

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque | 10

Étude mécanistique & fonctionnelle de la sénescence radio-induite des cellules endothéliales microvasculaires

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, Médecine et Santé
Spécialité : Biologie Cellulaire

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Audrey LAFARGUE

Le 28 Février 2014, devant le jury ci-dessous

Président et Examineur :	Dr Daniel HENRION	DR, Université d'Angers, INSERM Laboratoire de Biologie Neurovasculaire & Mitochondriale Intégrée.
Rapporteurs :	Dr Pascale BERTRAND	DR, CEA, Fontenay aux Roses, Institut de Radiobiologie cellulaire et moléculaire.
	Dr Jean-Luc PERFETTINI	DR, Université Paris XI, INSERM Institut Gustave Roussy.

Directeur de thèse : Dr François PARIS, DR INSERM.

Unité de Recherche : INSERM U892 – Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers

Edmond des Papillons : Et dites-moi, qu'est-ce que vous fichez ici ?

Marcel Pagnol : Rien, Monsieur. On était juste monté sur la colline.

Edmond des Papillons : Quoi faire ?

Marcel Pagnol : Pour voir.

Edmond des Papillons : Hein ?

Marcel Pagnol : Pour voir ce qu'il y a derrière.

Edmond des Papillons : Ah, ah, ah, misère ! Depuis que l'homme est homme, c'est son idée fixe, savoir ce qu'il y a derrière. Alors, il fait la guerre, il fait des enfants, il fait des voyages et même il se fait curé, et tout ça pour voir ce qu'il y a derrière.

Extrait de l'adaptation cinématographique réalisée par Yves Robert en 1990 du roman de Marcel Pagnol, « La Gloire de mon Père », 1957.

REMERCIEMENTS

Je remercie en tout premier lieu l'ensemble de mon jury de thèse. Merci au Docteur Daniel Henrion pour avoir accepté de présider ce jury et d'être examinateur. Merci par ailleurs d'avoir accepté de participer aux comités annuels de suivi de thèse. Je vous remercie chaleureusement pour vos discussions intéressantes et vos conseils avisés tout au long de ce projet. Je remercie aussi chaleureusement les Docteurs Pascale Bertrand et Jean-Luc Perfettini pour avoir accepté d'être rapporteurs dans ce jury de thèse, et pour tout le soin pris dans la lecture et la correction du manuscrit. Merci aussi pour l'ensemble des questions pertinentes et pour les discussions développées lors de la soutenance qui furent d'un très grand intérêt. Soyez tous assurés de ma reconnaissance. Je vous souhaite à tous une très bonne continuation et beaucoup de réussite pour l'ensemble de vos projets futurs.

Je remercie également Docteure Catherine Muller pour avoir accompagné mes premiers pas dans la Recherche au cours de mon M2R au sein de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, et avec qui j'ai beaucoup appris. Je vous remercie par ailleurs d'avoir accepté de participer aux comités annuels de suivi de thèse. Merci aussi pour vos précieux conseils, et vos encouragements tout au long de ces années. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon amitié. Vous m'avez un jour transmis un « bruit de couloirs de laboratoire » : « *La plus grande qualité d'un chercheur, c'est sa résistance à l'échec!* ». Une sacrée formule que je n'ai jamais oublié! Je ne vous souhaite que le meilleur pour vos prochains projets.

Je remercie ensuite mon directeur de thèse, Docteur François Paris, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir confié les rênes de ce projet important. Comme on dit « *à vaincre sans péril, on triomphe sans gloire* », on aura réussi à mener ce projet ambitieux et conséquent à bon port en attendant les prochains travaux. Ce long travail aura porté ses fruits, merci pour la collaboration que nous avons pu établir au cours de ces quatre années. Bonne chance pour les prochaines étapes!

Merci aussi à tous nos collaborateurs de premières lignes. Je remercie Docteure Marie-Hélène Gaugler pour sa participation active aux débuts de ce projet, et pour sa contribution et ses conseils précieux lors de la préparation de l'article et de la préparation de la soutenance. Sois assurée de ma gratitude, merci beaucoup pour ton soutien, je te souhaite le meilleur pour tes projets personnels et professionnels. Je remercie aussi Docteure Claire Pecqueur et Docteur François Vallette pour leur collaboration déterminante, leurs conseils avisés, et leurs expertises sur les secrets des mitochondries, qui auront permis à ce projet de franchir un cap important. Je vous souhaite à tous une grande réussite pour vos prochains projets.

Je remercie également Docteur Isabelle Corre pour son soutien depuis le Québec et pour toutes les discussions que nous avons pu mener tout au long de ces années. Je te souhaite beaucoup de réussite à toi et à Maëva dans votre projet. J'espère qu'à défaut d'avoir récupéré un accent québécois à couper au couteau (quoi qu'en matière d'accent je suis plutôt mal placée...), tu auras pu accomplir tout ce que tu souhaitais. Je t'envoie à mon tour plein de bonnes ondes. Je te souhaite bon courage et plein de réussite!

Je remercie par ailleurs Docteur Stéphane Supiot et Docteur Stéphane Birklé pour leur collaboration. Bonne chance dans vos projets respectifs!

Je remercie chaleureusement l'ensemble des personnels de l'unité et des plateformes qui nous permettent chaque jour de mener à bien nos travaux. En particulier, merci beaucoup à Stéphanie

Desevedavy, Philippe Hulin, Steven Nedellec, Sylvia Lambot, Agnès de France, et Myriam Robard. Merci pour votre expertise, votre disponibilité, et votre bonne humeur!

Enfin, un grand merci aux membres passés et présents de l'équipe 14 et d'Atlab pour leur solidarité, leur soutien, leur conseils avisés, leurs discussions, mais surtout pour votre bonne humeur et tous les moments que nous avons pu partager au cours de ces quatre années. La thèse est un long parcours d'endurance, je dirais même une étape de vie, où l'on avance toujours mieux lorsqu'on est bien accompagné. Donc merci à vous d'avoir partagé ce bout de chemin avec moi. Notamment, merci aux vieux de la vieille qui sont passés par là et qui ont accompagné mes premiers pas en thèse, Ariane et Aude (les deux autres « A » de l'époque), et Eric, et merci aux actuels qui auront partagé mes aventures, mes joyeuses co-bureaux Rym, Nolwenn, et Maëva, et Vincent-pumpkin, Vincent-demi-démêlée-du-dimanche, Catherine, Denis et Julien. Un merci tout spécial aux « mi-mi » du 1^{er}, Mylène et Mickaël, qui m'ont accueilli au moment de la rédac dans leur *labo sweet labo*, et m'auront offert écoute, soutien, et corrections nocturnes jusqu'au bout! Merci également à Caroline et Sophie, les maîtres de la dosimétrie du four à rayons X. Je remercie aussi les collègues de l'unité avec qui j'ai pu interagir au labo voire (et surtout) en dehors du labo... ;) donc merci à Carole, Quentin, Janic, Mazène et Nouridine. Je vous souhaite à tous bon courage et l'accomplissement de tout ce que vous espérez! Bon courage aux prochains docteurs! J'ai été ravie de vous rencontrer, soyez tous assurés de mon amitié sincère, je vous dis à la prochaine! ;)

Egalement, un merci tout particulier aux deux stagiaires de choc qui ont participé au projet, et apporté leur petite pierre à l'édifice. Merci à Marie, ce fut un plaisir de travailler avec toi et de te connaître, j'ai été ravie de cette transmission de savoir, je te souhaite bonne chance dans tes prochains travaux et plein de réussite! Merci aussi à notre *giant*-suisse Sophia pour sa collaboration mais surtout pour sa bonne humeur communicative. Je te souhaite une bonne réussite dans tes études et tes prochains projets!

Ensuite, merci infiniment à mes amis nantais qui m'ont soutenu, accompagné, et encouragé tout au long de ce parcours. Un grand merci à mes choupettes et mes chupitos, Ariane *aka* iaiane, Holisoa, et Anne-Lise, Manu, Fabien, et Fripounew, mesdames et messieurs, ce fut un honneur de plaider avec vous à la cour (celle de derrière du Floride), mais attention les dossiers s'accumulent, je crois que nous n'aurons pas assez d'une vie pour en finir avec toutes ces affaires! Ce n'est que le début! ;) Un grand merci aussi à ma petite Sylvanie (ou Sylviane, ne le saura-t-on donc jamais?! ^^), pour tes encouragements, mais surtout pour tous les bons moments partagés, on se sera bien marré poulette! Merci aussi au presque-père, Thibault, de mon presque-fils, Nico, ainsi que son presque-demi-frère (« *ou quoi que ce 'soye'!* »), Matthieu, et merci aussi à Adeline et Alexia, pour tous les fous-rires que l'on a partagé que ça soit autour d'un verre ou au cours de la quête du Grrraaaaaal (« *sur un ooooooangéééé!* »)! Je vous souhaite à tous plein de bonheur et de réussite dans vos projets personnels et professionnels! La route est encore longue, nos chemins n'ont pas fini de se croiser, soyez tous assurés de mon amitié sincère!

Un immense merci aux amis toulousains qui m'auront envoyé leurs bonnes ondes depuis ces lointaines contrées. Merci à Alex pour toutes les aventures que nous avons partagé depuis l'IUT, et pour toutes les nombreuses aventures que nous partagerons encore. Entre deux accords de guitares, à défaut d'avoir bouclé un morceau correct, on aura au moins bouclé nos thèses, haha! *My friend, the road is ours, baby!* ;) Merci à mes binômes et co-backpackeuses, Magali et Mélanie, pour tous ces bons moments passés sur les bancs de la fac et sur les routes des vacances. Préparez vos sacs, on a encore pleins de trucs à faire et à voir, parce que « *'tain, mais t'te rends pas compte, avant ils étaient là y'a 2000 ans au même endroit que nous, à cheval et tout...!!!* »! Merci aussi à Pierre et Agathe, pour tous les bons moments passés depuis les bancs des inscriptions de la fac jusqu'à ce jour, et lors de

vos apéros *grungis*! J'ai été tous ravie de faire votre rencontre et je suis heureuse de vous compter parmi mes amis. Vous aurez tous été d'un soutien essentiel. Je vous souhaite un bel avenir que j'espère nous partagerons longtemps. Merci également aux anciens de la promo M2R Cancéro, avec qui j'ai partagé boulot, stress, et petits verres! Vous avez tous été d'excellents camarades et je vous souhaite plein de belles choses pour la suite de vos aventures!

Merci aux vieux pots montalbanais du lycée, Elodie, Anaïs, Loïc, Max, Seb, Fanny, Nath, et Audrey, qui sont là depuis maintenant de très nombreuses années et le seront pour encore longtemps. Merci pour votre soutien et pour les beaux souvenirs que nous partageons. Merci à Christopher, mon ami de toute éternité malgré la distance, je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

Pour terminer, les derniers mais pas les moindres, je remercie infiniment l'ensemble de ma famille pour son soutien inconditionnel tout au long de mon parcours. Merci à mes parents, Claude et Anne-Marie, pour votre présence et vos encouragements quoi qu'il arrive. Votre soutien a été plus que déterminant pour moi, il a été essentiel. Cédric et moi avons eu beaucoup de chance, nous vous devons beaucoup, notre sens de l'intégrité en fait parti. Vous avez su nous assurer des racines solides, et l'équilibre en toutes circonstances. C'est bien grâce à vous que nous sommes parvenus jusque là aujourd'hui. Merci à Cédric, mon grand frère, tu as grandi et tracé un chemin devant moi, je t'ai suivi à petits pas jusqu'à que je puisse tracer le mien. Je te remercie pour tous les bons moments partagés, pour ta présence, ton exemplarité, tes conseils et ton aide pour tout et n'importe quoi, même aujourd'hui je me rappelle encore des réveils-matin à coup de Metallica lorsqu'il fallait partir prendre le bus tôt le matin, (bon cela dit j'suis toujours pas trop du matin...haha!). Je te souhaite le meilleur pour tout, et une belle et longue carrière. Merci beaucoup aussi à ta compagne et ton fils, Noémie et Louis, pour leur présence et leur soutien. Ce petit bonhomme est une force à lui seul, je suis très heureuse d'être sa tata et sa marraine, je serais présente à mon tour pour lui quoi qu'il arrive. Merci à mes grands-parents pour leur soutien, et leur courage de tous temps. Une pensée pour les disparus. Merci aussi à tout le reste de ma nombreuse famille, oncles, tantes, cousins, cousines, pour leur présence, leurs encouragements, et tous les bons moments partagés ensemble.

Ma reconnaissance à vous tous! - *Audrey Lafargue*

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
Table des matières	7
Abréviations	10
Avant-Propos.....	12
Introduction	13
I. Radiothérapie & Radiobiologie.....	13
A. Principes de la Radiothérapie externe	13
1. Radiothérapie & Rayonnements ionisants	13
<i>Historique</i>	14
<i>Les rayonnements ionisants</i>	15
<i>La radiothérapie externe</i>	16
<i>La curiethérapie</i>	17
<i>La radiothérapie interne vectorisée ou radiothérapie métabolique</i>	17
2. Effets primaires des rayonnements ionisants	17
3. Effets biologiques des rayonnements ionisants	19
a. Impacts structurels & biochimiques	19
i. Noyau & ADN	19
<i>Les cassures double-brin</i>	19
<i>Les cassures simple-brin</i>	19
<i>Altérations des bases</i>	19
ii. Membranes plasmiques & Constituants lipidiques	20
<i>La peroxydation des lipides</i>	21
<i>Communication inter-cellulaire</i>	21
<i>Les Sphingolipides & Réorganisation des domaines lipidiques</i>	21
iii. Organelles	23
<i>Mitochondrie</i>	23
<i>Autres organelles</i>	24
b. Signalisations & devenir cellulaires	25
i. Arrêt dans le cycle cellulaire.....	25
ii. Réparation des dommages radio-induits de l'ADN.....	27
<i>La Jonction d'Extrémités Non-Homologues (NHEJ)</i>	27
<i>La Recombinaison Homologue</i>	29
<i>La Réparation par Excision de Base (BER)</i>	30
<i>Foyers de cassures double-brins</i>	31
<i>Signalisation en absence de cassures</i>	31
iii. Mort cellulaire radio-induite.....	32

iiia. L'apoptose.....	32
<i>La voie d'activation dépendante de la signalisation nucléaire et de p53</i>	33
<i>La voie d'activation dépendante des récepteurs de mort</i>	33
<i>La voie d'activation dépendante de la génération du Céramide à la membrane</i>	33
<i>La voie d'activation dépendante de l'atteinte directe des mitochondries</i>	36
<i>Importance des protéines de la famille Bcl-2</i>	37
iiib. La mort post-mitotique	39
iv. Réponse au stress oxydant radio-induit & antioxydants endogènes.....	39
v. Survie : Normalité / Sénescence cellulaire / Activation	42
B. Radiotoxicité sur le tissu sain.....	42
1. Effets secondaires aigus	42
a Toxicité aiguë à forte doses létale : les Syndromes Aigus Radio-induits	42
i. Le Syndrome Hématopoïétique.....	43
ii. Le Syndrome Gastro-Intestinal.....	43
iii. Le Syndrome Cérébro-Vasculaire	45
b Toxicité aiguë non-létale	45
2. Effets secondaires tardifs & Epidémiologie.....	46
a Principaux effets secondaires tardifs – Tête & cou.....	47
b Principaux effets secondaires tardifs – Thorax	47
c Principaux effets secondaires tardifs – Abdomen & Pelvis	48
II. Importance de l'endothélium dans la réponse aux rayonnements ionisants & Sphingosine-1-Phosphate	50
A. Vascularisation et homéostasie tissulaire.....	50
B. Radiosensibilité des cellules endothéliales	52
C. Modulation de la mort radio-induite aiguë des cellules endothéliales par la Sphingosine-1-Phosphate	54
1. Le Céramide & l'ASMase : médiateurs endogènes de la mort cellulaire endothéliale après irradiation	54
2. La Sphingosine-1-Phosphate : agent exogène pro-survie après irradiation des cellules endothéliales.....	55
D. Effets de l'irradiation sur le tissu vasculaire & perturbation de l'homéostasie tissulaire	60
E. Implication de l'endothélium irradié dans les lésions radio-induites tardives	61
<i>Endothélium & lésions radio-induites au sein du SNC</i>	61
<i>Endothélium & lésions radio-induites cardiovasculaires et athérosclérotiques</i>	63
<i>Endothélium & fibrose tissulaire radio-induite</i>	64
<i>Endothélium, SIP & lésions radio-induites tardives</i>	67

III. Caractères & Mécanismes de la sénescence endothéliale	69
A. Le phénotype « sénescant »	69
B. Mécanismes moléculaires de la sénescence endothéliale	74
1. Sénescence endothéliale répliquative	74
a Mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence endothéliale répliquative	74
i. L'érosion des télomères & mécanismes dépendants de l'ADN	74
ii. Le stress oxydant chronique & les voies mitochondriales	78
iii. Le Céramide & Sphingosine-1-Phosphate	86
b Sénescence endothéliale répliquative & processus physiopathologiques	86
2. Sénescence endothéliale prématurée radio-induite	88
a Limites des modèles expérimentaux	88
b Mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence endothéliale prématurée radio-induite	90
i. Les voies de réponses aux dommages de l'ADN	90
ii. Le stress oxydant chronique radio-induit & les voies mitochondriales	95
Hypothèses & Objectifs	98
Résultats	101
Discussion & Perspectives	145
Références	162
Annexes	189

ABBREVIATIONS

53BP1 : p53 Binding Protein 1	γ H2AX : Histone 2A variant X
APE1 : Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1	HAEC : Human Artery Endothelial Cell
ASMase : Acide Sphingomyelinase	HAT : Histone Acetyl Transferase
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	HDAC : Histone Deacetylase
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad 3 related protein	HMEC-1 : Human Microvascular Endothelial Cell 1
ATRIP : ATR-Interacting Protein	HMVEC-L : Human Microvascular Endothelial Cell – Lung
AVC : Accident Vasculaire Cérébral	HP1 : Heterochromatin Protein 1
BAEC : Bovine Aortic Endothelial Cell	HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer	ICAD : Inhibitor of Caspase activated DNase
Bax : Bcl-2 associated X protein	ICAM-1 : Inter Cellular Adhesion Molecule 1
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2	IGF-1 : Insulin Growth Factor-1
Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large	IL : Interleukin
BER : Base Excision Repair	KO : Knock Out
BRCA1/2 : Breast Cancer 1/2	MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
CAK : Cdk Activating Kinase	Mfn1/ 2 : Mitofusin 1/2
Caspases : Cystein Aspartic acid specific protease	Mdm2 : Mouse double minute 2
CDB : Cassures Double-Brins	MIPs : Macrophage Inflammatory Proteins
Cdk : Cycline dependant kinase	MMPs : Matrix MetalloProteinases
CS : Ceramide Synthase	MnTBAP : Manganese 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin
Chk1/2 : Checkpoint kinase 1/2	NAC : N-acétyl cystéine
CKI : Cdk inhibitor	Nbs1 : Nijmegen Breakage Syndrom 1
DNA-PKcs : DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit	NHEJ : Non-Homologous End Joining
DNA-SCARS : DNA-Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence	NSMase : Neutral Sphingomyelinase
DR5 : Death Receptor 5	NOS : Nitric Oxide Synthase
Drp1 : Dynamin-related GTPase 1	Nox : NADPH oxidase
eNOS : endothelial Nitric Oxyde Synthase	PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1
EPC : Endothelial Progenitor Cell	PARP : Poly-ADP Ribose Polymérase
ERK : Extracellular signal Regulated Kinase	PARP1 : Poly-ADP Ribose Polymerase 1
FEN1 : Flap Structure-Specific Endonuclease 1	PATZ1 : POZ/BTB and AT-hook-containing zinc finger protein 1
FGF : Fibroblast Growth Factor	PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
GBM : Glioblastomes multiforme	PDGF : Platelet Derived Growth Factor
GM-CSF : Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor	PECAM-1 : Platelet Adhesion Molecule-1
GPX : Glutathione Peroxdase	PI3K/Akt : Phosphatidyl Inositol 3-Kinase/Akt
GROs : Growth Regulated Oncogenes	

PI3KK : Phosphatidylinositol 3-OH Kinase related Kinase
PLC : Phospholipase C
PNK : Polynucleotide Kinase
POT1 : Protection Of Telomere 1
RAP1 : Repressor and Activator Protein 1
RCPG : récepteurs couplés à une protéine G
RH : Recombinaison Homologue
RILI : Radiation-induced lung injury
RNS : Reactive Nitrogen Species
ROS : Reactive Oxygen Species
RPA : Replication Protein A
S1P : Sphingosine-1-Phosphate
SAHF : Senescence-Associated Heterochromatin Foci
SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype
SIRT1 : Sirtuin 1 ou Silent Information Regulation 2 homolog 1
SK1 : Sphingosine Kinase 1
SNC : Système Nerveux Central
SOD : Superoxide Dismutase
SPP : Sphingosine-1-Phosphate Phosphatase

SAR : Syndromes Aigus Radio-induits
SCV : Syndrome Cérébro-Vasculaire
SGI : Syndrome Gastro-Intestinal
SH : Syndrome Hématopoïétique
TERC : Telomerase RNA Component
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase
TGF- β : Tumoral Growth Factor- β
TIF : Telomere dysfunction-Induced Foci
TIN2 : TRF1 Interacting protein 2
TNF α : Tumor Necrosis Factor
tPA : tissue type Plasminogen Activator
TPP1 : TIN2 and POT1 interacting Protein 1
TRAIL : TNF-related apoptosis inducing ligand
TRF1/2 : Telomere Repeat binding Factor 1/2
UCP2 : mitochondrial Uncoupling Protein 2
uPA : urokinase type Plasminogen Activator
UV : Ultra-violet
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
XLF : XRCC4 like factor, ou Cernunnos
XRCC4 : X-ray Repair Cross Complementing protein4
ZO-1 : Zonula Occludens-1

ETUDE MECANISTIQUE ET FONCTIONNELLE DE LA SENESCENCE RADIO-INDUITE DES CELLULES ENDOTHELIALES MICROVASCULAIRES

AVANT-PROPOS

La radiothérapie concerne plus de la moitié des patients atteints du cancer. Cette thérapie est efficace mais implique néanmoins des effets secondaires indésirables sur les tissus sains. Il est donc crucial aujourd'hui de comprendre les mécanismes d'apparitions de ces effets secondaires afin d'améliorer les protocoles de radiothérapie et de mettre au point de nouveaux agents pharmacologiques. C'est ainsi que, maintenant depuis plusieurs années, l'équipe « Radiobiologie & Ciblage de l'endothélium » dirigée par le Dr François Paris au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers (Inserm UMR6299), où j'ai effectué ce travail de thèse, décrypte les processus biologiques impliqués. Il a pu être notamment établi que le réseau vasculaire sanguin joue un rôle clé dans la réponse des tissus à l'irradiation. En effet, la mort cellulaire aiguë radio-induite des cellules endothéliales microvasculaires est contrôlée par un mécanisme dépendant de la voie du sphingolipide Céramide. En particulier, un pré-traitement par le sphingolipide Sphingosine-1-Phosphate (S1P) permet de bloquer cette mort cellulaire aiguë, et d'empêcher l'apparition de la toxicité radio-induite aiguë.

