well as OCR following injection of oligomycin, CCCP, rotenone and antimycin A were measured (mean \pm SD, n=4, *P < 0.01). B) Relative contribution of complex I and II to basal OCR in control and 15 Gy-irradiated cells C) Expression of the labile subunits of mitochondrial chain complexes using OXPHOS antibody cocktail, assessed by Western blot, day 7 post-15 Gy (n=3, representative blot). D) Bax, Bcl-xl and Bcl-2 proteins expression, assessed by Western blot, day 7 and 14 post-15 Gy (n=3, representative blot). E) Mitochondrial network assessed by immunostaining with Mitotracker[™] Red CMXRos, day 21 post-15 Gy. Cells were counterstained with DAPI (blue). Scale Bar: 20 µm. F) Mitochondrial mass per cell quantified by Mitotracker[™] Red CMXRos by Facs assay, day 21 post-15 Gy (mean of fluorescence \pm SD, *P < 0.01, n = 3).

3.4. p53 and mitochondrial O_{2} - are implicated in IR-induced endothelial cells senescence in 2 separated pathways

To better characterize their involvement in senescence, pharmacological inhibition of p53 activity and mitochondrial O₂:-, was assessed in HMVEC-L. Chronic treatment with PFT-a, a p53 transcriptional activity inhibitor [25] and/or a manganese metalloporphyrin (MnTBAP), a SOD-mimetic [26], were performed starting 4 days post-IR to avoid potential acute radiosensitization. Here, both inhibitors significantly reduced the SA β -gal positive-staining and the expression of p21^{Waf1} by at least 40% in 15 Gy-irradiated cells (each drug vs. IRsham; n=3; P < 0.01; Fig. 5A-B), validating a role for p53 and mitochondrial O2- in IR-induced quiescent microvascular endothelial cell senescence. Those results were confirmed with the other senescent marker $p16^{\mathrm{Ink4}}\text{,}$ which was moderately repressed by PFT and strongly by MnTBAP (Fig. 5C). Moreover, co-treatment with both drugs totally reverted senescence. These 2 pharmacological strategies did not modulate the amount of yH2AX foci per HMVEC-L cell 14 days after exposure to 15 Gy as compared to irradiated control (Fig. 5D).

Then, interconnection between p53 and O₂-- was studied. First, p53 overexpression in senescent HMVEC-L was blocked by PFT- α , but not MnTBAP (Fig. 6A). Next, we determined whether mitochondrial O₂-- and mitochondrial Cplx II dysfunction may be connected with p53 pathway. PFT- α treatment did not affect the respiratory Cplx II activity (Fig. 6B) nor the generation of mitochondrial O₂--, respectively at 7 and 21 days after exposure to 15 Gy (Fig. 6C). Then, we studied the impact

of SOD mimetic on mitochondrial dysfunctions. Interestingly, MnTBAP rescued the Cplx II activity (Fig. 6D) and limit the generation of O₂-(Fig. 6E). Those data clearly demonstrate the discrepancy between 2 senescent pathways involving either O₂- generation related to mitodysfunction of respiratory Cplx II or the protein p53.

4. Discussion

Our previous studies highlighted the mechanism of early apoptosis in non-proliferating endothelial cell after exposure to high-dose of IR [8,20]. In the present study, we now established that confluent nonproliferating endothelial cells also respond to IR by activating a longterm senescence program, through 2 independent mechanisms: the mitochondrial dysfunction associated with oxidative stress and the activation of p53 pathway.

Senescence has already been described in endothelial cells exposed to oxidative stress [13,27] and ionizing radiation [15–17,28–30]. However, studies were mainly performed in a model of proliferating macrovascular endothelial cells (HUVEC and BAEC) that poorly reflects the normal physiological vasculature. First, supply of organs with oxygen and nutrients involves the microvascular network that plays a key role in tissue homeostasis. Secondly, endothelial cells in normal tissues are mostly not dividing [18]. We established that death mechanisms induced by IR may differ in endothelial cells depending on their proliferating status [20]. Irradiated quiescent endothelial cells died by apoptosis within hours through ceramide generation, whereas A. Lafargue et al.



Fig. 5. Inhibiting p53 activity or superoxide dismutase mimetic blocks IR-induced endothelial cells senescence. Percentage of senescent cells chronically treated with PFT- α and/or MnTBAP after 15 Gy. Senescence was assessed by SA β -gal assay, day 21 post-IR. (mean $\% \pm$ SD, *P < 0.01, n = 6). B) p21^{Waf1} and C) p16^{Ink4a} expression, evaluated by Western blot in PFT- α and/or MnTBAP-treated HMVEC-L, day 21 post-15 Gy (n=6, representative blot). D) Number of γ H2AX foci per cell in PFT- α - and/or MnTBAP-treated HMVEC-L, day 14 post-15 Gy (mean \pm SD, n = 3).

proliferating endothelial cells are also killed within days through a mitotic death triggered by misrepaired DNA breaks. If senescence is clearly observed in proliferating cells after IR, this premature aging in non-dividing endothelial cells remains uncharacterized. Igarishi et al. showed that HUVEC and BAEC irradiated at confluent stage developed senescence [20]. However, senescence was observed when quiescent cells were replated at lower density immediately after IR allowing cells to proliferate. In the present study, we demonstrated that a broad range of therapeutic dose of IR (from 1 to 15 Gy) induces a long-term senescence of non-proliferating microvascular endothelial cells, as shown by several hallmarks: SA β -gal assay, p16^{Ink4a} and p21^{Waf1} protein expression, IL-8 secretion and DDR activation.

Interestingly, our cellular model allows to investigate whereas endothelial cells committed to acute IR-induced apoptosis switch to long-term senescence once their apoptotic program is inhibited. As already described in microvascular SV-40 transformed HMEC-1 [20], we showed in quiescent HMVEC-L that, S1P pretreatment inhibits IRinduced acute cell death (Fig. 1). However, senescence occurred in irradiated endothelial cells, independently of S1P pretreatment, suggesting that IR-induced acute apoptosis and long-term senescence are mediated by 2 distinct pathways. Our results are in agreement with Panganiban and coll., where the blockade of IGF-1R with AG1024 treatment inhibits IR-induced senescence, but not apoptosis [31].

Underlying mechanisms in IR-induced senescence remain underinvestigated. The p53/p21^{Waf1} pathway expression has been predominantly defined as a key actor of H₂O₂- and IR-induced proliferating macrovascular endothelial cell senescence [13,32]. We also observed the enhancement of the expression of p53 and its related regulator MDM2 and effector p21^{Waf1} during IR-induced quiescent microvascular senescence (Fig. 3A). The fact that PFT- α significantly blocks HMVEC-L senescence, definitely links p53 to IR-induced premature aging. Furthermore, we explain the limited inhibition of p21^{Waf1} and p16^{Ink4a} by PFT- α by a regulation of those senescence biomarkers by a p53dependent pathway, but also though a mitochondrial-dependent and p53-independent mechanism. In fact, it has been shown that cristacarpin treatment in PANC-1 or MCF-7 promotes endoplasmic reticulum stress, ROS generation and p53-independent senescence defined by SA- β -gal staining and p21^{Waf1} upregulation [33]. Moreover, mutation of TRF2 in primary human fibroblasts induced telomere shortening and replicative senescence involving separately p16^{Ink4a} and p53 [34], 2004). While p53 deficiency alone only partially limited telomeredirected senescence, inhibition of both p16^{Ink4a} and p53 led to nearly complete bypass of the cellular aging. Stabilization of p53 might be triggered through its phosphorylation on serine 15 residue by the persistence of DDR induced by remaining DNA breaks [35]. During quiescent endothelial cell senescence, ATM, DNA-PKcs and CHK-2, members of the DDR, are still activated after 21 days (Fig. 2G). Moreover, chronic treatment with KU55933, an ATM inhibitor, reduced the expression of p53, MDM2 and p21^{Waf1} (Fig. 3B). These results support a link between the DDR persistent activation and p53 pathway in endothelial cell senescence after IR, in agreement with previous results on H₂O₂-induced vascular aging [13]. Further investigation must definitively decipher the p53-dependent pathway involved in quiescent endothelial cell senescence after IR.

Besides p53 activation, we showed that mitochondrial oxidative stress associated with mitochondrial dysfunctions are involved in IRinduced senescence since both MnTBAP, a SOD mimetic, and NAC, a ROS scavenger, are sufficient to reduce the percentage of SA β-galpositive senescent HMVEC-L (Figs. 5A and 3C). Our results are in agreement with Kurz and coll., showing that buthionine sulfoxamine, a glutathione synthesis inhibitor, increases intracellular ROS in HUVEC and accelerates replicative senescence [27]. IR induces within milliseconds a rapid and acute H₂O radiolysis leading to a burst of ROS. However, this ROS production is not directly involved in the IR-induced senescence since NAC or MnTBAP treatment start only 4 days post-IR. Endogenous sources of ROS include mitochondria, in particular from respiratory complexes I and III [36]. Yet, succinate-driven oxidation via respiratory Cplx II can contribute significantly to ROS production [37]. In our model, IR alters mitochondrial network, reduces respiratory Cplx II activity and increases mitochondrial O₂- production. Only a few studies linked Cplx II with aging. None was shown in endothelial cells or after exposure to IR, in contrast to inactivation of complexes I, III and IV that have been noticeably associated with oxidative stress-induced senescence [38]. In particular, Cplx II defect, via down-regulation of its iron-sulfur succinate deshydrogenase subunit (SDHB) by desferroxamine mesylate induces mitochondrial dysfunction and cell cycle arrest in Chang hepatic cells [38]. However, the inactivation of Cplx II could not be explained in senescent HMVEC-L by a down-regulation of the SDHB subunit expression (Fig. 4C) suggesting that other mechanisms are involved such as its disintegration following intracellular acidification [39], lipid peroxidation [40] or glutathionylation of flavoprotein succinate dehydrogenase subunit (SDHA) induced by O2- generation [41]. In fact, we showed that MnTBAP reduces mitochondrial O_2 generation but also reverts respiratory Cplx II dysfunction. These results demonstrated that, in our model, superoxide anions are involved in



Fig. 6. SOD mimetic, but not p53 inhibition, rescues mitochondrial dysfunction. A) p53 expression evaluated by Western blot in HMVEC-L treated with PFT- α and/or MnTBAP day 21 post-15 Gy (n=6, representative blot). B–C. Respiratory Cplx II activity and mitochondrial superoxide quantification in PFT- α – treated HMVEC-L, respectively evaluated by Seahorse, day 7 post-15 Gy and by FACS analysis with MitoSOXTM Red, day 21 post-15 Gy (both mean \pm SD, *P < 0.01, n=3). D–E. Respiratory Cplx II activity and mitochondrial superoxide quantification in MnTBAP – treated HMVEC-L, respectively evaluated by Seahorse, day 7 post-15 Gy and by FACS analysis with MitoSOXTM Red, day 21 post-15 Gy (both mean \pm SD, *P < 0.01, n=3).



Fig. 7. Graphic model of IR induces long-term senescence in endothelial cells involving 2 separated molecular pathways: mitochondrial respiratory Cplx II dysfunction/superoxide generation and DDR/p53.

Cplx II dysfunction. (Fig. 6C-D). Therefore, we ought to propose a model where a vicious cycle amplifies oxidative stress, with primary O_2 - induces respiratory Cplx II dysfunctions with, in return, increases mitochondrial O_2 - production (Fig. 7).

Further investigations must define the primary source of O2-. NADPH-oxidase, and xanthine-oxidase complexes might be at the origin of initial burst of O2-. Of note, expression of mitochondrial Nox4 was not modified in senescent HMVEC-L after IR (data not shown). The down-regulation of detoxification enzymes may also promote ROS and has been detected during senescence [42]. However, we observed opposite results, where mitochondrial O2.- generation was correlated with the up-regulation of mitochondrial SOD2 and GPX1 (Fig. 3C). The persistence of mitochondrial oxidative stress and the up-regulation of detoxification enzymes suggest an inability of quiescent endothelial cells to counteract the deleterious effects of IR, leading to the establishment of a chronic stress [43]. Bcl-2 also demonstrates an anti-oxidative property by locating glutathione at mitochondria [12]. Its downregulation in replicative senescent HUVECs enhances the oxidant stress and impairs mitochondrial membrane potential. We also observed Bcl-2 downregulation, which was not modulated by PFT- α - or MnTBAP (data not shown). We concluded that Bcl-2 may play a role in IR-induced senescence in quiescent HMVEC-L above p53 or in parallel of activation and O_2 - generation.

In our study, we define key roles for the 2 pathways, p53 and O₂-/ Cplx II in IR-induced endothelial cell senescence (Fig. 7). Some studies link the 2 pathways when p53 is activated following ROS-induced DNA damage and ATM phosphorylation [44]. First, in our model, neither MnTBAP nor PFT- α was able to limit the amount of γ H2AX foci per cell, proving that p53 and O₂- pathways were downstream of IR-induced DDR. It has been shown that p53 is also able to inhibit ROS generation by activating the transcription of detoxification enzymes [45]. In our study, PFT- α did not affect the induced expression of SOD2 or GPX1 in irradiated HMVEC-L (data not shown). Moreover, PFT- α surprisingly did not inhibit the long-term dysfunction of respiratory Cplx II or the generation of mitochondrial O₂'- (Fig. 6B–C), demonstrating that mitochondrial redox status was not regulated by long-term p53 overexpression. On the other hand, MnTBAP significantly restores respiratory Cplx II activity, inhibits mitochondrial O₂'- without modulating p53 expression (Fig. 6A, D–E). Altogether, these results show that these 2 pathways are disconnected. This unique result may be due to the singularity of the cell model involving a quiescent primary microvascular endothelial cell and must be explored in other vascular cell models.

Senescence in endothelial cells impairs vascular functions, e.g. proinflammatory cytokines secretion, vasotonicity, migration, angiogenesis or permeability [15], known to be involved in chronic pathologies, encountered during aging or long-term radiation toxicity [1]. In this context, we define an active but disconnected roles for p53 and mitochondrial O2-/Cplx II generation in senescent primary HMVEC-L after IR (Fig. 7). Their combined pharmacological inhibition should mitigate endothelial cell premature aging, vascular dysfunctions and late radiation pathologies. However, inhibiting p53 tumor suppressor in vivo remains difficult because of potential enhancement of radiationinduced mutagenesis. On the other hand, inhibiting O₂- by delivering SOD2 with plasmid-liposome or adenovirus has been shown to prevent lung inflammatory alveolitis and fibrosis in irradiated C57BL/6J or Nu/ J mice [46]. Further studies should deeply investigate pharmacological drugs against other p53 partners and mitochondrial oxidative stress in order to provide new strategies against endothelial cell aging and to limit chronic radiation toxicity.

Disclosure

The study was founded by the project ProVasc from Région Pays de la Loire, Electricité de France, la Ligue Nationale Contre le Cancer, l'Association de la Recherche sur le Cancer.

Conflict of interest

No conflict of interest.

Acknowledgment

We thank Denis Cochonneau, Elise Beneteau, the microscopy platform MicroPICell and the cytometry core facility Cytocell for technical help.

References

- M.H. Gaugler, A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? BJR Suppl. 27 (2005) 100–105.
- [2] I. Corre, M. Guillonneau, F. Paris, Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity, Int J. Mol. Sci. 14 (11) (2013) 22678–22696.
- [3] J. Wang, M. Boerma, Q. Fu, M. Hauer-Jensen, Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy, World J. Gastroenterol. 13 (22) (2007) 3047–3055.
- [4] F. Paris, Z. Fuks, A. Kang, P. Capodieci, G. Juan, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo, R. Kolesnick, Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice, Science 293 (5528) (2001) 293–297.
- [5] Y.Q. Li, P. Chen, A. Haimovitz-Friedman, R.M. Reilly, C.S. Wong, Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation, Cancer Res 63 (18) (2003) 5950–5956.
- [6] L.A. Pena, Z. Fuks, R.N. Kolesnick, Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency, Cancer Res. 60 (2) (2000) 321–327.
- [7] J. Xu, X. Yan, R. Gao, L. Mao, A.P. Cotrim, C. Zheng, C. Zhang, B.J. Baum, S. Wang, Effect of irradiation on microvascular endothelial cells of parotid glands in the miniature pig, Int J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 78 (3) (2010) 897–903.
- [8] S. Bonnaud, C. Niaudet, F. Legoux, I. Corre, G. Delpon, X. Saulquin, Z. Fuks, M.H. Gaugler, R. Kolesnick, F. Paris, Sphingosine-1-phosphate activates the AKT

pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis, Cancer Res. 70 (23) (2010) 9905–9915.

- [9] J. Campisi, Cancer, aging and cellular senescence, Vivo 14 (1) (2000) 183–188.[10] J.P. Coppe, C.K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D.P. Munoz, J. Goldstein, P.S. Nelson,
- P.Y. Desprez, J. Campisi, Senescence-associated secretory phenotypes reveal cellnonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor, PLoS Biol. 6 (12) (2008) 2853–2868.
- [11] F. Rodier, J.P. Coppe, C.K. Patil, W.A. Hoeijmakers, D.P. Munoz, S.R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A.R. Davalos, J. Campisi, Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion, Nat. Cell Biol. 11 (8) (2009) 973–979.
- [12] M. Uraoka, K. Ikeda, R. Kurimoto-Nakano, Y. Nakagawa, M. Koide, Y. Akakabe, Y. Kitamura, T. Ueyama, S. Matoba, H. Yamada, M. Okigaki, H. Matsubara, Loss of bcl-2 during the senescence exacerbates the impaired angiogenic functions in endothelial cells by deteriorating the mitochondrial redox state, Hypertension 58 (2) (2011) 254–263.
- [13] H. Zhan, T. Suzuki, K. Aizawa, K. Miyagawa, R. Nagai, Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence, J. Biol. Chem. 285 (38) (2010) 29662–29670.
- [14] K. Igarashi, M. Miura, Inhibition of a radiation-induced senescence-like phenotype: a possible mechanism for potentially lethal damage repair in vascular endothelial cells, Radiat. Res. 170 (4) (2008) 534–539.
- [15] Z. Ungvari, A. Podlutsky, D. Sosnowska, Z. Tucsek, P. Toth, F. Deak, T. Gautam, A. Csiszar, W.E. Sonntag, Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebromicrovascular endothelia cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosensitivity, J. Gerontol. A Biol. Sci. Med Sci. 68 (12) (2013) 1443–1457.
- [16] Z. Barjaktarovic, N. Anastasov, O. Azimzadeh, A. Sriharshan, H. Sarioglu, M. Ueffing, H. Tammio, A. Hakanen, D. Leszczynski, M.J. Atkinson, S. Tapio, Integrative proteomic and microRNA analysis of primary human coronary artery endothelial cells exposed to low-dose gamma radiation, Radiat. Environ. Biophys. 52 (1) (2013) 87–98.
- [17] J.I. Heo, W. Kim, K.J. Choi, S. Bae, J.H. Jeong, K.S. Kim, XIAP-associating factor 1, a transcriptional target of BRD7, contributes to endothelial cell senescence, Oncotarget 7 (5) (2016) 5118–5130.
- [18] B. Hobson, J. Denekamp, Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies, Br. J. Cancer 49 (4) (1984) 405–413.
- [19] Y. Morita, G.I. Perez, F. Paris, S.R. Miranda, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, Z. Xie, J.C. Reed, E.H. Schuchman, R.N. Kolesnick, J.L. Tilly, Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy, Nat. Med. 6 (10) (2000) 1109–1114.
- [20] S. Bonnaud, C. Niaudet, G. Pottier, M.H. Gaugler, J. Millour, J. Barbet, L. Sabatier, F. Paris, Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death, Cancer Res. 67 (4) (2007) 1803–1811.
- [21] G.P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, et al., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (20) (1995) 9363–9367.
- [22] K. Oizel, C. Gratas, A. Nadaradjane, L. Oliver, F.M. Vallette, C. Pecqueur, D-2-Hydroxyglutarate does not mimic all the IDH mutation effects, in particular the reduced etoposide-triggered apoptosis mediated by an alteration in mitochondrial NADH, Cell Death Dis. 6 (2015) e1704.
- [23] V.A. Potiron, R. Abderrahmani, E. Giang, S. Chiavassa, E. Di Tomaso, S.M. Maira, F. Paris, S. Supiot, Radiosensitization of prostate cancer cells by the dual PI3K/ mTOR inhibitor BEZ235 under normoxic and hypoxic conditions, Radiother. Oncol. 106 (1) (2013) 138–146.
- [24] A. Rufini, P. Tucci, I. Celardo, G. Melino, Senescence and aging: the critical roles of p53, Oncogene 32 (43) (2013) 5129–5143.
- [25] P.G. Komarov, E.A. Komarova, R.V. Kondratov, K. Christov-Tselkov, J.S. Coon, M.V. Chernov, A.V. Gudkov, A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy, Science 285 (5434) (1999) 1733–1737.
- [26] S. Nistico, D. Ventrice, C. Dagostino, F. Lauro, S. Ilari, M. Gliozzi, C. Colica, V. Musolino, C. Carresi, M.C. Strongoli, I. Vecchio, M. Rizzo, V. Mollace, C. Muscoli, Effect of MN (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin by photodynamically generated free radicals on SODs keratinocytes, J. Biol. Regul. Homeost. Agents 27 (3) (2013) 781–790.
- [27] D.J. Kurz, S. Decary, Y. Hong, E. Trivier, A. Akhmedov, J.D. Erusalimsky, Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells, J. Cell Sci. 117 (Pt 11) (2004) 2417–2426.
- [28] C.W. Oh, E.A. Bump, J.S. Kim, D. Janigro, M.R. Mayberg, Induction of a senescencelike phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation, Radiat. Res. 156 (3) (2001) 232–240.
- [29] K.S. Kim, J.E. Kim, K.J. Choi, S. Bae, D.H. Kim, Characterization of DNA damageinduced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells, Int J. Radiat. Biol. 90 (1) (2014) 71–80.
- [30] R.A. Panganiban, O. Mungunsukh, R.M. Day, X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells, Int J. Radiat. Biol. 89 (8) (2013) 656–667.
- [31] R.A. Panganiban, R.M. Day, Inhibition of IGF-1R prevents ionizing radiationinduced primary endothelial cell senescence, PLoS One 8 (10) (2013) e78589.
- [32] Z. Barjaktarovic, D. Schmaltz, A. Shyla, O. Azimzadeh, S. Schulz, J. Haagen, W. Dorr, H. Sarioglu, A. Schafer, M.J. Atkinson, H. Zischka, S. Tapio, Radiationinduced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays, PLoS One 6 (12) (2011) e27811.
- [33] S. Chakraborty, R.U. Rasool, S. Kumar, D. Nayak, B. Rah, A. Katoch, H. Amin, A. Ali, A. Goswami, Cristacarpin promotes ER stress-mediated ROS generation leading to premature senescence by activation of p21(waf-1), Age (Dordr.) 38 (3) (2016) 62.
- [34] J.J. Jacobs, T. de Lange, Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence, Curr. Biol. 14 (24) (2004) 2302–2308.
- [35] S. Banin, L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C.W. Anderson, L. Chessa, N.I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, Y. Ziv, Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage, Science 281 (5383) (1998) 1674–1677.
- [36] V.G. Grivennikova, A.D. Vinogradov, Generation of superoxide by the mitochondrial complex I, Biochim Biophys. Acta 1757 (5–6) (2006) 553–561.
- [37] R. Moreno-Sanchez, L. Hernandez-Esquivel, N.A. Rivero-Segura, A. Marin-Hernandez, J. Neuzil, S.J. Ralph, S. Rodriguez-Enriquez, Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II–evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I, Febs J. 280 (3) (2013) 927–938.
- [38] Y.S. Yoon, H.O. Byun, H. Cho, B.K. Kim, G. Yoon, Complex II defect via downregulation of iron-sulfur subunit induces mitochondrial dysfunction and cell cycle delay in iron chelation-induced senescence-associated growth arrest, J. Biol. Chem. 278 (51) (2003) 51577–51586.
- [39] D. Lagadic-Gossmann, L. Huc, V. Lecureur, Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles, Cell Death Differ. 11 (9) (2004) 953–961.
- [40] K.B. Choksi, J.E. Nuss, W.H. Boylston, J.P. Rabek, J. Papaconstantinou, Age-related

increases in oxidatively damaged proteins of mouse kidney mitochondrial electron transport chain complexes, Free Radic. Biol. Med 43 (10) (2007) 1423–1438.