Concernant les effets secondaires tardifs, leurs mécanismes d'apparition doivent être éclaircis et suggèrent la présence d'un stress chronique. Ces lésions surviennent chez 5 à 10% des patients traités par radiothérapie, ce qui est considérable, et sont difficilement prévisibles. Ils sont caractérisés par l'apparition de lésions tissulaires (fibrose radique, athérosclérose,...), où l'implication des vaisseaux sanguins peut jouer un rôle clé. Cependant, les mécanismes moléculaires doivent être encore clairement déterminés. Ainsi, mes travaux de thèse ont montré que les cellules endothéliales microvasculaires deviennent sénescents à long terme après irradiation. La sénescence cellulaire se définit notamment par une morphologie cellulaire élargie et la sécrétion de molécules inflammatoires. Nous avons alors examiné les processus impliqués et mis à jour des perturbations fonctionnelles (activation, perméabilité) et l'expression de signaux de stress chroniques tels qu'un défaut de respiration mitochondriale, un stress oxydant mitochondrial, et une surexpression persistante de p53. L'inhibition de l'axe p53 ou l'utilisation d'antioxydant permet de réduire le niveau de sénescence. Ainsi, cibler ces axes pourrait contribuer à la réduction de la toxicité tardive liée aux radiations et à l'endommagement des microvaisseaux sanguins.

ÉTUDE MÉCANISTIQUE ET FONCTIONNELLE DE LA SÉNESCENCE RADIO-INDUITE DES CELLULES ENDOTHELIALES MICROVASCULAIRES

INTRODUCTION

I. RADIOTHERAPIE & RADIOBIOLOGIE

A. Principes de la Radiothérapie externe

1. Radiothérapie & Rayonnements ionisants

Les derniers chiffres de l'Institut National du Cancer en 2011 rapportent 365500 nouveaux cas de patients atteints du cancer en France, dont 207000 chez l'homme et 158500 chez la femme. Cette même année, 147500 décès ont été recensés des suites de la maladie. Chez l'homme, le cancer est la première cause de mortalité, et les cancers les plus fréquents sont les cancers de la prostate, suivis des cancers du poumon et des cancers colorectaux. Chez la femme, le cancer est la seconde cause de mortalité, et les cancers les plus fréquents sont les cancers du sein, suivi des cancers colorectaux et des cancers du poumon. Bien que le taux de mortalité lié au cancer soit en régression, l'incidence des personnes diagnostiquées reste en augmentation.

Le cancer est une maladie caractérisée par la transformation d'une cellule acquérant une capacité à se diviser indéfiniment ainsi qu'une insensibilité aux stimuli de régulation de la prolifération et de mort cellulaire. Les cellules cancéreuses, proliférant donc de façon anormalement importante, forment une masse tumorale altérant le bon fonctionnement de l'organe porteur, voire de l'organisme dans son ensemble, conduisant ainsi à l'engagement du pronostic vital du patient. En effet, ces cellules ont la capacité de détourner le métabolisme énergétique à leur avantage, appauvrissant la consommation énergétique du tissu sain environnant. Dans des stades avancés de la maladie, ces cellules peuvent acquérir la capacité à se disséminer au sein du même ou d'un autre organe, formant ainsi des métastases ou tumeurs secondaires. Pour cela, les cellules cancéreuses utilisent et conditionnent le microenvironnement tumoral qui les entoure, notamment en sollicitant la génération de néovaisseaux ou angiogénèse, et se désolidarisent de la masse tumorale par transition épithélio-mésenchymateuse, puis migrent et se réimplantent sur un autre site (**Figure n°1** ; Hanahan, Weinberg, 2011).

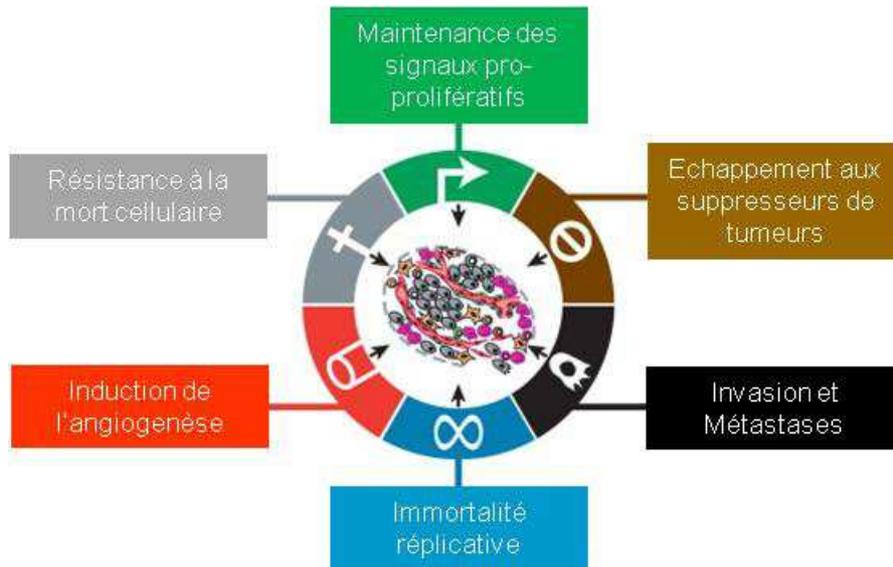


Figure n°1 : Caractéristiques du cancer.
Adapté de Hanahan & Weinberg, 2011.

La radiothérapie, avec la chimiothérapie et la chirurgie, est aujourd’hui un des principaux traitements du cancer.

Historique – Les principes de bases de l’utilisation des rayonnements ionisants et de la radiothérapie ont été mis à jour avec la découverte des rayons X par Wilhelm Conrad Röntgen en 1895 et la réalisation des premiers clichés radiographiques, la découverte de la radioactivité γ émanant de l’uranium par Henri Becquerel en 1896, et la découverte de deux radioéléments, le radium et le polonium, par Marie Curie en 1898. Marie et Pierre Curie et Henri Becquerel recevront alors le prix Nobel de Physique en 1903 pour leurs travaux sur la radioactivité. Marie Curie recevra également le prix Nobel de Chimie en 1911 pour ses travaux sur le radium et le polonium. Ces découvertes majeures mettent à jour la capacité que certains éléments atomiques réagissent autrement que par réaction chimique. En effet, ces rayonnements sont dits « ionisants » car ils ont la capacité d’arracher les électrons de la matière, soit d’ioniser les atomes.

De nombreuses tentatives d’utilisations thérapeutiques verront le jour aussitôt notamment par Danlos & Bloch en 1901, pour un traitement de lupus par le radium, et par Freund en 1903, qui rapporte la disparition d’un grain de beauté suite à l’utilisation de rayons X. Peu après, Bergonié et Tribondeau montrent que les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux radiations que les cellules saines. Les premières apparitions d’effets indésirables sont également constatées rapidement, notamment par Becquerel lui-même qui constate une

ulcération de sa peau qui fut en contact avec un tube de radium. Il sera également montré une radiosensibilité des cellules lymphoïdes. Le premier cas de fibrose pulmonaire radique sera décrit en 1922 suite à une tentative de traitement du cancer du sein par rayons X. C'est en 1927 que Régaud montre que le fractionnement de la dose d'irradiation permet de réduire les effets indésirables sur la peau. (Bernier *et al*, 2004 ; Reed, 2011).

Les rayonnements ionisants – De nos jours, quatre types de rayonnements ionisants sont principalement utilisés et ont des propriétés différentes :

- **Les rayons X et les rayons γ** : Les rayons X et les rayons γ sont tout deux des rayonnements électromagnétiques constitués de photons, mais sont produits de façon différentes : le premier est le produit de transition électronique, le second est issu de la désintégration radioactive des noyaux des atomes. Ils sont de même nature que la lumière mais avec une longueur d'onde plus courte. Ceci leur confère une propriété de grande pénétration et leur permet de traverser des objets alors que la lumière reste bloquée. Ces rayonnements électromagnétiques sont de haute énergie, ainsi, ils ont la capacité de rompre des liaisons chimiques conduisant ainsi à l'altération de l'élément ciblé. Ils ont une portée de plusieurs centaines de mètres dans l'air, et peuvent être bloqué par du plomb ou une forte épaisseur de béton.
- **Le rayonnement β** : Les particules β sont des électrons (charge négative) de grande énergie, éjectées du noyau d'un atome. Elles ont une pénétration plus faible que les rayons X et γ mais plus forte que les particules α . Une feuille d'aluminium de quelques millimètres peut les arrêter.
- **Le rayonnement α** : Les particules α (faisceaux de noyau d'hélium) émises par un atome radioactif ont une faible pénétration, une simple feuille de papier peut les arrêter. Elles n'ont pas d'électron et sont de charge positive.
- **Les neutrons** : Ils sont indirectement ionisants et ont une pénétration dépendante de leur énergie. Ils peuvent être arrêtés par une forte épaisseur de béton, d'eau ou de paraffine.

La quantité d'énergie que les rayonnements vont déposer dans le volume ciblé correspond à la dose de rayonnement délivrée. Elle s'exprime en Gray (Gy) soit une énergie de 1 Joule déposée dans 1 kilogramme de matière.

Contrairement à la chimiothérapie qui aura une action systémique, la radiothérapie cible un volume tumoral préalablement défini. Elle s'applique donc le plus souvent pour des cancers dits « solides » car localisés. Le but du traitement par radiothérapie, comme tout traitement génotoxique, vise à éliminer les cellules cyclantes dans cette zone.

Il existe trois principales formes de radiothérapie : la radiothérapie externe, la plus courante, à laquelle se réfère ce travail de thèse ; la curiethérapie ; et la radiothérapie interne vectorisée.

La radiothérapie externe – Cette procédure thérapeutique est employée seule ou en association avec d'autres traitements chez près de 50% des patients pris en charge. Par définition, la source des rayonnements est ici à l'extérieur du patient. Il s'agit généralement de d'accélérateurs linéaires produisant des rayons X et des électrons ou de source de radioactivité γ au cobalt 60.

Récemment la radiothérapie externe a connu un essor technique majeur avec l'amélioration de la qualité de la balistique, permettant ainsi d'optimiser les doses délivrées au volume tumoral tout en préservant au maximum les tissus sains périphériques. En effet, on estime à plus ou moins 5%, qu'un sous-dosage peut entraîner une résurgence tumorale alors qu'un surdosage peut entraîner des complications cliniques. Ainsi sont apparus de nouveaux procédés tels que la radiothérapie conformationnelle 3D, la plus utilisée aujourd'hui et qui combine l'utilisation de l'imagerie médicale ; la radiothérapie à modulation d'intensité, qui permet de moduler la forme du faisceau pendant la séance de traitement ; et la radiothérapie stéréotaxique, qui utilise des microfaisceaux pour traiter de très petits volumes. (Source : [Institut National du Cancer](#)).

Cependant, les tissus sains ne sont jamais totalement épargnés, il peut alors en résulter l'apparition d'effets secondaires ([cf partie I-B](#)). Ils apparaissent en majorité en cours ou en fin de traitement (effets secondaires aigus) mais peuvent aussi survenir après plusieurs mois/années post-traitement (effets secondaires tardifs). Leurs conséquences sont variables et peuvent au mieux, altérer la qualité de vie du patient, au pire, engager son pronostic vital.

Le choix du protocole de traitement dépendra du type de tumeur, de son grade, de son volume, de sa localisation, et de son degré d'expansion. Classiquement, la dose totale à administrer ne se délivre pas en une seule séance mais par fraction de 2Gy/jour sur 5jours/semaine. (Source : [Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire](#)). En effet, ceci repose sur le principe que les tissus sains tendent à se réparer plus vite que les tissus tumoraux. De plus, les cellules tumorales sont d'avantages sensibles aux radiations en phase de division. Le fractionnement permet donc à la fois de réduire les effets délétères aux tissus

sains et de les augmenter sur les tissus tumoraux, qui auront alors le temps de ré-entrer en cycle, (Clifton Ling *et al*, 2010).

La radiothérapie peut avoir d'autres objectifs, notamment réduire des symptômes tels que la douleur. On parlera alors de radiothérapie symptomatique ou palliative. Egalement, elle peut être utilisée en « per-opératoire » en prévention d'une résurgence tumorale sur les tissus périphériques en marge du volume tumoral lors d'une tumorectomie.

La curiethérapie – Cette procédure emploie une source radioactive sous forme de fils ou de tubes, placée à l'intérieur de la tumeur du patient pendant une durée fixée ou de façon permanente. Il s'agit principalement de source d'iridium 192 ou de césium 137. Elle se pratique sur des tumeurs accessibles et qui ne se répandent pas, (*e.g.* prostate).

La radiothérapie interne vectorisée ou radiothérapie métabolique – Cette procédure utilise des radiopharmaceutiques et est appliquée en médecine nucléaire. Ce traitement peut être administré par voie orale ou par injection. Il va donc circuler dans le corps jusqu'à un organe cible. Dans le cas de la thyroïde en tant que cible, l'iode 131 peut être administré seul car il a un tropisme pour cet organe, c'est-à-dire une affinité métabolique naturelle. Les radioéléments peuvent être aussi vectorisés c'est-à-dire associés à un vecteur tel qu'un anticorps monoclonal qui leur conférera une cible spécifique, on parle alors de radio-immunothérapie (RIT).

2. Effets primaires des rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants peuvent avoir une action directe ou indirecte, (**Figure n°2**). Les effets directs consistent en une ionisation directe de l'atome impacté. Les effets indirects consistent en la radiolyse de l'eau. Les cellules animales étant constituées d'eau à 80%, les effets indirects sont majoritaires. Dans ce cas, les rayonnements ionisants vont

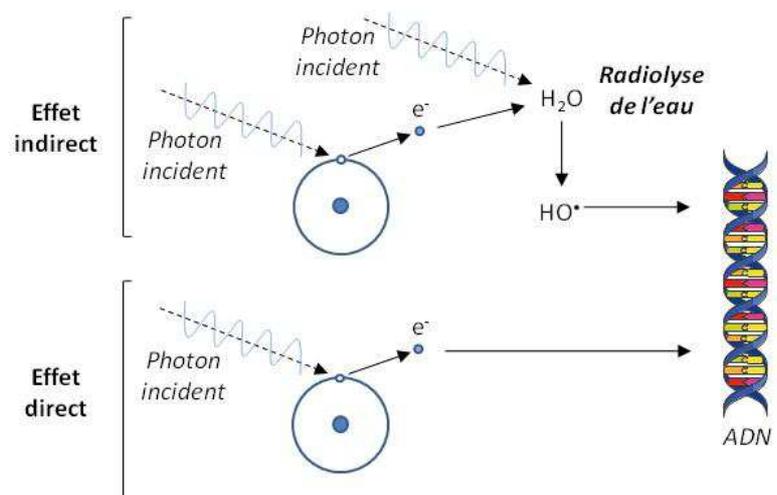


Figure n°2 : Principes des effets direct et indirect des rayonnements ionisants.

exciter et ioniser les molécules d'H₂O, conduisant ainsi à la formation de radicaux libres et de molécules. Ces événements sont extrêmement rapides et occurrent dans un laps de temps de l'ordre de la femto- à la microseconde, (**Figure n°3**). Les espèces générées, comprennent des espèces réactives de l'oxygène ou ROS (pour Reactive Oxygen Species), notamment : HO[•], O₂^{•-}, H₂O₂, etc... S'il existe un niveau basal de ROS endogènes dans la cellule qui permet une signalisation moléculaire essentielle, le niveau élevé de ROS générés lors des radiations aura un impact autrement plus délétère. Ils ont une forte réactivité avec les constituants biologiques (acides nucléiques, lipides, protéines) et créent un stress oxydant. Ils peuvent induire la cassure de liaison entre atomes, et par conséquent une altération des molécules, (*Scholes et al, 1953 ; Collinson et al, 1960 ; Azzam et al, 2012*).

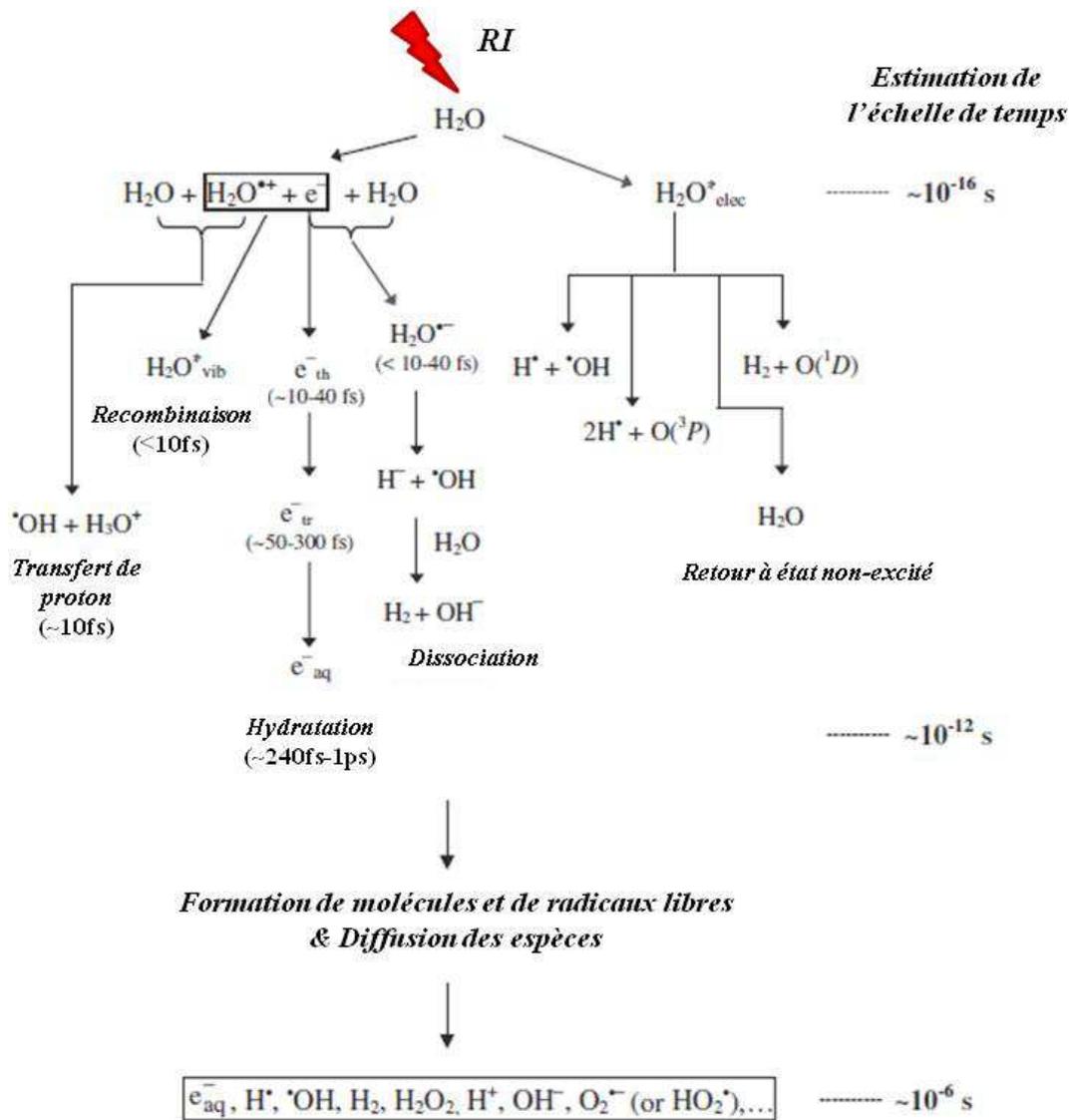


Figure n°3 : Evènements primaires de la radiolyse de l'eau.

Adapté de *Azzam et al, 2012*.

3. Effets biologiques des rayonnements ionisants

a Impacts structurels & biochimiques

i. Noyau & ADN

L'irradiation est capable d'engendrer une altération de la morphologie du noyau et de l'ADN. Il a été observé un élargissement visible dès les 30-60 premières minutes suivant l'irradiation et pouvant perdurer jusqu'à plusieurs jours/semaines, ainsi qu'une dilatation de la membrane nucléaire, (Montgomery *et al*, 1965 ; Somosy, 2000). Les altérations de la chromatine peuvent être observées sous forme d'agrégats. L'irradiation peut aussi engendrer des aberrations chromosomiques telles que des délétions et des translocations, pouvant conduire à une instabilité génomique. Les dommages de l'ADN ont un impact prépondérant. Ils surviennent sous différentes formes, (Figure n°4 ; Hoeijmakers, 2001) :

Les cassures double-brin – Les deux brins sont rompus, ce sont les dommages les plus délétères. S'ils sont non-réparés, ils entraînent la perte définitive de l'information génétique concernée. Il existe deux types de réparation. La première est la Recombinaison Homologue (RH) qui permet une réparation fidèle mais nécessite la présence de la chromatide sœur (phase S/G2). La seconde est la Jonction d'Extrémités Non-Homologue (NHEJ), qui est majoritaire et permet la ligature des deux brins rompus mais peut toutefois donner lieu à des erreurs ou à une mutation du gène concerné. La réparation des cassures double-brin survient rapidement. Le pic de signalisation des dommages survient généralement autour de 30 minutes/1 heure post-radiation et décroît au fur et à mesure de la réparation, (Kato *et al*, 2008 ; Martin *et al*, 2013).

Les cassures simple-brin – Un seul brin est rompu. La réparation des cassures simple-brin s'exécute généralement rapidement par le processus de Réparation par Excision de Base (BER). Or, si elle est mal exécutée ou altérée à nouveau, elle peut conduire à une cassure double-brin, (Caldecott, 2008).

Altérations des bases – Les bases peuvent être oxydées, altérées, voire pontées (« *cross-link* ») entre elles. La réparation de ces dommages survient généralement rapidement par processus de BER. Les pontages inter-brins peuvent nuire à la réplication, s'ils sont mal réparés, ils peuvent également conduire à l'apparition d'une cassure double-brin (Niedernhofer *et al*, 2004 ; Ding, Greenberg, 2007).

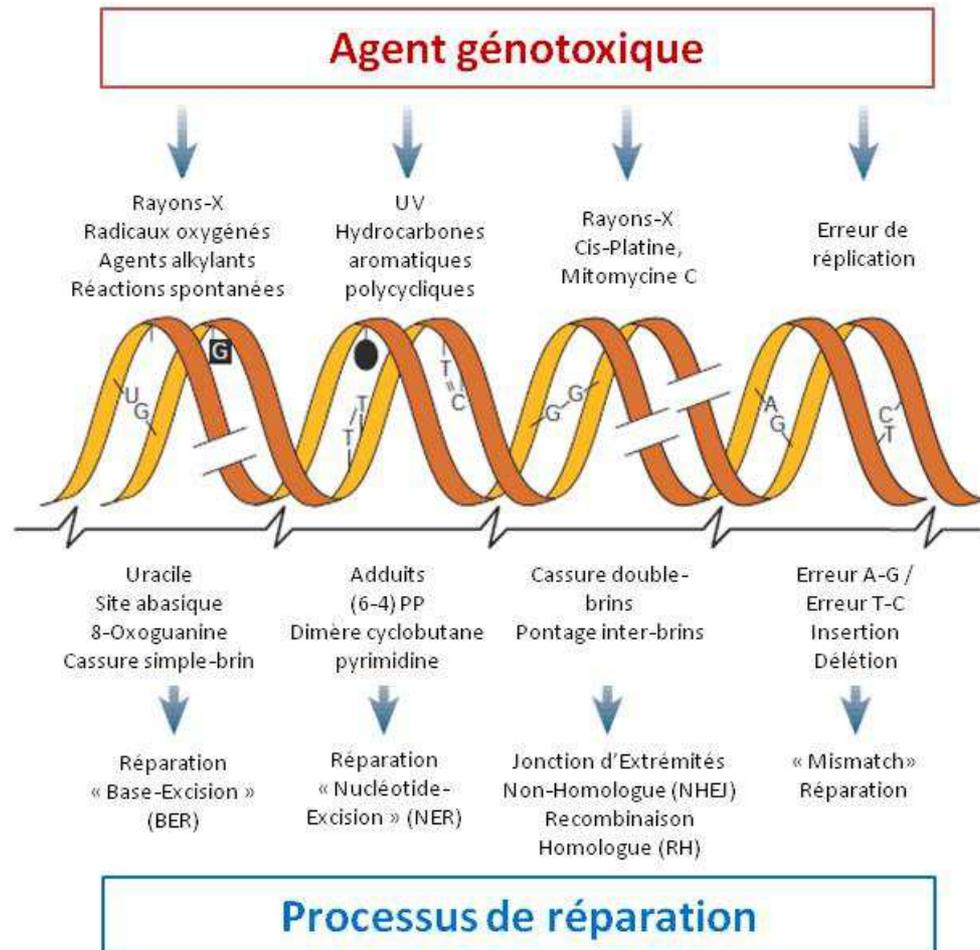


Figure n°4 : Les différents types de dommages de l'ADN.
Adapté de Hoeijmakers, 2001.

ii. Membranes plasmiques & Constituants lipidiques

Les bicouches lipidiques formant les membranes plasmiques sont composées de phospholipides (phosphoglycérides, sphingolipides, glycosyl-phosphatidyle inositol), de cholestérol, et de protéines périphériques ou transmembranaires organisées au sein de domaines lipidiques. L'altération des membranes après irradiation aura, tout comme l'altération de l'ADN, un impact majeur sur la cellule. Ces caractéristiques ont pu être identifiées en partie grâce à l'utilisation de vésicules lipidiques ou de membranes d'érythrocytes, (Grzelinska *et al*, 1979 ; Benderitter *et al*, 2003). L'irradiation induit notamment une peroxydation des lipides, des modulations du métabolisme des sphingolipides, et une réorganisation des microdomaines de la membrane.

La peroxydation des lipides – Sur le plan structurel, l'irradiation provoque en particulier une fragmentation et une peroxydation des lipides qui la compose. Les membranes plasmiques contiennent des lipides polyinsaturés présentant des double-liaisons sur certains de leurs carbones de leur chaîne carbonée. Ces carbones sont susceptibles de réagir avec les radicaux oxygénés produits lors de l'irradiation après radiolyse de l'eau. Ceci produit un radical lipidique qui pourra à son tour réagir avec une molécule d'O₂, conduisant ainsi à la formation d'un lipide hydroperoxydé. Les conséquences sont une altération de la fluidité des membranes plasmiques et de leur perméabilité, (Albanese, Dainiak, 2003).

Communication inter-cellulaire – La membrane plasmique contient des protéines de communication dites « jonctions Gap » constituées de Connexines. Après irradiation, ces jonctions permettent une diffusion des signaux radio-induits aux cellules voisines permettant la diffusion du stress oxydant et des dommages (Autsavapromporn *et al*, 2013 ; Feine *et al*, 2012). Egalement, l'irradiation conduit à une augmentation de la perméabilité inter-cellulaire, phénomène bien établi chez les cellules endothéliales, conduisant à une perturbation de l'équilibre osmotique entre les compartiments et à l'apparition de dysfonctions tissulaires, (Evans *et al*, 1986 ; Young *et al*, 2011 ; Fauquette *et al*, 2012).

Les Sphingolipides & Réorganisation des domaines lipidiques – Les sphingolipides sont caractérisés par une structure dérivée d'une longue chaîne sphingosine. Constituants essentiels de la membrane lipidique, ils peuvent être localisés au sein de microdomaines tels que les rafts ou les cavéoles. Les voies de synthèse de ces lipides sont diverses, (Figure n°5 ; Bartke *et al*, 2009). Certains d'entre-eux sont dits « bio-actifs » et sont largement impliqués dans les mécanismes de transduction de signaux cellulaires. Les plus étudiés sont le Céramide et la Sphingosine-1-Phosphate (S1P), dont les rôles sont antagonistes. En effet, si le Céramide est connu pour ces rôles notamment dans la mort cellulaire et la différenciation, la S1P a des effets opposés et contribue à la prolifération, la survie, la migration. L'irradiation est capable de déséquilibrer cette balance en induisant la génération de Céramide dès les premières minutes, suite à la translocation de l'enzyme Sphingomyélinase acide (ASMase) à la membrane. Ceci induit la mort cellulaire indépendamment des dommages de l'ADN et de p53. De la même façon, la déficience en ASMase induit une résistance à l'apoptose radioinduite, (Haimovitz-Friedman *et al*, 1994 ; Santana *et al*, 1996 ; Wright *et al*, 1996).

Les rafts sont des microdomaines lipidiques membranaires enrichis en sphingomyéline, céramide, cholestérol, phospholipides et en protéines membranaires. Il a pu être observé que

l'irradiation, tout comme d'autres stimuli (*e.g.* TNF α , ROS, UV), induit une redistribution des microdomaines à la surface des membranes, impliquant une fusion des *rafts* et conduisant à la formation de plateformes lipidiques permettant l'activation de transduction de signaux. En particulier, il a pu être observé que la relocalisation du Céramide au sein de plateformes se produisait via l'activation de l'ASMase par les ROS générés suite à l'irradiation (Bionda *et al*, 2007). Cette redistribution en plateformes peut permettre de rassembler à forte densité certains récepteurs membranaires conduisant ainsi l'activation et la transduction de signaux, (Cremesti *et al*, 2001 ; Grassmé *et al*, 2003 ; Bollinger *et al*, 2005 ; Rotolo *et al*, 2005 ; Corre *et al*, 2010 ; Stancevic, Kolesnick 2010).

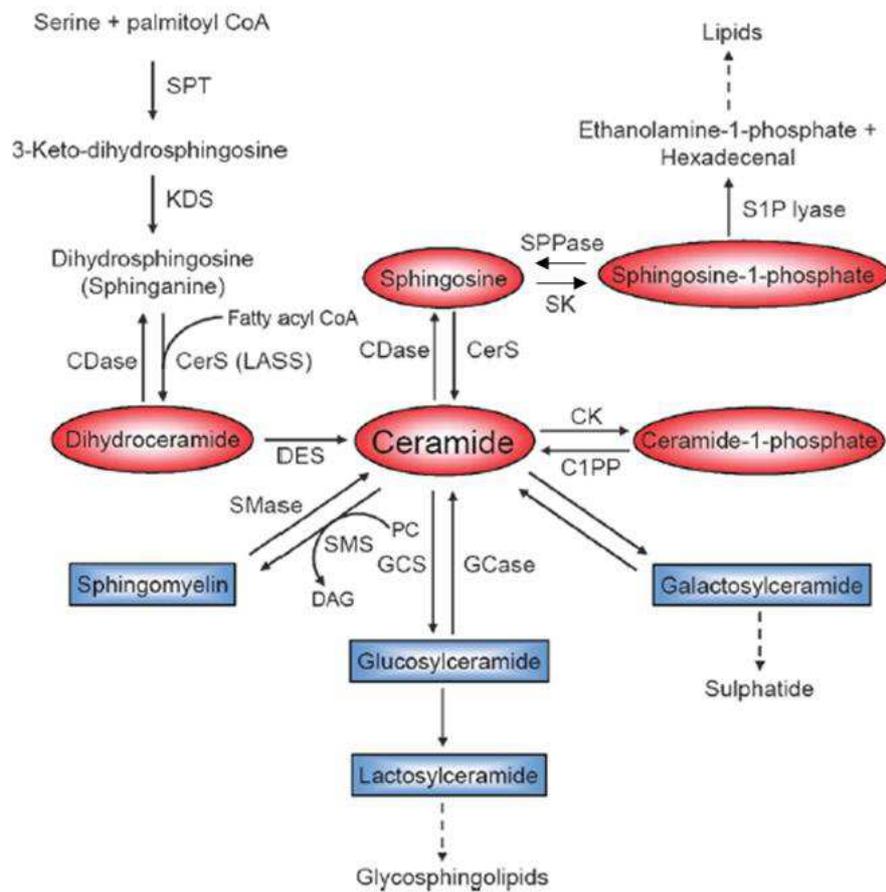


Figure n°5 : Métabolisme des Sphingolipides, (Bartke *et al*, 2009).

SPT, Serine palmitoyl transferase ; KDS, 3-keto-dihydrosphingosine reductase ; CDase, Ceramidase ; CerS, Ceramide synthase ; SK, Sphingosine kinase ; SPPase, Sphingosine phosphate phosphatase ; DES, Dihydroceramide desaturase ; SMase, Sphingomyelinase ; SMS, Sphingomyelin synthase ; DAG, Diacylglycerol ; GCS, Glucosylceramide synthase ; PC, Phosphatidylcholine ; GCCase, Glucosyl ceramidase ; CK, Ceramide kinase ; C1PP, C1P phosphatase.

iii. Organelles

L'irradiation entraîne également une altération de la structure et de la fonction des organelles cellulaires, (Somosy, 2000).

Mitochondrie – Selon le type cellulaire, les mitochondries occupent 4 à 25% du volume cellulaire. Elles sont le siège de la respiration cellulaire, et l'ADN mitochondrial contient 13 gènes sur 37 codant pour des sous-unités des complexes I (ou NADH-ubiquinone oxydoreductase), III (ou Ubiquinol ferricytochrome c oxydoreductase), IV (ou cytochrome c oxidase) et V (ou ATP synthase) de la chaîne respiratoire. Les sous-unités du complexe II (ou Succinate déshydrogénase ou Succinate-ubiquinone oxydoreductase) et les autres sous-unités des complexes I, III, IV et V sont codées par l'ADN nucléaire, (Figure n°6).

L'irradiation peut induire des dommages de l'ADN mitochondrial, altérer la respiration, et altérer la structure des mitochondries. Le stress oxydant radio-induit est autant mis en cause qu'il est aussi une conséquence. En effet, après irradiation, la mitochondrie présente des dysfonctions, ce qui entraîne la génération de ROS mitochondriaux (en particulier, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$). Il a pu être observé que l'irradiation peut induire une altération de l'activité des complexes I, II, et III, associée à une augmentation de la génération de superoxydes mitochondriaux et à une altération du potentiel membranaire. Ces phénomènes peuvent perdurer dans le temps et être associés à l'apparition de dysfonctions tissulaires via le maintien d'un stress oxydant et/ou de l'altération du métabolisme, (Pearce *et al*, 2001 ; Slane *et al*, 2006 ; Dayal *et al*, 2009 ; Aykin-Burns *et al*, 2011 ; Barjaktarovic *et al*, 2011 ; Azzam *et al*, 2012 ; Yamamori *et al*, 2012 ; Kam, Banati, 2013). Il a également été montré qu'une déficience dans le complexe I protège de la mort cellulaire radio-induite notamment via l'altération de l'expression de p53 et de son activité, (Compton *et al*, 2011).

Il a également pu être observé que la masse mitochondriale et le nombre de copies du génome mitochondrial sont augmentés après irradiation, mais il est toutefois suggéré qu'il s'agit d'un moyen de maintenir les fonctions des cellules irradiées. Il a été montré que les cellules $\rho^{(0)}$, dépourvues d'ADN mitochondrial et donc de chaîne respiratoire complète, sont plus résistantes au stress oxydant que les cellules non-déficientes, (Park *et al*, 2004). Cependant, ces cellules sont capables d'augmenter leur pouvoir antioxydant, notamment en produisant d'avantage de MnSOD (pour Manganese Superoxide Dismutase, ou SOD2, cf partie I-A-3-b-iv). Or, la surexpression de MnSOD permet une protection contre la cytotoxicité radio-induites, (Epperly *et al*, 1998, 2002, 2008 ; Murley *et al*, 2006 ; Kam, Banati, 2013).

L'irradiation conduit également à des modifications de la structure des mitochondries, (Flaks, Bresloff, 1966). Leur volume peut être augmenté. La qualité du réseau mitochondrial (fragmentation versus élongation) peut être modifiée. Il a pu être observé que l'irradiation induit chez le fibroblaste une augmentation persistante de la génération de superoxydes mitochondriaux (avec un pic à 3 jours post-irradiation), associé à une accélération de la fission mitochondriale dépendante de la protéine Drp1, (Kobashigawa *et al*, 2011). Il semble toutefois que ceci ne soit pas systématiquement observé, (Barjaktarovic *et al*, 2011). Il a également été montré qu'un traitement par H₂O₂ induit une fragmentation des mitochondries visible dans les premières heures, mais que la structure du réseau est rétablie les jours suivants faisant appel aux processus de fusion/fission et à la génération de nouvelles mitochondries, (Jendrach *et al*, 2008).

En conséquence, si l'irradiation entraîne une première vague de stress oxydant, il semble que les mitochondries endommagées peuvent ensuite être responsables d'une seconde vague pouvant persister dans le temps et participer à la mise en place d'un stress chronique.

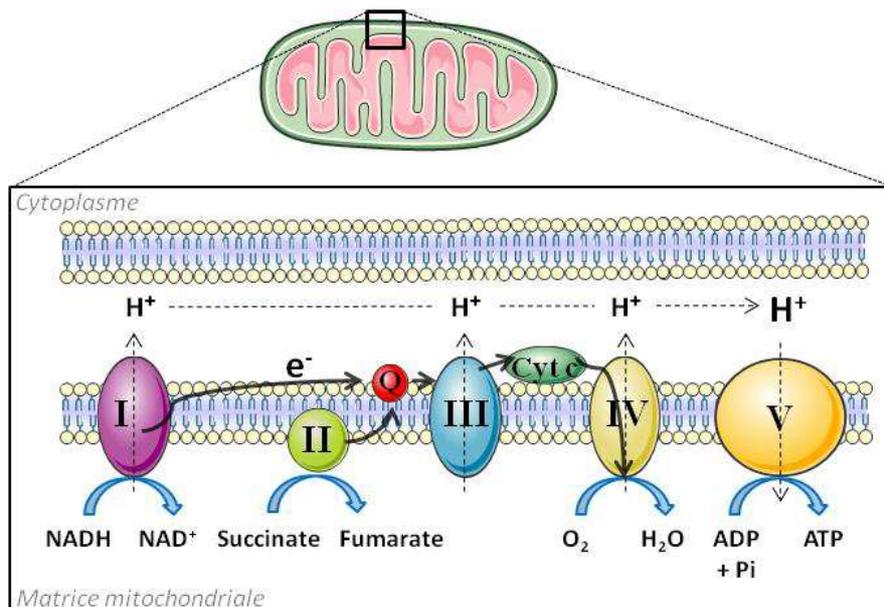


Figure n°6 : Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale et de ses complexes. Complexes **I** : NADH-ubiquinone oxydoreductase ; Complexe **II** : Succinate déshydrogénase ; Complexe **III** : Ubiquinol ferricytochrome c oxydoreductase ; Complexe **IV** : Cytochrome c oxydase ; Complexe **V** : ATP synthase ; **Q** : Coenzyme Q ; **Cyt c** : Cytochrome c.