- [41] Y.R. Chen, C.L. Chen, D.R. Pfeiffer, J.L. Zweier, Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation, J. Biol. Chem. 282 (45) (2007) 32640–32654.
- [42] H. Zhang, Z. Zhai, Y. Wang, J. Zhang, H. Wu, Y. Wang, C. Li, D. Li, L. Lu, X. Wang, J. Chang, Q. Hou, Z. Ju, D. Zhou, A. Meng, Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice, Free Radic. Biol. Med. 54 (2013) 40–50.
- [43] E.I. Azzam, J.P. Jay-Gerin, D. Pain, Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury, Cancer Lett. 327 (1–2) (2012) 48–60.
- [44] A. Borodkina, A. Shatrova, P. Abushik, N. Nikolsky, E. Burova, Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells, Aging (Albany NY) 6 (6) (2014) 481–495.
- [45] P. Drane, A. Bravard, V. Bouvard, E. May, Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis, Oncogene 20 (4) (2001) 430–439.
- [46] M. Epperly, J. Bray, S. Kraeger, R. Zwacka, J. Engelhardt, E. Travis, J. Greenberger, Prevention of late effects of irradiation lung damage by manganese superoxide dismutase gene therapy, Gene Ther. 5 (2) (1998) 196–208.

Résultats complémentaires :

Nous avons démontré que l'irradiation induit la sénescence des cellules endothéliales microvasculaires quiescentes notamment via la production d'O2•-. Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant la source primaire d'O2•-. En effet, certains enzymes sont naturellement spécialisés dans la production de ROS telles que les NOXs. De plus, il est montré qu'elles peuvent être activées après irradiation et participer au processus de sénescence (Ameziane-El-Hassani et al., 2015). De ce fait, nous avons étudié l'expression de différents membres de la famille des NOXs (NOX-1, -2, -3, -4, -5) par western blot dans notre modèle de sénescence radio-induite (Figure 28). Les résultats montrent que l'expression des protéines NOX-1, -3 et -4 n'est pas modulée 21 jours après une irradiation de 15Gy. Cependant, l'irradiation induit une diminution d'expression de NOX-2 et une augmentation de NOX-5 suggérant un rôle potentiel de ces protéines dans la modulation du niveau d'anion superoxyde observée après irradiation. Ces résultats nécessitent une étude plus approfondie afin de mieux comprendre le rôle spécifique de chacune de ces protéines dans la modulation du stress oxydant radio-induit ainsi que dans la sénescence des cellules endothéliales.



Figure 28 : Profil d'expression des NADPH oxydases 21 jours après irradiation.

Expression des NOXs étudiée par western blot 21 jours après irradiation (15Gy) des HMVEC-L (n=3, western blot représentatif). (Co. : Contrôle ; +IR : irradiée). Le poids moléculaire de chacune des protéines est indiqué en face de chaque bande. A. Expression de NOX-1. B. Expression de NOX-2. C. Expression de NOX-3. D. Expression de NOX-4. E. Expression de NOX-5.

Article 2 : Implication du SASP des cellules endothéliales sénescentes dans la réponse du glioblastome à la radiothérapie

« Senescent endothelial cells increase the bellicosity of GBM cells surviving from radiation therapy through secretion of CXCL5/8 » *En préparation*

<u>Charlotte Degorre</u>, Ophélie Renoult, Charbel Touma, Manon Pietri, Noemie Joalland, Natacha Galopin, Catherine Gratas, François Vallette, Claire Pecqueur & François Paris

Lors de la radiothérapie, les tissus sains adjacents à la tumeur, notamment les cellules endothéliales, ne sont jamais totalement épargnées par les rayons en particulier dans le cas de tumeurs infiltrantes telles que le glioblastome. Cette tumeur du système nerveux central très agressive rechute dans 90% des cas dans le champ d'irradiation initial suggérant une implication du microenvironnement (Gebhardt et al., 2014). Nous avons montré dans notre étude précédente que des doses thérapeutiques d'irradiation provoquent la sénescence des cellules endothéliales in vitro. De plus deux études montrent sur des coupes de biopsies de patients atteints de GBM et traités par radiothérapie la présence de cellules endothéliales sénescentes (Borovski et al., 2013) (Pascalis et al., 2018). Cependant, aucune étude ne démontrent l'implication des ces cellules dans la réponse du GBM à la radiothérapie. Or, il est admis que les cellules sénescentes présentent un sécrétome particulier appelé SASP et pouvant avoir des effets pro- et anti-tumoraux importants. Il semble donc primordial d'étudier le dialogue entre les cellules endothéliales sénescentes radio-induites et les cellules GBM afin de mieux comprendre leur implication dans la réponse de la tumeur aux traitements. L'objectif de cette étude a donc été de déterminer l'impact du sécrétome des cellules endothéliales sénescentes dans le devenir du GBM après radiothérapie. Elle permettra de mieux comprendre les conséquences à long terme de l'irradiation des tissus sains sur la résistance et les récidives tumorales. Si il s'avère que le SASP des cellules endothéliales sénescentes à un effets néfastes sur la réponse du GBM à la radiothérapie, l'identification des acteurs impliqués permettra de définir de nouvelles cibles thérapeutiques aussi bien au niveau du microenvironnement qu'au niveau du dialogue avec la tumeur et ainsi d'améliorer la survie des patients.

Senescent endothelial cells increase the bellicosity of GBM cells surviving from radiation therapy through secretion of CXCL5/8

Charlotte Degorre¹, Ophélie Renoult¹, Charbel Touma¹, Manon Pietri^{1,2}, Noemie Joalland¹, Natacha Galopin¹, Catherine Gratas^{1,3}, François Vallette^{1,2,4}, Claire Pecqueur^{1,4 §} & François Paris^{1,2 §}

Authors affiliation: ¹CRCINA, INSERM, CNRS, Université de Nantes, Nantes, France, ²Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, France, ³Centre Hospitalier-Universitaire de Nantes, Nantes, France, ⁴LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, France.

[§] Corresponding authors:

 François Paris, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, INSERM U1232, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, France;
il 6 de la construction (22) 220000202 E (22) 220000204

e-mail: francois.paris@inserm.fr; phone: (33) 228080302; Fax: (33) 228080204

 Claire Pecqueur, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, INSERM U1232, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, France; e-mail: claire.pecqueur@univ-nantes.fr; phone: (33)2 2808 0325; Fax: (33)2 2808 0204

Authors contribution: CD, CP, FP designed research, FV provided primary human samples; CD, OR, CT, MP, NJ, NG, CG performed research, CD, CP, FP analyzed data, CD, CP, FP manuscript writing

Keywords: endothelium, senescence, genomic instability, radiation resistance,

The authors declare no conflict of interest

Abstract

Despite an aggressive combined treatment, glioblastoma (GBM) tumor are rapidly relapsing in the irradiated peritumoral area around the site of the surgical site. The recurrent tumor is resistant to new radiotherapy, which is commonly explained by the intrinsic radioresistance of infiltrating tumor cells, disregarding the plasticity alteration of irradiated peritumoral microenvironment. In fact, senescence of microvascular endothelial cells relarguing proinflammatory chemokines has been noticed in culture but also in GBM biopsies after irradiation. In this present, manuscript, we are suggesting that senescent endothelial cells are alleviating the behavior and the aggressiveness of surviving GBM cells after exposure to ionizing radiation.

Those data demonstrate a crucial role of senescent endothelial cells through the secretion of CXCL5/8 cells in the bellicosity of GBM cells surviving from radiation therapy. We clearly demonstrate using long-term time lapse microscopy that secretome from senescent endothelial cells is lowering the proliferation and death of irradiated GBM cells, but also increasing mitotic abnormalities, genomic instability considered by micronuclei generation and cellular aneuploidy. Functional characterization of the secretome demonstrates the involvement of the chemokines CXCL5 and CXCL8, which are mimicking effects of the whole secretome of senescent cells on irradiated GBM cells. Inhibition of those chemokines or of CXCR2, their shared receptor, in GBM cells reduced the induction of micronuclei and the aneuploidy. Orthotopic injection in mouse brain of irradiation-surviving GBM cells pretreated either by SASP or CXCL5/8 showed an increase of aggressiveness and lethality as compared to those treated with medium from non-senescent endothelial cells.

Introduction

Radiation therapy by inducing irreversible DNA damage and thereafter death of cancer cells, is one of the most common curative anti-cancer treatments, allowing, in some cases, a complete regression of the tumor. Unfortunately, its efficacy against aggressive tumors like glioblastoma is challenged by the intrinsic tumor resistance of infiltrating cellular clones, such as a subpopulation of cancer stem cells. The highly infiltrative features of these tumors requires large field radiotherapy covering up to a third of the whole brain, leading to significant irradiation of the surrounding healthy tissue. Despite these aggressive treatments, median survival of GBM patients does not exceed 18 months and most patients experienced tumor recurrence at the original tumor location within the year of primary treatment. Those tumor relapse acquired a gain of aggressiveness and resistance to genotoxic treatment. Indeed, they are usually insensitive to a second run of radiation therapy. The resistance may also be mediated by the ability of radiation to induce DNA damage. If left un- or mis-repaired, DNA breaks leads to genomic instability in which genetic alterations range from nucleotide changes to chromosomal translocations and aneuploidy. This genomic instability may lead to mitotic catastrophe and cell death, but also to emergence of novel radio-resistant subpopulations of tumor cells.

In the purpose to kill the whole population of tumor cells and avoid tumor relapse, new therapeutic approaches are developed targeting not only clonogenic tumor cells, but also non-transformed cells from the stroma (Moding, Cancer J, 2016). Because of its ubiquity and its vital function in normal and tumoral tissues, vascular network is one of the stimulating stroma's targets. Microvasculature lined by a single inner layer of endothelial cells supported by pericytes is delivering nutrients and oxygen to tissues while removing metabolic wastes.

Abundant evidences highlight that endothelial cells dysfunctions induced by radiation impact tumor responses. High doses of ionizing radiation induce endothelial cells apoptosis within the tumor, subsequently sensitizing cancer cells to radiation allowing tumor regression (Garcia-Barros, Paris et al. 2003). Endothelial cell apoptosis is triggered by the rapid generation of ceramide, a pro-apoptotic sphingolipid, upon the hydrolysis of sphingomyelin by acid sphingomyelinase (aSMase) (Niaudet et al., Cellular Signaling, 2017). The genetic disruption of the *asmase* gene in mice prevents endothelial cells apoptosis and the radiationinduced tumor regression (Garcia-Barros, Paris et al. 2003). High doses of radiation also induce a well-known tumor bed effect characterized by an impaired neovascularization with reduced blood perfusion and low oxygen tension (Rofstadt EK, Cancer Res 2005). This hypoxic microenvironment triggers an extended latency period and a low growth rate in tumor, but also enhances radiation resistance as compared to the same tumor budding in a more oxygenated bed.

Besides its acute effects, radiation exposure of endothelial cells may lead to long-term dysfunctions including adhesion and aggregation of platelets, development of platelet-fibrin thrombi and ultimately cellular senescence. Senescence is a premature aging process characterized by the inability of the cell to cycle, the up-regulation of senescence-associated β -galactosidase (SA β -gal) staining, the maintenance of a Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) and the persistence of DNA lesion. Senescent endothelial cells perturbed the normal tissue homeostasis by enhancing ischemia or fibrosis through increase of hypoxia and inflammation. We recently better deciphered the radio-induced senescence in quiescent primary microvascular endothelial cells and showed the induction of 2 different mechanisms implying either cytoplasmic p53 activation, initiated by long lasting DNA damage and ATM

phosphorylation, or the induction of superoxide stress, triggered in part by a dysfunctional complex II of the mitochondrial respiratory chain (Lafargue et al., 2017a).

Induction of tumor cell senescence by radio- or chemotherapy is now a well-accepted strategy to participate to the tumor control (Yang, Nature 2017) by limiting the number of tumor cell able to divide. However, the chronic maintenance of a secretory phenotype (Senescent Associated Secretory Phenotype or SASP) also interfers in the dialog between senescent cells and the other cells within the tumor. This secretome includes inflammatory cytokines, chemokines, proteases and growth factors. Whereas some factors fuel beneficial effects limiting tumor progression, other factors may have deleterious tumorigenic properties, for example by stimulating cell proliferation, neoangiogenesis or Epithelial-Mesenchymal transition (EMT) (DeMaria, 2016). Normal stromal fibroblasts also enter senescence after DNA-damaging treatment. These senescent cells and their SASP can promote tumor cell proliferation and invasion. For example, secreted matrix metalloprotease 3 (MMP-3) is disrupting alveolar and branching morphogenesis, inducing a functional differentiation of non-malignant breast epithelial cells and finally stimulating epithelial cell proliferation leading to carcinogenesis (Krtolica et al., 2001) (Parrinello et al., 2005).

Senescent endothelial cells have been detected in 20 Gy-irradiated brains of nude mice and in the tumor vicinity of post-mortem biopsies of recurrent glioblastoma from patients treated with surgery and 60 Gy radiotherapy (Borovski et al., 2013) (Pascalis et al., 2018). However whether endothelial cell senescence modulates biological response to radiation therapy remains unclear. In the present manuscript, we are assessing how senescent endothelial cells mitigate GBM response to ionizing radiation. We demonstrated that CXCL5 and CXCL8 chemokines secreted by senescent endothelial cells are enhancing radiation-induced genomic instability, aneuploidy and aggressiveness of tumor recurrence proving that the modification of tumor microenvironment plasticity by irradiation directly impacts the bellicosity of GBM cells surviving from radiation therapy.

Results

SASP enhances tumor genomic instability in response to radiation

In order to analyze SASP effects on GBM cell response to radiation, irradiated U251 tumor cells were stalked by videomicroscopy after pretreatment with conditionned medium from non-irradiated (CM) or 15 Gy-induced senescent (SASP) endothelial cells. As compared to CM, SASP treatment significantly decreased the proliferation of unirradiated U251 cells. This inhibition was dramatically emphased by the combination of 5 Gy-irradiation and SASP (Figure 1A and supplementary data S1). Furthermore, we observed the occurrence of abnormal divisions corresponding to cells that either divided in more than two cells or are unable to finish their mitosis because of chromosomal bridge. Indeed, whereas the number of abnormal divisions in non-irradiated and irradiated cells treated in CM was around 2% at all time points, it increased to 10% when cells were irradiated in SASP (Fig 1B). Because abnormal divisions lead to genome misdistribution and polyploidy, we counted the number of polynucleated cells 72 hours after 5 Gy and found 2-times more polynucleated cells when cells were pretreated by SASP as compared to CM (Fig. 1C).

To further evaluate GBM cell response to radiation in presence of senescent endothelial cell, U251 clonogenic cell assays were performed at different radiation doses (0-15Gy) in presence of SASP or CM. Plating efficiency was not altered by SASP since the number of colonies in absence of irradiation was similar in both conditions (Fig 1D). Interestingly, SASP increased the number of U251 colonies only after exposure to high dose of radiation (Fig. 1D and 1E).

The radioprotective properties of SASP was confirmed using primary cultures of GBM cells directly isolated from human tumors, since the number of colonies was higher in presence of SASP compared to CM after radiation in a dose-dependent manner up to 10 Gy (Fig. 1F).

Because of its relation to abnormal division and genomic instability, micronuclei (MN), corresponding to extranuclear organelles containing DNA, were evaluated in 5 Gy-irradiated U251 pretreated with CM or SASP. As expected, significant number of MN was only observed in irradiated U251 cells (Figure 2A and 2B). Furthermore, SASP triggered a faster and stronger production of MN as compared to CM. These micronuclei mostly sequestered damaged DNA regardless of the culture conditions, as shown by yH2AX staining (Figure 2C). Interestingly, the frequency of cells displaying various numbers of MN 72 hours after 5Gy was significantly different between the 2 conditions. In fact, 50% of the irradiated cells displayed no MN after CM treatment vs. 35% after SASP (Figure 2D). On the other hand, 22% of irradiated cells with SASP showed 3 MN or more as compared to 11% after CM. These observations were confirmed in various primary GBM cells where the number of MN per cell was significantly increased when cells were irradiated in presence of the SASP (Figure 2E). To determine whether SASP-induced MN formation is limited to tumor cells or also occurs in normal cells, the endothelial cell line HUVEC was cultured in presence of either CM or the SASP, and irradiated at 5 Gy. Again, the SASP increased MN production in response to 5Gy-irradiation (Supplementary data S2). Altogether, these results showed that the SASP promotes MN formation in response to radiation.

Identification of key cytokines from the SASP

RNAseq analysis was performed on radio-induced senescent endothelial cells in order to identify the key SASP factors involved in GBM cell genomic instability. The comparison of

transcriptional profiling between non-irradiated and senescent endothelial cells identified 242 genes differentially expressed, with a majority of them being up-regulated (Figure 3A). Bioinformatics analysis using gene annotation analysis showed an enrichment of proteins involved in several binding processes, in particular receptor binding (Supplementary data S3). This latter category included 13 potentially secreted factors such as chemokines, cytokines and growth factors (Figure 3B). To validate these results, RTqPCR (Figure 3C) and ELISA (Figure 3D) were performed focusing on the 2 most up-regulated proteins, LIF and CXCL5, as well as 2 well-known interleukins secreted by endothelial cells, CXCL8 and IL-33. Surprisingly, if RTqPCR confirmed the transcriptional upregulation of those chemokines, a strong discrepancy was observed by ELISA at the secretion level. IL-33 was detectable neither in the CM nor in the SASP. LIF was present without difference of concentration in both CM and the SASP. Remarkably, when a low concentration of CXCL8 and CXCL5 were detected in CM (0.87±0.4 and 0 respectively), their amounts were significantly increased in SASP (2.6±0.6 and 25±6 respectively).

CXCL8 and CXCL5 modulated radiation-induced genomic instability and colonegenic survival through binding to the shared receptor CXCR2

To determine whether these 2 chemokines secreted by senescent endothelial cells were impacting radiation responses of GBM cells, blocking antibodies against CXCL8 and CXCL5 respectively were added to CM or SASP prior to tumor cell irradiation. Blocking either CXCL8 or CXCL5 significantly reduced micronuclei production when U251 cells were irradiated in presence of the SASP whereas it did not affect significantly micronuclei formation when cells were irradiated in CM (Figure 4A). Of note, the combination of both blocking antibodies did not displayed additional effect on micronuclei formation compared to each individual blocking antibody. To confirm these results, CXCL8 (1ng/ml), CXCL5 (50pg/ml) or a combination of both were added to the cell media 24 hours prior to irradiation. Each chemokine increased micronuclei production in response to 5 Gy (Figure 4B). Moreover, addition of both CXCL8 and CXCL5 triggered the same amount of micronuclei after irradiation compared to SASP itself. Similar experiments using CM supplemented with both CXCL8 and CXCL5 were realized to analyze polynucleated cell frequencies and radioresistance. Again, the combination of both chemokines increased the number of polynucleated cells (Figure 4C) as well as the number of U251 colonies (Figure 4D) after irradiation. CXCL8 chemokine binds to CXCR1 and CXCR2. Interestingly, CXCR2 is also a receptor for CXCL5. U251 cells did not express CXCR1 in contrast to CXCR2 that was slightly but significantly expressed (Figure 5A). Various primary GBM cell models also expressed CXCR2 receptor (Figure 5B). To investigate whereas CXCL8 and CXCL5 trigger genomic instability through binding to their common receptor, CXCR2 antagonist (SB332235 (SB)) or a CXCR2 blocking antibody (MAB331 (MAB)) was added to SASP before U251 irradiation. Both pharmacological and immunological approaches to block CXCR2 activation were able to reduce micronuclei formation (Figure 5C) and polynucleated cells frequency (Figure 5D) while no effect was observed when it was added to CM. Altogether, these results show that the binding of CXCL8 and CXCL5 to CXCR2 fully recapitulates the SASP-induced phenotypes.

SASP triggers the phosphorylation of CHK1, NPM and ERK through CXCL8 and CXCL5

To better investigate the molecular mechanisms triggering SASP-induced genomic instability, the activation of DNA damage response and stress pathways were analyzed by western blot in irradiated U251. As expected, phosphorylation of DDR proteins, including

DNA-PK, ATM, ATR, NPM, CHK1, CHK2 were enhanced after irradiation (Figure 6 and Supplementary data S4). Studied stress pathways (AKT, P38 MAPK) were constitutively activated without radiation (data not shown). The SASP pretreatment did not alter the phosphorylation level for most of those proteins. Only, the phosphorylated forms of NPM, CHK1 and ERK1/2 were significantly increased when U251 cells were irradiated in presence of the SASP (Figure 6A). Importantly, individual inhibition of the activation of those proteins significantly reduced radio-induced MN formation (Figure 6B) and polynucleated cell frequency (Figure 6C) triggered by addition of CXCL8 and CXCL5 in the CM.

CXCL8 and CXCL5 present in SASP increases U251 cells bellicosity in vivo

To investigate whether this genomic instability is associated to tumor aggressiveness *in vivo*, U251 cells clones surviving from irradiation after pretreatment by either CM or SASP (respectively called RCM and RSASP), then injected orthotopically into the cerebral subventricular zone of NSG mice. As shown in Figure 7A, mice bearing RCM tumors survived longer than the ones bearing RSASP tumors (median survival: 58 days for RCM vs 42 days for RSASP; p=0.0028; Figure 7E). Similar experiments were repeated with U251 clones surviving from radiation after treatment with CM containing CXCL8 and CXCL5 chemokines (called $R_{CM}CXCL$). Interestingly, the survival of the mice population transplanted with $R_{CM}CXCL$ was reduced and similar to the one of RSASP (median survival 40.5 days) (Figure 7B). Finally, we assessed the opposite experiment by collecting radio-resistant U251 clones pretreated with SASP and CXCR2 inhibitors, using either the blocking antibody or the antagonist (respectively called $R_{SASP}MAB$ and $R_{SASP}SB$). If the survival of the population of mice transplanted with $R_{SASP}MAB$ and $R_{SASP}SB$). If the one of $R_{SASP}MAB$ was strongly enhanced and the mice were surviving as well as those with

RMC (median survival 49 days for R_{SASP}MAB and 57.5 days for R_{SASP}SB) (Figure 7C and 7D). Altogether, these results showed that tumor cells arising in a senescent environment are more belliquous than the ones cultured in regular CM. Importantly, presence of both CXCL8 and CXCL5, the 2 chemokines triggering genomic instabilities, was sufficient to recapitulate this aggressiveness *in vivo*.

Materiel and methods:

Cell culture

Culture of Primary Human Lung Microvascular Endothelial Cell (HMVEC-L) was performed as described previously (Lafargue et al., 2017b). Briefly, HMVEC cells were cultured in EBM medium. At confluence, HMVEC cells were irradiated at 15Gy and maintained for 28 days. Conditioned media was collected during 28 days of culture every 7days, centrifuged 5min at 3000rpm and directly frozen on nitrogen.

Human glioblastoma cell lines, U251 MG, were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin and 2mM Glutamine. Primary GBM cultures were obtained from high grade glioma patients, mechanically dissociated and cultured in defined medium as previously described in (Oizel et al., 2017). For micronuclei study, only primary adherent GBM cultures were used.

Tumor cells were seeded and cultured in appropriate medium for at least 2hours before being treated overnight with conditioned media (volume to volume), EBM containing either 1ng/ml CXCL8 (Preprotech, Rocky hill, USA) and/or 50pg/ml CXCL5 (Preprotech, Rocky hill, USA), or conditioned media containing 0.5µg/ml of blocking antibodies against CXCL8 and/or 0.2µg/ml of blocking antibodies against CXCL5 (respectively 18672 and 9802;

Abcam, Cambridge, UK), or 250ng/ml of blocking antibody against CXCR2, MAB331 (MB) (R&D, Minneapolis, USA), or 1nM of CXCR2 antagonist, SB332235 (SB) (TOCRIS Bioscience, Bristol, UK), or 20μM of ERK1/2 inhibitor (FR180204; Bioscience, Bristol, UK), or 0.1μM of CHK1 inhibitor (Rabusertib (LY2603618); Selleckchem, Houston, USA). When indicated, tumor cells were irradiated 16 hours after addition of conditioned media.

Resistant cells were obtained after seeding U251 cells at very low density in either CM, SASP, CM supplemented with both CXCL8 and CXCL5 or SASP supplemented with either CXCR2 blocking antibody (MAB) or CXCR2 antagonist (SB). Cells were irradiated at 15 Gy and resistant clones were amplified for 3 to 5 weeks before orthotopic injections in mice (respectively RCM, RSASP and R_{CM}CXCL, R_{SASP}MAB and R_{SASP}SB).

Genomic instability

Tumor cells were seeded, treated with conditioned media overnight and irradiated at 5Gy. Seventy-two hours after irradiation, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with Hoechst (FP-BB1340 Interchim, Montlucon, France) 30min at 37°C. Ten pictures per well were captured using Zeiss microscope 60X oil, (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) and then analyzed using Image J Software (>100 cells per condition). Micronuclei were identified by distinct staining of Hoechst in structures outside of the nucleus and manually counted for each field. Polynucleated cells were manually counted for each field.

Clonogenic assay

Tumor cells were plated in 6-well plates accordingly to their respective plating efficiency (PE)

and radiation doses. Cells were treated with conditioned media overnight and then exposed to increasing doses of X-rays (0, 2, 5, 10 and 15Gy). When colonies are formed, cells were washed with PBS, stained with a solution of crystal violet (229288 from sigma-aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Plating efficiency (PE) and survival fraction (SF) and Relative Survival Fraction (RSF) were calculated using the following formula:

PE=number of colony/number of plating cells

SF=number of colony/(number of plating cells*PE)

RSF=SF(SASP)/SF(CM)

Time-lapse assay

Time lapse movies were performed on tumor cells plated in 12-well plates (10000 cells/well) stained overnight with 0,5 μ M of SiR-DNA (SC007, Spirochrome Switzerland). Cells were irradiated (XRAD225Cx preclinical irradiator, Precision X-Ray Inc, CT, USA) at 5Gy and maintained in conditioned media for 5days. Each film was composed of a sequence of pictures taken every 10minutes using a Nikon microscope (ECLIPSE Ti-E, Japan). Four fields per well were recorded. The number of cells, micronuclei and abnormal divisions were quantified on each film every 6 or 12hours.

ELISA assay

LIF, IL-33, CXCL8 (R&D system, Minneapolis, USA).and CXCL5 (Invitrogen, Villebonsur-Yvette, France) dosages were performed by ELISA on HMVEC-L conditioned media according to the manufacturer instruction.

RTqPCR

RNA was extracted using Nucleospin RNA/Protein kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer instruction. DNAse treatment was included in the protocol. The quantity and quality of RNA were evaluated using the NanoDrop[®] (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Primers sequences are given in Table below. The housekeeping genes were HGPRT, TATA and GAPDH.

Genes	Primer sequences for/reverse
IL-33	GGTCCAGAAATATACTAGAGCAC
	/
	GACTCATAGTAACTCAGTAACAC
	С
LIF	AGTGCCAATGCCCTCTTTATTCT
	C / CCAAGGTACACGACTATGCGG
CXCL5	ATCTGCAAGTGTTCGCCA /
	TCCTTGTTTCCACCGTCCA
CXCL8	GACATACTCCAAACCTTTCCA /
	AACTTCTCCACAACCCTCTG
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC /
	GAAGATGGTGATGGGATTTC
HGPRT	GAAGAGCTATTGTAATGACCAG /
	GCCAGTGTCAATTATATCTTCC
ТАТА	CAAGAGTGAAGAACAGTCCAG /
	ACAAGGCCTTCTAACCTTATAGG

Flow cytometry

To assess expression of CXCR1 and CXCR2 on membrane surface, tumour cells were collected, washed once with cold PBS and incubated using antibodies against CXCR1, CXCR2 or corresponding isotype in PBS BSA 0,1% (respectively 551080 and 555933 BD Pharmingen, Le pont de Claix, France). Fluorescence staining was measured with FACSCalibur flow cytometer (BD bioscience, Paris, France). Each measurement was conducted on 10000 events on CellQuest software (BD bioscience, Paris, France) and

analyzed using FlowJo Software (FlowJo LLC, USA). Results are presented as Geomean of fluorescence.

RNAseq analysis

After demultiplexing and quality control with fastQC_0.11.2 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), illumina adapter was trimmed with cutadapt-1.2.15 and reads with Phred quality score below 30 were filtered with prinseq-lite-0.20.36. Reads were aligned against human hg19 reference genome with tophat2.0.107, reads count was realised with htseq-count from HTSeq-0.5.4p58 and differential analysis with DESeq29.

Western blot

Twenty micrograms of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF Immobilon-P membranes (Millipore). Milk 5% saturated membranes were hybridized overnight at 4°C with a primary antibody, and with a HRP-coupled secondary antibody. Proteins of interest were revealed by Clarity Western Blot ECL substrate (Biorad). Primary antibodies used in Western Blot were directed against phospho- Thr202/Tyr204 Erk1/2, phospho-Thr199 NPM, phospho-Ser345 CHK1 (respectively 4370, 3541, 2348; Cell Signaling) and actin (05-636, MAB1501; Millipore). Densitometry analyses of the proteins were performed from Fusion Capt FX7 (Vilber).

Immunocytochemistry

Tumor cells were seeded at 10000cells/well on glass coverslips coated with 1% gelatin in appropriate medium for at least 2hours before being treated overnight with conditioned media (volume to volume). Cells were irradiated at 5Gy 16hours after addition of conditioned media. Cells were gently washed with cold PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 10minutes, permeabilized in 0,1% Triton X-100 for 10minutes and blocked in PBS-5% serum goat for 30minutes. Cells were incubated with the primary antibody 1/200 γH2AX (9718, Cell Signaling) overnight at 4°C and the secondary antibody 1/200 anti-IgG-Alexa568 (A11036, Invitrogen) during one hour at room temperature. Coverslips were mounted in slides with Prolong Gold with DAPI (P39635, molecular Probes from Life technology, Saint Aubin, France). Slides were observed on laser confocal microscope (model FV1000, Olympus or Nikon-A1) and images were processed using Image J.

Orthotopic injections of U251 human tumor cells in NSG mice.

This study was carried out in accordance with the recommendations of the French Regional Ethics Committee of the Pays de la Loire (Approvement #00186.02). Immunodeficient NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) mice, aged 8–12 weeks, were obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, MA) and bred in the animal facility of the University of Nantes (UTE, SFR F. Bonamy) under SPF status. Orthotopic injections of resistant U251 cells (10⁴ in 2 μ l PBS), respectively RCM, RSASP and RCXCL8/5, were performed in the subventricular zone of brain (2 mm on the right of the medial suture and 0.5 mm in front of the bregma, depth: 2.5 mm) using a stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL). Animals were observed daily and euthanized when characteristic symptoms occurred, such as reduced mobility and significant weight loss.

Statistical analysis

Experiments were repeated at least 3 times. Data are presented as mean \pm SEM or SD as indicated in the figures. Statistical analyses were carried out using Prism5 (Version 5.0c, GraphPad, USA) software. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Acknowledgements: We thank the microscopy platform MicroPICell, the cytometry core facility Cytocell for technical help and genomic plateform (ERRATA project). We also thank La ligue contre le cancer.



Figure 1: SASP enhances resistance and genomic instabilities after radiation

A. Proliferation of U251 cells in CM (grey) and SASP (black) in response to radiation using videomicroscopy analysis. Results are presented as the number of cells per field normalized to the initial number of cells (mean±sem, n≥3, Two-Way Anova; *p<0.05; ** p<0.01). **B**. Abnormal divisions U251 cells in CM (grey) and SASP (black) in response to radiation using videomicroscopy analysis. Results are presented as the relative frequency of abnormal cell division per field normalized to sham (CM and no irradiation) (mean±sem, n≥3, Two-Way Anova; *p<0.05; ** p<0.01). **C**. Frequency of polynucleated U251 cells in CM (grey) and SASP (black) in response to radiation (mean±sem, n≥6, t-test; *p<0.05). **D**. Clonogenic assay of U251 cells in CM or SASP in response to 15Gy-irradiation. E. Survival fraction of U251 cells in CM or SASP in response to increased doses of irradiation (0 to 15 Gy). Results are presented as the relative survival fraction of primary GBM cells in CM or SASP in response to irradiation (0, 2, 5 and 10 Gy). Results are presented as the relative survival fraction as compared to sham (relative survival fraction as compared to sham (mean±sem, n=2).



Figure 2: SASP enhances micronuclei formation in tumor cells

A. Micronuclei production in U251 cells in CM (grey) and SASP (black) in response to 5Gy-radiation using videomicroscopy analysis. Results are presented as the mean of micronuclei (MN) in cells per field (mean±sem, n=3, Two-Way Anova; *p<0.05). **B**. Representative pictures of MN-containing cells in CM and SASP 72hours after 5Gy-irradiation. **C**. Frequency of γ -H2AX positive MN in CM and SASP in response to radiation. MN were analyzed for DAPI and γ -H2AX staining 72 hours after 5Gy-irradiation. (mean±sem, n=3, Two-way ANOVA; *p<0.05). Representative pictures of immunofluorescence staining are presented on the right panel. **D**. Production of micronuclei in U251 cells in CM or SASP 72hours following 5Gy-irradiation (mean±sem, n=3, Two-Way Anova; ** p<0.01; *** p<0.001). **E**. Production of micronuclei in primary cells in CM or SASP 72hours following 5Gy-irradiation (mean±sem, n=3, Two-Way Anova; *** p<0.001).



В

Figure 3: Identification of key cytokines from the SASP

A. Hierarchical clustering of the 242 genes differentially expressed in endothelial cells 21 days after 0Gy or 15Gy. The expression values are normalized using the mean of all samples and presented as a heat map (XLstat analysis). **B.** PANTHER gene list belonging to the "Receptor Binding" category and corresponding log2 fold change compared to non-irradiated endothelial cells. **C.** Relative level of RNA coding IL-33, LIF, CXCL8 and CXCL5 in U251 cells 72 hours after 5Gy irradiation in SASP. Relative RNA level is expressed as compared as U251 cells in CM 72 hours after 5Gy irradiation (mean±sem, n≥3, t-test; * p<0.05, **p<0.01). **D.** ELISA assay of IL-33, LIF, CXCL8 and CXCL5 in CM and SASP 72 hours after 5Gy irradiation. (mean±sem, n≥3, t-test; *p<0.05).



Figure 4: Combination of CXCL8 and CXCL5 fully recapitulates SASP-induced genomic instability and radio-resistance

A. Production of micronuclei in cells in CM or SASP supplemented with blocking antibody against CXCL8 and/or CXCL5, respectively at 0.5µg/mL and/or 0.2µg/mL. (mean±sem, n≥3, one-Way Anova; *p<0.05; ** p<0.01). B. Production of micronuclei in cells treated with vehicle, CXCL8 (1ng/mL) and CXCL5 (50pg/mL), alone or in combination, 72hours following 5Gy-irradiation (mean±sem, n≥3, One-Way Anova; *p<0.05, *** p<0.001). C. Frequency of polynucleated cells in U251 cells 72 hours after 5Gy-irradiation in CM supplemented with vehicule or a combination of CXCL8/CXCL5 (respectively 1ng/mL and 50pg/mL). (mean±sem, n=33, One-Way Anova; *p<0.05). D. Survival fraction of U251 cells following 15Gy-irradiation in presence of vehicule, CXCL8 (1ng/mL), CXCL5 (50 pg/mL), alone or in combination. Results are presented as the relative survival fraction as compared to vehicule. (mean±sem, n=4, One-Way Anova; *p<0.01).



Figure 5: CXCL8 and CXCL5 trigger genomic instabilities through binding to CXCR2

A. CXCR1 and CXCR2 expression in U251 cells by FACS analysis. *Left panel*, Results are presented as the relative fluorescence (geomean) compared to isotype; *Right panel*, representative FACS histograms. (mean±sem, n≥3, t-test; *p<0.05). **B**. CXCR2 expression in GBM primary cells by FACS analysis. Results are presented as in (A). Mean CXCR2 expression in U251 cells is indicated as a white square on the graph (mean±sem, n≥3, t-test; *p<0.01). **C**. Production of MN 72 hours after 5Gy-irradiation in U251 cells in CM or SASP supplemented with 250ng/ml of blocking antibody against CXCR2 (MAB), or 1nM of CXCR2 antagonist (SB). (mean±sem, n≥3, One Way Anova; *p<0.05). **D**. Frequency of polynucleated cells 72hours after 5Gy-irradiation of U251 cells in CM or SASP supplemented with 250ng/ml of CXCR2 blocking antibody (MAB) or 1nM of CXCR2 antagonist (SB). (mean±sem, n≥3, One Way Anova; *p<0.05). **D**. Frequency of antagonist (SB). (mean±sem, n≥3, One Way Anova; *p<0.05). D. Frequency of NASP supplemented with 250ng/ml of CXCR2 blocking antibody (MAB) or 1nM of CXCR2 antagonist (SB). (mean±sem, n≥3, One Way Anova; *p<0.05).

132



Figure 6: SASP triggers the phosphorylation of CHK1, NPM and ERK through CXCL8 and CXCL5

A.Total and phosphorylated forms of NPM, CHK1 and ERK proteins evaluated by Western blot 24 hours after 15Gy-irradiation in CM or SASP (n=4, representative blots). **B**. Production of micronuclei in U251 cells 72 hours in response to 5Gy-irradiation after inhibition of ERK1/2, CHK1 and NPM. Inhibitors, respectively an ATP-competitive inhibitor of ERK1/2 (FR 180204, 20 μ M), a CHK1 inhibitor (LY2603618) or a NPM inhibitor (NSC348884), were added in U251 cell media supplemented with both CXCL8 (1ng/ml) and CXCL5 (50pg/ml). (mean±sem, n≥3, One-Way Anova; *p<0.05, *** p<0.001). **C**. Frequency of polynucleated cells in U251 cells 72 hours after 5Gy-irradiation after inhibition of ERK1/2, Chk1 and NPM as in (B). (mean±sem, n≥3, One-Way Anova; **p<0.01, *** p<0.001).



Figure 7: SASP increases resistant U251 bellicosity in an orthotopic GBM murine model

A. Mean survival of tumor-bearing mice after orthotopic injections of radioresistant U251 cells. Radioresistant U251 cells were obtained from surviving clones 3 weeks after 15Gyirradiation in presence of either CM or SASP (respectively called RCM (n=8) and RSASP(n=6)). **B.** Mean survival of tumor-bearing mice after orthotopic injections of radioresistant U251 cells obtained in presence of CM supplemented with CXCL8 and CXCL5 ($R_{CM}CXCL$) (n=8). **C.** Mean survival of tumor-bearing mice after orthotopic injections of radioresistant U251 cells obtained in presence of SASP supplemented with CXCR2 blocking antibody (n=8). **D.** Mean survival of tumor-bearing mice after orthotopic injections of radioresistant U251 cells obtained in presence of SASP supplemented with CXCR2 blocking antibody (n=8). **D.** Mean survival of tumor-bearing mice after orthotopic injections of radioresistant U251 cells obtained in presence of SASP supplemented with CXCR2 antagonist ($R_{SASP}SB$) (n=6). **E.** Median survival of tumor-bearing mice after orthotopic injection of radioresistant U251 cells. Log-rank p-values are indicated as compare to mice survival injected with either RCM radioresistant cells or RSASP radioresistant cells.



Time lapse analysis after 5Gy-irradiation of U251 cells cultured in CM or SASP. Cells were stained with the SirDNA probe. Representative pictures were taken 72 hours after irradiation.





Production of micronuclei in HUVEC in CM or SASP 72hours following 5Gy-irradiation (mean±sem, n=3, 2-Way Anova; ** p<0.01).



Franscriptomic analyses of the 10 most up-regulated pathways using PANTHER analysis. *Top panel* Functional annotations of differentially expressed pathways are indicated (GO : Gene Ontology). *Bottom panel* Transcriptomic analyses using PANTHER software for molecular functions focusing on genes involved in protein binding. Results are presented as pie charts.



Western blot analysis of total and phosphorylated forms of NPM, Chk1, ATM, DNA-PK, CHK2 and ERK proteins after 15Gy-irradiation in CM or SASP at the indicated timepoints. Actin was used as a loading control. (n=4, representative blots)

Discussion

Our earlier studies highlighted how early apoptosis in microvascular endothelial cells are enhancing tumor regression after exposure to high-dose of ionizing radiation (Garcia-Barros et al. Science 2001). In the present study, we now established that long-term endothelial senescent is driven an aggressive phenotype to relapse GBM cells after radiotherapy through the secretion of CXCL5 and CXCL8 leading to enhancement of genomic instability.

S4

The recurrence of tumor after first-line therapy represents a major issue in oncology. In fact, it is well accepted that tumor cells inside a cancerous mass may respond differently to the therapy. This heterogeneity will select the survival of resistant tumor cells when the most sensitive will be killed. The subpopulation of self-renewing and pluripotent GBM stem-like cells (GSCs), commonly explain the high rate of GBM relapse, because of their protumorigenic properties and their high radioresistance induced by highly efficient DNA damage repair (Bao et al. Nature). Furthermore, genotoxic treatment against cancer will also induce gene mutation leading to chromosome rearrangement and stochastic development of cancer clones with a gain of resistance. In the present manuscript, we described that the modification of peritumoral microenvironment plasticity by radiation therapy also enhances the aggressiveness of tumor relapse. The irradiation of the peritumoral area after surgery is commonly provided for infiltrating tumors, such as GBM or mammary carcinoma to kill the remaining tumor cells. We prove that the irradiation of this peritumoral area will induce the chronic senescence of non-transformed endothelial cells which is enhancing GBM tumor cell instability through a paracrine response.

Because of the inability to divide and to migrate, tumor cell senescence is emerging as a therapeutic strategy to repress the overall tumor growth after radiation therapy (Sabin RJ et al. Genome integ. 2011). However, its detrimental effects including tumor promotion, relapse and metastasis, must be considered (Coppé et al., 2006; Parrinello et al., 2005; Krtolica et al., 2001). Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) is associated with the release of numerous cytokines, chemokines, growth factors and proteases. Whereas some SASP factors are known to fuel the deleterious effects of senescent cells, other factors may have beneficial effects. Consistent with its complex composition, the SASP can have various effects from stimulating cell proliferation to cell differentiation or EMT stimulation. Tumor

cell senescence induced by ionizing radiation may also modify microenvironment homeostasis by enhancing angiogenesis (Han et al. 2012) or inflammation-induced immune response or cell surface heparin proteoglycan syndecan 1 (SDC1) expression in malignant breast stromal fibroblasts (Liakou et al, 2016). The over-expression of SDC1 in those fibroblasts are, in return, creating a favorable setting for human mammary carcinoma cell proliferation via FGF2 activation. However, no studies seems to proposes hypothesis that senescent microenvironment may mitigate tumor response to radiotherapy. Our results on endothelial cell senescence driven GBM aggressiveness and recurrence confirm how senescence of tumor microenvironment cellular compound is deleterious on the behavior of the tumor exposed to ionizing radiation.