Autres organelles – Brièvement, suite à l'irradiation, le nombre et le volume des lysosomes augmentent ainsi que l'activité des enzymes lysosomales. L'irradiation induit également une dilatation, une « vésicularisation », et une fragmentation du réticulum endoplasmique. L'irradiation induit une fragmentation en vésicules et un réarrangement de l'appareil de Golgi, (Somosy, 2000).

b Signalisations & devenir cellulaires

Selon la dose d'irradiation délivrée et les caractéristiques intrinsèques à chaque cellule ciblée – leur type cellulaire, leur fréquence de division, leur oxygénation, leur capacité de réparation des dommages, etc... – la réponse cellulaire sera différente.

i. Arrêt dans le cycle cellulaire

L'exposition des cellules aux radiations ionisantes entraînent un arrêt dans le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire eucaryote comprend quatre phases successives, la phase G1, la phase S de réplication, la phase G2 et la phase M de mitose, (**Figure n°7**). L'avancée dans le cycle est régulée par l'activité des complexes Cdk (pour Cycline dépendant kinase)-Cycline. L'expression des Cyclines varie au cours des phases du cycle conditionnant ainsi l'activité des Cdk. Globalement, l'activité des Cdk est aussi régulée par des protéines kinases comme Wee1 et CAK (pour Cdk Activating Kinase), par des protéines phosphatases Cdc25, et par des protéines inhibitrices CKI (pour Cdk inhibitor) telles que p21, p16, p27 et p57. Au cours du cycle, différents points de contrôle ou *checkpoints* sont présents et veille au maintien de

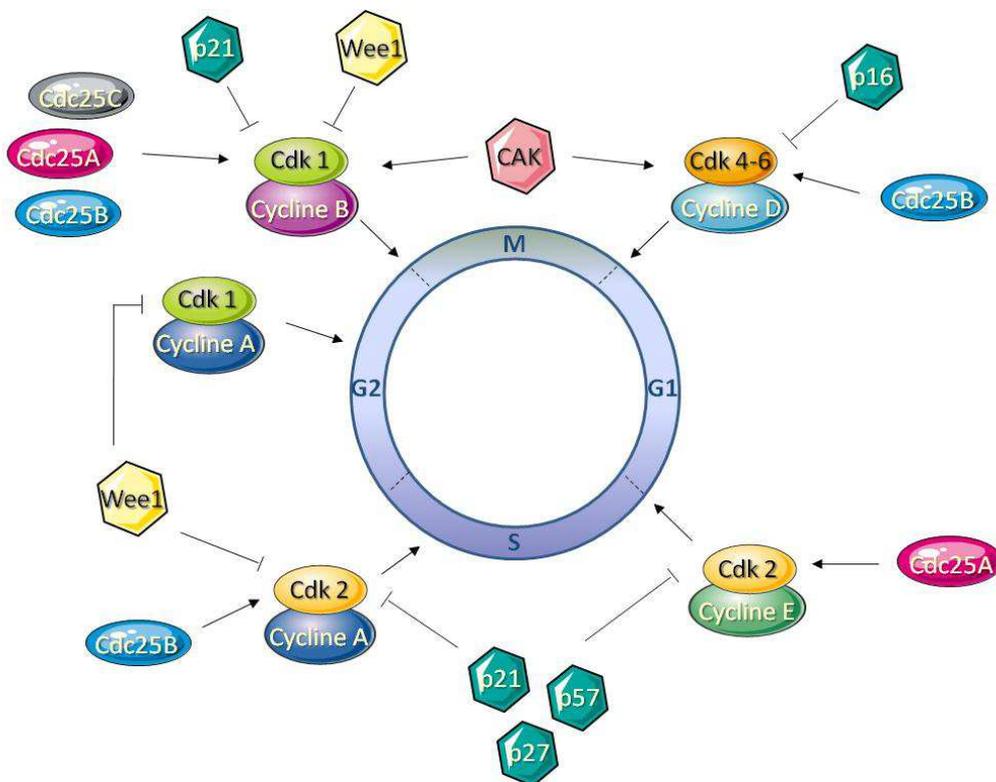


Figure n°7 : Mécanismes de contrôle du cycle cellulaire.

l'intégrité du génome. Ces différents *checkpoints* sont présent à la transition G1/S (*checkpoint* G1/S), dans la phase S (*checkpoint* intra-S), et à la transition G2/M (*checkpoint* G2/M). Ils sont notamment activés en présence des dommages de l'ADN ou d'autres défauts d'intégrité du génome. La réponse aux dommages passe dans un premier temps par une détection et une signalisation par des protéines « senseurs », et par l'activation de leurs cibles, (Kastan, Bartek, 2004 ; Houtgraaf *et al*, 2006). Les principaux senseurs sont deux membres de la famille des sérine/thréonine kinases PI3KK (pour Phosphatidylinositol 3-OH Kinase related Kinase) : la protéine ATM (pour Ataxia Telangiectasia Mutated) et la protéine ATR (pour Ataxia Telangiectasia and Rad 3 related protein), ainsi que leurs cofacteurs respectifs, (Lovejoy, Cortez, 2009).

La protéine ATR est davantage décrite pour être senseur des fourches de réplication bloquées. La stabilisation de ces fourches est permise par le recrutement des protéines RPA (pour Replication Protein A), ATRIP (pour ATR-Interacting Protein) et ATR, au niveau des zones simple-brin de l'ADN, (Zou, Elledge, 2003 ; Nam, Cortez, 2011). L'activation d'ATR se marque par sa localisation au niveau de ce site et par la phosphorylation sur la sérine 428. Cette activation permet notamment ensuite l'activation par phosphorylation de la protéine de contrôle du cycle Chk1 (pour Checkpoint kinase 1, sérine/thréonine kinase) sur la sérine 345, et par la phosphorylation de la protéine p53 sur la sérine 15 et de la protéine Rad17 sur les sérines 635 et 645, (Tibbetts *et al*, 1999 ; Bao *et al*, 2001). L'activation de Chk1 permet la phosphorylation des Cdc25 ce qui induit leur exclusion du noyau et leur dégradation. Ceci conduit à l'inhibition des complexes CDK-Cycline, bloquant ainsi l'avancée du cycle. L'activation de p53 conduit à l'inhibition de sa dégradation par Mdm2 (pour Mouse double minute 2), et à l'expression de p21. Ce dernier se lie aux complexes CDK-Cycline et les inhibent, contribuant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire.

La protéine ATM tient quand à elle un rôle clé dans la signalisation des dommages de l'ADN. Lors de la présence de cassures double-brins, ATM et le complexe MRN (constitué des protéines Mre11, Rad50, et Nbs1 (pour Nijmegen Breakage Syndrom 1)) sont recrutés au niveau du site de cassure. L'activation d'ATM se fait par reconnaissance du dommage ADN et par autophosphorylation sur la sérine 1981. Elle passe ainsi d'une forme dimérique inactive à une forme monomérique active, (Bakkenist, Kastan, 2003). L'activation d'ATM est dépendante de son interaction avec le complexe MRN et l'ADN, (Uziel *et al*, 2003). Cependant, ce signal doit être amplifié pour avoir un impact. Pour cela, ATM va phosphoryler les histones H2AX sur la sérine 139 (γ H2AX) sur plusieurs mégabases au niveau des cassures, (Rogakou *et al*, 1999). Ceci permet le remodelage de la chromatine et le recrutement

des substrats d'ATM et des facteurs de réparation de l'ADN, (Fernandez-Capetillo *et al*, 2004 ; Bonner *et al*, 2008). Les substrats d'ATM sont nombreux et peuvent notamment conduire à l'arrêt du cycle, la réparation de l'ADN et la mort cellulaire, (Kurz, Lees-Miller, 2004 ; Shiloh, Ziv, 2013). Dans le cas de l'arrêt du cycle, ATM va notamment activer la protéine Chk2 (pour Checkpoint kinase 2, sérine/thréonine kinase) par phosphorylation sur la thréonine 68, et p53 sur la sérine 15. Chk2 peut également phosphoryler p53 sur la sérine 20. La protéine p53 phosphorylée n'est plus dégradée par Mdm2, et permet alors l'expression de p21. Chk2 et p21 vont alors inhiber l'activité des CDK-Cycline, conduisant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire. Il a aussi été montré qu'ATM peut réguler en phase S/G2 le recrutement d'ATR à la chromatine pour le contrôle du cycle dépendant de Chk1 suite aux dommages de l'ADN après irradiation, (Cuadrado *et al*, 2006).

Il est à noter que si les substrats Chk préférentiels sont respectivement Chk2 pour ATM et Chk1 pour ATR, il a été montré qu'ATM est également capable d'activer Chk1 et qu'ATR peut activer Chk2, (Gatei *et al*, 2003 ; Pabla *et al*, 2008). De même, la phosphorylation de H2AX peut aussi être effectuée par ATR au niveau des fourches de réplication bloquées.

ii. Réparation des dommages radio-induits de l'ADN

Nous décrivons ici les principales voies de réparations impliquées en réponse aux dommages de l'ADN induits par les rayonnements ionisants, (**Figure n°4**).

La Jonction d'Extrémités Non-Homologues (NHEJ) – C'est la voie de réparation majoritaire des cassures double-brins (CDB), (Wang, Lees-Miller, 2013). Elle est mobilisable dans toutes les phases du cycle cellulaire. Elle s'effectue en trois étapes : dans un premier temps, les extrémités libres de l'ADN sont reconnues et stabilisées par le recrutement des protéines Ku70 et Ku80, qui vont se complexer avec la protéine DNA-PKcs (pour DNA-PK catalytic subunit, membre des PI3KK), formant ainsi la DNA-PK, (**Figure n°8**). Ceci permet la protection des extrémités libres d'ADN contre l'action d'exonucléases, mais permet aussi aux deux complexes DNA-PK sur chaque extrémités de s'homodimériser, et ainsi de stabiliser les extrémités libres et de recruter les facteurs de réparation des étapes suivantes. Le recrutement à l'ADN et la complexation avec Ku70/80 permettent à eux seuls d'activer la fonction kinase de la DNA-PKcs, (Gottlieb, Jackson, 1993 ; DeFazio *et al*, 2002).

La détection de l'activation de la DNA-PKcs au cours de la réparation se détermine par son autophosphorylation sur la sérine 2056 (Uematsu *et al*, 2007). La protéine ATM peut également phosphoryler la DNA-PKcs sur le *cluster* de la thréonine 2609, (Chen *et al*, 2007). L'autophosphorylation sur la sérine 2056 et la phosphorylation sur la thréonine 2609 permettent de laisser l'accès du site de cassure aux autres protéines de réparation via un changement de conformation, et leur activité, (Davis *et al*, 2010).

Dans un second temps, une fois la DNA-PK activée, des protéines de « maturation » sont recrutées. Ceux sont les ADN polymérases μ et λ , la polynucléotide kinase (PNK), et la protéine endonucléase Artémis. Ces protéines vont permettre de « nettoyer » les extrémités libres et de former des extrémités franches. Enfin, dans un dernier temps, la DNA-PK va permettre le recrutement des protéines du complexe XRCC4 (pour X-ray Repair Cross

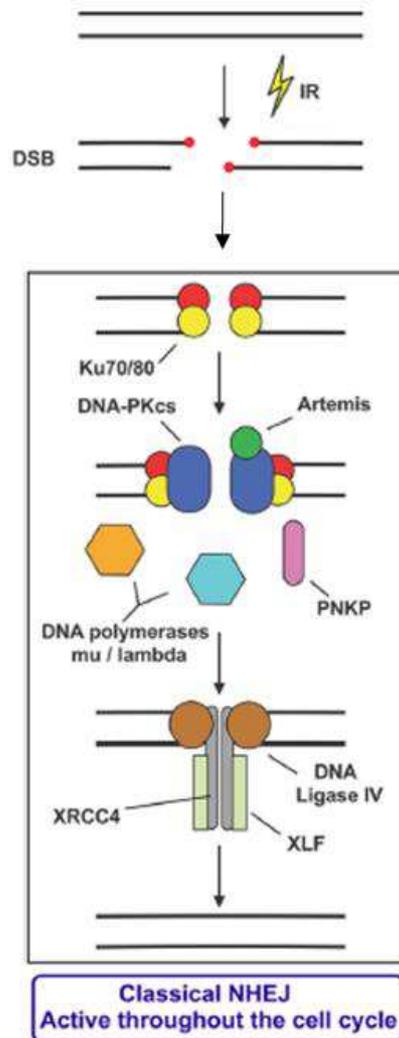


Figure n°8 : Représentation du mécanisme de la réparation des cassures double-brin par Jonction d'Extrémités Non-Homologue (NHEJ).

Adapté de Wang, Lees-Miller, 2013.

Complementing protein4)-ADN Ligase IV-XLF (pour XRCC4 like factor, ou Cernunnos) sur le site de cassure afin de ligaturer les deux extrémités franches.

Il est à noter que l'étape de « nettoyage » de la cassure est susceptible de donner lieu à une modification de la séquence génétique en question par délétion/insertion de bases. La NHEJ peut donc donner lieu à l'apparition de mutations.

Egalement, la DNA-PKcs possède des substrats communs avec ATM et ATR. Elle est capable notamment de phosphoryler H2AX sur la sérine 139 (Stiff *et al*, 2004) et de phosphoryler p53 sur la sérine 15 et 37, (Lees-Miller *et al*, 1992 ; Hill, Lee, 2010).

La Recombinaison Homologue – Cette voie peut se réaliser lorsque la chromatide sœur est présente (phase S-G2), et permet la réparation des dommages sans causer de perte d'information génétique. Elle nécessite trois étapes, (Figure n°9 ; Hoeijmakers, 2001). La première étape est la phase d'initiation et met en jeu l'activité exonucléase 5'-3' du complexe MRN (substrat d'ATM) afin d'exposer les extrémités 3'. Les protéines RPA vont alors se positionner sur ces extrémités afin de les stabiliser et faciliter le recrutement de Rad51 sur

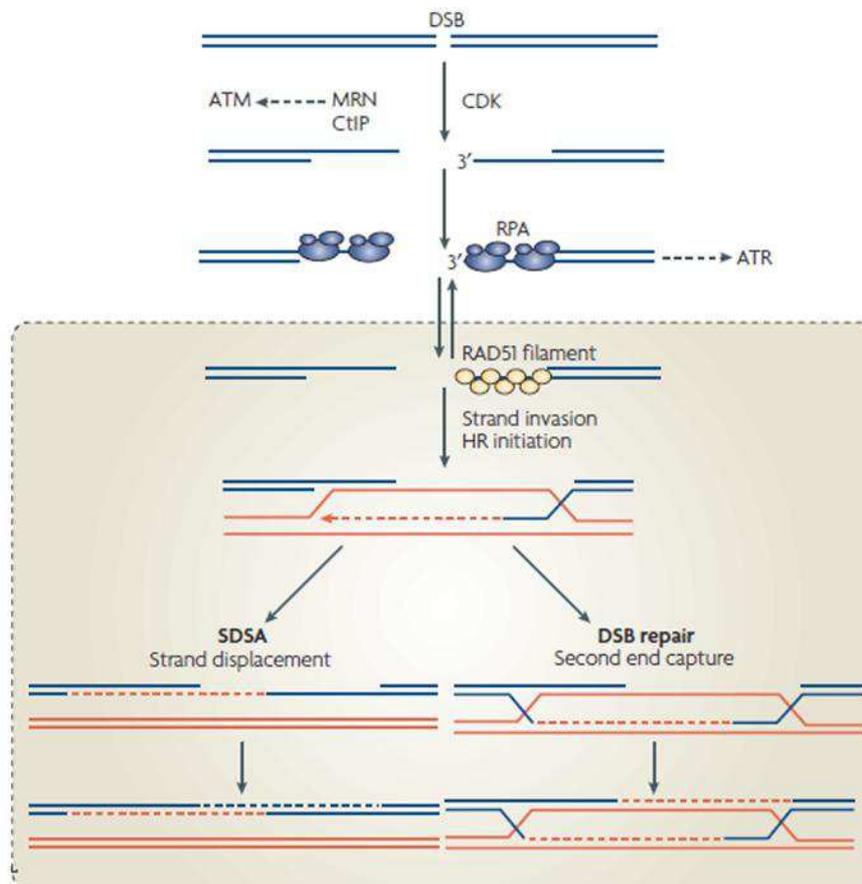


Figure n°9 : Représentation du mécanisme de la réparation des cassures double-brin par Recombinaison Homologue, (Branzei, Foiani, 2008).

l'ADN. Ce recrutement est également stimulé par les protéines BRCA1 et BRCA2 (pour Breast Cancer 1 & 2) qui peuvent être elles-mêmes activées par ATM. Rad51 va alors pouvoir amorcer la recherche de la chromatide sœur avec l'aide de Rad52 et Rad54, afin de former une jonction d'Holliday. Les brins stabilisés vont alors pouvoir interagir avec les brins de la chromatide sœur, c'est la phase d'appariement. Enfin, pendant la dernière phase, la phase de résolution, les polymérase ADN δ et ϵ vont amorcer la synthèse d'ADN, et une fois la polymérisation terminée, la jonction d'Holliday va se refermer et la ligature des brins néo-formés se fait par l'ADN ligase I.

La Réparation par Excision de Base (BER) – Ce processus permet la réparation des cassures simple-brin et des altérations de bases, (**Figure n°10** ; Caldecott, 2008). Il tient un rôle important dans le maintien continu de l'intégrité du génome. Lorsqu'une base est altérée, une ADN glycosylase entre en jeu afin de l'éliminer et crée ainsi un site abasique. Ce site est alors reconnu par l'endonucléase APE1 (pour Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1) qui va hydrolyser le lien 5' phosphodiester, créant ainsi une cassure simple-brin. Cette cassure est alors reconnue et signalée par PARP1 (pour Poly-ADP Ribose Polymerase 1) et PNK (pour

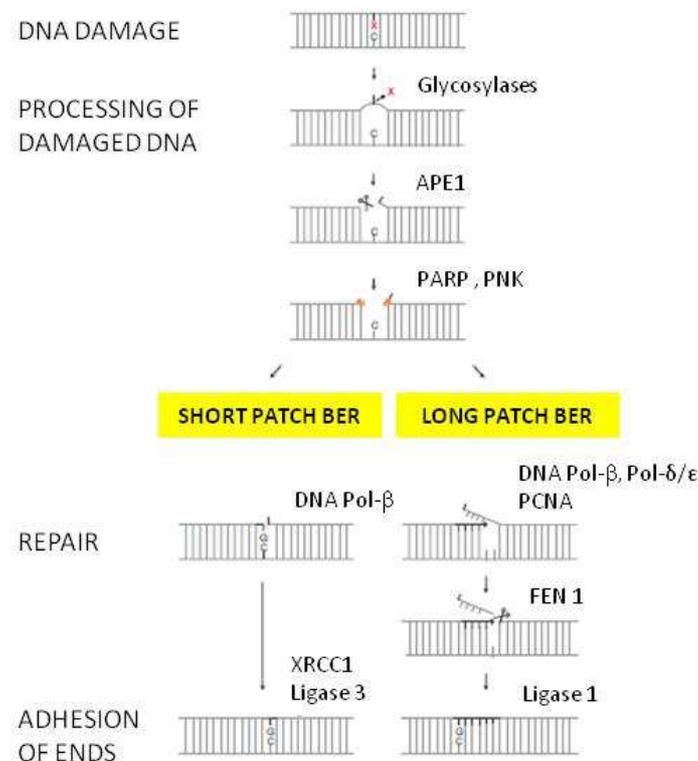


Figure n°10 : Représentation du mécanisme de Réparation par Excision de Base (BER).
Adapté de Houtgraaf *et al*, 2006.

Polynucleotide Kinase), et va pouvoir être réparée par *Short Patch BER* ou par *Long Patch BER*. Le *Short Patch BER* ou BER à « brèche courte » est le processus majoritaire. Il met en jeu l'ADN Polymérase β et XRCC1 qui vont remplacer le nucléotide manquant, et l'ADN Ligase III qui ligaturera le brin. Le *Long Patch BER* ou BER à « brèche longue » est le processus alternatif. Il met en jeu l'ADN Polymérase ϵ ou δ et PCNA (pour Proliferating Cell Nuclear Antigen) qui vont pouvoir resynthétiser le fragment d'ADN porteur de la lésion, (2 à 10 bases). Ensuite l'endonucléase FEN1 (pour Flap Structure-Specific Endonuclease 1) incise le brin lésé, et l'ADN Ligase I ligature le brin néo-formé.

Foyers de cassures double-brins – En pratique, la phosphorylation de H2AX est couramment utilisée pour la détection des cassures double-brins (ou de fourches de réplication bloquée si la phosphorylation est due à ATR) qui sont alors visibles sous forme de foyers. Les foyers d'autres facteurs de la signalisation/réparation tel qu'ATM phosphorylé, Nbs1, 53BP1, etc... sont aussi utilisés afin de confirmer la nature du dommage, (Bonner *et al*, 2008).

Signalisation en absence de cassures – L'activation des protéines de réponses aux dommages de l'ADN n'est pas strictement dépendante des cassures double-brin de l'ADN. Une modification de l'organisation de la chromatine est susceptible d'activer ces voies en absence de cassure. En effet, les travaux de Soutoglou & Misteli en 2008 ont montré l'activation des voies dépendantes d'ATM et de la DNA-PK à l'aide d'un système forcé de surexpression et d'association stable à la chromatine de cofacteurs, (e.g. ATM, Nbs1, Mre11, MDC1...). De plus, Bakkenist & Kastan en 2003 ont montré qu'une modification de la structure de la chromatine à l'aide de Chloroquine (intercalant de l'ADN) ou de Trichostatine A (inhibiteur d'histone déacetylase) permet l'activation d'ATM. Alors, le signal d'ATM phosphorylé sera visible sous forme diffuse dans le noyau et non sous forme de foyers. Un stress hypoxique pourra également présenter ce profil, (Bencokova *et al*, 2008). Il a également été montré qu'un stress hypoxique entraîne des modifications de la chromatine activant DNA-PKcs de la même façon qu'un traitement à la Trichostatine A, et que l'utilisation d'Acide Anacardique (inhibiteur d'histone acetyl transferase) permet de contrecarrer l'activation de DNA-PKcs en hypoxie, (Bouquet *et al*, 2011).