Long-term time-lapse microscopy provides direct evidence that the SASP from endothelial cells is lowering the proliferation and radiosensitivity of GBM cells, but also increasing their genomic instability distinguishable by mitotic abnormalities and induction of aneuploidy and micronuclei. Characterization of the SASP demonstrates the involvement of the chemokines CXCL5 and CXCL8 that are mimicking the effects on irradiated GBM induced by the whole secretome of senescent cells. Inhibition of those chemokines or of CXCR2, their shared receptor, in GBM cells reduced the induction of micronuclei and aneuploidy. Finally, orthotopic injection in mouse brain of irradiation-surviving GBM cells pretreated either by SASP or by a combination of CXCL8 and CXCL5 showed an increase of aggressiveness and lethality as compared to those treated with medium from non-senescent endothelial cells, or in presence of CXCR2 inhibition. Those data clearly demonstrate a crucial role of senescent endothelial cells through the secretion of CXCL5 and CXCL8 in the bellicosity of GBM cells surviving from radiation therapy.

References

Borovski, T., Beke, P., van Tellingen, O., Rodermond, H.M., Verhoeff, J.J., Lascano, V., Daalhuisen, J.B., Medema, J.P., and Sprick, M.R. (2013). Therapy-resistant tumor microvascular endothelial cells contribute to treatment failure in glioblastoma multiforme. Oncogene *32*, 1539–1548.

Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C.M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. J. Biol. Chem. 281, 29568–29574.

De Pascalis, I., Morgante, L., Pacioni, S., D'Alessandris, Q.G., Giannetti, S., Martini, M., Ricci-Vitiani, L., Malinverno, M., Dejana, E., Larocca, L.M., et al. (2018). Endothelial trans-differentiation in glioblastoma recurring after radiotherapy. Mod. Pathol. *31*, 1361–1366.

Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. Science *300*, 1155–1159.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 12072–12077.

Lafargue, A., Degorre, C., Corre, I., Alves-Guerra, M.-C., Gaugler, M.-H., Vallette, F., Pecqueur, C., and Paris, F. (2017). Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. Free Radic. Biol. Med. *108*, 750–759.

Liakou, E., Mavrogonatou, E., Pratsinis, H., Rizou, S., Evangelou, K., Panagiotou, P.N., Karamanos, N.K., Gorgoulis, V.G., and Kletsas, D. (2016). Ionizing radiation-mediated premature senescence and paracrine interactions with cancer cells enhance the expression of syndecan 1 in human breast stromal fibroblasts: the role of TGF- β . Aging (Albany NY) *8*, 1650–1669.

Moding, E.J., Mowery, Y.M., and Kirsch, D.G. (2016). Opportunities for Radiosensitization in the SBRT Era. Cancer J 22, 267–273.

Niaudet, C., Bonnaud, S., Guillonneau, M., Gouard, S., Gaugler, M.-H., Dutoit, S., Ripoche, N., Dubois, N., Trichet, V., Corre, I., et al. (2017). Plasma membrane reorganization links acid sphingomyelinase/ceramide to p38 MAPK pathways in endothelial cells apoptosis. Cell. Signal. *33*, 10–21.

Parrinello, S., Coppe, J.-P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. J. Cell. Sci. *118*, 485–496.

Rofstad, E.K., Mathiesen, B., Henriksen, K., Kindem, K., and Galappathi, K. (2005). The tumor bed effect: increased metastatic dissemination from hypoxia-induced up-regulation of metastasis-promoting gene products. Cancer Res. *65*, 2387–2396.

Sabin, R.J., and Anderson, R.M. (2011). Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. Genome Integr 2, 7.

Yang, L., Fang, J., and Chen, J. (2017). Tumor cell senescence response produces aggressive variants. Cell Death Discov 3, 17049.

DISCUSSION

Mes travaux de thèse se sont concentrés sur l'étude des effets tardifs de l'irradiation sur le compartiment vasculaire ainsi qu'à ses implications dans la réponse de la tumeur au traitement. Lors de cette thèse nous avons montré que l'irradiation induit la sénescence tardive des cellules endothéliales, de manière indépendante de l'apoptose précoce, via deux voies moléculaires dictinctes : la voie classique p53 et une voie mitochondriale comprenant un dysfonctionnement du complexe II de la chaine respiratoire associé à une production chronique d'anion superoxyde (Figure 29). De plus, nous avons mis en évidence que le sécrétome (SASP) de ces cellules induit une forte instabilité génomique et la radiorésistance des cellules de GBM *in vitro*, ainsi qu'une augmentation de leur agressivité *in vivo*. La caractérisation du SASP combinée à des études fonctionnelles nous a permis d'identifier le rôle de l'axe CXCL8/CXCL5/CXCR2 et de l'implication des protéines ERK, NPM et Chk1 dans ces phénotypes.



Figure 29 : Schéma récapitulatif des résultats du projet de thèse.

L'irradiation induit la sénescence des cellules endothéliales via deux voies moléculaire indépendantes : la voie classique p53 et une voie mitochondriale associant un dysfonctionnement du complexe II de la chaine respiratoire et une production chronique d'anion superoxyde. Les cellules endothéliales sénescentes augmentent l'instabilité génomique (micronoyaux, polyploïdie) et la radiorésistance *in vitro* ainsi que l'agressivité *in vivo* des cellules de GBM irradiées via l'axe CXCL8/CXCL5/CXCR2 et l'activation des protéines ERK, Chk1 et NPM.

Beaucoup d'études visant à comprendre l'effet de la radiothérapie sur les cellules endothéliales sont réalisées avec des modèles macrovasculaires en prolifération tels que les BAECs, les HAECs ou les HUVECs. Or, les travaux d'Igarashi et coll montrent que les cellules endothéliales proliférantes deviennent rapidement et massivement sénescentes 5 jours après une irradiation de 8Gy alors que, à l'opposé, les cellules confluentes irradiées montrent moins de sénescence (Igarashi et al., 2007). De plus, si ces modèles reflètent les effets de l'irradiation sur les vaisseaux artériels et veineux, ils ne reflètent pas précisément les effets sur les microvaisseaux qui sont pourtant le composant majoritaire de tous les tissus. Les macrovaisseaux sont plus radiorésistants que les microvaisseaux certainement de part leur paroi plus large composée de cellules relativement radiorésistantes. De plus, ils présentent des lésions radio-induites différentes et moins fréquentes que les microvaisseaux. Par ailleurs, la sensibilité des microvaisseaux aux rayonnements ionisants dépendra du tissu dans lequel ils se trouvent. Par exemple, les cellules endothéliales microvasculaires du derme sont plus radiosensibles que les cellules endothéliales microvasculaires hépatiques (Fajardo, 2005). Il semble donc important de prendre en considération le type de vaisseaux ainsi que l'indice de prolifération des cellules utilisées afin d'étudier les lésions induites après irradiation. Très peu d'études sont faites à partir de cellules endothéliales microvasculaires primaires quiescentes et ne reflètent donc pas la physiologie. Lors de ma thèse j'ai donc développé un modèle de sénescence, plus proche de la physiologie, en utilisant des cellules endothéliales microvasculaires primaires (HMVEC-L). Ces cellules sont cultivées à confluence et présentent une inhibition de contact parfaite nous permettant de les maintenir en culture durant plusieurs semaines. Une fois à confluence (en quiescence), elles sont irradiées à des doses thérapeutiques d'irradiation (1-15Gy) et la sénescence est étudiée 21 jours posttraitement. Nous avons montré dans notre modèle cellulaire que l'irradiation induit la sénescence de ces cellules de manière dépendante de la dose et du temps, atteignant près de 70% 28 jours après irradiation. Ces résultats sont accord avec d'autres études de la littérature montrant par exemple que l'irradiation par des rayons X ou y provoque la sénescence prématurée de cellules endothéliales microvasculaires de cerveau (Ungvari et al., 2013) (McRobb et al., 2017). Notre modèle cellulaire nous a ensuite permis de mieux définir les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénotype.
L'implication de la protéine p53 dans la sénescence des cellules endothéliales macrovasculaires en prolifération a déjà été montrée dans de nombreuses études (Zhan et al., 2010) (Barjaktarovic et al., 2011). Nous avons confirmé son implication dans notre modèle cellulaire puisque l'expression de p53 augmente en fonction du temps et de la dose d'irradiation et que le traitement par la Pifithrin- α (inhibiteur transcriptionnel de p53) permet de réduire partiellement le niveau de sénescence radio-induite ainsi que l'expression de p21^{WAF1}. Certaines études relient l'activation de p53, les dommages à l'ADN et la sénescence (Borodkina et al., 2014). Dans notre modèle, nous observons une persistance d'activation des voies de réparation des dommages à l'ADN. L'inhibiteur d'ATM permet de réduire l'expression de p53 suggérant que les dommages à l'ADN se trouvent en amont de p53 et permettent le maintien chronique de son expression.

En plus de la voie p53, nous avons mis en évidence une voie mitochondriale impliquant un dysfonctionnement du complexe II de la chaine respiratoire associé à une production chronique d'anion superoxyde. Dans notre étude, l'inhibition des ROS mitochondriaux par traitement avec le MnTBAP (SOD2 mimétique) permet de prévenir la sénescence radioinduite des cellules endothéliales ainsi que l'expression de p21^{WAF1} tout en préservant l'expression de p53. Ces résultats sont en accord avec ceux de Kurz et coll décrivant que l'inhibition de la synthèse de glutathion augmente le niveau de ROS et accélère l'entrée en sénescence des HUVECs (Kurz et al., 2004). Nous montrons également que le MnTBAP est capable de restaurer l'activité du complexe II de la chaine respiratoire, suggérant que les ROS sont impliqués dans cette dysfonction mitochondriale. Nous émettons l'hypothèse d'un cercle vicieux où les ROS produits par l'irradiation vont endommager le complexe II de la chaine respiratoire permettant, en retour, le maintien de la production chronique de ROS mitochondriaux. Les sources primaires de ROS après irradiation sont multiples. Il est notamment montré que l'activation de DUOX1 (appartenant à la famille de NOXs) par l'irradiation permet le maintien d'un stress oxydant chronique favorisant l'apparition d'instabilités génomiques (Ameziane-El-Hassani et al., 2015). De plus, des études montrent que les protéines NOX-1, NOX-4 et NOX-2 sont impliquées dans la sénescence des cellules endothéliales induite par le Resveratol ou la doxorubicine (Schilder et al., 2009) (De Falco et al., 2016). Dans notre modèle cellulaire, nous avons montré que les NOX-2 et NOX-5 sont respectivement sous-exprimées et surexprimées après irradiation. L'étude plus précise de leur rôle dans la sénescence radio-induite permettrait de mieux déterminer la source du stress oxydant chronique impliquée dans ce phénomène. En plus des NOX, les mitochondries sont également largement impliquées dans la production de ROS. Il est généralement décrit que les complexes I et III de la chaine respiratoire sont les producteurs majeurs de ROS mitochondriaux. Moins d'études sont faites sur le complexe II bien qu'il soit également capable de participer à la production de ROS (Barjaktarovic et al., 2011).

Nos études complémentaires de la mesure directe de l'activité du complexe II en présence de son substrat (le succinate) montrent que c'est directement l'activité de ce dernier qui est impactée. En effet, aucune augmentation d'activité du complexe II n'est détectée après irradiation en présence de succinate. Plusieurs études montrent que l'inactivation de ce complexe peut être due à une diminution d'expression de sa sous unité catalytique menant à l'arrêt du cycle cellulaire de cellules du foie (Chang) (Yoon et al., 2003). Dans notre cas, l'analyse de l'expression des sous unités catalytiques des différents complexes de la chaine respiratoire ne montre aucune modulation d'expression, suggérant que l'inactivation du complexe II est attribuée à une autre anomalie. En effets, certaines études montrent que l'inactivation de ce complexe peut être provoquée par des phénomènes tels que l'acidification intracellulaire menant à sa désintégration (Lagadic-Gossmann et al., 2004) ou des modifications oxydatives des sous unités (Choksi et al., 2007). De plus, il est montré que des mutations au niveau des sous unités des différents complexes de la chaine respiratoire peuvent provoquer une augmentation du stress oxydant. Par exemple, les cellules mutées pour la sousunité SDHC du complexe II ont un niveau de ROS beaucoup plus important que les cellules sauvages (Slane et al., 2006). En effet, cette sous unité permet l'ancrage du complexe II à la membrane mitochondriale et facilite le transfert d'électrons au CoenzymeQ. La mutation de ce complexe altère donc le transfert d'électrons et favorise leur réaction avec l'oxygène et la formation d'anion superoxyde. Nous avons réalisé une étude de RNAseq sur les cellules endothéliales sénescentes radio-induites. L'analyse des séquences codant pour la sous-unité du complexe II nous permettrait de déceler la présence de mutations et peut être de mieux comprendre la cause de son dysfonctionnement.

Notre équipe de recherche a précédemment montré que l'irradiation induit l'apoptose précoce des cellules endothéliales dépendante de la voie Asmase/céramide et pouvant être inhibée par la S1P (Paris et al., 2001) (Bonnaud et al., 2007). Cependant, le lien entre cette

apoptose précoce et les effets tardifs de l'irradiation des cellules endothéliales n'est pas clair. Nous avons montré que, malgré le traitement par la S1P, les cellules endothéliales entrent en sénescence après irradiation, suggérant que l'apoptose précoce n'est pas reliée au phénotype sénescent. Ces résultats sont en accord avec ceux de Panganiban *et coll* montrant que l'inhibition d'IGF1R permet d'inhiber la sénescence radio-induite sans toutefois prévenir l'apoptose précoce des cellules endothéliales (Panganiban and Day, 2013).

Nous avons montré que la sénescence radio-induite des cellules endothéliales est impliquée dans l'instabilité génomique, la radiorésistance ainsi que l'agressivité des cellules de GBM via la sécrétion des facteurs pro-inflammatoires CXCL8 et CXCL5. Cette tumeur du système nerveux central est la plus fréquente et la plus agressive chez l'adulte. Elle est très infiltrante et est traitée par chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie (Stupp et al., 2005). Le caractère infiltrant de cette tumeur oblige les radiothérapeutes à utiliser des champs d'irradiation larges impliquant le ciblage des cellules tumorales mais également du parenchyme cérébral sain adjacent. La rechute du GBM est systématique et se produit dans 90% des cas dans la zone irradiée (Gebhardt et al., 2014). Il est démontré sur des coupes post-mortem de biopsies de patients atteints et traités pour un GBM (60Gy) que 30% des cellules endothéliales comprises dans le champs d'irradiation sont sénescentes contre 0% dans la zone non irradiée (Borovski et al., 2013). De plus, une étude récente renforce ces résultats en montrant une augmentation de la sénescence des cellules endothéliales sur des coupes de récidives (obtenues après radiothérapie) de GBM par rapport à la tumeur primaire (avant traitement) (Pascalis et al., 2018). Toutes ces données suggèrent une implication du microenvironnement irradié dans la récidive du GBM après traitement. D'autres tumeurs comme le cancer de la prostate rechutent également dans le champ d'irradiation initial (Pucar et al., 2007) et il est montré in vitro que le SASP de fibroblastes sénescents augmente l'invasion de ces cellules. Il est donc pertinent de penser que la sénescence radio-induite des tissus péri-tumoraux peut jouer un rôle délétère dans la réponse de la tumeur à la radiothérapie.

Les SASP des cellules sénescentes peuvent différer d'un point de vue quantitatif et qualitatif en fonction des types cellulaires et du stress inducteur de sénescence (Coppé et al., 2010). Cependant, il existe un programme de sécrétion conservé déclenché dans toutes

cellules entrant en sénescence. Notamment, la très grande majorité des SASP présentent des taux élevés de cytokines inflammatoires, de modulateurs immunitaires et de facteurs de croissance, suggérant que les SASP pourraient avoir une myriade d'activités biologiques. Les facteurs du SASP retrouvés dans notre modèle (CXCL8, CXCL5, CXCL1, MCP-1 etc.) sont associés à un phénotype pro-inflammatoire et chimioattractant, et sont également sécrétés par d'autres cellules sénescentes telles que des fibroblastes, des cellules endothéliales microvasculaires de cerveaux, des cellules endothéliales aortiques ou encore certaines cellules tumorales (Ungvari et al., 2008) (Coppé et al., 2008) (Song et al., 2011) (Philipp et al., 2017).

Nous avons montré dans un modèle orthotopique, que l'injection de cellules de GBM irradiés en présence de SASP ou d'un co-traitement avec CXCL8/5 diminue la survie des souris par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent donc que les cytokines contenues dans le SASP des cellules endothéliales sénescentes augmentent l'agressivité des cellules de GBM résistantes à l'irradiation et confirment donc son action pro-tumorale. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études montrant que le SASP des cellules du microenvironnement peut jouer un rôle dans l'augmentation de la tumorigénèse et de la résistance (Krtolica et al., 2001) (Ortiz-Montero et al., 2017). Afin d'aller plus loin dans ces études, il est primordial de valider la sénescences radio-induite des cellules endothéliales in vivo. L'irradiation d'un hémisphère cérébral associée à des analyses immunohistologiques (Co-marquage CD31^{*}/β-galactosidase, CD/31p21^{WAF1} CD31/p16^{INK4a}) nous permettrait de confirmer la sénescence des cellules endothéliales in vivo ainsi que les acteurs moléculaires impliqués. Des résultats de la littérature sont en faveur de notre étude puisqu'il est montré la présence de cellules endothéliales sénescentes sur des coupes de biopsies de patients traités par radiothérapie (Borovski et al., 2013) (Pascalis et al., 2018). Il serait également intéressant de confirmer la sécrétion locale ou sanguine des facteurs du SASP dans un modèle in vivo. Notre laboratoire va disposer d'échantillons de sang et de coupes de récidives de patient atteints de GBM. La détection de ces cytokines dans ces échantillons biologiques nous permettrait de confirmer nos résultats in vitro. S'il s'avère que ces facteurs sont retrouvés dans la circulation sanguine, ils pourraient constituer des biomarqueurs prédictifs de la réponse des tissus sains à la radiothérapie. Il est par ailleurs montré que les patients atteints de tumeur du

^{*} Marqueur des cellules endothéliales

pancréas présentent un taux élevé de CXCL5 et que ceci est associé à un mauvais pronostic (Li et al., 2011a).

L'instabilité génomique est l'une des caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011). Elle se caractérise par l'augmentation de l'acquisition d'altérations dans le génome conduisant à des anomalies du caryotype, des mutations et amplifications géniques, la transformation cellulaire, l'hétérogénéité clonale et la mort cellulaire. Ces anomalies biologiques peuvent persister dans les générations cellulaires suivantes et être associées à la carcinogénèse. Hanahan et Weinberg ont décrit que ces instabilités ne constituent pas une capacité fonctionnelle du cancer en soi, mais plutôt une propriété permettant l'acquisition des fonctions essentielles des cellules cancéreuses (Negrini et al., 2010) (Hanahan and Weinberg, 2011). Le stade de développement tumoral ainsi que les mécanismes moléculaires par lesquels se produisent ces instabilités sont encore peu connus. Elles sont présentent sous différentes formes dans la majorité des cancers humains. La forme la plus fréquente est l'instabilité chromosomique, dont les micronoyaux sont les marqueurs prépondérants, impliquant la modulation du nombre de chromosomes ainsi que de leur structure. Elles sont généralement dues à la présence de dommages à l'ADN non réparés telles que les CDBs ou à un défaut de ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Il est proposé que les instabilités génomiques ne soient pas des phénomènes intrinsèques aux cellules mais des réponses à des stimuli inflammatoires. Il est par ailleurs démontré que le traitement de souris avec un antiinflammatoire diminue le nombre d'instabilités génomiques post-irradiation (Mukherjee et al., 2012). De plus, certaines cytokines et facteurs de croissance sont capables d'induire des stress réplicatifs et l'apparition d'instabilités chromosomiques (Gorgoulis et al., 2005). Certaines d'entre elles sont également capable d'augmenter la concentration de ROS intracellulaires via l'activation des NOXs ou des NOS favorisant la formation de dommages à l'ADN et l'activation de voies de signalisation menant à l'apparition d'instabilités génomiques et de mutations (Jackson and Loeb, 2001) (Reuter et al., 2010). Dans notre étude, nous montrons l'implication des facteurs CXCL8 et CXCL5, contenus dans le SASP des cellules endothéliales sénescentes, dans l'instabilité génomique après irradiation. Plus précisément, ces facteurs provoquent une augmentation du nombre de micronoyaux ainsi que de la polyploïdie des cellules de GBM après irradiation. C'est, à ma connaissance, la première fois qu'une étude démontre l'implication du facteur CXCL5 dans l'instabilité génomique après irradiation. Notre étude constitue donc une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes

impliqués dans la formation d'instabilités génomiques après radiothérapie. Concernant CXCL8, nos résultats sont en accord avec ceux de *Laiakis et coll* montrant que l'ajout de ce facteur sur des cellules hybrides hamster-homme (GM10115) augmente la formation de micronoyaux (Evagelia C.Laiakis, 2008). Mon hypothèse serait que l'augmentation de l'instabilité génomique induite par ces cytokines pourrait participer à la radiorésistance et la récurrence via l'acquisition de mutations renforçant l'hétérogénéité tumorale et par conséquent l'émergence de clones résistants. Il est par ailleurs montré qu'un taux élevé de CXCL8 est associé à un mauvais pronostic des patients atteints de GBM (Dwyer et al., 2012).

Les micronoyaux proviennent principalement de fragments de chromosomes acentriques ou de chromosomes entiers non inclus dans le noyau de la cellule fille de part une fixation incorrecte au fuseau mitotique lors de la ségrégation des chromosomes. Ces petits fragments d'ADN cytoplasmiques sont généralement encapsulés par une membrane et peuvent être détectés par diverses protéines telles que cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase). La rupture de la membrane micronucléaire entraine la fixation de cGAS sur le fragment d'ADN extranucléaire, provoquant la formation d'un second messager appelé cGAMP (2'-5', 3'-5' cyclic GMP-AMP) activant ensuite la protéine STING (Stimulator of Interferon Genes) et la transcription de gènes tels que des cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'activation de la voie des interférons de type I (Härtlova et al., 2015) (Mackenzie et al., 2017). Les conséquences biologiques de la détection des ADN cytosoliques sont dépendantes du contexte cellulaire, de l'intensité et de la durée d'activation des premiers stimuli et peuvent provoquer des modulations allant de la sénescence à la tumorigénèse (Ahn et al., 2014) (Yang et al., 2017). Si l'activation de la voie cGAS/STING et la sécrétion de l'interféron de type I dans des cellules de cancer du sein exposées à une irradiation fractionnée provoque une immunité antitumorale systémique (Harding et al., 2017) (Vanpouille-Box et al., 2017), cette voie favorise également le processus métastatique (Bakhoum et al., 2018). Dans notre étude, nous montrons que l'irradiation des cellules de GBM en présence de SASP augmente le nombre de micronoyaux, la radiorésistance ainsi que l'agressivité tumorale. Il serait donc intéressant d'analyser l'activation de cette voie par la présence de cGAS dans les micronoyaux induit par le SASP et l'irradiation ainsi que l'activation de STING (Figure 30). L'activation de cGAS/STING dans notre modèle serait en faveur d'une action pro-tumorale et constituerait donc une cible thérapeutique potentielle afin d'éviter les rechutes tumorales.



Härtlova et al., 2015 Harding et al., 2017

Figure 30 : La voie cGAS/STING pourrait être impliquée dans la récurrence du GBM après radiothérapie.

Le caractère infiltrant du GBM oblige les radiothérapeutes à utiliser des champs d'irradiation larges impliquant une irradiation significative du microenvironnement péritumoral. Nous avons montré que l'irradiation des cellules endothéliales induit leur sénescence ainsi que la sécrétion de facteurs du SASP tels que CXCL8 et CXCL5. Ces cytokines provoquent l'augmentation de l'instabilité génomique, traduite entre autres par la formation de micronoyaux, des cellules de GBM après irradiation. Il est montré que la présence d'ADN extranucléaire peut provoquer l'activation de la voie cGAS/STING favorisant l'inflammation via l'activation de la voie des interférons de type I. Cette inflammation peut être associée à une diminution de la tumeur à distance (effet abscopal) (Harding et al., 2017) ou à une augmentation de la tumorigénèse et du processus métastatique (Bakhoum et al., 2018). Il serait intéressant d'étudier l'activation de cette voie dans notre modèle ainsi que l'implication de l'inflammation dans la récurrence du GBM après radiothérapie.

Nous avons montré que l'augmentation des instabilités génomiques induites par les facteurs CXCL8 et CXCL5 après l'irradiation passe par l'activation de leur récepteur commun CXCR2. Si certaines études montrent que ce récepteur n'est pas exprimé par les cellules de GBM (Raychaudhuri and Vogelbaum, 2011), des études plus récentes montrent que son expression est retrouvée dans des échantillons de GBM humain (Presti et al., 2018)

(Yang et al., 2015). Nos résultats confirment ces dernières études puisque nous montrons l'expression de CXCR2 aussi bien sur les lignées que sur les cultures primaires de GBM. CXCL8 et CXCL5 sont capables de se lier à ce récepteur et d'activer les voies de signalisation en aval comme la voie MEK/ERK décrite comme jouant des rôles pro- ou anti-tumoraux dépendants du contexte cellulaire (Deschênes-Simard et al., 2014). Nous avons montré que le SASP des cellules endothéliales sénescentes potentialise l'activation de ERK 24h après irradiation. De plus, l'inhibition de CXCR2 ou de ERK induit une diminution du nombre de MN et de cellules polyploïdes, indiquant que cette voie de signalisation est impliquée dans l'augmentation des instabilités génomiques observées après irradiation des cellules de GBM. L'implication de cette voie dans l'instabilité génomique induite par des stress comme certaines chimiothérapies a été montrée dans quelques études mais reste controversée. En effet, des études montrent que l'activation de la voie ERK, par certaines drogues, augmente le nombre de micronoyaux via la régulation de la protéine Aurora B impliquée dans le contrôle du fuseau mitotique et donc dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose (Jorquera and Tanguay, 2001) (Rosner, 2007) (Kabil et al., 2008) (Eves and Rosner, 2010). Cependant, d'autres études attestent que ERK est requis pour la maintenance des télomères et la stabilité génomique et que son inhibition augmente le nombre d'aberrations chromosomiques (Chen et al., 2015) (Ma et al., 2016) (Stepanenko et al., 2016). Les différences rencontrées entre ces études peuvent venir des types cellulaires utilisés. Nos résultats sont en faveur de l'implication de ERK dans l'instabilité génomique. Cependant, des études complémentaires quant aux mécanismes moléculaires impliqués nous permettrait de valider cette hypothèse.

Nous avons mis en évidence que les facteurs CXCL8 et CXCL5 sont également impliqués dans la radiorésistance des cellules de GBM. Nos résultats sont en accord avec la littérature puisque de nombreuses études montrent que l'inhibition de la sécrétion de cytokines sensibilise les cellules tumorales à la radiothérapie (Sun and Nelson, 2012) (Laine et al., 2013) (Neta, 1997). Par exemple, l'inhibition de la voie NFKB inhibe la production de CXCL8 et d'IL-6 et augmente la radiosensibilité de cellules de carcinome (Tamatani et al., 2004). Cette radiorésistance peut être induite via l'activation d'une multitude de voie de signalisation comme les voies p38/MAPK ou STAT3 (Bonner et al., 2009). La voie ERK est également connue comme étant impliquée dans l'activation de nombreux gènes régulant la résistance aux traitements. Il est par exemple démontré que l'expression d'un dominant négatif de MEK2 (acteurs de la voie ERK) augmente la sensibilité des cellules à l'irradiation

en les bloquant en phase G2/M (Abbott and Holt, 1999). De plus, les protéines ERK1/2 sont capables de phosphoryler et d'inhiber les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bad, Bim et la caspase9 (Hein et al., 2014). Il serait intéressant d'étudier la radiorésistance des cellules de GBM en présence de l'inhibiteur pharmacologique de ERK utilisé dans notre étude afin d'analyser son implication dans ce phénomène.

Le dialogue entre les cellules endothéliales sénescentes et les cellules de GBM joue donc un rôle délétère dans la réponse du GBM à la radiothérapie. Une meilleure caractérisation des instabilités génomiques permettrait d'enrichir les résultats de notre étude et peut être de mieux comprendre l'acquisition de la radio-résistance. Nous avons produit au laboratoire des clones résistants développés en présence de SASP ou de milieu conditionné control. La caractérisation de ces clones par RNAseq permettrait d'analyser les gènes modulés lors de l'acquisition de l'instabilité génomique et de la radiorésistance. De plus, une analyse haut débit par CGH (*Comparative Genomic Hybridization*) permettrait d'étudier les variations du nombre de copies de loci chromosomiques de l'ADN et ainsi de mieux caractériser les instabilités génomiques. Ces résultats nous permettraient de savoir si les modifications chromosomiques observées (amplifications, délétions, etc.) sont retrouvées de manière récurrente ou au contraire aléatoire au sein des différents clones. De plus, il serait intéressant d'analyser par vidéomicroscopie les modulations phénotypiques des différents clones (prolifération, micronoyaux, mort cellulaire, migration, etc.). Ces expériences nous permettront d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans les phénotypes observés.

Plusieurs approches permettraient d'inhiber le dialogue entre les cellules endothéliales sénescentes et les cellules de GBM (Figure 31).



Figure 31 : Approches thérapeutiques permettant d'inhiber le dialogue entre les cellules endothéliales sénescentes et les cellules de GBM.

Nous avons montré que le dialogue entre les cellules endothéliales sénescentes et les cellules de GBM implique les cytokines CXCL8 et CXCL5 et engendre une augmentation de la radiorésistance et de l'agressivité *in vivo*. Après validation de la sénescence des cellules endothéliales sénescentes et de la présence des cytokines CXCL8 et CXCL5 *in vivo* et chez le patient (vert), plusieurs approches thérapeutiques permettraient d'inhiber ce dialogue. L'une d'elle serait de cibler directement les cellules sénescentes ou d'inhiber leur apparition. L'utilisation d'anticorps bloquants contre les cytokines du SASP ou leur récepteur, ou d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant les protéines impliquées dans la radiorésistance constituerait également une approche thérapeutique permettant d'inhiber le dialogue entre ces deux compartiments cellulaires. Il serait intéressant à terme de valider ces approches thérapeutiques *in vivo* ainsi que chez le patient afin de limiter la récurrence des GBM.

 La première approche envisagée serait d'empêcher les cellules endothéliales de devenir sénescentes après irradiation. Nous avons identifié *in vitro* deux molécules (le MnTBAP et la Pifithrin-α) capables de prévenir la sénescence radio-induite des cellules endothéliales. Le traitement des souris avec ces inhibiteurs permettrait de valider leur efficacité *in vivo*. Après validation de la sénescence *in vivo*, l'injection de cellules de GBM au niveau du site d'irradiation couplé au traitement d'une de ces molécules permettrait de mieux comprendre l'implication de la sénescence des cellules endothéliales dans le devenir du GBM après radiothérapie. Nous avons montré *in vitro* que le MnTBAP inhibe de manière plus importante la sénescence radio-induite des cellules endothéliales par rapport à la Pifithrin- α . De plus, ce scavenger de ROS est déjà utilisé dans de nombreuses études *in vivo* ainsi que chez le patient (Wu et al., 2012) (Suresh et al., 2013). Bien qu'un faible niveau de MnTBAP traverse la BHE, son efficacité a déjà été démontrée dans certaines études (Liu et al., 2013). De plus, les patients atteints de GBM présentent une BHE modifiée et plus perméable ce qui permettrait une meilleure pénétration du MnTBAP dans le SNC. D'après toutes ces données, il me semblerait plus pertinent d'utiliser le MnTBAP afin d'inhiber la sénescence radio-induites *in vivo* plutôt que la Pifithrin- α . Par ailleurs, il ne me paraît pas judicieux d'utiliser un inhibiteur transcriptionnel de p53 qui est un gène suppresseur de tumeur jouant des rôles primordiaux dans toutes les cellules.

- La deuxième approche serait d'éliminer les cellules endothéliales sénescentes par traitement avec des sénolytiques. Il est par exemple démontré que l'ABT-263 (inhibiteur spécifique des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL) provoque la clairance des cellules sénescentes en induisant leur apoptose (Chang et al., 2016). Nous pourrions donc envisager l'utilisation d'une telle molécule dans notre modèle. Par ailleurs, l'équipe de DeMaria a développé des souris transgéniques p16-3MR contenant le promoteur du gène p16^{INK4a} induit lors de la sénescence et les domaines fonctionnels de la luciférase de Renilla (LUC), de la protéine fluorescente rouge monomère (mRFP) et de la thymidine kinase (HSV-TK) du virus de l'herpès simplex tronqué 1 (Demaria et al., 2014). Cette construction permet de visualiser les cellules sénescentes par luminescence et de les éliminer par administration de ganciclovir chez l'animal. Après validation de la sénescence radio-induite in vivo, l'injection des cellules de GBM au site d'irradiation couplée au traitement des souris avec un sénolytique nous permettrait de savoir si l'élimination des cellules sénescentes du microenvironnement améliore le devenir de la tumeur après radiothérapie. Il me semble toutefois important de prendre en compte que la mort des cellules endothéliales par apoptose favorisera une réaction inflammatoire pouvant à son tour jouer un rôle dans la réponse de la tumeur au traitement.
- La troisième approche serait d'inhiber les facteurs du SASP impliqués dans les effets délétères observés soit par l'inhibition de leur transcription ou en les ciblant directement avec des anticorps bloquants. Il est par exemple montré que l'inhibition de la sécrétion de

CXCL8 par inactivation de la voie NF κ B radiosensibilise les cellules tumorales et diminue la tumorigénèse *in vivo* (Tamatani et al., 2004). Dans notre modèle, nous avons identifié une quinzaine de gène surexprimé dans les cellules endothéliales sénescentes et codant pour des protéines sécrétées. Nous avons déterminer le rôle de deux d'entre elles (CXCL8 et CXCL5) dans la résistance et l'agressivité des cellules de GBM. L'inhibition de ces cytokines semble donc être une bonne approche thérapeutique puisque nous montrons une inhibition totale de l'instabilité génomique après irradiation en présence d'anticorps bloquants dirigés contre ces cytokines.

 Enfin, nous avons montré que le récepteur CXCR2 et la protéine ERK sont impliqués dans le dialogue et que leur inhibition *in vitro* réverse certains phénotypes délétères radioinduits tels que l'instabilité génomique (micronoyaux et polyploïdie). L'inhibition de ces acteurs moléculaires *in vivo* permettrait de réduire les effets délétères du SASP sur les cellules tumorales. Des inhibiteurs de la voie ERK sont en cours d'essai clinique dans certains cancers tels que le pancréas (Neuzillet and Hammel, 2012). Ils semblent avoir une action anti-tumorale importante mais des effets secondaires non négligeables.

*

En conclusion, bien que la radiothérapie soit considérée comme un traitement anticancéreux efficace, j'ai démontré lors de ma thèse que ce traitement présente certaines limites de part l'irradiation des tissus sains adjacents à la tumeur. En effet, nous avons décrit que les effets tardifs de l'irradiation se traduisent par une sénescence prématurée des cellules endothéliales dépendante de deux voies moléculaires distinctes et participant à la radiorésistance, l'instabilité génomique et l'agressivité des cellules de GBM via la sécrétion de facteurs du SASP. Mon hypothèse serait que les instabilités génomiques provoquées par le SASP après irradiation augmenteraient l'hétérogénéité tumorale et par conséquent le nombre de clones potentiellement résistants au traitement et le plus à même de récidiver. La très grande majorité des patients étant actuellement traités par radiothérapie, il me paraît donc primordial de prendre en considération les conséquences de l'irradiation du compartiment vasculaire dans les récidives tumorales. Les différents acteurs moléculaires mis en évidence lors cette thèse constituent de potentielles cibles thérapeutiques dans l'amélioration de la réponse du GBM à la radiothérapie. Bien que de nombreuses questions restent en suspens, en particulier concernant l'acquisition des instabilités génomiques, ce projet de recherche ouvre de nouvelles pistes thérapeutiques afin de limiter l'acquisition de résistances des GBM et ainsi les récidives systématiques fatales pour le patient.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, D.W., and Holt, J.T. (1999). Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation. J. Biol. Chem. 274, 2732–2742.

Abou-Antoun, T.J., Hale, J.S., Lathia, J.D., and Dombrowski, S.M. (2017). Brain Cancer Stem Cells in Adults and Children: Cell Biology and Therapeutic Implications. Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother. *14*, 372–384.

Adams, P.D. (2007). Remodeling chromatin for senescence. Aging Cell 6, 425-427.

Ahn, G.-O., and Brown, J.M. (2008). Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: Role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. Cancer Cell *13*, 193.

Ahn, G.-O., Tseng, D., Liao, C.-H., Dorie, M.J., Czechowicz, A., and Brown, J.M. (2010). Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 8363.

Ahn, J., Xia, T., Konno, H., Konno, K., Ruiz, P., and Barber, G.N. (2014). Inflammationdriven carcinogenesis is mediated through STING. Nat. Commun. *5*, 5166.

Alaoui-Lasmaili, K.E., and Faivre, B. (2018). Antiangiogenic therapy: Markers of response, "normalization" and resistance. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *128*, 118–129.

Albanese, J., and Dainiak, N. (2003). Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane–derived vesicles by ionizing radiation. Exp. Hematol. *31*, 455–464.

Aliru, M.L., Schoenhals, J.E., Venkatesulu, B.P., Anderson, C.C., Barsoumian, H.B., Younes, A.I., K Mahadevan, L.S., Soeung, M., Aziz, K.E., Welsh, J.W., et al. (2018). Radiation therapy and immunotherapy: what is the optimal timing or sequencing? Immunotherapy *10*, 299–316.

Ameziane-El-Hassani, R., Talbot, M., de Souza Dos Santos, M.C., Al Ghuzlan, A., Hartl, D., Bidart, J.-M., De Deken, X., Miot, F., Diallo, I., de Vathaire, F., et al. (2015). NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 5051–5056.

Anniko, M., Thornell, L.E., Hultcrantz, M., Virtanen, I., Ramaekers, F.C., and Stigbrand, T. (1989). Prenatal low-dose gamma irradiation of the inner ear induces changes in the expression of intermediate filaments. Acta Otolaryngol. (Stockh.) *108*, 206–216.

Azimzadeh, O., Sievert, W., Sarioglu, H., Merl-Pham, J., Yentrapalli, R., Bakshi, M.V., Janik, D., Ueffing, M., Atkinson, M.J., Multhoff, G., et al. (2015). Integrative proteomics and targeted transcriptomics analyses in cardiac endothelial cells unravel mechanisms of longterm radiation-induced vascular dysfunction. J. Proteome Res. *14*, 1203–1219. Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., and Pain, D. (2012). Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. *327*, 48–60.

Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. Annu. Rev. Immunol. 15, 675–705.

Bakhoum, S.F., Ngo, B., Laughney, A.M., Cavallo, J.-A., Murphy, C.J., Ly, P., Shah, P., Sriram, R.K., Watkins, T.B.K., Taunk, N.K., et al. (2018). Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. Nature *553*, 467–472.

Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 444, 756–760.

Bar, E.E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., and Eberhart, C.G. (2010). Hypoxia Increases the Expression of Stem-Cell Markers and Promotes Clonogenicity in Glioblastoma Neurospheres. Am. J. Pathol. *177*, 1491–1502.

Barjaktarovic, Z., Schmaltz, D., Shyla, A., Azimzadeh, O., Schulz, S., Haagen, J., Dörr, W., Sarioglu, H., Schäfer, A., Atkinson, M.J., et al. (2011). Radiation-induced signaling results in mitochondrial impairment in mouse heart at 4 weeks after exposure to X-rays. PloS One *6*, e27811.

Barker, H.E., Paget, J.T.E., Khan, A.A., and Harrington, K.J. (2015). The Tumour Microenvironment after Radiotherapy: Mechanisms of Resistance and Recurrence. Nat. Rev. Cancer *15*, 409.

Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *5*, 792–804.

BelAiba, R.S., Djordjevic, T., Bonello, S., Flügel, D., Hess, J., Kietzmann, T., and Görlach, A. (2004). Redox-sensitive regulation of the HIF pathway under non-hypoxic conditions in pulmonary artery smooth muscle cells. Biol. Chem. *385*, 249–257.

Benderitter, M., Vincent-Genod, L., Berroud, A., Muller, S., Donner, M., and Voisin, P. (1999). Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure? Int. J. Radiat. Biol. *75*, 1043–1053.

Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R., and Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. Science *282*, 290–293.

Berghoff, A.S., Kiesel, B., Widhalm, G., Rajky, O., Ricken, G., Wöhrer, A., Dieckmann, K., Filipits, M., Brandstetter, A., Weller, M., et al. (2015). Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma. Neuro-Oncol. *17*, 1064–1075.

Bessho, T. (2003). Induction of DNA Replication-mediated Double Strand Breaks by Psoralen DNA Interstrand Cross-links. J. Biol. Chem. 278, 5250–5254.

Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. Mol. Cell *66*, 801–817.

Blitzer, P.H. (1985). Reanalysis of the RTOG study of the palliation of symptomatic osseous metastasis. Cancer *55*, 1468–1472.

Bonnaud, S., Niaudet, C., Pottier, G., Gaugler, M.-H., Millour, J., Barbet, J., Sabatier, L., and Paris, F. (2007). Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. Cancer Res. *67*, 1803–1811.

Bonnaud, S., Niaudet, C., Legoux, F., Corre, I., Delpon, G., Saulquin, X., Fuks, Z., Gaugler, M.-H., Kolesnick, R., and Paris, F. (2010). Sphingosine-1-Phosphate Activates the AKT Pathway to Protect Small Intestines from Radiation-Induced Endothelial Apoptosis. Cancer Res. *70*, 9905–9915.

Bonner, J.A., Trummell, H.Q., Willey, C.D., Plants, B.A., and Raisch, K.P. (2009). Inhibition of STAT-3 Results in Radiosensitization of Human Squamous Cell Carcinoma. Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol. *92*, 339.

Borasio, G.D. (2011). Translating the World Health Organization definition of palliative care into scientific practice. Palliat. Support. Care 9, 1–2.

Borodkina, A., Shatrova, A., Abushik, P., Nikolsky, N., and Burova, E. (2014). Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. Aging *6*, 481–495.

Borovski, T., Beke, P., van Tellingen, O., Rodermond, H.M., Verhoeff, J.J., Lascano, V., Daalhuisen, J.B., Medema, J.P., and Sprick, M.R. (2013). Therapy-resistant tumor microvascular endothelial cells contribute to treatment failure in glioblastoma multiforme. Oncogene *32*, 1539–1548.

Bosman, F.T., and Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. J. Pathol. *200*, 423–428.

Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonnhammer, E.L. (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. Trends Biochem. Sci. 25, 225–227.

Bradshaw, A., Wickremesekera, A., Brasch, H.D., Chibnall, A.M., Davis, P.F., Tan, S.T., and Itinteang, T. (2016). Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme. Front. Surg. *3*.

Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. Nat. Rev. Cancer 9, 701–713.

Brown, K.A., Didion, S.P., Andresen, J.J., and Faraci, F.M. (2007). Effect of aging, MnSOD deficiency, and genetic background on endothelial function: evidence for MnSOD haploinsufficiency. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27, 1941–1946.

Burrell, K., Hill, R.P., and Zadeh, G. (2012). High-Resolution In-Vivo Analysis of Normal Brain Response to Cranial Irradiation. PLoS ONE *7*.

Butowski, N., Colman, H., De Groot, J.F., Omuro, A.M., Nayak, L., Wen, P.Y., Cloughesy, T.F., Marimuthu, A., Haidar, S., Perry, A., et al. (2016). Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. Neuro-Oncol. *18*, 557– 564.

Byrd, P.J., Srinivasan, V., Last, J.I., Smith, A., Biggs, P., Carney, E.F., Exley, A., Abson, C., Stewart, G.S., Izatt, L., et al. (2012). Severe reaction to radiotherapy for breast cancer as the presenting feature of ataxia telangiectasia. Br. J. Cancer *106*, 262–268.

Calderwood, D.A. (2004). Integrin activation. J. Cell Sci. 117, 657-666.

Cammarano, P., Pons, S., Chinali, G., and Gaetani, S. (1969). Effect of x-irradiation on polyribosome organization and RNA labeling in the liver of normal and adrenalectomized rats. Radiat. Res. *39*, 289–304.

Campisi, J. (2005). Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. Cell *120*, 513–522.

Cantelmo, A.R., Conradi, L.-C., Brajic, A., Goveia, J., Kalucka, J., Pircher, A., Chaturvedi, P., Hol, J., Thienpont, B., Teuwen, L.-A., et al. (2016). Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. Cancer Cell *30*, 968–985.

Carruthers, R., Ahmed, S.U., Strathdee, K., Gomez-Roman, N., Amoah-Buahin, E., Watts, C., and Chalmers, A.J. (2015). Abrogation of radioresistance in glioblastoma stem-like cells by inhibition of ATM kinase. Mol. Oncol. *9*, 192–203.

Castedo, M., Coquelle, A., Vivet, S., Vitale, I., Kauffmann, A., Dessen, P., Pequignot, M.O., Casares, N., Valent, A., Mouhamad, S., et al. (2006). Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. EMBO J. *25*, 2584–2595.