Ainsi, le remodelage de la chromatine est un point clé dans l'activation des protéines majeures de la réparation et de leurs substrats.

iii. Mort cellulaire radio-induite

Les conséquences délétères induites par les radiations ionisantes résident essentiellement dans l'altération des membranes et de l'ADN, et dans la signalisation qui en résulte. En outre, ces altérations, si elles ne sont pas réparées ou tolérées, contribuent à la mort de la cellule. Cette mort cellulaire survient principalement sous deux formes : une mort cellulaire programmée dite « pré-mitotique » ou apoptose ; ou, une mort cellulaire post-mitotique, passive, qui survient face à la présence de dommages ADN non-réparés et/ou d'aberrations chromosomiques, conduisant alors à une mitose abortive.

iiia. L'apoptose

Ce processus de mort cellulaire est un mécanisme cytolitique programmé qui survient dans les premières heures post-irradiation. Il s'accompagne d'un arrondissement et d'une rétractation de la cellule, d'une condensation de la chromatine, une exposition externe des phosphatidylsérines, et d'une fragmentation de l'ADN (par environ 200pb) et du noyau. L'apoptose met en jeu la fuite du Cytochrome c de la mitochondrie et l'activation de protéases, les Caspases (pour Cystein Aspartic acid specific protease), qui clivent un grand nombre de cibles dont les Lamines, la PARP, (pour Poly-ADP Ribose Polymérase), et l'ICAD (pour Inhibitor of Caspase activated DNase). Ceci aboutit à la fragmentation cellulaire, la

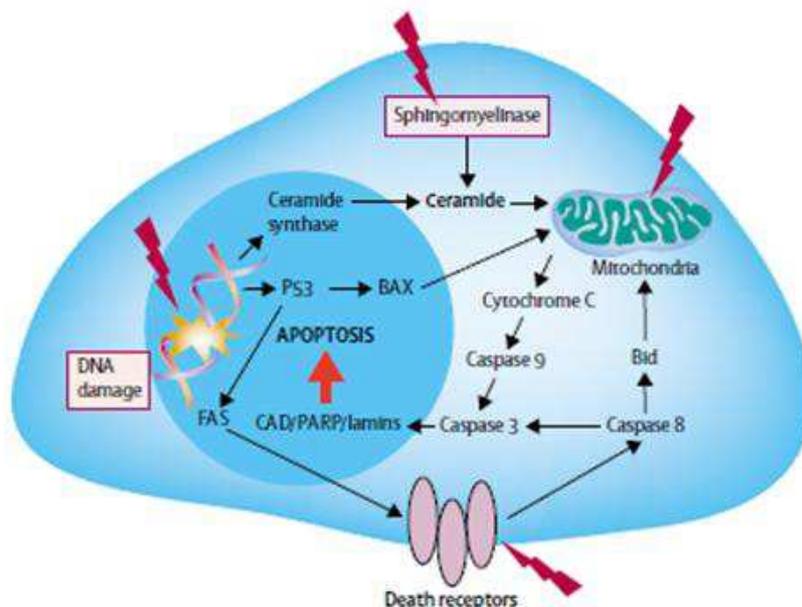


Figure n°11 : Apoptose radio-induite, (Prise *et al*, 2005).

formation de corps apoptotiques et la destruction de la cellule. Il existe une voie d'apoptose dite « extrinsèque », qui dépend de l'activation de récepteurs de mort membranaire par leur ligand (*e.g.* Fas/Fas-ligand), et une voie dite « intrinsèque », qui dépend du relargage de Cytochrome c par la mitochondrie, (**Figure n°11**). L'activation de ces voies, qui dépend du contexte cellulaire, peut avoir différentes origines, (*Zhou et al, 2008*) :

La voie d'activation dépendante de la signalisation nucléaire et de p53 – La présence de dommages de l'ADN va en particulier permettre une stabilisation, une activation et une augmentation de l'expression du facteur de transcription p53. Non seulement l'activité de p53 peut conduire à l'arrêt dans le cycle cellulaire via l'induction de l'expression de p21, mais peut conduire aussi à l'apoptose, si les dommages sont trop importants, via l'induction de l'expression de Fas, ou l'induction de l'expression de facteurs pro-apoptotiques et la répression de facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, (*cf. plus bas ; e.g. Bax, Bcl-2, Bcl-xL, Noxa, Puma ; Figure n°11 & 15*). L'activation de p53 sera notamment possible via la signalisation dépendante d'ATM et/ou ATR soit directement par phosphorylation de p53, soit via l'inhibition de Mdm2. En effet, Mdm2 se fixe à p53 non-phosphorylé sur son domaine de transactivation et bloque son activité transcriptionnelle, et induit sa dégradation par le protéasome. La protéine p53 est également capable d'induire l'expression de Mdm2. Par conséquent, l'augmentation de p53 après irradiation pourra conduire à une augmentation de Mdm2 formant alors une boucle de régulation négative sur p53, (*Lowe et al, 1993 ; Newsheeh, Yang, 2012 ; Shiloh, Ziv, 2013*).

La voie d'activation dépendante des récepteurs de mort – L'activation de ces récepteurs par la liaison de leur ligand conduit à leur oligomérisation et à l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose via l'activation de la Caspase 8, (**Figure n°11**). Par exemple, après irradiation, l'activité de p53 est capable d'induire l'expression du récepteur Fas. Fas (ou CD95 ou APO-1), appartient à famille des récepteurs du TNF, (pour Tumor Necrosis Factor). L'irradiation peut également activer Fas directement à la membrane par la formation de *clusters*, indépendamment de Fas-ligand. D'autres types de ligand-récepteurs de mort peuvent être activés sous irradiation, par exemple, TRAIL (pour TNF-related apoptosis inducing ligand), et DR5, (pour Death Receptor 5), (*Sheard et al, 1997, 2003 ; Niemöller, Belka, 2009*).

La voie d'activation dépendante de la génération du Céramide à la membrane – Comme énoncé précédemment, il a été montré que les radiations engendrent dès les premières minutes une translocation de l'ASMase à la membrane, indépendamment des dommages de l'ADN et

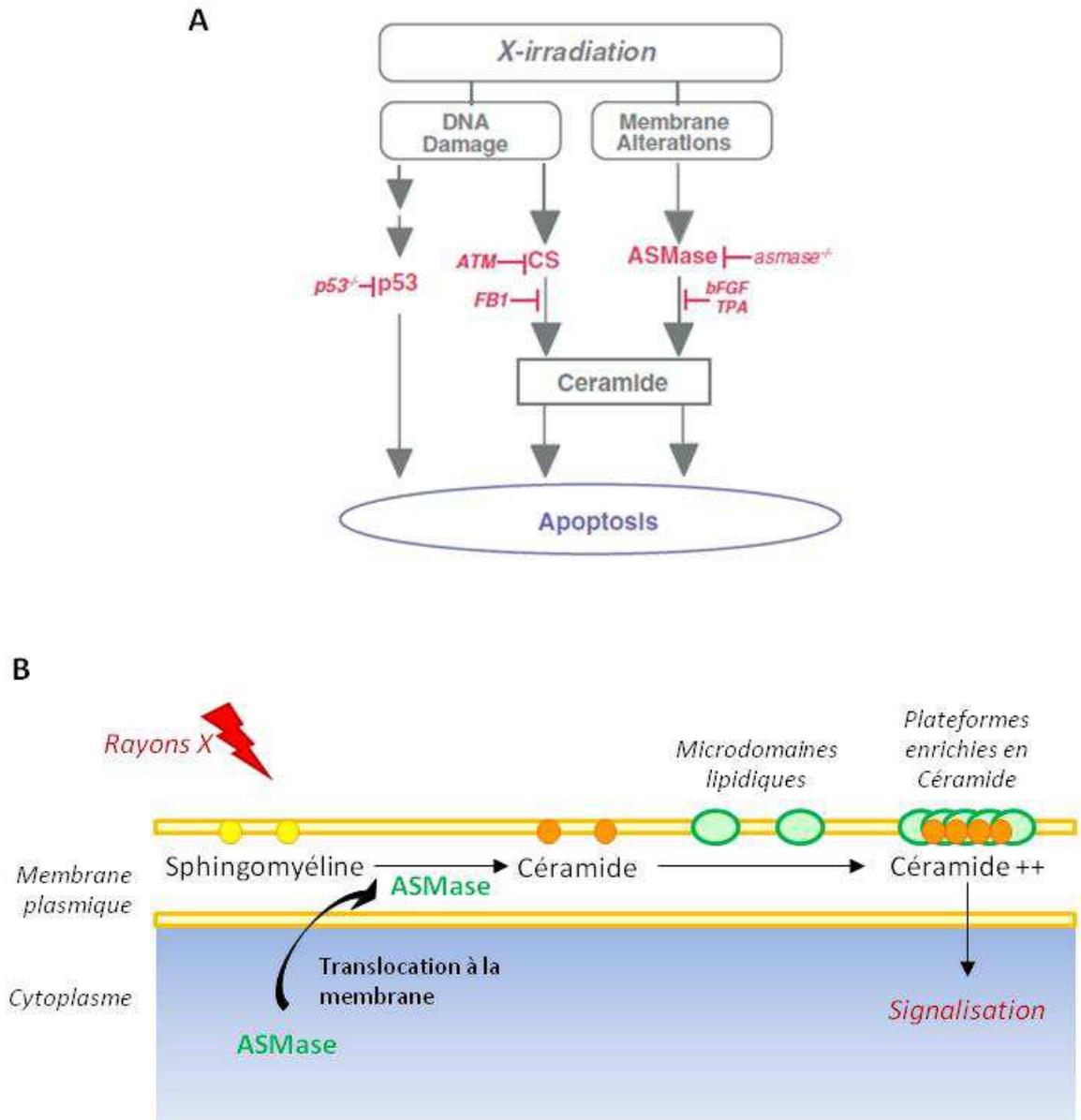


Figure n°12 : Apoptose radio-induite & Céramide.

A. Apoptose radio-induite, (Kolesnick, Fuks, 2003).

B. Translocation membranaire de l'ASMase et génération de Céramide.

de p53, conduisant ainsi à la conversion de la sphingomyéline en Céramide, (Haimovitz-Freidman *et al*, 1994 ; Kolesnick *et al*, 1994 ; Kolesnick, Fuks, 2003 ; Beckham *et al*, 2013). Le Céramide généré peut alors être relogé au sein de plateformes lipidiques induisant ainsi l'activation de voies de signalisation conduisant à l'apoptose, (**Figure n°12A & B**). Vit & Rosselli en 2003, ont montré chez les lymphoblastes que cette mort cellulaire dépendante du Céramide pouvait également dépendre d'une synthèse *de novo* via l'activation de Céramide Synthase (CS) après dommages de l'ADN. Il s'agit ici d'une seconde vague de Céramide

survenant dans les heures post-irradiation, et dont l'apparition est dépendante de la première vague dépendante de l'ASMase. S'ils montrent aussi une dépendance d'ATM dans l'activation de la CS, *Liao et coll*, en 1999 montrent au contraire qu'ATM est un répresseur de la CS, (**Figure n°12A**).

La voie de mort dépendante du Céramide revêt une importance chez les cellules présentant une forte activité de l'ASMase, en particulier, les cellules endothéliales, mais aussi les lymphoblastes, les pneumocytes, les fibroblastes, (*Santana et al*, 1996 ; *Liu et al*, 1997 ; *Marathe et al*, 1998). De plus, contrairement aux cellules cyclantes dont l'impact majeur des radiations passera par une mort post-mitotique, la voie dépendante du Céramide concernera les cellules cyclantes comme les cellules non-cyclantes. Le type cellulaire conditionnera également la dépendance de la voie de mort empruntée : p53 versus ASMase. Par exemple, les cellules endothéliales seront protégées de la mort cellulaire radio-induite chez les souris *asmase*^{-/-} mais ne le seront pas chez les souris *p53*^{-/-}. Inversement, les thymocytes seront protégés de la mort cellulaire radio-induite chez les souris *p53*^{-/-} mais ne le seront pas chez les souris *asmase*^{-/-}, (**Figure n°13**). Une déficience en ASMase, et donc en Céramide, peut

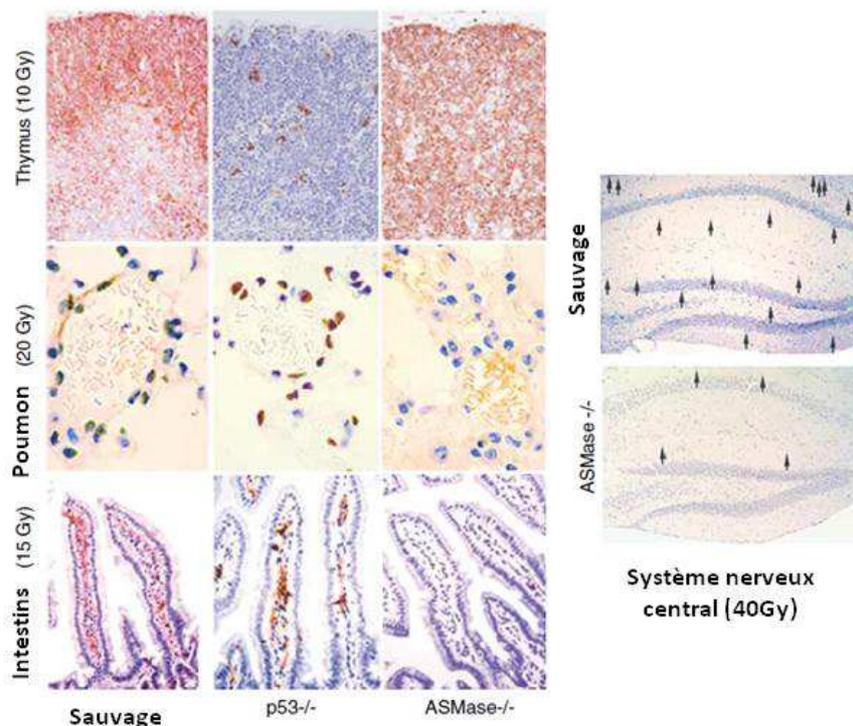


Figure n°13 : Indépendance des voies p53 et ASMase.

Adapté de *Kolesnick, Fuks*, 2003, (*Santana et al*, 1996 ; *Peña et al*, 2000 ; *Paris et al*, 2001). Marquage des cellules apoptotiques par TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labelling ; marquage marron) sur tissus de thymus, poumon (endothélium), intestin (endothélium), et système nerveux central (endothélium), de souris sauvage, *p53*^{-/-} ou *asmase*^{-/-}, à 4 à 10h post-irradiation corporelle totale.

donc permettre une résistance à l'apoptose radio-induite selon le type cellulaire, (Santana *et al*, 1996 ; Peña *et al*, 2000 ; Paris *et al*, 2001 ; Lozano *et al*, 2001 ; Kolesnick, Fuks, 2003 ; Beckham *et al*, 2013). La radioprotection des cellules *asmase*^{-/-} peut être levée par addition de Céramide exogène, (Lozano *et al*, 2001). Inversement, la surexpression de l'ASMase augmente la mort cellulaire après irradiation, (Smith, Schuchman, 2008). Également, l'utilisation d'anticorps anti-Céramide permet une inhibition de l'apoptose endothéliale en inhibant la formation de plateformes enrichies en Céramide, (Rotolo *et al*, 2012).

De plus, il a également été montré une corrélation entre radiorésistance et défaut de formation de larges plateformes membranaires contenant du Céramide ; ceci étant associé à un défaut d'activation et de translocation de l'ASMase. Ces cellules montrent également un fort pouvoir anti-oxydant (Glutathion), et un traitement pro-oxydant permet de contrecarrer la radiorésistance et de réactiver la voie de l'ASMase, (Bionda *et al*, 2007).

La signalisation pro-apoptotique engagée une fois le Céramide généré demande encore à être mieux décrite. Cependant, il a pu être montré que son rôle de second messager va notamment induire l'activité de facteur pro-apoptotiques, en particulier Bax et Bak, (cf plus bas). L'extinction *in vivo* de Bax ou de Bak suffit à bloquer la mort des cellules endothéliales intestinales murines après irradiation sur corps entier, (Rotolo *et al*, 2008). Le Céramide stimule l'incorporation de Bax dans la membrane mitochondriale externe, activant ainsi le relargage de Cytochrome c et l'activation de la Caspase 3, (Kim *et al*, 2001 ; Lee *et al*, 2011). De plus, dans les cellules *asmase*^{-/-}, Bax ne se réorganise pas à la mitochondrie, et il n'y a pas de relargage de Cytochrome c. Ceci peut être rétabli par l'addition de Céramide ou par transfection avec l'*asmase*, montrant ainsi l'importance de l'axe ASMase/Céramide dans l'activation de Bax et l'engagement de l'apoptose, (Kashkar *et al*, 2005).

Il a également été décrit suite à la génération de Céramide, une activation de la voie JNK (Verheij *et al*, 1998), et une inhibition de la voie PI3K/AKT, (Zundel, Giaccia, 1998), toutes deux favorables à une signalisation pro-apoptotique.

La voie d'activation dépendante de l'atteinte directe des mitochondries – L'irradiation peut provoquer aussi une altération directe de la mitochondrie susceptible de conduire au relargage de Cytochrome c. L'utilisation de mitochondries isolées et irradiées en traitement sur un système cytosols/noyaux non-irradiés, suffit à induire une réponse apoptotique, (Taneja *et al*, 2001). D'autre part, la mitochondrie, comme la membrane plasmique, contient du Céramide, (Bionda *et al*, 2004). Le Céramide peut former des canaux au sein de la membrane mitochondriale et provoquer le relargage des protéines intermembranaires comme le

Cytochrome c, (Siskind *et al*, 2006). Il a pu être montré en réponse aux radiations, que sa réorganisation membranaire régule la redistribution et l'oligomérisation de Bax, (Lee *et al*, 2011).

Importance des protéines de la famille Bcl-2 – La régulation de l'apoptose est grandement attribuée à une famille de protéines : les protéines de la famille Bcl-2 (pour B-cell lymphoma-2) ou protéines à domaine BH3, (**Figure n°14**). Ces protéines ont un pouvoir anti-apoptotique (protéines à « domaine BH4 ») ou pro-apoptotique (protéines à « multi-domaines » et à « domaine BH3 seul ») et agissent principalement par séquestration/libération. En effet, en s'oligomérisant entre elles ou en interagissant avec d'autres cibles, notamment p53, ces protéines augmentent ou répriment leurs activités. L'oligomérisation des protéines pro-apoptotiques Bax (pour Bcl-2 associated X protein) et Bak (pour Bcl-2 homologous antagonist/killer), permet le relargage de Cytochrome c au niveau de la mitochondrie, et l'activation des Caspases. Les protéines anti-apoptotiques à « domaine BH4 » telles que Bcl-2 et Bcl-xL (pour B-cell lymphoma-extra large) peuvent se complexer aux protéines à « multi-domaines » et les inactiver, permettant ainsi le maintien du potentiel membranaire mitochondrial, (Chipuk *et al*, 2004 ; Leu *et al*, 2004 ; Yip, Reed, 2008 ; Matissek *et al*, 2013 ; **Figure n°15**).

Par ailleurs, les protéines de la famille Bcl-2 ont également un rôle dans la régulation de la dynamique mitochondriale : Bax et Bak permettent notamment d'activer des protéines de fission telles que Drp1 (pour Dynamin-related GTPase 1) ou d'inhiber des protéines de fusion telles que Mfn1 et 2 (pour Mitofusin 1/2), ceci pouvant favoriser l'apoptose, (Rolland, Conradt, 2010).

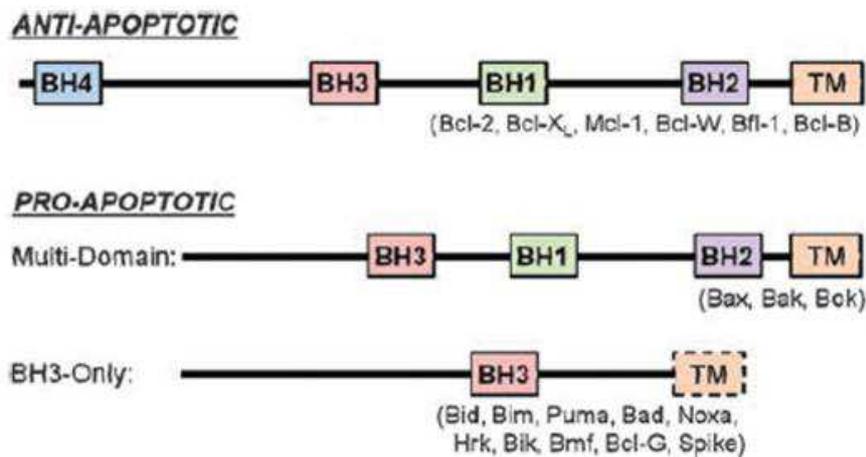


Figure n°14 : Structure des protéines de la famille Bcl-2, (Yip, Reed, 2008).

Aussi, si la stabilisation de l'expression de p53 est capable d'induire l'expression de protéines comme Bax, elle conduit aussi à la suppression de l'expression Bcl-2, activant ainsi d'autant plus le processus d'apoptose, (Harms *et al*, 2004). Dans ce sens, la mutation chez la souris des protéines Bcl-2, Bcl-xL ou Bcl-w provoque une forte radiosensibilité, et le *KO* (pour *Knock Out*, invalidation du gène) de Bax et Bak provoque une forte radiorésistance. Il est d'ailleurs montré pour de nombreux types de cancers que le ratio Bcl-2/Bax est un important déterminant de la radiosensibilité tumorale, (Pritchard *et al*, 1999, 2000 ; Lee *et al*, 1999).

D'autre part, les protéines de la famille Bcl-2 ont la capacité de moduler la formation de canaux de Céramide au sein de la membrane mitochondriale. Ainsi, les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL et Bcl-2 ont la capacité de désassembler les canaux. Par ailleurs, l'activité de la Sphingosine Kinase 1 est favorisée par Bcl-2, pouvant ainsi déséquilibrer la balance Céramide/S1P, (Bektas *et al*, 2005). Il apparaît également que le Céramide et Bax agissent en synergie : les deux ont la capacité autonome de former des canaux de relargage des protéines intermembranaires, favorisant ainsi l'engagement de l'apoptose. Le Céramide a en plus, comme décrit plus haut, la capacité à moduler la réorganisation de Bax, (Siskind *et al*, 2008 ; Ganesan, Colombini, 2010 ; Perera *et al*, 2012).