Cesarini, V., Martini, M., Vitiani, L.R., Gravina, G.L., Agostino, S.D., Graziani, G., D'Alessandris, Q.G., Pallini, R., Larocca, L.M., Rossi, P., et al. (2017). Type 5 phosphodiesterase regulates glioblastoma multiforme aggressiveness and clinical outcome. Oncotarget *8*, 13223.

Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. Cell *125*, 1241–1252.

Chan, D.W., Chen, B.P.-C., Prithivirajsingh, S., Kurimasa, A., Story, M.D., Qin, J., and Chen, D.J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. Genes Dev. *16*, 2333–2338.

Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., et al. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. Nat. Med. *22*, 78–83.

Chang, L., Graham, P.H., Hao, J., Ni, J., Bucci, J., Cozzi, P.J., Kearsley, J.H., and Li, Y. (2013). Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in prostate cancer radioresistance. Cell Death Dis. *4*, e875.

Chautard, E., Loubeau, G., Tchirkov, A., Chassagne, J., Vermot-Desroches, C., Morel, L., and Verrelle, P. (2010). Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma. Neuro-Oncol. *12*, 434–443.

Chen, Z., and Hambardzumyan, D. (2018). Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. Front. Immunol. 9.

Chen, B.P.C., Chan, D.W., Kobayashi, J., Burma, S., Asaithamby, A., Morotomi-Yano, K., Botvinick, E., Qin, J., and Chen, D.J. (2005). Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. J. Biol. Chem. *280*, 14709–14715.

Chen, H., Guo, R., Zhang, Q., Guo, H., Yang, M., Wu, Z., Gao, S., Liu, L., and Chen, L. (2015). Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, E5936-5943.

Chen, J., Huang, X., Halicka, D., Brodsky, S., Avram, A., Eskander, J., Bloomgarden, N.A., Darzynkiewicz, Z., and Goligorsky, M.S. (2006). Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *290*, H1575-1586.

Chiarugi, V., Magnelli, L., and Cinelli, M. (1998). Role of p53 mutations in the radiosensitivity status of tumor cells. Tumori *84*, 517–520.

Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., et al. (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. N. Engl. J. Med. *370*, 709–722.

Choksi, K.B., Nuss, J.E., Boylston, W.H., Rabek, J.P., and Papaconstantinou, J. (2007). Age-related increases in oxidatively damaged proteins of mouse kidney mitochondrial electron transport chain complexes. Free Radic. Biol. Med. *43*, 1423–1438.

Chow, E., Harris, K., Fan, G., Tsao, M., and Sze, W.M. (2007). Palliative radiotherapy

trials for bone metastases: a systematic review. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 25, 1423–1436.

Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., et al. (1998). Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. Blood *91*, 3527–3561.

Claesson-Welsh, L. (2015). Vascular permeability—the essentials. Ups. J. Med. Sci. 120, 135.

Clavreul, A., Etcheverry, A., Chassevent, A., Quillien, V., Avril, T., Jourdan, M.-L., Michalak, S., François, P., Carré, J.-L., Mosser, J., et al. (2012). Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. J. Neurooncol. *106*, 493–504.

Clavreul, A., Guette, C., Faguer, R., Tétaud, C., Boissard, A., Lemaire, L., Rousseau, A., Avril, T., Henry, C., Coqueret, O., et al. (2014). Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. J. Pathol. *233*, 74–88.

Cohen-Jonathan Moyal, E. (2012). [From bench to bedside: experience of the glioblastoma model for the optimization of radiosensitization]. Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol. *16*, 25–28.

Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. Nat. Rev. Cancer *10*, 51–57.

Collinson, E., Dainton, F.S., and Kroh, J. (1960). Effects of linear energy transfer on the radiolysis of water and heavy water. Nature *187*, 475–477.

Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C.M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. J. Biol. Chem. *281*, 29568–29574.

Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. PLoS Biol. *6*, 2853–2868.

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annu. Rev. Pathol. *5*, 99–118.

Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C.K., Freund, A., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2011). Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. J. Biol. Chem. *286*, 36396–36403.

Cordes, N., Hansmeier, B., Beinke, C., Meineke, V., and Beuningen, D. van (2003). Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. Br. J. Cancer 89, 2122.

Corre, I., Guillonneau, M., and Paris, F. (2013). Membrane Signaling Induced by High Doses of Ionizing Radiation in the Endothelial Compartment. Relevance in Radiation Toxicity. Int. J. Mol. Sci. *14*, 22678–22696.

Correia-Melo, C., Marques, F.D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B.M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., et al. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. EMBO J.

D'Abaco, G.M., and Kaye, A.H. (2007). Integrins: molecular determinants of glioma invasion. J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas. *14*, 1041–1048.

Dahan, P., Gala, J.M., Delmas, C., Monferran, S., Malric, L., Zentkowski, D., Lubrano, V., Toulas, C., Moyal, E.C.-J., and Lemarie, A. (2014). Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance. Cell Death Dis. *5*, e1543.

Dahlbäck, B. (2017). Novel insights into the regulation of coagulation by factor V isoforms, tissue factor pathway inhibitorα, and protein S. J. Thromb. Haemost. JTH *15*, 1241–1250.

Datta, K., Suman, S., Fornace, A.J., and Jr (2014). Radiation persistently promoted oxidative stress, activated mTOR via PI3K/Akt, and downregulated autophagy pathway in mouse intestine. Int. J. Biochem. Cell Biol. *57*, 167.

Davalos, A.R., Coppe, J.-P., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. Cancer Metastasis Rev. 29, 273–283.

Davies, M.J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. Biochem. J. 473, 805-825.

Dayal, D., Martin, S.M., Owens, K.M., Aykin-Burns, N., Zhu, Y., Boominathan, A., Pain, D., Limoli, C.L., Goswami, P.C., Domann, F.E., et al. (2009). Mitochondrial complex II dysfunction can contribute significantly to genomic instability after exposure to ionizing radiation. Radiat. Res. *172*, 737–745.

De Falco, E., Carnevale, R., Pagano, F., Chimenti, I., Fianchini, L., Bordin, A., Siciliano, C., Monticolo, R., Equitani, F., Carrizzo, A., et al. (2016). Role of NOX2 in mediating doxorubicin-induced senescence in human endothelial progenitor cells. Mech. Ageing Dev. *159*, 37–43.

De Palma, M., and Lewis, C.E. (2013). Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. Cancer Cell *23*, 277–286.

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

Delanian, S., and Lefaix, J.-L. (2004). The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol. *73*, 119–131.

Delmas, C., Heliez, C., Cohen-Jonathan, E., End, D., Bonnet, J., Favre, G., and Toulas, C. (2002). Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. Int. J. Cancer *100*, 43–48.

Delmas, C., End, D., Rochaix, P., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan, E. (2003). The farnesyltransferase inhibitor R115777 reduces hypoxia and matrix metalloproteinase 2 expression in human glioma xenograft. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *9*, 6062–6068.

Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., et al. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. Dev. Cell *31*, 722–733.

Deschênes-Simard, X., Kottakis, F., Meloche, S., and Ferbeyre, G. (2014). ERKs in cancer: friends or foes? Cancer Res. 74, 412–419.

Desgrosellier, J.S., and Cheresh, D.A. (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. Nat. Rev. Cancer *10*, 9–22.

Dewhirst, M.W., Cao, Y., and Moeller, B. (2008). Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. Nat. Rev. Cancer *8*, 425–437.

Di Mitri, D., and Alimonti, A. (2016). Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. Trends Cell Biol. *26*, 215–226.

Dong, X., Tong, F., Qian, C., Zhang, R., Dong, J., Wu, G., and Hu, Y. (2014). NEMO Modulates Radiation-Induced Endothelial Senescence of Human Umbilical Veins Through NF-κB Signal Pathway. Radiat. Res.

Dovedi, S.J., Adlard, A.L., Lipowska-Bhalla, G., McKenna, C., Jones, S., Cheadle, E.J., Stratford, I.J., Poon, E., Morrow, M., Stewart, R., et al. (2014). Acquired Resistance to Fractionated Radiotherapy Can Be Overcome by Concurrent PD-L1 Blockade. Cancer Res. 74, 5458–5468.

Ducassou, A., Uro-Coste, E., Verrelle, P., Filleron, T., Benouaich-Amiel, A., Lubrano, V., Sol, J.-C., Delisle, M.-B., Favre, G., Ken, S., et al. (2013). ανβ3 Integrin and Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): Prognostic factors in a phase I-II clinical trial associating continuous administration of Tipifarnib with radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 *49*, 2161–2169.

Dungey, F.A., Löser, D.A., and Chalmers, A.J. (2008). Replication-dependent radiosensitization of human glioma cells by inhibition of poly(ADP-Ribose) polymerase:

mechanisms and therapeutic potential. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 72, 1188-1197.

Dvorak, A.M., and Feng, D. (2001). The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. 49, 419–432.

Dwyer, J., Hebda, J.K., Guelte, A.L., Galan-Moya, E.-M., Smith, S.S., Azzi, S., Bidere, N., and Gavard, J. (2012). Glioblastoma Cell-Secreted Interleukin-8 Induces Brain Endothelial Cell Permeability via CXCR2. PLOS ONE *7*, e45562.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu. Rev. Biochem. *68*, 383–424.

Ebrahimian, T.G., Pouzoulet, F., Squiban, C., Buard, V., André, M., Cousin, B., Gourmelon, P., Benderitter, M., Casteilla, L., and Tamarat, R. (2009). Cell Therapy Based on Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Promotes Physiological and Pathological Wound Healing. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *29*, 503–510.

Eren, M., Boe, A.E., Klyachko, E.A., and Vaughan, D.E. (2014). Role of plasminogen activator inhibitor-1 in senescence and aging. Semin. Thromb. Hemost. *40*, 645–651.

Eriksson, D., Löfroth, P.-O., Johansson, L., Riklund, K., and Stigbrand, T. (2009). Apoptotic signalling in HeLa Hep2 cells following 5 Gy of cobalt-60 gamma radiation. Anticancer Res. *29*, 4361–4366.

Evagelia C.Laiakis (2008). Interleukin 8 exhibits a pro-mitogenic and pro-survival role in radiation induced genomically unstable cells. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. *640*, 74–81.

Evans, H.J., Neary, G.J., and Williamson, F.S. (1959). The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on Vicia faba roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosone damage: the production of micronuclei. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. *1*, 216–229.

Eves, E.M., and Rosner, M.R. (2010). MAP kinase regulation of the mitotic spindle checkpoint. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *661*, 497–505.

d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. Nat. Rev. Cancer *8*, 512–522.

Fajardo, L.F. (2005). The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. Acta Oncol. *44*, 13–22.

Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. Nature *434*, 605–611.

Fedrigo, C.A., Grivicich, I., Schunemann, D.P., Chemale, I.M., dos Santos, D., Jacovas, T.,

Boschetti, P.S., Jotz, G.P., Braga Filho, A., and da Rocha, A.B. (2011). Radioresistance of human glioma spheroids and expression of HSP70, p53 and EGFr. Radiat. Oncol. Lond. Engl. *6*, 156.

Fei, P., Bernhard, E.J., and El-Deiry, W.S. (2002). Tissue-specific Induction of p53 Targets in Vivo. Cancer Res. *62*, 7316–7327.

Forastiere, A.A., Goepfert, H., Maor, M., Pajak, T.F., Weber, R., Morrison, W., Glisson, B., Trotti, A., Ridge, J.A., Chao, C., et al. (2003). Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. N. Engl. J. Med. *349*, 2091–2098.

Freund, A., Patil, C.K., and Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. EMBO J. *30*, 1536–1548.

Frey, R.S., Ushio-Fukai, M., and Malik, A.B. (2009). NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. Antioxid. Redox Signal. *11*, 791–810.

Friedman, M., Ryan, U.S., Davenport, W.C., Chaney, E.L., Strickland, D.L., and Kwock, L. (1986). Reversible alterations in cultured pulmonary artery endothelial cell monolayer morphology and albumin permeability induced by ionizing radiation. J. Cell. Physiol. *129*, 237–249.

Fuks, Z., Persaud, R.S., Alfieri, A., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Schwartz, J.L., Seddon, A.P., Cordon-Cardo, C., and Haimovitz-Friedman, A. (1994). Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo. Cancer Res. *54*, 2582–2590.

Gajdusek, C., Onoda, K., London, S., Johnson, M., Morrison, R., and Mayberg, M. (2001). Early molecular changes in irradiated aortic endothelium. J. Cell. Physiol. *188*, 8–23.

Galley, H.F., and Webster, N.R. (2004). Physiology of the endothelium. Br. J. Anaesth. 93, 105–113.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. *25*, 486–541.

Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. Science *300*, 1155–1159.

Gary, R.K., and Kindell, S.M. (2005). Quantitative assay of senescence-associated beta-

galactosidase activity in mammalian cell extracts. Anal. Biochem. 343, 329-334.

Gasperin, P., Gozy, M., Pauwels, O., Frühling, J., Van Houtte, P., Pasteels, J.L., and Kiss, R. (1992). Monitoring of radiotherapy-induced morphonuclear modifications in the MXT mouse mammary carcinoma by means of digital cell image analysis. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. *22*, 979–987.

Gaugler, M.H., Squiban, C., van der Meeren, A., Bertho, J.M., Vandamme, M., and Mouthon, M.A. (1997). Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. Int. J. Radiat. Biol. *72*, 201–209.

Gaugler, M.-H., Vereycken-Holler, V., Squiban, C., and Aigueperse, J. (2004). PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation. J. Thromb. Haemost. JTH *2*, 2020–2026.

Gebhardt, B.J., Dobelbower, M.C., Ennis, W.H., Bag, A.K., Markert, J.M., and Fiveash, J.B. (2014). Patterns of failure for glioblastoma multiforme following limited-margin radiation and concurrent temozolomide. Radiat. Oncol. Lond. Engl. *9*, 130.

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., et al. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N. Engl. J. Med. *366*, 883–892.

Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., et al. (2014). A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. N. Engl. J. Med. *370*, 699.

Gioscia-Ryan, R.A., LaRocca, T.J., Sindler, A.L., Zigler, M.C., Murphy, M.P., and Seals, D.R. (2014). Mitochondria-targeted antioxidant (MitoQ) ameliorates age-related arterial endothelial dysfunction in mice. J. Physiol. *592*, 2549–2561.

Goldar, S., Khaniani, M.S., Derakhshan, S.M., and Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP *16*, 2129–2144.

Golding, S.E., Morgan, R.N., Adams, B.R., Hawkins, A.J., Povirk, L.F., and Valerie, K. (2009). Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells. Cancer Biol. Ther. *8*, 730–738.

Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.-V.F., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Kastrinakis, N.G., Levy, B., et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature *434*, 907–913.

Gulbins, E., and Kolesnick, R. (2002). Acid sphingomyelinase-derived ceramide signaling in

apoptosis. Subcell. Biochem. 36, 229-244.

Guliaeva, N.A., Abdullaev, S.A., Malakhova, L.V., Antipova, V.N., Bezlepkin, V.G., and Gaziev, A.I. (2009). [Reduction of the number of mutant copies of mitochondrial DNA in tissues of irradiated mice in the postradiation period]. Genetika *45*, 949–956.

Habiel, D.M., Krepostman, N., Lilly, M., Cavassani, K., Coelho, A.L., Shibata, T., Elenitoba-Johnson, K., and Hogaboam, C.M. (2016). Senescent stromal cell-induced divergence and therapeutic resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. Oncotarget 7, 83514.

Haimovitz-Friedman, A., Vlodavsky, I., Chaudhuri, A., Witte, L., and Fuks, Z. (1991). Autocrine effects of fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells. Cancer Res. *51*, 2552–2558.

Haimovitz-Friedman, A., Kan, C.C., Ehleiter, D., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Fuks, Z., and Kolesnick, R.N. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. J. Exp. Med. *180*, 525–535.

Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Bayoumy, S., Garzotto, M., McLoughlin, M., Gallily, R., Edwards, C.K., Schuchman, E.H., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (1997). Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. J. Exp. Med. *186*, 1831–1841.

Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. Trends Biochem. Sci. *35*, 505–513.

Hamberg, H., Brunk, U., Ericsson, J.L., and Jung, B. (1977). Cytoplasmic effects of Xirradiation on cultured cells 2. Alterations in lysosomes, plasma membrane, Golgi apparatus, and related structures. Acta Pathol. Microbiol. Scand. [A] *85*, 625–639.

Han, S., Ma, E., Wang, X., Yu, C., Dong, T., Zhan, W., Wei, X., Liang, G., and Feng, S. (2016). Rescuing defective tumor-infiltrating T-cell proliferation in glioblastoma patients. Oncol. Lett. *12*, 2924–2929.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.

Harding, S.M., Benci, J.L., Irianto, J., Discher, D.E., Minn, A.J., and Greenberg, R.A. (2017). Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. Nature *548*, 466.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol. *11*, 298–300.

Härtlova, A., Erttmann, S.F., Raffi, F.A., Schmalz, A.M., Resch, U., Anugula, S., Lienenklaus, S., Nilsson, L.M., Kröger, A., Nilsson, J.A., et al. (2015). DNA damage primes

the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. Immunity *42*, 332–343.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. *25*, 585–621.

Heckmann, M., Douwes, K., Peter, R., and Degitz, K. (1998). Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation. Exp. Cell Res. *238*, 148–154.

Heddleston, J.M., Li, Z., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2009). The Hypoxic Microenvironment Maintains Glioblastoma Stem Cells and Promotes Reprogramming towards a Cancer Stem Cell Phenotype. Cell Cycle Georget. Tex *8*, 3274–3284.

Hein, A.L., Ouellette, M.M., and Yan, Y. (2014). Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (review). Int. J. Oncol. *45*, 1813–1819.

Heissig, B., Rafii, S., Akiyama, H., Ohki, Y., Sato, Y., Rafael, T., Zhu, Z., Hicklin, D.J., Okumura, K., Ogawa, H., et al. (2005). Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. J. Exp. Med. *202*, 739–750.

Heo, J.-I., Kim, W., Choi, K.J., Bae, S., Jeong, J.-H., and Kim, K.S. (2016). XIAPassociating factor 1, a transcriptional target of BRD7, contributes to endothelial cell senescence. Oncotarget 7, 5118.

Hida, K., Ohga, N., Akiyama, K., Maishi, N., and Hida, Y. (2013). Heterogeneity of tumor endothelial cells. Cancer Sci. *104*.

Hoeijmakers, J.H. (2001). DNA repair mechanisms. Maturitas 38, 17-22-23.

Hosoya, N., and Miyagawa, K. (2014). Targeting DNA damage response in cancer therapy. Cancer Sci. *105*, 370.

Høyer, M., Thor, M., Thörnqvist, S., Søndergaard, J., Lassen-Ramshad, Y., and Muren, L.P. (2011). Advances in radiotherapy: from 2D to 4D. Cancer Imaging *11*, S147.

Hsieh, C.-H., Lee, C.-H., Liang, J.-A., Yu, C.-Y., and Shyu, W.-C. (2010). Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity. Oncol. Rep. *24*, 1629–1636.

Hu, F., a Dzaye, O.D., Hahn, A., Yu, Y., Scavetta, R.J., Dittmar, G., Kaczmarek, A.K., Dunning, K.R., Ricciardelli, C., Rinnenthal, J.L., et al. (2015). Glioma-derived versican promotes tumor expansion via glioma-associated microglial/macrophages Toll-like receptor 2 signaling. Neuro-Oncol. *17*, 200–210.

Hundsberger, T., Reardon, D.A., and Wen, P.Y. (2017). Angiogenesis inhibitors in tackling

recurrent glioblastoma. Expert Rev. Anticancer Ther. 17, 507-515.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell *110*, 673–687.

Igarashi, K., Sakimoto, I., Kataoka, K., Ohta, K., and Miura, M. (2007). Radiation-induced senescence-like phenotype in proliferating and plateau-phase vascular endothelial cells. Exp. Cell Res. *313*, 3326–3336.

Iyama, T., and Wilson, D.M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. DNA Repair *12*, 620–636.

Jackson, A.L., and Loeb, L.A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. Mutat. Res. 477, 7–21.

Jain, R.K. (2005). Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. Science *307*, 58–62.

Jamal, M., Rath, B.H., Williams, E.S., Camphausen, K., and Tofilon, P.J. (2010). Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *16*, 6049–6059.

Jette, N., and Lees-Miller, S.P. (2015). The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. Prog. Biophys. Mol. Biol. *117*, 194–205.

Jin, X., Kim, L.J.Y., Wu, Q., Wallace, L.C., Prager, B.C., Sanvoranart, T., Gimple, R.C., Wang, X., Mack, S.C., Miller, T.E., et al. (2017). Targeting glioma stem cells through combined BMI1 and EZH2 inhibition. Nat. Med. *23*, 1352–1361.

Jin, Z., Aixi, Y., Baiwen, Q., Zonghuan, L., and Xiang, H. (2015). Inhibition of hypoxiainducible factor-1 alpha radiosensitized MG-63 human osteosarcoma cells in vitro. Tumori *101*, 578–584.

Jordan, S.W. (1967). Ultrastructural studies of spleen after whole body irradiation of mice. Exp. Mol. Pathol. *6*, 156–171.

Jorquera, R., and Tanguay, R.M. (2001). Fumarylacetoacetate, the metabolite accumulating in hereditary tyrosinemia, activates the ERK pathway and induces mitotic abnormalities and genomic instability. Hum. Mol. Genet. *10*, 1741–1752.

Kabil, A., Silva, E., and Kortenkamp, A. (2008). Estrogens and genomic instability in human breast cancer cells--involvement of Src/Raf/Erk signaling in micronucleus formation by estrogenic chemicals. Carcinogenesis *29*, 1862–1868.

Kamochi, N., Nakashima, M., Aoki, S., Uchihashi, K., Sugihara, H., Toda, S., and Kudo, S. (2008). Irradiated fibroblast-induced bystander effects on invasive growth of squamous cell

carcinoma under cancer-stromal cell interaction. Cancer Sci. 99, 2417-2427.

Kanaar, R., Hoeijmakers, J.H., and van Gent, D.C. (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. Trends Cell Biol. *8*, 483–489.

Kase, M., Vardja, M., Lipping, A., Asser, T., and Jaal, J. (2011). Impact of PARP-1 and DNA-PK expression on survival in patients with glioblastoma multiforme. Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol. *101*, 127–131.

Kaur, B., Khwaja, F.W., Severson, E.A., Matheny, S.L., Brat, D.J., and Van Meir, E.G. (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. Neuro-Oncol. *7*, 134–153.

Kergonou, J.F., Braquet, M., and Rocquet, G. (1981). Influence of whole-body gamma irradiation upon rat liver mitochondrial fractions. Radiat. Res. *88*, 377–384.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. Br. J. Cancer *26*, 239.

Kessler, J., Hahnel, A., Wichmann, H., Rot, S., Kappler, M., Bache, M., and Vordermark, D. (2010). HIF-1 α inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression. BMC Cancer *10*, 605.

Kim, K.S., Kim, J.E., Choi, K.J., Bae, S., and Kim, D.H. (2014). Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells. Int. J. Radiat. Biol. *90*, 71–80.

Kim, Y., Kim, K.H., Lee, J., Lee, Y.-A., Kim, M., Lee, S.J., Park, K., Yang, H., Jin, J., Joo, K.M., et al. (2012). Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *92*, 466–473.

Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., and Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. Toxicol. Appl. Pharmacol. *254*, 86–99.

van Kleef, E., Verheij, M., te Poele, H., Oussoren, Y., Dewit, L., and Stewart, F. (2000). In vitro and in vivo expression of endothelial von Willebrand factor and leukocyte accumulation after fractionated irradiation. Radiat. Res. *154*, 375–381.

Kobashigawa, S., Suzuki, K., and Yamashita, S. (2011). Ionizing radiation accelerates Drp1dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 414, 795–800.

Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. Oncogene 22, 5897–5906.

Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J., and Takeya, M. (2008). Possible involvement of the

M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. J. Pathol. *216*, 15–24.

Kozin, S.V., Kamoun, W.S., Huang, Y., Dawson, M.R., Jain, R.K., and Duda, D.G. (2010). Recruitment of myeloid but not endothelial precursor cells facilitates tumor regrowth after local irradiation. Cancer Res. *70*, 5679–5685.

Krokan, H.E., and Bjørås, M. (2013). Base excision repair. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*, a012583.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2001a). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 12072–12077.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2001b). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 12072–12077.

Kuger, S., Graus, D., Brendtke, R., Günther, N., Katzer, A., Lutyj, P., Polat, B., Chatterjee, M., Sukhorukov, V.L., Flentje, M., et al. (2013). Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. Transl. Oncol. *6*, 169.

Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. Nat. Rev. Cancer 9, 81–94.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. Cell *133*, 1019–1031.

Kumar, S., Millis, A.J., and Baglioni, C. (1992). Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 4683–4687.

Kumazaki, T. (1992). Cellular aging and expression of fibronectin. Hiroshima J. Med. Sci. *41*, 101–104.

Kumazaki, T., Robetorye, R.S., Robetorye, S.C., and Smith, J.R. (1991). Fibronectin expression increases during in vitro cellular senescence: correlation with increased cell area. Exp. Cell Res. *195*, 13–19.

Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., Trivier, E., Akhmedov, A., and Erusalimsky, J.D. (2004). Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. J. Cell Sci. *117*, 2417–2426.

Kuzminov, A. (2001). Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause doublestrand breaks. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 8241–8246. Laberge, R.-M., Awad, P., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc. *5*, 39–44.

Lafargue, A., Degorre, C., Corre, I., Alves-Guerra, M.-C., Gaugler, M.-H., Vallette, F., Pecqueur, C., and Paris, F. (2017a). Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. Free Radic. Biol. Med. *108*, 750–759.

Lafargue, A., Degorre, C., Corre, I., Alves-Guerra, M.-C., Gaugler, M.-H., Vallette, F., Pecqueur, C., and Paris, F. (2017b). Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. Free Radic. Biol. Med. *108*, 750–759.

Lagadic-Gossmann, D., Huc, L., and Lecureur, V. (2004). Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. Cell Death Differ. *11*, 953–961.

Laine, A., Iyengar, P., and Pandita, T.K. (2013). The Role of Inflammatory Pathways in Cancer-Associated Cachexia and Radiation Resistance. Mol. Cancer Res. MCR *11*, 967.

Lamszus, K., Kunkel, P., and Westphal, M. (2003). Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. Acta Neurochir. Suppl. *88*, 169–177.

Laprie, A., Catalaa, I., Cassol, E., McKnight, T.R., Berchery, D., Marre, D., Bachaud, J.-M., Berry, I., and Moyal, E.C.-J. (2008). Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in newly diagnosed glioblastoma: predictive value for the site of postradiotherapy relapse in a prospective longitudinal study. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 70, 773–781.

Larson, S.M., Carrasquillo, J.A., Cheung, N.-K.V., and Press, O. (2015). Radioimmunotherapy of human tumours. Nat. Rev. Cancer *15*, 347.

Lee, J.M., and Bernstein, A. (1993). p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 5742–5746.

Lee, C.-L., Moding, E.J., Cuneo, K.C., Li, Y., Sullivan, J.M., Mao, L., Washington, I., Jeffords, L.B., Rodrigues, R.C., Ma, Y., et al. (2012). p53 Functions in Endothelial Cells to Prevent Radiation-Induced Myocardial Injury in Mice. Sci. Signal. *5*, ra52.

Lee, H., Rotolo, J.A., Mesicek, J., Penate-Medina, T., Rimner, A., Liao, W.-C., Yin, X., Ragupathi, G., Ehleiter, D., Gulbins, E., et al. (2011). Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. PloS One *6*, e19783.

Lesueur, P., Chevalier, F., El-Habr, E.A., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., Castera, L., Müller, E., Stefan, D., and Saintigny, Y. (2018). Radiosensitization Effect of Talazoparib, a Parp Inhibitor, on Glioblastoma Stem Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. Sci. Rep. *8*, 3664. Li, A., King, J., Moro, A., Sugi, M.D., Dawson, D.W., Kaplan, J., Li, G., Lu, X., Strieter, R.M., Burdick, M., et al. (2011a). Overexpression of CXCL5 Is Associated With Poor Survival in Patients With Pancreatic Cancer. Am. J. Pathol. *178*, 1340–1349.

Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z.N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M.W., and Li, C.-Y. (2007). Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. Mol. Cell *26*, 63–74.

Li, H., Wang, Y., Pazhanisamy, S.K., Shao, L., Batinic-Haberle, I., Meng, A., and Zhou, D. (2011b). Mn(III) meso-tetrakis-(N-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin mitigates total body irradiation-induced long-term bone marrow suppression. Free Radic. Biol. Med. *51*, 30–37.

Li, H.-F., Kim, J.-S., and Waldman, T. (2009a). Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. Radiat. Oncol. *4*, 43.

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al. (2009b). Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. Cancer Cell *15*, 501–513.

Liao, K.-L., Huang, S., and Wu, Y.-P. (2018). The prognosis for patients with newly diagnosed glioblastoma receiving bevacizumab combination therapy: a meta-analysis. OncoTargets Ther. *11*, 3513–3520.

Lin, C.C., Fedewa, S.A., Prickett, K.K., Higgins, K.A., and Chen, A.Y. (2016). Comparative effectiveness of surgical and nonsurgical therapy for advanced laryngeal cancer. Cancer *122*, 2845–2856.

Lin, X., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2000). Ceramide mediates radiation-induced death of endothelium. Crit. Care Med. *28*, N87-93.

Liu, D., and Hornsby, P.J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. Cancer Res. *67*, 3117–3126.

Liu, D., Shan, Y., Valluru, L., and Bao, F. (2013). Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin scavenges reactive species, reduces oxidative stress, and improves functional recovery after experimental spinal cord injury in rats: comparison with methylprednisolone. BMC Neurosci. *14*, 23.

Liu, S., Shiotani, B., Lahiri, M., Maréchal, A., Tse, A., Leung, C.C.Y., Glover, J.N.M., Yang, X.H., and Zou, L. (2011). ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation. Mol. Cell *43*, 192–202.

Liu, S.-C., Alomran, R., Chernikova, S.B., Lartey, F., Stafford, J., Jang, T., Merchant, M., Zboralski, D., Zöllner, S., Kruschinski, A., et al. (2014). Blockade of SDF-1 after irradiation inhibits tumor recurrences of autochthonous brain tumors in rats. Neuro-Oncol. *16*, 21–28.

van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J.N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J.M.,

Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J.D., Quaschning, T., Malinski, T., et al. (2000). Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. J. Exp. Med. *192*, 1731–1744.

M. Frame, F., R. Noble, A., Klein, S., F. Walker, hannah, Suman, R., Kasprowicz, R., M. Mann, V., S. Simms, M., and J. Maitland, N. (2017). Tumor heterogeneity and therapy resistance - implications for future treatments of prostate cancer. J. Cancer Metastasis Treat.

Ma, X., Chen, H., and Chen, L. (2016). A dual role of Erk signaling in embryonic stem cells. Exp. Hematol. *44*, 151–156.

Mackenzie, K.J., Carroll, P., Martin, C.-A., Murina, O., Fluteau, A., Simpson, D., Olova, N., Sutcliffe, H., Rainger, J., Robertson, A., et al. (2017). cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. Nature *548*, 461.

Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., and Herskind, C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. Int. J. Mol. Sci. *17*.

Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., and Hendrix, M.J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. Am. J. Pathol. *155*, 739–752.

Marampon, F., Gravina, G.L., Di Rocco, A., Bonfili, P., Di Staso, M., Fardella, C., Polidoro, L., Ciccarelli, C., Festuccia, C., Popov, V.M., et al. (2011). MEK/ERK inhibitor U0126 increases the radiosensitivity of rhabdomyosarcoma cells in vitro and in vivo by downregulating growth and DNA repair signals. Mol. Cancer Ther. *10*, 159–168.

Marampon, F., Gravina, G.L., Zani, B.M., Popov, V.M., Fratticci, A., Cerasani, M., Di Genova, D., Mancini, M., Ciccarelli, C., Ficorella, C., et al. (2014). Hypoxia sustains glioblastoma radioresistance through ERKs/DNA-PKcs/HIF-1α functional interplay. Int. J. Oncol. *44*, 2121–2131.

Marampon, F., Gravina, G.L., Festuccia, C., Popov, V.M., Colapietro, E.A., Sanità, P., Musio, D., De Felice, F., Lenzi, A., Jannini, E.A., et al. (2016). Vitamin D protects endothelial cells from irradiation-induced senescence and apoptosis by modulating MAPK/SirT1 axis. J. Endocrinol. Invest. *39*, 411–422.

Mathias, S., and Kolesnick, R. (1993). Ceramide: a novel second messenger. Adv. Lipid Res. 25, 65–90.

Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. Science *316*, 1160–1166.

McQuibban, G.A., Gong, J.-H., Wong, J.P., Wallace, J.L., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. (2002). Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. Blood *100*, 1160–1167.

McRobb, L.S., McKay, M.J., Gamble, J.R., Grace, M., Moutrie, V., Santos, E.D., Lee, V.S., Zhao, Z., Molloy, M.P., and Stoodley, M.A. (2017). Ionizing radiation reduces ADAM10 expression in brain microvascular endothelial cells undergoing stress-induced senescence. Aging *9*, 1248–1268.

Mendonca, M.S., Chin-Sinex, H., Dhaemers, R., Mead, L.E., Yoder, M.C., and Ingram, D.A. (2011). Differential mechanisms of x-ray-induced cell death in human endothelial progenitor cells isolated from cord blood and adults. Radiat. Res. *176*, 208–216.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature *436*, 720– 724.

Milhas, D., Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2010). Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. FEBS Lett. *584*, 1887–1894.

Milia, J., Teyssier, F., Dalenc, F., Ader, I., Delmas, C., Pradines, A., Lajoie-Mazenc, I., Baron, R., Bonnet, J., Cohen-Jonathan, E., et al. (2005). Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. Cell Death Differ. *12*, 492–501.

Milliat, F., Sabourin, J.-C., Tarlet, G., Holler, V., Deutsch, E., Buard, V., Tamarat, R., Atfi, A., Benderitter, M., and François, A. (2008a). Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. Am. J. Pathol. *172*, 691–701.

Milliat, F., François, A., Tamarat, R., and Benderitter, M. (2008b). [Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]. Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris) 57, 139–148.

Moeller, B.J., Cao, Y., Li, C.Y., and Dewhirst, M.W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. Cancer Cell *5*, 429–441.

Moeller, B.J., Dreher, M.R., Rabbani, Z.N., Schroeder, T., Cao, Y., Li, C.Y., and Dewhirst, M.W. (2005). Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. Cancer Cell *8*, 99–110.

Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. Mol. Cell. Biol. *29*, 4495–4507. Mollà, M., Gironella, M., Miquel, R., Tovar, V., Engel, P., Biete, A., Piqué, J.M., and Panés, J. (2003). Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 57, 264–273.

Mondal, S., Mandal, C., Sangwan, R., Chandra, S., and Mandal, C. (2010). Withanolide D induces apoptosis in leukemia by targeting the activation of neutral sphingomyelinase-ceramide cascade mediated by synergistic activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. Mol. Cancer *9*, 239.

Monferran, S., Skuli, N., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Cohen-Jonathan-Moyal, E., and Toulas, C. (2008). $\alpha\nu\beta3$ and $\alpha\nu\beta5$ integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. Int. J. Cancer *123*, 357–364.

Mouton, R.E., and Venable, M.E. (2000). Ceramide induces expression of the senescence histochemical marker, beta-galactosidase, in human fibroblasts. Mech. Ageing Dev. *113*, 169–181.

Moyal, E.C.-J., Laprie, A., Delannes, M., Poublanc, M., Catalaa, I., Dalenc, F., Berchery, D., Sabatier, J., Bousquet, P., De Porre, P., et al. (2007). Phase I trial of tipifarnib (R115777) concurrent with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme.

Mukherjee, D., Coates, P.J., Lorimore, S.A., and Wright, E.G. (2012). The in vivo expression of radiation-induced chromosomal instability has an inflammatory mechanism. Radiat. Res. *177*, 18–24.

Nagane, M., Kuppusamy, M.L., An, J., Mast, J.M., Gogna, R., Yasui, H., Yamamori, T., Inanami, O., and Kuppusamy, P. (2018). Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) Kinase Regulates eNOS Expression and Modulates Radiosensitivity in Endothelial Cells Exposed to Ionizing Radiation. Radiat. Res. *189*, 519–528.

Narayan, R.S., Fedrigo, C.A., Stalpers, L.J.A., Baumert, B.G., and Sminia, P. (2013). Targeting the Akt-pathway to improve radiosensitivity in glioblastoma. Curr. Pharm. Des. *19*, 951–957.

Narita, M., Nũnez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. Cell *113*, 703–716.

Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 220–228.

Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., and Zglinicki, T. von (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. Aging Cell *11*, 345.

Nelson, G., Kucheryavenko, O., Wordsworth, J., and von Zglinicki, T. (2018). The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- κ B signalling. Mech. Ageing Dev. *170*, 30–36.

Neta, R. (1997). Modulation with cytokines of radiation injury: suggested mechanisms of action. Environ. Health Perspect. *105 Suppl 6*, 1463–1465.

Neuzillet, C., and Hammel, P. (2012). La voie de Ras-MAP kinases : une piste d'avenir pour le traitement de l'adénocarcinome du pancréas ? Hépato-Gastro Oncol. Dig. *19*, 152–161.

Nghiemphu, P.L., Wen, P.Y., Lamborn, K.R., Drappatz, J., Robins, H.I., Fink, K., Malkin, M.G., Lieberman, F.S., DeAngelis, L.M., Torres-Trejo, A., et al. (2011). A phase I trial of tipifarnib with radiation therapy, with and without temozolomide, for patients with newly diagnosed glioblastoma. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. *81*, 1422.

Niaudet, C., Bonnaud, S., Guillonneau, M., Gouard, S., Gaugler, M.-H., Dutoit, S., Ripoche, N., Dubois, N., Trichet, V., Corre, I., et al. (2017). Plasma membrane reorganization links acid sphingomyelinase/ceramide to p38 MAPK pathways in endothelial cells apoptosis. Cell. Signal. *33*, 10–21.

Niemöller, O., and Belka, C. (2009). Targeting death-receptors in radiation therapy. Results Probl. Cell Differ. 49, 219–239.

Nirmala, C., Jasti, S.L., Sawaya, R., Kyritsis, A.P., Konduri, S.D., Ali-Osman, F., Rao, J.S., and Mohanam, S. (2000). Effects of radiation on the levels of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 during morphogenic glial-endothelial cell interactions. Int. J. Cancer *88*, 766–771.

Nübel, T., Dippold, W., Kaina, B., and Fritz, G. (2004). Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. Carcinogenesis *25*, 1335–1344.

Nugent, S.M.E., Mothersill, C.E., Seymour, C., McClean, B., Lyng, F.M., and Murphy, J.E.J. (2007). Increased mitochondrial mass in cells with functionally compromised mitochondria after exposure to both direct gamma radiation and bystander factors. Radiat. Res. *168*, 134–142.

Nussenbaum, F., and Herman, I.M. (2010). Tumor Angiogenesis: Insights and Innovations. J. Oncol. 2010.

Oh, E.-T., Park, M.-T., Song, M.-J., Lee, H., Cho, Y.U., Kim, S.J., Chu, Y.-C., Choi, E.K., and Park, H.J. (2014). Radiation-induced angiogenic signaling pathway in endothelial cells obtained from normal and cancer tissue of human breast. Oncogene *33*, 1229–1238.

Ohuchida, K., Mizumoto, K., Murakami, M., Qian, L.-W., Sato, N., Nagai, E., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Tanaka, M. (2004). Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. Cancer
Res. 64, 3215-3222.

Oike, T., Suzuki, Y., Al-Jahdari, W., Mobaraki, A., Saitoh, J.-I., Torikai, K., Shirai, K., and Nakano, T. (2012). Suppression of HIF-1 α expression and radiation resistance in acute hypoxic conditions. Exp. Ther. Med. *3*, 141–145.

Oizel, K., Chauvin, C., Oliver, L., Gratas, C., Geraldo, F., Jarry, U., Scotet, E., Rabe, M., Alves-Guerra, M.-C., Teusan, R., et al. (2017). Efficient Mitochondrial Glutamine Targeting Prevails Over Glioblastoma Metabolic Plasticity. Clin. Cancer Res. *23*, 6292– 6304.

Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A., and Vernot, J.-P. (2017). Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. Cell Commun. Signal. CCS *15*.

Ostrom, Q.T., Gittleman, H., Stetson, L., Virk, S.M., and Barnholtz-Sloan, J.S. (2015). Epidemiology of Gliomas. Curr. Underst. Treat. Gliomas 1–14.

Özcan, S., Alessio, N., Acar, M.B., Mert, E., Omerli, F., Peluso, G., and Galderisi, U. (2016). Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. Aging *8*, 1316.

Panganiban, R.A.M., and Day, R.M. (2013). Inhibition of IGF-1R prevents ionizing radiation-induced primary endothelial cell senescence. PloS One *8*, e78589.

Panganiban, R.-A.M., Snow, A.L., and Day, R.M. (2013). Mechanisms of Radiation Toxicity in Transformed and Non-Transformed Cells. Int. J. Mol. Sci. 14, 15931.

Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodieci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. Science *293*, 293–297.

Park, H., Kim, C.-H., Jeong, J.-H., Park, M., and Kim, K.S. (2016). GDF15 contributes to radiation-induced senescence through the ROS-mediated p16 pathway in human endothelial cells. Oncotarget *7*, 9634.

Park, J., Jo, Y.H., Cho, C.H., Choe, W., Kang, I., Baik, H.H., and Yoon, K.-S. (2013). ATM-deficient human fibroblast cells are resistant to low levels of DNA double-strand break induced apoptosis and subsequently undergo drug-induced premature senescence. Biochem. Biophys. Res. Commun. *430*, 429–435.

Parrinello, S., Coppe, J.-P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. J. Cell Sci. *118*, 485–496.

Pascalis, I.D., Morgante, L., Pacioni, S., D'Alessandris, Q.G., Giannetti, S., Martini, M.,

Ricci-Vitiani, L., Malinverno, M., Dejana, E., Larocca, L.M., et al. (2018). Endothelial trans-differentiation in glioblastoma recurring after radiotherapy. Mod. Pathol. 1.

Passos, J.F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C.J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., et al. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. Mol. Syst. Biol. *6*, 347.

Patel, A.P., Tirosh, I., Trombetta, J.J., Shalek, A.K., Gillespie, S.M., Wakimoto, H., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., et al. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. Science *344*, 1396–1401.

Peña, L.A., Fuks, Z., and Kolesnick, R.N. (2000). Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. Cancer Res. *60*, 321–327.

Philipp, J., Azimzadeh, O., Subramanian, V., Merl-Pham, J., Lowe, D., Hladik, D., Erbeldinger, N., Ktitareva, S., Fournier, C., Atkinson, M.J., et al. (2017). Radiation-Induced Endothelial Inflammation Is Transferred via the Secretome to Recipient Cells in a STAT-Mediated Process. J. Proteome Res. *16*, 3903–3916.

Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., et al. (2006a). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. Cancer Cell *9*, 157–173.

Phillips, T.M., McBride, W.H., and Pajonk, F. (2006b). The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. J. Natl. Cancer Inst. *98*, 1777–1785.

te Poele, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. Cancer Res. *62*, 1876–1883.

Potten, C.S. (1990). A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine. Int. J. Radiat. Biol. *58*, 925–973.

Presti, M., Mazzon, E., Basile, M.S., Petralia, M.C., Bramanti, A., Colletti, G., Bramanti, P., Nicoletti, F., and Fagone, P. (2018). Overexpression of macrophage migration inhibitory factor and functionally-related genes, D-DT, CD74, CD44, CXCR2 and CXCR4, in glioblastoma. Oncol. Lett. *16*, 2881.

Preusser, M., de Ribaupierre, S., Wöhrer, A., Erridge, S.C., Hegi, M., Weller, M., and Stupp, R. (2011). Current concepts and management of glioblastoma. Ann. Neurol. *70*, 9–21.

Pucar, D., Hricak, H., Shukla-Dave, A., Kuroiwa, K., Drobnjak, M., Eastham, J., Scardino, P.T., and Zelefsky, M.J. (2007). Clinically Significant Prostate Cancer Local Recurrence

After Radiation Therapy Occurs at the Site of Primary Tumor: Magnetic Resonance Imaging and Step-Section Pathology Evidence. Int. J. Radiat. Oncol. 69, 62–69.

Puck, T.T., Morkovin, D., Marcus, P.I., and Cieciura, S.J. (1957). ACTION OF X-RAYS ON MAMMALIAN CELLS. J. Exp. Med. *106*, 485–500.

Radford, I.R. (1986). Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. *49*, 611–620.

Rannou, E., François, A., Toullec, A., Guipaud, O., Buard, V., Tarlet, G., Mintet, E., Jaillet, C., Iruela-Arispe, M.L., Benderitter, M., et al. (2015). In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury. Sci. Rep. *5*, 15738.