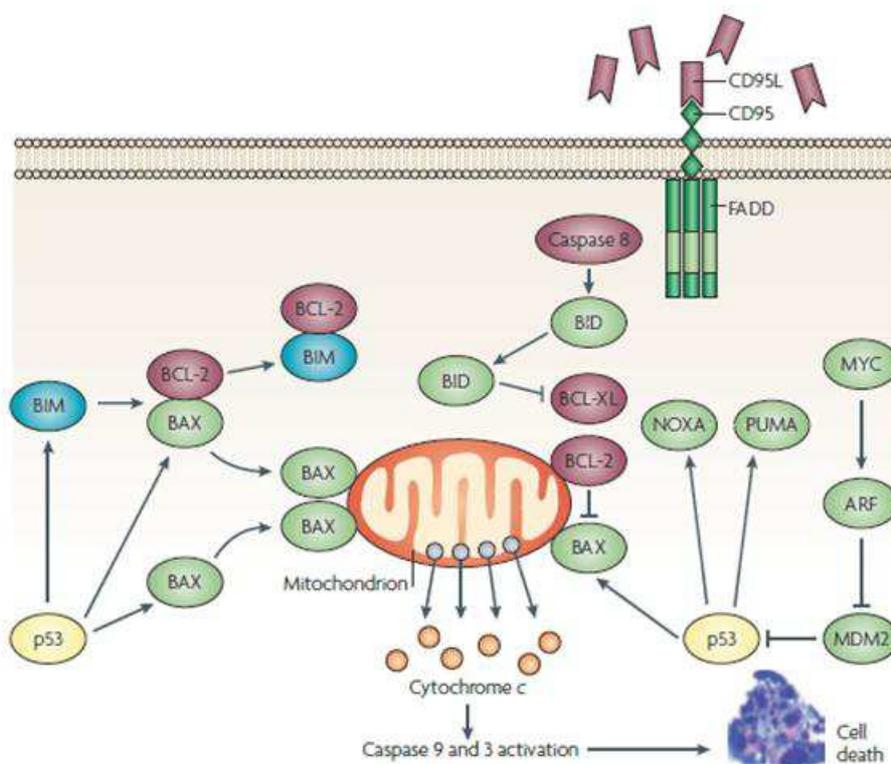


Figure n°15 : Apoptose & voies de signalisations dépendantes des protéines de la famille Bcl-2, (Cotter, 2009).

iiib. La mort post-mitotique

Ce processus de mort implique par définition que la cellule concernée soit en cycle ou entre en cycle. Elle survient lorsqu'une mitose ne s'achève pas avec succès suite à la présence de dommages de l'ADN, s'aggravant en dommages chromosomiques. Puis, s'ensuivent la formation de micronoyaux et un gonflement cellulaire, et enfin la mort de la cellule. Sur le plan mécanistique, l'ADN endommagé peut recruter des Condensines, conduisant à une compaction anormale de l'ADN. Il en résulte alors un défaut d'alignement des chromosomes sur les plaques équatoriales au moment de la mitose, une ségrégation défectueuse, puis une polyploïdie et une formation de micronoyaux, (Blank, Shiloh, 2007 ; Vakifahmetoglu *et al*, 2008). La mort post-mitotique représente une voie de mort majeure pour les cellules tumorales ayant perdu leur capacité à induire l'apoptose, et les cellules saines cyclantes en réponse aux rayonnements ionisants. Elle est donc à la base des effets de la radiothérapie.

iv. Réponse au stress oxydant radio-induit & antioxydants endogènes

L'induction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au moment de l'irradiation va entraîner une réponse cellulaire mettant en jeu les antioxydants endogènes de la cellule. Il existe deux classes d'antioxydants endogènes : les antioxydants non-enzymatiques et les antioxydants enzymatiques. Les antioxydants non-enzymatiques incluent le glutathion, les vitamines C et E, les caroténoïdes et les flavonoïdes. Le glutathion est un chelateur hydrophilyque et constitue un cofacteur des antioxydants enzymatiques GPX (pour Glutathione Peroxidase). Les antioxydants enzymatiques, quand à eux, incluent les SOD, (pour Superoxide Dismutase), la Catalase et les GPX, (**Figure n°16** ; Mikkelsen, Wardman, 2003). Les SOD permettent la dismutation d'un anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ en molécules d' H_2O_2 et d' O_2 . La Catalase, située dans les peroxysomes, dégrade les molécules d' H_2O_2 en H_2O et O_2 . Enfin, les GPX dégradent l' H_2O_2 via l'oxydo-réduction des molécules de glutathion. Il existe plusieurs isoformes de SOD, toutes codées par le génome nucléaire, et qui ont une localisation différente : SOD1 est cytoplasmique, SOD2 est mitochondriale, et SOD3 est extracellulaire. Les SOD sont des métalloprotéines : SOD2 est une protéine à Manganèse, elle est dite aussi MnSOD, et les SOD1 et 3 ont du Cuivre et du Zinc et sont dites Cu/ZnSOD.

Les GPX sont cytoplasmiques. Parmi les isoformes des GPX, seules deux sont ubiquitaires : GPX1 est la plus abondante, son substrat préférentiel est H_2O_2 , et GPX4, moins exprimées, a pour substrat préférentiel les lipides hydroperoxydés.

Il est intéressant de noter que SOD2 et GPX1 sont des substrats transcriptionnels de p53. Ils sont donc susceptibles d'être induits en réponse aux radiations. Il est à noter que dans le cas de SOD2, p53 est capable d'activer ou de réprimer sa transcription. p53 détient donc un rôle de contrôle en faveur ou en défaveur du stress oxydant, conditionnant d'autant plus le devenir cellulaire. Ces régulations dépendraient de la durée et du niveau de stress oxydant et/ou d'expression de p53, (Tan *et al*, 1999 ; Pani *et al*, 2000, 2011 ; Perwez-Hussain *et al*, 2004 ; Harms *et al*, 2004 ; Liu, Xu, 2011 ; Maillet, Pervaiz, 2012). D'autre part, en réponse aux dommages de l'ADN mitochondrial, p53 est transloqué à la mitochondrie et interagit avec la mtDNA polymérase γ , et induit la réplication de l'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial codant pour des éléments de la chaîne respiratoire, cette autre activité de p53 contribuerait également à réguler la formation de ROS mitochondriaux, (Achanta *et al*, 2005).

Par ailleurs, en plus de son rôle anti-apoptotique, la protéine Bcl-2 détient un pouvoir anti-oxydant en induisant la relocalisation du Glutathion à la mitochondrie, et l'utilisation de mimétiques des BH3 bloque cet effet, (Zimmermann *et al*, 2007). A l'inverse, certaines protéines pro-apoptotiques telles que Bax ont un pouvoir pro-oxydant en favorisant la génération de superoxide mitochondriaux par un mécanisme qui reste encore à déterminer, (Kirkland *et al*, 2002, 2010). De plus, ces protéines étant régulées suite à l'irradiation ceci

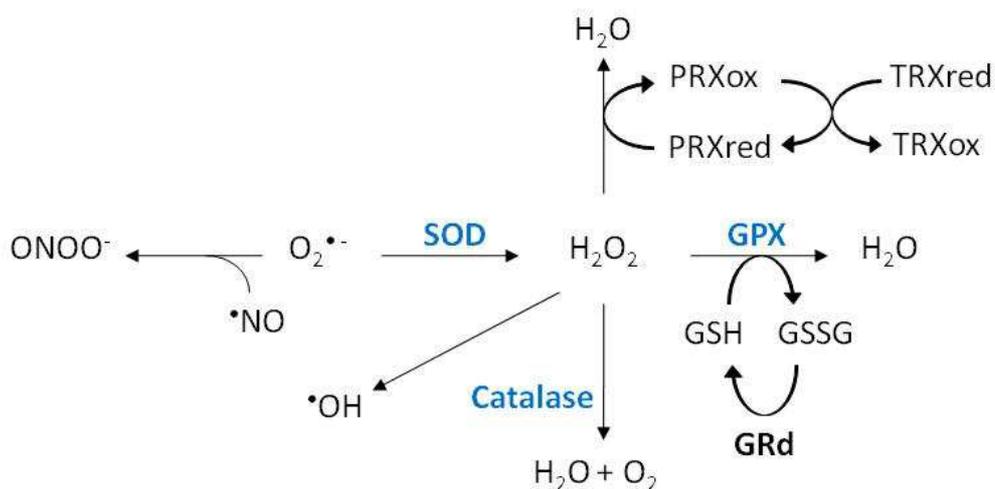


Figure n°16 : Principaux mécanismes de régulation du stress oxydant.

SOD, Superoxide Dismutase ; GPX, Glutathione Peroxidase ; GSH, Glutathion ; GSSG, Glutathione disulphide ; GRd, Glutathione Reductase, PRX, Peroxyredoxine ; TRX, Thioredoxine.

peut expliquer l'installation et la persistance d'un stress oxydant mitochondrial, (Ogura *et al*, 2009). D'autre part, si l'utilisation de BH3-mimétiques ne semble pas altérer l'activité de GPX1, (Zimmermann *et al*, 2007), la forte expression de GPX1 peut quand à elle induire une diminution de l'expression de Bax, (Faucher *et al*, 2005). Il a pu être également montré que SOD2 peut interagir avec un large panel de protéines après irradiation, notamment avec Bcl-2, (Eldridge *et al*, 2012).

Il existe également un lien entre stress oxydant et sphingolipides. Si l'ajout de Céramide est connu pour induire une perturbation mitochondriale et créer un stress oxydant, inversement, le stress oxydant peut induire une génération de Céramide, engageant ainsi un signal de stress, (Garcia-Ruiz *et al*, 1997 ; Goldkorn *et al*, 1998). Il a également été montré que le Glutathion se fixe à la Sphingomyélinase neutre (NSMase), bloquant ainsi son activité. Par contre, en présence d'un stress oxydant, le Glutathion capte les ROS et libère la NSMase, qui pourra alors induire la génération de Céramide, (Liu *et al*, 1997, 1998). De plus, l'inactivation de la Ceramide Synthase 2 provoque un stress oxydant chronique causé par la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale, (Zigdon *et al*, 2013 ; Kogot-Levin, Saada, 2013). Il a aussi été montré que l'inhibition de la Sphingosine Kinase 1 (SK1) favorise la génération de Céramide et le stress oxydant, et qu'inversement, un traitement par H₂O₂ induit une inhibition de la SK1, (Pchejetski *et al*, 2007). A l'opposé, un pré-traitement à la S1P permet d'empêcher l'apoptose induite par un stress oxydant à l'H₂O₂, (Moriue *et al*, 2008). D'autre part, il est à noter que p53 est susceptible d'induire une diminution de SK1, (Taha *et al*, 2004). En somme, la balance Céramide/S1P peut jouer un rôle important dans la production et la signalisation des ROS. Ainsi, l'irradiation favorisant la génération de Céramide, la dérégulation de la balance Céramide/S1P pourra conduire là aussi à la génération et/ou au maintien des ROS.

Egalement, les Nox (pour NADPH oxidase) sont situées sur la membrane plasmique et sur la membrane des phagosomes, et forment une source potentielle de ROS d'origine non-mitochondriale. Les isoformes des Nox ne diffèrent que par la nature de leur sous-unité catalytique gp91phox (ou Nox2), (Kleniewska *et al*, 2012). Ainsi, on distingue les Nox1, 2, 3, et 5 qui produisent des O₂^{•-}, et les Nox4 et Duox1 et 2 qui produisent des H₂O₂. L'irradiation est capable d'induire l'activité NADPH oxidase, et augmente l'expression de certaines sous-unités dont Nox4, p22phox, p47phox, ce qui favorise la formation de ROS, (Collins-Underwood *et al*, 2008 ; Zhang *et al*, 2012). L'isoforme Nox4 est également capable d'inactiver le complexe I de la chaîne respiratoire conduisant ainsi à d'autant plus de stress

oxydant, (Koziel *et al*, 2013). Egalement, l'expression de la sous-unité cytosolique p67phox peut être stimulée par p53, (Italiano *et al*, 2012).

L'irradiation induit aussi l'activation de la NOS (pour Nitric Oxide Synthase) conduisant à la génération de NO et d'autres espèces réactives de l'azote ou RNS (pour Reactive Nitrogen Species), (Mikkelsen, Wardman, 2003). En particulier, le NO peut réagir avec $O_2^{\cdot -}$ pour former le radical anion peroxy-nitrite $ONOO^-$, qui pourra également altérer les macromolécules, (Leach *et al*, 2002 ; Pall, 2008).

Bien que les systèmes de régulations soient effectifs, il est possible suite à l'irradiation, qu'un stress oxydant chronique s'installe et donne lieu à l'installation de l'inflammation et de dysfonctions tissulaires pathologiques. Les mécanismes à la source de ce stress oxydant chronique et à l'origine de l'apparition de ces effets sont à l'heure actuelle encore en cours d'investigation, mais semblent mettre en jeu la persistance de dysfonctions cellulaires où les voies liées à p53 et la mitochondrie apparaissent jouer un rôle essentiel, (*e.g.* altération des mitochondries, modulation de l'expression de p53 et/ou des régulateurs du stress oxydant, altération des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et/ou de leur ADN codant).

v. Survie : Normalité / Sénescence cellulaire / Activation

Les cellules ayant survécu à l'irradiation sont celles qui auront réparé ou toléré leurs dommages. Elles présenteront un phénotype normal et assureront leurs fonctions.

Cependant, certaines cellules survivantes présenteront un phénotype anormal. Ces cellules présenteront un stress chronique, notamment visible par la production de facteurs inflammatoires et/ou une morphologie altérée. Ces cellules sont activées et/ou sénescents. En particulier, ce profil fait partie des devenir majeurs observés chez les cellules endothéliales après irradiation et pouvant persister. Il sera décrit au cours des prochains chapitres.

B. Radiotoxicité sur le tissu sain

1. Effets secondaires aigus

a Toxicité aiguë à forte doses létale : les Syndromes Aigus Radio-induits

Les Syndromes Aigus Radio-induits (SAR), surviennent chez l'homme dans les heures/jours suite à une exposition de l'ensemble ou d'une grande partie du corps, à une forte dose de rayonnements ionisants pendant un court laps de temps. Ceux sont donc des événements plutôt rares survenant généralement en cas d'accidents d'irradiation. Il existe trois stades de SAR dont le développement dépend de la dose reçue, (Coleman *et al*, 2003 ; Waselenko *et al*, 2004 ; Donnelly *et al*, 2010 ; Stewart *et al*, 2012) :

i. Le Syndrome Hématopoïétique

Le Syndrome Hématopoïétique (SH) survient chez l'homme dès une exposition de 2,5 à 8Gy. Le décès du patient survient 1 à 2 mois après irradiation, (Donnelly *et al*, 2010).

Le nombre de leucocytes, de plaquettes et d'hématies déclinent au cours du temps. En effet, les cellules souches hématopoïétiques renouvelantes et les cellules progénitrices de la moelle osseuse sont sensibles aux rayonnements ionisants. Leur disparition est dépendante d'une mort post-mitotique et d'une apoptose dépendante de p53. Ceci conduit à une aplasie médullaire affectant le système hématopoïétique (leucopénie, anémie, thrombocytopénie), des hémorragies, et des infections.

Selon la dose et l'état du patient, un traitement par transplantation de moelle osseuse, cytokines, facteurs de croissance, et antibiotiques, peut être appliqué.

Chez la souris, le SH apparaît dès une exposition sur corps entier de 5 à 13Gy, et le décès survient entre 10 et 13 jours.

ii. Le Syndrome Gastro-Intestinal

Le Syndrome Gastro-Intestinal (SGI) survient chez l'homme dès une exposition de 5 à 15Gy, et le décès survient 3 à 10 jours après irradiation, (Donnelly *et al*, 2010). A la suite de l'exposition, des troubles gastro-intestinaux sévères apparaissent et s'en suivent une défaillance multi-organes, un choc septique, et des hémorragies.

Les altérations à l'origine du SGI proviennent principalement de la mort des cellules proliférantes à la base des cryptes des villosités intestinales, causant ainsi une destruction des villosités et à une dégénérescence progressive de la paroi intestinale.

Chez la souris, le SGI apparaît dès une exposition à 15Gy sur corps entier et le décès survient entre 6 et 8 jours. A 14Gy, le SH et le SGI interviennent : on observe 75% de SGI et 25% de SH.

Les travaux du groupe de [Kolesnick et coll](#), ont permis de mieux comprendre les événements cellulaires se déroulant lors du SGI, et ont pu notamment montrer que le compartiment épithélial n'était pas le seul impliqué. Il a ainsi été montré que la destruction de la paroi intestinale après irradiation corporelle totale dépendait de l'apoptose précoce (pic à 4h post-irradiation) des cellules endothéliales microvasculaires des villosités, avant la mort des cellules épithéliales intestinales. En effet, un traitement par la cytokine bFGF (pour basic Fibroblast Growth Factor) permet de bloquer le SGI, alors que dans l'intestin, les récepteurs au bFGF ne sont présents que sur les cellules endothéliales et non sur les cellules épithéliales, ([Paris et al, 2001](#)). D'autre part, la survie des cellules épithéliales intestinales après protection des cellules endothéliales par bFGF est liée à un maintien du volume des cryptes et non à une stimulation de la régénération, ([Maj et al, 2003](#)).

Ce modèle à « double compartiment » est appuyé par des résultats *in vitro* montrant à l'aide d'un système de coculture, que la mort des cellules épithéliales intestinales non-irradiées est augmentée lorsqu'elles sont mises en présence de cellules endothéliales microvasculaires irradiées à 15Gy, ([Gaugler et al, 2007](#)).

De plus, les expériences réalisées sur souris transgénétiques *asmase*^{-/-} ou *p53*^{-/-} ont montré que les souris *p53*^{-/-} ne sont pas protégées du SGI, tandis que les souris *asmase*^{-/-} le sont via une protection contre la mort dépendante du Céramide des cellules endothéliales microvasculaires de l'intestin. Cependant, la protection conférée par l'inactivation de l'ASMase contre le SGI, ne protège pas contre le SH et les souris en meurent ensuite sous quelques jours. Ceci peut être bloqué par une greffe de moelle osseuse 16h post-irradiation, ([Paris et al, 2001](#)). D'autre part, concernant la mort des cellules épithéliales lors du SGI, il a pu être montré deux vagues de mort : une première vague précoce par apoptose dépendante de p53, et une seconde vague, dépendante d'une mort mitotique qui est essentielle puisque les souris *p53*^{-/-} ne sont pas protégées du SGI, ([Komarova et al, 2004](#)).

Une déficience en Bax ou Bak favorise la radioprotection endothéliale observée chez les souris *asmase*^{-/-}, et permet une protection des cellules épithéliales intestinales, ([Rotolo et al, 2008](#)). Cependant, il a aussi été montré une indépendance du SGI vis-à-vis de Bax ou Bak, ([Kirsch et al, 2010](#)). Ces auteurs montreront également ensuite qu'une surexpression de p53 permet de lever l'impact sur les cellules épithéliales et de protéger du SGI, ([Kirsch et al, 2010](#) ; [Sullivan et al, 2012](#)). Finalement, [Rotolo et coll](#), montreront que l'utilisation

d'anticorps anti-Céramide permet une inhibition de l'apoptose endothéliale et une radioprotection intestinale. Là aussi, une transplantation de moelle osseuse empêche le SH collatéral et permet une protection complète de la souris, (Rotolo *et al*, 2012).

iii. Le Syndrome Cérébro-Vasculaire

Le Syndrome Cérébro-Vasculaire (SCV) est le plus délétère et survient chez l'homme dès une exposition à 35Gy. Le décès survient dans les 48h. Ce délai est encore réduit pour les doses supérieures à 50Gy, (Donnelly *et al*, 2010). Suite à cette forte exposition, les larges vaisseaux sont endommagés et la circulation est très déficiente. La pression intra-crânienne augmente, une inflammation des vaisseaux cérébraux et des méninges peuvent apparaître. Les dommages intestinaux et médullaires n'ont pas le temps d'apparaître dans ce laps de temps. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement.

b Toxicité aiguë non-létale

Bien que de plus en plus précise, la radiothérapie externe n'épargne jamais complètement les tissus sains périphériques. Chez 80% des patients traités surviendront des effets secondaires aigus liés à l'endommagement de ces tissus sains. Ces effets secondaires vont différer selon le volume irradié, la localisation de la tumeur ciblée, la dose d'irradiation, la sensibilité individuelle du patient, et son état général, (Stewart *et al*, 2012).

Les effets secondaires classiquement rencontrés consistent à : une réaction inflammatoire caractérisée par des œdèmes et des érythèmes au niveau de la zone irradiée ; une lésion des muqueuses ; une aplasie médullaire partielle si la zone irradiée concerne une large proportion du thorax, de l'abdomen ou du pelvis ; des nausées, vomissement, diarrhées, lorsqu'il s'agit de la région gastro-abdominale ; une perte des cheveux lorsqu'il s'agit de la tête ; une infertilité, lorsqu'il s'agit des gonades.

Ils peuvent être réduits par une diminution de la dose d'irradiation au cours du traitement ou être traités par différents agents pharmacologiques.

Ils sont principalement liés à une inflammation et à une mort cellulaire précoce par apoptose ou par mort mitotique, dans les heures/jours/semaines suivant la radiothérapie. Ainsi, les cellules ciblées sont principalement des cellules ayant une capacité de prolifération. (Figure n°17 ; Stone *et al*, 2003 ; Barnett *et al*, 2009 ; Stewart *et al*, 2012).

2. Effets secondaires tardifs & Epidémiologie

L'apparition des effets secondaires tardifs après irradiation concernent une plus faible proportion de patients : 5 à 10%, ce qui reste néanmoins considérable. Ces effets surviennent plusieurs mois voire plusieurs années après traitement par radiothérapie. Ils sont donc difficilement prévisibles et traitables, et vont dépendre aussi des caractéristiques individuelles de chaque patient, (âge, antécédents, volume irradié...). Dans le moindre des cas, ils peuvent simplement altérer la qualité de vie, mais dans le pire des cas, ils peuvent engager le pronostic vital.