Raychaudhuri, B., and Vogelbaum, M.A. (2011). IL-8 is a mediator of NF- κ B induced invasion by gliomas. J. Neurooncol. *101*, 227–235.

Reardon, D.A., Omuro, A., Brandes, A.A., Rieger, J., Wick, A., Sepulveda, J., Phuphanich, S., de Souza, P., Ahluwalia, M.S., Lim, M., et al. (2017). OS10.3 Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143. Neuro-Oncol. *19*, iii21-iii21.

Reed, A.B. (2011). The history of radiation use in medicine. J. Vasc. Surg. 53, 3S-5S.

Rello-Varona, S., Kepp, O., Vitale, I., Michaud, M., Senovilla, L., Jemaà, M., Joza, N., Galluzzi, L., Castedo, M., and Kroemer, G. (2010). An automated fluorescence videomicroscopy assay for the detection of mitotic catastrophe. Cell Death Dis. *1*, e25.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? Free Radic. Biol. Med. 49, 1603.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells.

Robles, S.J., and Adami, G.R. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. Oncogene *16*, 1113–1123.

Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. Nat. Cell Biol. *11*, 973–979.

Rodier, F., Muñoz, D.P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J.-P., Campeau, E., Beauséjour, C.M., Kim, S.-H., et al. (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine

secretion. J. Cell Sci. 124, 68.

Rodon, J., Curigliano, G., Delord, J.-P., Harb, W., Azaro, A., Han, Y., Wilke, C., Donnet, V., Sellami, D., and Beck, T. (2018). A Phase Ib, open-label, dose-finding study of alpelisib in combination with paclitaxel in patients with advanced solid tumors. Oncotarget *9*, 31709–31718.

Rogounovitch, T.I., Saenko, V.A., Shimizu-Yoshida, Y., Abrosimov, A.Y., Lushnikov, E.F., Roumiantsev, P.O., Ohtsuru, A., Namba, H., Tsyb, A.F., and Yamashita, S. (2002). Large deletions in mitochondrial DNA in radiation-associated human thyroid tumors. Cancer Res. *62*, 7031–7041.

Rosenberg, R.D. (1989). Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism. Am. J. Med. *87*, 2S–9S.

Rosner, M.R. (2007). MAP kinase meets mitosis: a role for Raf Kinase Inhibitory Protein in spindle checkpoint regulation. Cell Div. 2, 1.

Rotolo, J., Stancevic, B., Zhang, J., Hua, G., Fuller, J., Yin, X., Haimovitz-Friedman, A., Kim, K., Qian, M., Cardó-Vila, M., et al. (2012). Anti-ceramide antibody prevents the radiation gastrointestinal syndrome in mice. J. Clin. Invest. *122*, 1786.

Rotolo, J.A., Zhang, J., Donepudi, M., Lee, H., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2005). Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. J. Biol. Chem. 280, 26425–26434.

Rousseau, N., Brazeau, P., Lapierre, H., and Abribat, T. (1998). Effect of aging on growth hormone-induced insulin-like growth factor-I secretion from cultured rat chondrocytes. Growth Horm. IGF Res. Off. J. Growth Horm. Res. Soc. Int. IGF Res. Soc. *8*, 403–409.

Russo, A.L., Kwon, H.-C., Burgan, W.E., Carter, D., Beam, K., Weizheng, X., Zhang, J., Slusher, B.S., Chakravarti, A., Tofilon, P.J., et al. (2009). In vitro and in vivo radiosensitization of glioblastoma cells by the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor E7016. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *15*, 607–612.

Rycaj, K., and Tang, D.. (2014). CANCER STEM CELLS AND RADIORESISTANCE. Int. J. Radiat. Biol. *90*, 615.

Sánchez, I., Hughes, R.T., Mayer, B.J., Yee, K., Woodgett, J.R., Avruch, J., Kyriakis, J.M., and Zon, L.I. (1994). Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. Nature *372*, 794–798.

Sato, I., Morita, I., Kaji, K., Ikeda, M., Nagao, M., and Murota, S. (1993). Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. Biochem. Biophys. Res. Commun. *195*, 1070–1076.

Schilder, Y.D.C., Heiss, E.H., Schachner, D., Ziegler, J., Reznicek, G., Sorescu, D., and

Dirsch, V.M. (2009). NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells. Free Radic. Biol. Med. *46*, 1598–1606.

Schwint, A.E., Gomez, E., Itoiz, M.E., and Cabrini, R.L. (1993). Nucleolar organizer regions as markers of incipient cellular alterations in squamous epithelium. J. Dent. Res. 72, 1233–1236.

Severino, J., Allen, R.G., Balin, S., Balin, A., and Cristofalo, V.J. (2000). Is betagalactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? Exp. Cell Res. *257*, 162– 171.

Shadyro, O.I., Yurkova, I.L., and Kisel, M.A. (2002). Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. Int. J. Radiat. Biol. 78, 211–217.

Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., and Funk, W.D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. Curr. Biol. CB *9*, 939–945.

Shen, Z.Y., Ye, C.Q., and Wu, D.C. (1989). Effect of inhaled 239PuO2 on alveolar type II cells. Int. J. Radiat. Biol. *56*, 169–178.

Shimura, T., Sasatani, M., Kamiya, K., Kawai, H., Inaba, Y., and Kunugita, N. (2016). Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in lowdose irradiated human fibroblasts. Oncotarget 7, 3559.

Shlush, L.I., and Hershkovitz, D. (2015). Clonal evolution models of tumor heterogeneity. Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet. e662-665.

Siddiqui, M.S., François, M., Fenech, M.F., and Leifert, W.R. (2015). Persistent γH2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. Mutat. Res. Mutat. Res. 766, 1–19.

Simeone, E., Grimaldi, A.M., and Ascierto, P.A. (2015). Anti-PD1 and anti-PD-L1 in the treatment of metastatic melanoma. Melanoma Manag. *2*, 41–50.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 31–39.

Sinclair, W.K. (1968). Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. 1968. Radiat. Res. *178*, AV112-124.

Singh, G., Hauswirth, W.W., Ross, W.E., and Neims, A.H. (1985). A method for assessing damage to mitochondrial DNA caused by radiation and epichlorohydrin. Mol. Pharmacol. *27*, 167–170.

Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., and Jeggo, P.A. (1999). The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. Mol. Cell. Biol. *19*, 3267–3277.

Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Lajoie-Mazenc, I., Favre, G., Toulas, C., and Cohen-Jonathan-Moyal, E. (2006). Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. Cancer Res. *66*, 482–489.

Skvortsova, I., Skvortsov, S., Stasyk, T., Raju, U., Popper, B.-A., Schiestl, B., von Guggenberg, E., Neher, A., Bonn, G.K., Huber, L.A., et al. (2008). Intracellular signaling pathways regulating radioresistance of human prostate carcinoma cells. Proteomics *8*, 4521–4533.

Slane, B.G., Aykin-Burns, N., Smith, B.J., Kalen, A.L., Goswami, P.C., Domann, F.E., and Spitz, D.R. (2006). Mutation of Succinate Dehydrogenase Subunit C Results in Increased O2^{.-}, Oxidative Stress, and Genomic Instability. Cancer Res. *66*, 7615–7620.

Smith, E.L., and Schuchman, E.H. (2008). Acid sphingomyelinase overexpression enhances the antineoplastic effects of irradiation in vitro and in vivo. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *16*, 1565–1571.

Somosy, Z. (2000). Radiation response of cell organelles. Micron Oxf. Engl. 1993 *31*, 165–181.

Somosy, Z., Sass, M., Bognár, G., Kovács, J., and Köteles, G.J. (1995). X-irradiationinduced disorganization of cytoskeletal filaments and cell contacts in HT29 cells. Scanning Microsc. 9, 763-770-772.

Song, J.H., Kandasamy, K., Zemskova, M., Lin, Y.-W., and Kraft, A.S. (2011). The BH3 mimetic ABT-737 induces cancer cell senescence. Cancer Res. *71*, 506–515.

Sonveaux, P., Brouet, A., Havaux, X., Grégoire, V., Dessy, C., Balligand, J.-L., and Feron, O. (2003). Irradiation-induced angiogenesis through the up-regulation of the nitric oxide pathway: implications for tumor radiotherapy. Cancer Res. *63*, 1012–1019.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. Mol. Cell *1*, 949–957.

Stafford, J.H., Hirai, T., Deng, L., Chernikova, S.B., Urata, K., West, B.L., and Brown, J.M. (2016). Colony stimulating factor 1 receptor inhibition delays recurrence of glioblastoma after radiation by altering myeloid cell recruitment and polarization. Neuro-Oncol. *18*, 797–806.

Stancevic, B., and Kolesnick, R. (2010). Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. FEBS Lett. *584*, 1728–1740.

Stancevic, B., Varda-Bloom, N., Cheng, J., Fuller, J.D., Rotolo, J.A., García-Barros, M., Feldman, R., Rao, S., Weichselbaum, R.R., Harats, D., et al. (2013). Adenoviral transduction of human acid sphingomyelinase into neo-angiogenic endothelium

radiosensitizes tumor cure. PloS One 8, e69025.

Steel, G.G., and Peckham, M.J. (1979). Exploitable mechanisms in combined radiotherapychemotherapy: the concept of additivity. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5, 85–91.

Steel, G.G., McMillan, T.J., and Peacock, J.H. (1989). The 5Rs of radiobiology. Int. J. Radiat. Biol. 56, 1045–1048.

Stepanenko, A.A., Andreieva, S.V., Korets, K.V., Mykytenko, D.O., Baklaushev, V.P., Chekhonin, V.P., and Dmitrenko, V.V. (2016). mTOR inhibitor temsirolimus and MEK1/2 inhibitor U0126 promote chromosomal instability and cell type-dependent phenotype changes of glioblastoma cells. Gene *579*, 58–68.

Stopper, H., Treutlein, A., Bahner, U., Schupp, N., Schmid, U., Brink, A., Perna, A., and Heidland, A. (2008). Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. Nephrol Dial Transpl.

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

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N. Engl. J. Med. *352*, 987–996.

Sun, Y., and Nelson, P.S. (2012). Molecular Pathways: Involving Microenvironment Damage Responses in Cancer Therapy Resistance. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *18*, 4019.

Supiot, S., and Paris, F. (2012). [Radiobiology dedicated to endothelium]. Cancer Radiother. J. Soc. Francaise Radiother. Oncol. *16*, 11–15.

Suresh, M.V., Yu, B., Lakshminrusimha, S., Machado-Aranda, D., Talarico, N., Zeng, L., Davidson, B.A., Pennathur, S., and Raghavendran, K. (2013). The protective role of MnTBAP in Oxidant-mediated injury and inflammation following Lung Contusion. Surgery *154*.

Takakura, N., Watanabe, T., Suenobu, S., Yamada, Y., Noda, T., Ito, Y., Satake, M., and Suda, T. (2000). A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. Cell *102*, 199–209.

Tamatani, T., Azuma, M., Ashida, Y., Motegi, K., Takashima, R., Harada, K., Kawaguchi, S., and Sato, M. (2004). Enhanced radiosensitization and chemosensitization in NF- κ B-suppressed human oral cancer cells via the inhibition of γ -irradiation- and 5-FU-induced production of IL-6 and IL-8. Int. J. Cancer *108*, 912–921.

Taylor, I.C., Hütt-Cabezas, M., Brandt, W.D., Kambhampati, M., Nazarian, J., Chang,

H.T., Warren, K.E., Eberhart, C.G., and Raabe, E.H. (2015). Disrupting NOTCH Slows Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Growth, Enhances Radiation Sensitivity, and Shows Combinatorial Efficacy with Bromodomain Inhibition. J. Neuropathol. Exp. Neurol. *74*, 778–790.

Truman, J.-P., García-Barros, M., Kaag, M., Hambardzumyan, D., Stancevic, B., Chan, M., Fuks, Z., Kolesnick, R., and Haimovitz-Friedman, A. (2010). Endothelial membrane remodeling is obligate for anti-angiogenic radiosensitization during tumor radiosurgery. PloS One *5*.

Trylcova, J., Busek, P., Smetana, K., Balaziova, E., Dvorankova, B., Mifkova, A., and Sedo, A. (2015). Effect of cancer-associated fibroblasts on the migration of glioma cells in vitro. Tumor Biol. *36*, 5873–5879.

Tsai, K.K.C., Chuang, E.Y.-Y., Little, J.B., and Yuan, Z.-M. (2005). Cellular mechanisms for low-dose ionizing radiation-induced perturbation of the breast tissue microenvironment. Cancer Res. *65*, 6734–6744.

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

Ungvari, Z., Labinskyy, N., Gupte, S., Chander, P.N., Edwards, J.G., and Csiszar, A. (2008). Dysregulation of mitochondrial biogenesis in vascular endothelial and smooth muscle cells of aged rats. Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol. *294*, H2121–H2128.

Ungvari, Z., Podlutsky, A., Sosnowska, D., Tucsek, Z., Toth, P., Deak, F., Gautam, T., Csiszar, A., and Sonntag, W.E. (2013). Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebromicrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosensitivity. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. *68*, 1443–1457.

Vala, I.S., Martins, L.R., Imaizumi, N., Nunes, R.J., Rino, J., Kuonen, F., Carvalho, L.M., Rüegg, C., Grillo, I.M., Barata, J.T., et al. (2010). Low Doses of Ionizing Radiation Promote Tumor Growth and Metastasis by Enhancing Angiogenesis. PLoS ONE *5*.

Valerie, K., Yacoub, A., Hagan, M.P., Curiel, D.T., Fisher, P.B., Grant, S., and Dent, P. (2007). Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. Mol. Cancer Ther. *6*, 789–801.

Valerio, A., and Nisoli, E. (2015). Nitric oxide, interorganelle communication, and energy flow: a novel route to slow aging. Front. Cell Dev. Biol. *3*.

Vanpouille-Box, C., Alard, A., Aryankalayil, M.J., Sarfraz, Y., Diamond, J.M., Schneider, R.J., Inghirami, G., Coleman, C.N., Formenti, S.C., and Demaria, S. (2017). DNA

exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. Nat. Commun. *8*, 15618.

Venable, M.E., Lee, J.Y., Smyth, M.J., Bielawska, A., and Obeid, L.M. (1995). Role of Ceramide in Cellular Senescence. J. Biol. Chem. 270, 30701–30708.

Venere, M., Hamerlik, P., Wu, Q., Rasmussen, R.D., Song, L.A., Vasanji, A., Tenley, N., Flavahan, W.A., Hjelmeland, A.B., Bartek, J., et al. (2014). Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. Cell Death Differ. *21*, 258–269.

Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. Cancer Cell *17*, 98–110.

Verheij, M., Dewit, L.G., and van Mourik, J.A. (1995). The effect of ionizing radiation on endothelial tissue factor activity and its cellular localization. Thromb. Haemost. *73*, 894–895.

Vit, J.-P., and Rosselli, F. (2003). Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. Oncogene *22*, 8645–8652.

Wang, J., Zheng, H., Ou, X., Fink, L.M., and Hauer-Jensen, M. (2002). Deficiency of Microvascular Thrombomodulin and Up-Regulation of Protease-Activated Receptor-1 in Irradiated Rat Intestine: Possible Link Between Endothelial Dysfunction and Chronic Radiation Fibrosis. Am. J. Pathol. *160*, 2063–2072.

Wang, J., Wakeman, T.P., Latha, J.D., Hjelmeland, A.B., Wang, X.-F., White, R.R., Rich, J.N., and Sullenger, B.A. (2010). Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells. Stem Cells Dayt. Ohio *28*, 17.

Wang, M., Kirk, J.S., Venkataraman, S., Domann, F.E., Zhang, H.J., Schafer, F.Q., Flanagan, S.W., Weydert, C.J., Spitz, D.R., Buettner, G.R., et al. (2005). Manganese superoxide dismutase suppresses hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor. Oncogene *24*, 8154–8166.

Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A.C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., et al. (2017). Tumor evolution of glioma intrinsic gene expression subtype associates with immunological changes in the microenvironment. Cancer Cell *32*, 42.

Wen, P.Y., Omuro, A., Ahluwalia, M.S., Fathallah-Shaykh, H.M., Mohile, N., Lager, J.J., Laird, A.D., Tang, J., Jiang, J., Egile, C., et al. (2015). Phase I dose-escalation study of the PI3K/mTOR inhibitor voxtalisib (SAR245409, XL765) plus temozolomide with or without radiotherapy in patients with high-grade glioma. Neuro-Oncol. *17*, 1275–1283.

Westermann, B. (2012). Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. Biochim.

Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1817, 1833-1838.

Wiley, C.D., Velarde, M.C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E.A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H.W., Davis, S.S., Ramanathan, A., et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. Cell Metab. *23*, 303–314.

Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., et al. (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. Nat. Genet. *17*, 141–143.

Wu, L., Shan, Y., and Liu, D. (2012). Stability, Disposition, and Penetration of Catalytic Antioxidants Mn-Porphyrin and Mn-Salen and of Methylprednisolone in Spinal Cord Injury. Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. *12*, 122.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature *445*, 656–660.

Yang, N.-C., and Hu, M.-L. (2005). The limitations and validities of senescence associatedbeta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. Exp. Gerontol. *40*, 813–819.

Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q., and Chen, Z.J. (2017). cGAS is essential for cellular senescence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, E4612–E4620.

Yang, L., DeBusk, L.M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y., Matrisian, L.M., Carbone, D.P., and Lin, P.C. (2004). Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. Cancer Cell *6*, 409–421.

Yang, L., Liu, Z., Wu, R., Yao, Q., Gu, Z., and Liu, M. (2015). Correlation of C-X-C chemokine receptor 2 upregulation with poor prognosis and recurrence in human glioma. OncoTargets Ther. *8*, 3203–3209.

Yentrapalli, R., Azimzadeh, O., Sriharshan, A., Malinowsky, K., Merl, J., Wojcik, A., Harms-Ringdahl, M., Atkinson, M.J., Becker, K.-F., Haghdoost, S., et al. (2013). The PI3K/Akt/mTOR pathway is implicated in the premature senescence of primary human endothelial cells exposed to chronic radiation. PloS One *8*, e70024.

Yoon, Y.-S., Byun, H.-O., Cho, H., Kim, B.-K., and Yoon, G. (2003). Complex II Defect via Down-regulation of Iron-Sulfur Subunit Induces Mitochondrial Dysfunction and Cell Cycle Delay in Iron Chelation-induced Senescence-associated Growth Arrest. J. Biol. Chem. 278, 51577–51586.

Young, A.R.J., and Narita, M. (2009). SASP reflects senescence. EMBO Rep. 10, 228-230.

Yue, P.Y.K., Mak, N.K., Cheng, Y.K., Leung, K.W., Ng, T.B., Fan, D.T.P., Yeung, H.W.,

and Wong, R.N.S. (2007). Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: antitumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. Chin. Med. 2, 6.

Zhan, H., Suzuki, T., Aizawa, K., Miyagawa, K., and Nagai, R. (2010). Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. J. Biol. Chem. *285*, 29662–29670.

Zhang, H., Yue, J., Jiang, Z., Zhou, R., Xie, R., Xu, Y., and Wu, S. (2017). CAF-secreted CXCL1 conferred radioresistance by regulating DNA damage response in a ROS-dependent manner in esophageal squamous cell carcinoma. Cell Death Dis. *8*, e2790.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science *300*, 1542–1548.



La sénescence radio-induite des cellules endothéliales Voies moléculaires et implication dans la récidive du glioblastome après radiothérapie

Mots clés : Radiothérapie, endothélium, sénescence, sécrétome, radiorésistance

Résumé : Les dysfonctions endothéliales jouent un rôle important dans la réponse de la tumeur à la radiothérapie. Le glioblastome (GBM), tumeur du système nerveux central, récidive dans 90% des cas dans le champ d'irradiation initial où ont été observées de nombreuses cellules endothéliales en senescence. Lors de ma thèse, j'ai appréhendé les voies moléculaires engageant la sénescence radio-induite des cellules endothéliales et étudié leur implication dans la réponse des cellules de GBM à la radiothérapie.

UNIVERSITE/BIOLOGIE

BRETAGNE \ SANTE

endothéliales L'irradiation des cellules microvasculaires quiescentes, induit la sénescence selon 2 voies moléculaires indépendantes soit l'antioncogène p53 impliquant soit le dysfonctionnement de la chaine respiratoire mitochondriale provoquant la génération d'anion superoxyde. L'inhibition pharmacologique de l'une ou l'autre de ces voies permet de prévenir cette sénescence.

Le sécrétome des cellules endothéliales (SASP) augmente sénescentes l'instabilité génomique après irradiation, caractérisée par l'augmentation du nombre de micronovaux et de division anormale, et la radiorésistance des cellules de GBM. De plus, dans un modèle murin orthotopique, les cellules de GBM irradiées en présence du SASP sont beaucoup plus agressives. La caractérisation du SASP combinée à des études fonctionnelles nous a permis d'identifier le rôle de l'axe CXCL8/CXCL5/CXCR2 dans ces phénotypes. Ces résultats soulignent l'impact de la radiothérapie sur les tissus sains péritumoraux et ses conséquences à long terme sur la résistance tumorale. Le ciblage des potentielles cibles identifiées permettrait d'améliorer le pronostic des GBM.

Radiation-induced endothelial cells senescence Molecular pathways and involvement in glioblastoma relapse after radiotherapy

Keywords : Radiotherapy, endothelium, senescence, secretome, radioresistance

Abstract : Radiotherapy is one of the main standard cancer treatment. Adjacent tissues, in particular endothelial cells, are never completely spared, especially in the case of highly invasive tumors such as glioblastoma (GBM). This aggressive tumor always relapses in the initial radiation field and the presence of senescent endothelial cells have been shown at this site. The objectives of my thesis were to better characterize the molecular pathways involved in radiationinduced senescence of endothelial cells and to investigate how it might impact GBM responses to radiotherapy.

First, using a new model of radiation-induced senescence from primary and quiescent microvascular endothelial cells, we identified two distinct molecular pathways involved in long-term senescence: the canonic pathway p53 and an

mitochondrial undescribed pathway involving respiratory chain dvsfunction and chronic superoxide anion production. Pharmacological inhibition of either one of these pathways prevents endothelial cell senescence. Then. usina biochemical and phenotypic analyses, we unrevealed a crucial role of their secretome in radiation response of GBM cells. Indeed, secreted CXCL8 and CXCL5 by senescent endothelial cells increase both genomic instabilities, displayed by polynucleidy, abnormal division and micronuclei formation, and radio-resistance of tumor cells, leading ultimately to more aggressive tumors in a murine orthotopic GBM model.

These results highlight the impact of irradiation on healthy tissues and its potential impact on tumor reccurence. Targeting the molecular actors identified during my thesis, could reduce GBM relapse and increase patient survival.