Ces effets concernent l'impact des rayonnements ionisants sur les tissus sains matures composés en majorité de cellules non-proliférantes. Ces cellules survivent aux radiations mais peuvent présenter un phénotype de stress persistant. (Figure n°17 ; Stone *et al*, 2003 ; Coleman *et al*, 2003 ; Stewart *et al*, 2012).

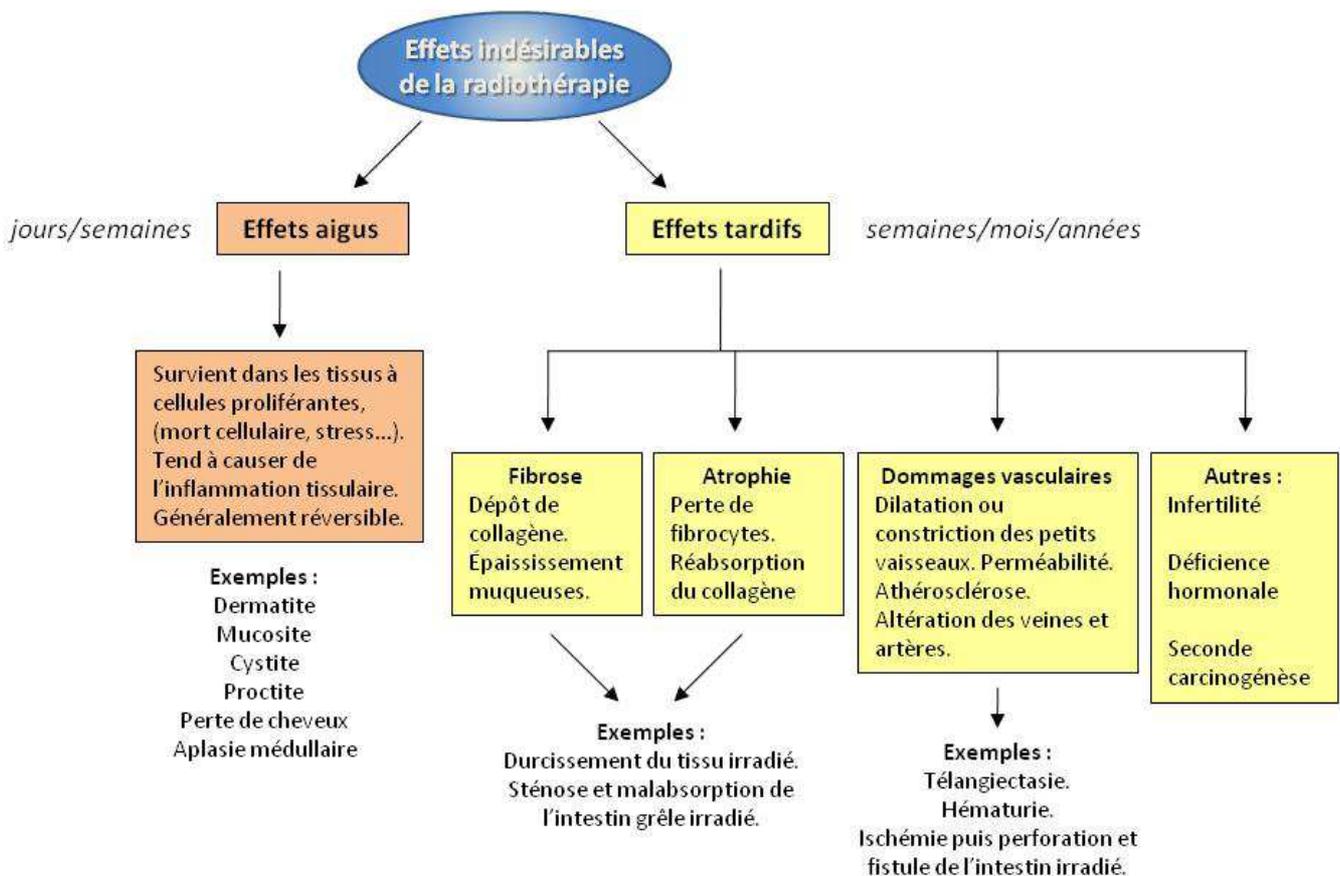


Figure n°17 : Exemples d'effets secondaires aigus & tardifs après radiothérapie.
Adapté de Barnett *et al*, 2009.

a Principaux effets secondaires tardifs – Tête & cou

Après une radiothérapie de cancer « Tête & Cou », divers dommages tardifs peuvent survenir. En particulier, les dommages vasculaires au niveau des carotides vont se traduire notamment par un épaississement de la paroi, une sténose, et en particulier une athérosclérose. Ces patients ont un risque relatif 2 à 9 fois plus élevé de développer un accident vasculaire cérébral (AVC), (*Gianicolo et al, 2010* ; *Stewart et al, 2012* ; *Gujral et al, 2013*).

L'irradiation des tumeurs cérébrales augmente également le risque relatif d'AVC de 38 fois pour des irradiations >30Gy, (*Bowers et al, 2006* ; *Stewart et al, 2012*). L'irradiation du cerveau entraîne également des complications au niveau de la microcirculation : les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique sont endommagées, notamment par une apoptose partielle dépendante de l'ASMase (*Li et al, 2003*), et une augmentation de la perméabilité, ce qui engendre des œdèmes, des thromboses et des hémorragies. Il y a également une inflammation et un stress oxydant. Peuvent également survenir une démyélinisation liée à une mort des oligodendrocytes et des neurones. De troubles cognitifs mineurs à sévères et un défaut de la mémoire peuvent apparaître. Ces effets sont irréversibles et surviennent dans les 6 mois post-irradiation à 40–60Gy fractionnés.

Les lésions tardives des muqueuses orales surviennent dans les 6 mois à 5 ans après radiothérapie (>50Gy fractionnés). Elles consistent au développement progressif de dommages vasculaires, de fibrose tissulaire, d'ulcères, (*Cooper et al, 1995*)

b Principaux effets secondaires tardifs – Thorax

De nombreuses pathologies cardiovasculaires sont recensées parmi les effets secondaires tardifs (*Stewart et al, 2012*). Ils surviennent jusqu'à plusieurs années après radiothérapie dès >30Gy fractionnés. Il s'agit de dysfonctions des artères coronaires, du myocarde, de la microcirculation sanguine, du péricarde...

En particulier, les atteintes du myocarde et du péricarde, sont caractérisées par des dommages des microvaisseaux associés notamment à une inflammation, des troubles thrombotiques, une diminution du nombre de capillaires, une ischémie et une fibrose.

Concernant les macrovaisseaux artériels et veineux, on peut observer une augmentation des risques de sténoses, de thromboembolie, une perturbation du flux sanguin, un épaissement des parois, et une athérosclérose.

Ces pathologies peuvent être sévères dans la mesure où il a été reporté une augmentation des décès liés aux pathologies cardiaques, en particulier par infarctus du myocarde, chez les patients traités par radiothérapie pour des cancers du sein (risque relatif 1,2 à 2 fois plus élevé) ou des lymphomes d'Hodgkin (risque relatif 2 à 7 fois plus élevé), (Aleman *et al*, 2007 ; Clarke *et al*, 2005)

Dans le cas d'une irradiation pulmonaire, les effets secondaires se traduisent par une pneumonie dans les 1 à 3 mois après radiothérapie, et peut conduire à une fibrose pulmonaire 6 à 24 mois après radiothérapie à <20Gy fractionnés, (Fajardo, 2005 ; Stewart *et al*, 2012). Il en résulte une insuffisance pulmonaire sévère. Au niveau cellulaire, la pneumonie est causée par une combinaison d'un défaut de la perméabilité vasculaire, une perte de pneumocytes, et une inflammation persistante, (notamment une surexpression de TGF- β). Surviennent ensuite une sclérose vasculaire progressive et l'installation de la fibrose.

c Principaux effets secondaires tardifs – Abdomen & Pelvis

Les lésions tardives du tractus gastro-intestinal surviennent d'au moins 3 mois à plusieurs années après radiothérapie. Elles se manifestent par des troubles de l'absorption et de la digestion jusqu'à des constrictions/obstructions intestinales, des perforations et des formations de fistules dans les muqueuses. Ces complications reposent elles-mêmes sur le développement d'une fibrose tissulaire et de dommages vasculaires et conjonctifs. Ceci conduit à l'installation de la fibrose intestinale radique, (Haydont, Vozenin-Brotans, 2007 ; Stewart *et al*, 2012).

La radiotoxicité du pancréas se caractérise par une pancréatite chronique et des troubles de la fonction exocrine, et apparaît pour des doses au-delà de 40–50Gy fractionnés. A 50–60Gy fractionnés, une atrophie des acini et une fibrose pancréatique apparaissent.

Dans le cas du foie, les dommages hépatiques surviennent approximativement 3 mois après irradiation. On parle de « maladie veino-occlusive ». Cela peut conduire à une défaillance hépatique sévère. Là aussi des troubles vasculaires et fibrotiques sont mis en jeu.

Notion émergente – Ainsi, l'apparition des effets secondaires tardifs semble faire intervenir un ensemble d'évènements cellulaires aboutissant au développement de lésions. Si déterminer quels sont les facteurs essentiels à cibler pour les empêcher est une tâche complexe, il semble toutefois que le développement de ces lésions repose **sur l'installation d'un stress cellulaire chronique chez les cellules survivantes**. En particulier, le développement de dommages vasculaires et de fibrose tissulaire sont des évènements majeurs parallèles ou conjoints.

En ce sens, le dernier rapport de l'ICRP, (The International Commission on Radiological Protection ; Stewart *et al*, 2012) rappelle que :

« Cependant, il est maintenant devenu clair que la mort cellulaire ne peut pas expliquer tous les effets observés dans les tissus irradiés, en particulier les effets tardifs. En plus des dommages de l'ADN, les ROS et les RNS générés dans les tissus irradiés altèrent aussi les protéines, les lipides, les glucides et autres molécules complexes, et initient les voies de signalisations. (...) Par exemple, la fibrose radique, un des principaux effets secondaires tardifs, peut être causée par une sénescence prématurée et par une différenciation post-mitotique accélérée conduisant à un dépôt excessif de collagène par les cellules mésenchymales irradiées, (fibroblastes, myofibroblastes, cellules musculaires lisses), et non par une mort cellulaire. (...) Ces réponses tissulaires (impliquant des cytokines et autres médiateurs) peuvent être initiées bien avant la mort cellulaire et la manifestation de dommages tissulaires, et peuvent persister pour de longues périodes. »

Il apparaît également que l'endothélium assure une réponse précoce et persistante/tardive. Comprendre les effets intervenants sur l'endothélium est donc d'une importance majeure dans le but de limiter aussi bien les effets aigus (nous avons déjà évoqué son rôle essentiel dans le développement du syndrome gastro-intestinal) que les effets tardifs. Ainsi, comme nous le verrons au cours des prochains chapitres, dans l'endothélium, les radiations engendrent notamment un phénotype dysfonctionnel, inflammatoire mais aussi plus particulièrement, un phénotype de sénescence prématurée. L'ensemble de ces évènements est tout à fait favorable au développement d'effets secondaires tardifs.

II. IMPORTANCE DE L'ENDOTHELIUM DANS LA REPONSE AUX RAYONNEMENTS IONISANTS & SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE

A. Vascularisation et homéostasie tissulaire

Les vaisseaux sanguins ont pour rôle majeur d'irriguer les tissus, permettant ainsi les échanges gazeux, et l'apport de nutriments essentiels à leur bon fonctionnement. Ils assurent aussi le rôle de barrière entre les éléments figurés du sang et les tissus environnants.

On distingue deux classes de vaisseaux sanguins : les macrovaisseaux (artères et veines) et les microvaisseaux (capillaires). Si les premiers assurent la répartition du sang vers l'ensemble des compartiments du corps, les seconds assurent l'irrigation au sein des tissus et le maintien de leur homéostasie, (Cines *et al*, 1998). Selon leur nature, la structure des vaisseaux diffère, (Figure n°18). Les macrovaisseaux sont composés d'endothélium et de couches cellulaires supérieures, en particulier des cellules musculaires permettant de contrôler la dilatation et la constriction de ces larges vaisseaux. Les capillaires ne sont quand à eux, composés que d'une simple couche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale. Chaque cellule du corps humain est normalement placée à une distance inférieure à

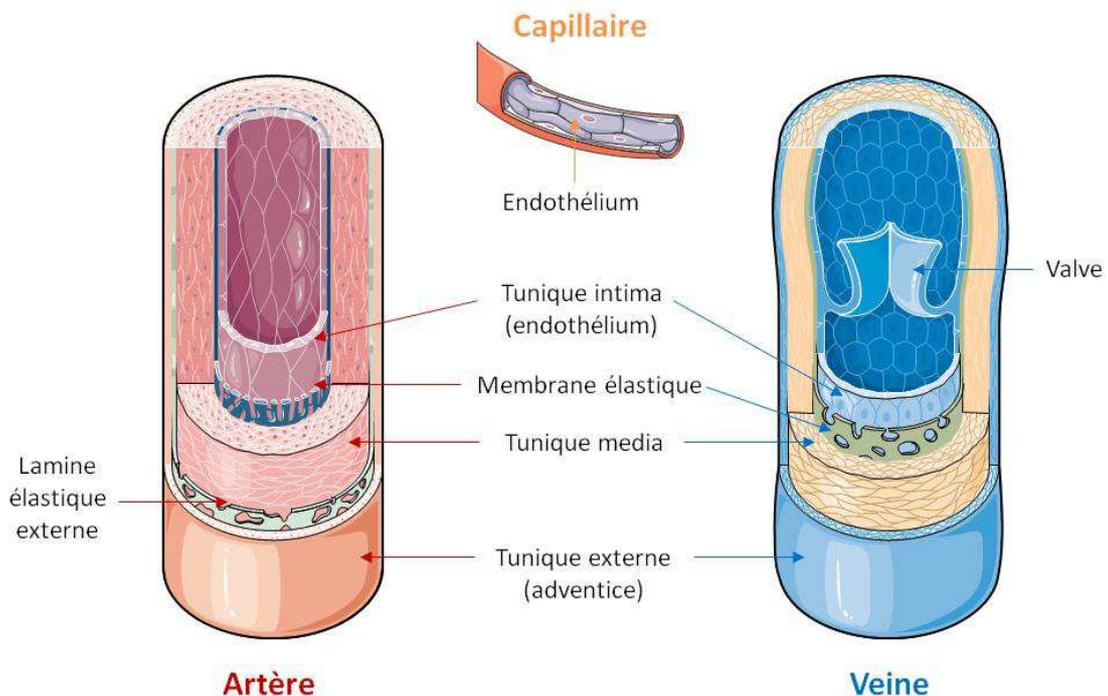


Figure n°18 : Représentation de la structure des vaisseaux sanguins.

100µm d'un capillaire, (Carmeliet, Jain, 2000). Les capillaires sont soit continus, soit fenestrés, soit sinusoides (ou discontinus). Leur diamètre varie de 3 à 10µm. Les capillaires continus sont composés de cellules endothéliales jointives, reposant sur une lame basale également continue. On les rencontre au sein de la vascularisation pulmonaire, intestinale, et musculaire. Le système nerveux central est composé de capillaires continus qui ont la particularité d'être associés à des astrocytes et d'avoir un haut contrôle des jonctions et des transports membranaires. Cette structure particulière forme la barrière hémato-encéphalique. Les capillaires fenestrés présentent des perforations dans la paroi endothéliale (pores de 70nm) et reposent sur une lame basale continue. On les rencontre dans les zones de hauts échanges moléculaires inter-compartmentaux telles que l'intestin, les reins, et les glandes endocrines. Enfin, les capillaires sinusoides présentent quant à eux des orifices trans-cytoplasmiques de 1 à 3µm, et reposent sur une lame basale discontinue. On les rencontrent par exemple dans la moelle osseuse, la rate, et le foie. Ils permettent un ralentissement du flux sanguins et le passage facile des éléments figurés du sang.

La fréquence de renouvellement des cellules endothéliales est faible hormis au sein des régions de l'arbre vasculaire soumises à un flux sanguin important. En moyenne, la durée de vie des cellules endothéliales est de 1 à 3 ans, mais peut descendre sous la barre des 100 jours s'il survient une dénudation mécanique liée à l'hypertension et au vieillissement, (Schwartz, Benditt, 1976, 1977 ; Davies *et al*, 1986).

L'endothélium a un rôle dans le contrôle de la vasodilatation et de la vasoconstriction, notamment via la sécrétion de NO, d'Endothélines et d'Angiotensines.

A l'état basal, l'endothélium a également un rôle anti-thrombotique. Il produit des substances anti-coagulantes et anti-agrégantes telles que la Thrombomoduline, la Prostacycline, et le tPA et l'uPA (pour tissue type et urokinase type Plasminogen Activator). Aussi, la paroi de la lumière endothéliale est chargée négativement afin d'inhiber les interactions avec les cellules circulantes.

L'endothélium a un rôle important lors de processus inflammatoire. Les cellules endothéliales expriment alors un panel de molécules permettant le recrutement des cellules immunitaires. Notamment, elles expriment les facteurs ICAM-1 (pour Inter Cellular Adhesion Molecule 1), PECAM-1 (pour Platelet Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (pour Vascular Cell Adhesion Molecule-1), et les E- et P-sélectines. (Cines *et al*, 1998).

B. Radiosensibilité des cellules endothéliales

Comme nous l'énoncions plus haut, si peu d'études concluent sur une mort mitotique des cellules endothéliales après irradiation sauf en cas de prolifération, (Hari *et al*, 2000), plusieurs études font état d'une mort par apoptose (Fuks *et al*, 1994 ; Gaugler *et al*, 1998) quelques heures post-irradiation : 4 à 10h pour les cellules endothéliales microvasculaires (Langley *et al*, 1997) et 12 à 16h pour les cellules endothéliales macrovasculaires (Gadjusek *et al*, 2001). Ces données sont en concordance avec le fait que les cellules endothéliales sont majoritairement soumises à une mort cellulaire dépendante de la génération du Céramide visible avant 4h et jusqu'à 24h post-irradiation, (Peña *et al*, 2000 ; Paris *et al*, 2001 ; Li *et al*, 2003).

Sur le plan histologique, les micro- et macrovaisseaux présenteront des lésions différentes. En effet, les macrovaisseaux sont moins radiosensibles que les microvaisseaux. Les macrovaisseaux peuvent présenter des dysfonctions vasculaires pouvant être fatales, comme des phénomènes de thrombose, d'occlusion, d'inflammation, de fibrose, d'athérogénèse, voire de rupture du vaisseau. Les lésions sur les microvaisseaux sont plus fréquentes. Ils peuvent présenter des phénomènes de constriction, d'augmentation de la perméabilité, d'inflammation, de thrombose, de fibrose, de réduction du réseau, et d'ischémie ; cela conduit à des dysfonctions tissulaires plus ou moins importantes pouvant altérer le bon fonctionnement des organes irrigués par ces vaisseaux, (**Figure n°19** ; Fajardo, 2005).

Cependant, de nombreuses publications utilisent des modèles *in vitro* de cellules issues de macrovaisseaux (*e.g.* HAEC (pour Human Artery Endothelial Cell)), voire même des cellules de macrovaisseau ombilical, (*e.g.* HUVEC (pour Human Umbilical Vein Endothelial Cell)), bien que ce dernier type ne soit jamais impliqué dans des pathologies vasculaires classiques. Ces interprétations sont à prendre avec une certaine précaution, notamment dans le cas d'une explication de la radiotoxicité vasculaire des tissus sains composés essentiellement de capillaires.

De plus, les cellules endothéliales microvasculaires peuvent avoir une radiosensibilité différente en fonction de leur nature et du tissu qu'elles irriguent. On observera ainsi que les cellules microvasculaires du derme sont plus radiosensibles que les cellules microvasculaires hépatiques ; et que les cellules microvasculaires du poumon, du cerveau, et des ovaires, auront une radiosensibilité intermédiaire, (Roth *et al*, 1999 ; Fajardo, 2005 ; Park *et al*, 2012).

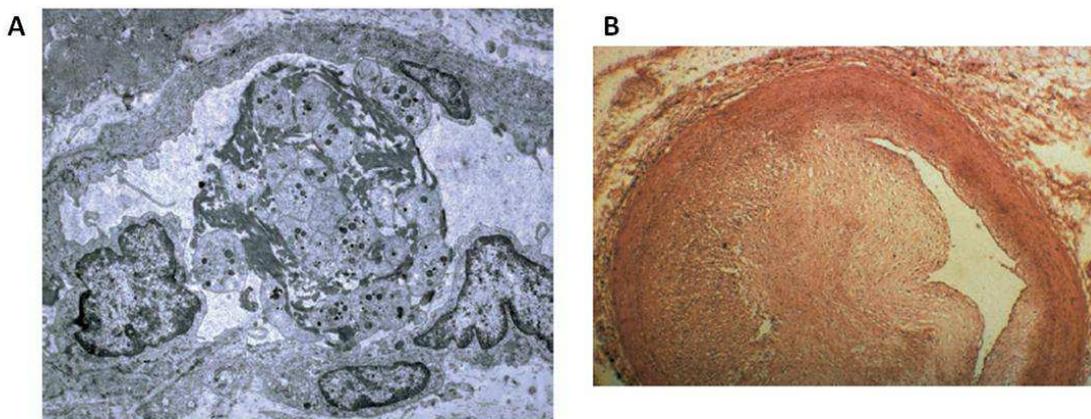


Figure n°19 : Observations histologiques de dommages vasculaires après radiothérapie, (Fajardo, 2005). **A.** Microscopie à transmission d'un capillaire myocardique de lapin en coupe longitudinale, 39 jours après 20Gy (dose unique sur cœur). Au centre, présence d'un large thrombus de fibrines et de plaquettes. **B.** Marquage hématoxyline-éosine. Coupe transversale d'une artère coronaire d'un patient décédé d'un infarctus du myocarde 16 mois après avoir reçu la dose de 40Gy pour un traitement de lymphome d'Hodgkin. Observation d'une lumière vasculaire rétrécit et d'une prolifération myointimale.

Il est important par ailleurs de considérer le cycle cellulaire des cellules endothéliales lors de la radiothérapie. Les cellules endothéliales une fois différenciées ne se divisent plus ou presque : on mesure $\sim 0,1\%$ de réplication/jour, (Gimbrone *et al*, 1974 ; Cines *et al*, 1998). Cependant, leur capacité de division et/ou le recrutement de progéniteurs endothéliaux peuvent être activés en cas de cicatrisation ou d'hypoxie tissulaire tel qu'il est observé au sein des tumeurs. Autrement dit, une étude *in vitro* utilisant des cellules proliférantes (1 à 10% de réplication/jour) ne fournira pas les mêmes résultats, ni les mêmes interprétations qu'une étude utilisant des cellules quiescentes formées en monocouche stable. Notamment, les cellules proliférantes seront d'avantage liées par exemple à un contexte d'angiogénèse, de cicatrisation, de vieillissement ou encore d'athérosclérose, alors que les cellules quiescentes seront davantage liées à une atteinte d'une vascularisation normale au sein d'un tissu sain. Dans le cas d'une étude sur l'impact de la radiothérapie sur l'endothélium, il faudra donc distinguer cet aspect afin de ne pas confondre une interprétation liée par exemple à l'endothélium tumoral proliférant ou à l'endothélium des tissus sains périphériques. En effet, pour ne citer que l'exemple des dommages de l'ADN : ils auront plus d'impact sur des cellules endothéliales en cours de division, que sur des cellules ne se divisant pas qui auront le temps de réparer leurs dommages voire pourront en partie les tolérer, (Igarashi *et al*, 2007 ; Bonnaud *et al*, 2007). Toutefois, de nombreuses publications sur la radiotoxicité écartent ce

paramètre et utilisent des cellules qui ne sont pas placées clairement en état de quiescence par confluence stable, ou par appauvrissement en facteurs de croissance. Les conclusions de ces études doivent donc toujours être replacées dans leur contexte.

Par ailleurs, « l'âge » des cellules est à prendre en compte. Il existe une différence de radiosensibilité pour des cellules endothéliales progénitrices provenant de sang de cordon ombilical ou de sang périphérique d'adulte. Il a ainsi été montré que les cellules « jeunes » sont plus proliférantes que les cellules « adultes » et qu'elle régule différemment la réponse au stress radio-induit. En particulier, si les cellules « jeunes » répondent préférentiellement par une entrée en apoptose, les cellules « adultes » quand à elles, répondent préférentiellement par une entrée en sénescence, (Mendonca *et al*, 2011).

C. Modulation de la mort radio-induite aigue des cellules endothéliales par la Sphingosine-1-Phosphate

1. Le Céramide & l'ASMase : médiateurs endogènes de la mort cellulaire endothéliale après irradiation

Comme nous avons pu le constater au cours des chapitres précédents, la voie de mort par apoptose dépendante de l'activation de l'ASMase et de la génération du Céramide revêt une importance majeure pour les cellules endothéliales saines irradiées, (Haimovitz-Freidman *et al*, 1994 ; Peña *et al*, 2000 ; Gaugler *et al*, 2007 ; Petrache *et al*, 2011 ; Rotolo *et al*, 2012).. Nous avons pu également constater que cette importance se caractérise *in vivo* notamment par la protection contre le Syndrome Gasto-Intestinal chez les souris *asmase*^{-/-}, (Paris *et al*, 2001).

Cette voie de mort sera aussi importante concernant les cellules endothéliales liées à l'angiogénèse tumorale. En effet, il a été montré que des souris *asmase*^{-/-} porteuses de tumeurs, ont une rapidité de croissance tumorale augmentée de 200 à 400%, et une microvascularisation moins sensible aux radiations. Ceci confère une augmentation de la radiorésistance de la tumeur, (Garcia-Barros *et al*, 2003). L'induction d'une surexpression d'ASMase dans l'endothélium tumoral restaure la radiosensibilité tumorale, (Stancevic *et al*, 2013). Cependant, les cellules endothéliales proliférantes sont également soumises aux dommages de l'ADN après irradiation, et seront donc également soumises à une mort post-mitotique, (Bonnaud *et al*, 2007).

Ainsi, pour les tumeurs étant hétérogéniquement composées de cellules endothéliales proliférantes et non-proliférantes, (*e.g.* hypoxique), les traitements anti-tumoraux devront s'attacher à cibler la voie dépendante du Céramide et la voie dépendante des dommages de l'ADN, mais, tout en préservant les cellules saines elles aussi soumises à l'apoptose dépendante de la génération du Céramide. Ou, comme nous le verrons ensuite, il s'agira de trouver le moyen de bloquer l'apoptose dépendante du Céramide sans bloquer la voie de mort post-mitotique.

2. La Sphingosine-1-Phosphate : agent exogène pro-survie après irradiation des cellules endothéliales

La Sphingosine-1-Phosphate (S1P) est un sphingolipide bio-actif originalement identifiée comme le produit de l'action des Sphingosine Kinases (SK) sur la Sphingosine, (pour rappel, **Figure n°5**).

Il existe un véritable rhéostat Céramide/S1P. Autrement dit, il a été montré une balance entre les concentrations cellulaires en Céramide et la S1P conditionnant l'état de la cellule. En effet, la S1P est connue pour avoir une action diamétralement opposée à celle du Céramide. Ses rôles biologiques sont multiples notamment dans la survie, la prolifération, la migration, la différenciation, l'inflammation, la perméabilité, l'angiogénèse, et l'hypertrophie. Ainsi, un déséquilibre de la balance Céramide/S1P, ou la stimulation d'une de ces deux voies, peut provoquer respectivement l'enclenchement d'un processus d'apoptose ou d'un processus de survie, (Cuvillier *et al*, 1996 ; Fyrst, Saba, 2010). La S1P peut avoir une action intracellulaire directe, ou extracellulaire auto/paracrine suite à sa sécrétion hors de la cellule. Des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G (RCPG) ont été identifiés pour la S1P. Il en existe 5 isoformes, nommés S1P₁ à S1P₅. Les récepteurs S1P₄ et S1P₅ sont respectivement réservés aux tissus lymphoïdes et hématopoïétiques, et au système nerveux central. La S1P peut également avoir un rôle intranucléaire en régulant des histones déacétylases, (Hait *et al*, 2009).

Le mécanisme d'action de la S1P dans l'endothélium demande encore à être éclairci. Parmi les cibles moléculaires connues, la S1P régule l'activité des voies PI3K/Akt (pour Phosphatidyl Inositol 3-Kinase/Akt), MAPK (pour Mitogen Activated Protein Kinase ou ERK pour Extracellular signal Regulated Kinase), PLC (pour Phospholipase C), eNOS (pour endothelial Nitric Oxide Synthase), Rac, Rho,... (Lucke, Levkau, 2010 ; Fyrst, Saba, 2010 ; Bonnaud *et al*, 2010). L'action extracellulaire de la S1P sur l'endothélium a essentiellement

été reportée via les récepteurs S1P₁, 2 et 3, (expression : S1P₁>S1P₂≈S1P₃). Le récepteur S1P₁ est couplé à une protéine G_i, alors que les S1P₂ et 3 sont couplés aux protéines G_q, G₁₃ et G_i. Ils n'ont pas exactement les mêmes cibles moléculaires. Il a par exemple été montré que S1P₁ active Rac et favorise la migration, alors que S1P₂ inhibe Rac et la limite, (**Figure n°20** ; Okamoto *et al*, 2000 ; Paik *et al*, 2001).

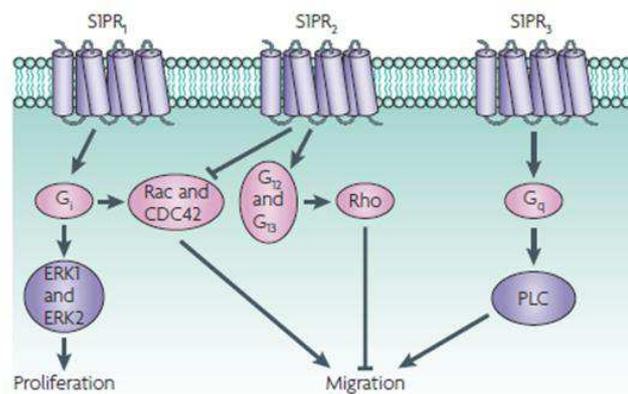


Figure n°20 : Exemple de signalisation des récepteurs S1P₁, 2 et 3, (Pyne, Pyne, 2010).

Les récepteurs à la S1P ont aussi la possibilité de transactiver d'autres récepteurs : des récepteurs à Tyrosine kinase, (*e.g.* VEGFR, PDGFR, EGFR), des RCPG, (*e.g.* CXCR4), et des récepteurs Ser/Thr kinases (*e.g.* TGF-βRII). La S1P possède aussi une activité ambivalente dans l'inflammation. Elle peut être pro-inflammatoire en induisant la Cyclooxygénase-2 et la Prostaglandine E2, mais peut tout aussi bien induire qu'inhiber l'adhésion endothélium/leucocyte, (Lucke, Levkau, 2010).

Depuis quelques années, l'action exogène de la S1P est exploitée en tant que potentiel agent pharmacologique contre la mort cellulaire dépendante du Céramide, (Cuvillier *et al*, 1996). Il a été montré que que les cellules transfectées avec la SK présentent une réduction de l'apoptose, (Olivera *et al*, 1999), alors que les cellules transfectées avec la Sphingosine-1-Phosphate Phosphatase (SPP), présentent une apoptose augmentée et une augmentation des concentrations en Céramide et Sphingosine intracellulaires, (Le Stunff *et al*, 2002). Par ailleurs, la S1P protège les cellules HUVEC d'une apoptose induite par un traitement au Céramide-C2, (Lee *et al*, 1999). Egalement, *in vivo* chez la souris, il a été montré une protection, par un pré-traitement à la S1P, de la mort cellulaire radio-induite dépendante du Céramide sur des oocytes exposés aux radiations afin d'induire une stérilité, (Morita *et al*, 2000 ; Paris *et al*, 2002). La S1P peut aussi empêcher la mort cellulaire induite par le TNFα, Fas, et H₂O₂, (Cuvillier *et al*, 1996 ; Moriue *et al*, 2008).

Comme nous l'avons vu précédemment, les travaux de l'équipe de Kolesnick *et coll*, ont mis en évidence une voie de mort dépendante de la génération du sphingolipide Céramide

à la membrane des cellules endothéliales microvasculaires, sous le contrôle de l'ASMase. Cette voie de mort impacte les cellules cyclantes et non-cyclantes.

Les recherches consécutives de [Bonnaud *et coll*, en 2007](#), au sein de notre équipe, ont alors porté sur l'utilisation de cellules endothéliales microvasculaires humaines transformées par le SV40, les cellules HMEC-1, placées en milieu appauvri permettant de bloquer la prolifération seulement durant les premières 24h. Il a pu être mis en évidence que l'utilisation de la Désipramine (inhibiteur de l'ASMase) mais pas de la Fumonisine B (inhibiteur de la Céramide Synthase), permet de bloquer l'apoptose radio-induite des HMEC-1 mesurée à 24h. Cette voie de mort est donc dépendante de l'ASMase et du Céramide généré après irradiation. De plus, un pré-traitement à la Sphingosine-1-Phosphate (1 μ M) permet de protéger les cellules HMEC-1 de l'apoptose radio-induite dépendante du Céramide. Cependant, la seconde vague de mort, mesurée à 72h, qui est indépendante du Céramide et est dépendante d'une mort post-mitotique, n'est pas inhibée par la S1P. Ceci est en concordance avec le fait que le pré-traitement à la S1P ne bloque pas l'induction de dommages de l'ADN, ni, l'arrêt dans le cycle cellulaire, ni l'induction de dommages chromosomiques, ni la formation de micronoyaux. La combinaison du pré-traitement à la S1P et du post-traitement au Nocodazole, qui est un inhibiteur de la formation de microtubule pendant la mitose et permet de bloquer ou retarder la mort mitotique, permet d'empêcher la mort par apoptose et post-mitotique après irradiation, (**Figure n°21**).

Ainsi, ce modèle a mis en avant les propriétés radioprotectrices de la S1P qui, en protégeant les cellules non-cyclantes, permet de protéger la vascularisation quiescente des tissus sains, et n'altère pas l'impact des rayonnements ionisants sur les cellules endothéliales cyclantes composant la néovascularisation proliférante des tumeurs.

Les travaux suivants de [Bonnaud *et coll*, en 2010](#), ont alors montré *in vivo*, que l'utilisation d'un pré-traitement par la S1P avant une irradiation sur corps entier à 15Gy chez la souris, permet d'empêcher la mort consécutive à l'apparition du SGI dans les 5–7 jours post-irradiation. Cependant, les souris basculent en SH et meurent dans les 9–12 jours post-irradiation, sauf en cas de greffe de moelle osseuse dans les 16h post-irradiation. La greffe de moelle osseuse seule ne protège pas de la mort par SGI. La protection par la S1P contre le SGI est conférée par une protection contre l'apoptose radio-induite dépendante du Céramide chez les cellules endothéliales des villosités intestinales. Cette protection passe par via l'activation de RCPG_i et l'activation de la voie AKT.

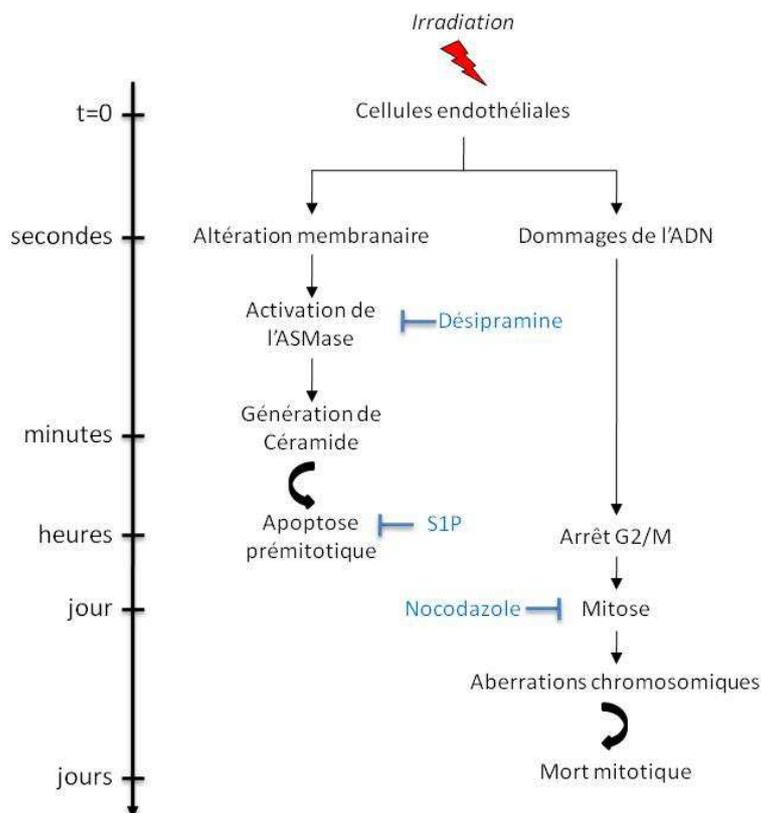


Figure n°21 : Schéma séquentiel des événements moléculaires conduisant à l'apoptose dépendante du Céramide et la mort post-mitotique dans les cellules endothéliales.

Adapté de Bonnaud *et al*, 2007.

Une certaine attention doit toutefois être accordée à l'utilisation de la S1P en tant que traitement pharmacologique contre d'éventuels effets indésirables de la radiothérapie. En effet, dans le cas de cellules cancéreuses répondant ou portant des récepteurs à la S1P, c'est par exemple le cas de glioblastomes multiforme (GBM), la S1P pourrait avoir des effets indésirables. La S1P a aussi des propriétés pouvant contribuer à la protection non-souhaitée de la tumeur, voire sa progression, (Van Brocklyn *et al*, 2003). L'utilisation d'inhibiteur de la SK1 permet de restaurer la sensibilité de GBM au Témzolomide, (Bektas *et al*, 2009). Il a pu aussi être observé que la résistance de mélanomes à l'apoptose induite par le Céramide ou Fas, était conférée par une forte expression de la SK1 et de S1P, (Bektas *et al*, 2005).

Egalement, si la S1P préserve la survie de l'endothélium, elle peut également avoir des effets indésirables sur sa fonction. En effet, la S1P peut moduler la perméabilité vasculaire via une régulation des complexes de jonctions cellule-cellule et une réorganisation du

cytosquelette d'actine. Si l'action de la S1P par S1P₁ favorise l'étanchéité des jonctions cellule-cellule, la diminution de S1P₁ ou l'activité de S1P₂ favorise au contraire une augmentation de la perméabilité. Toutefois, dans les cellules endothéliales, S1P₁ est généralement plus exprimé que S1P₂, (Singleton *et al*, 2005 ; Sanchez *et al*, 2007 ; Sun *et al*, 2009 ; Lee JF *et al*, 2009). Cependant, il apparaît une différence de profil chez les cellules endothéliales en sénescence qui vont exprimer davantage les récepteurs à la S1P. Comparées aux cellules normales, ces cellules présentent des défauts de perméabilité, de migration et de formation de tubes, sous traitement à la S1P. L'inhibition du récepteur S1P₂ permet de restaurer ces fonctions, montrant ainsi l'impact important de l'activité de S1P₂ dans les dysfonctions présentées par les cellules endothéliales sénescents, (Estrada *et al*, 2008 ; Lee *et al*, 2009 ; Lu *et al*, 2012).

Notion émergente – Suite aux travaux de notre équipe, une question apparaît, (**Figure n°22** ; Bonnaud *et al*, 2007). Nous avons pu constater que le pré-traitement à la S1P avant irradiation des cellules endothéliales ne modifiait pas l'induction de dommages de l'ADN mesurés par marquage de foyers γ H2AX. Nous avons aussi pu observer que la cinétique de disparition des foyers et donc de réparation des cassures n'était pas modifiée et était efficace avant 24h. En effet, au temps 24h, nous pouvons observer une différence significative pour les cellules traitées à la S1P : il reste ~10% de dommages de l'ADN de plus que les cellules irradiées uniquement. Ainsi, l'impact et la persistance de ces dommages doivent être vérifiés.

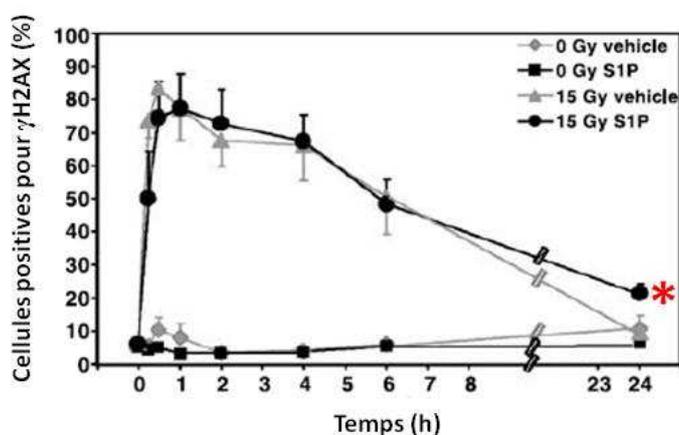


Figure n°22 : Mesure du nombre de cellules positives pour γ H2AX en fonction du temps, après irradiation et/ou pré-traitement à la S1P.

Adapté de Bonnaud *et al*, 2007.

Car, en effet, la persistance de dommages de l'ADN représente un stress chronique susceptible de déclencher des réponses cellulaires tardives. En particulier, comme nous le verrons au cours des prochains chapitres, la persistance de dommages de l'ADN peut aboutir au développement d'un phénotype sénescence potentiellement associé à un phénotype pro-inflammatoire. Ces caractéristiques sont susceptibles de favoriser l'apparition de dysfonctions et/ou de lésions tissulaires persistantes/tardives.

D. Effets de l'irradiation sur le tissu vasculaire & perturbation de l'homéostasie tissulaire

Suite à l'irradiation, les cellules endothéliales subissent des changements de conformations et des perturbations des interactions cellules-cellules. En effet, on peut notamment observer des modifications de la distribution du réseau de F-actine, des jonctions VE-Cadhérines et une activation de la GTPase RhoA. Il en résulte ainsi une perturbation de l'intégrité de la paroi des vaisseaux et une augmentation de la perméabilité endothéliale. Ces altérations sont dépendantes de la dose reçue et sont susceptibles de persister dans le temps, (Evans *et al*, 1986 ; Waters *et al*, 1996 ; Gabrys *et al*, 2007 ; Rousseau *et al*, 2011 ; Fauquette *et al*, 2011). Ainsi, les échanges entre le compartiment sanguin et les tissus sont altérés ce qui peut favoriser l'apparition d'œdèmes et l'engagement de processus inflammatoire et fibrotiques, (Law, 1985 ; d'Avella *et al*, 1998 ; Nguyen *et al*, 2000).

L'irradiation « active » les cellules endothéliales, (Figure n°23). Les cellules endothéliales irradiées présentent des changements dans leur sécrétome, en particulier, elles

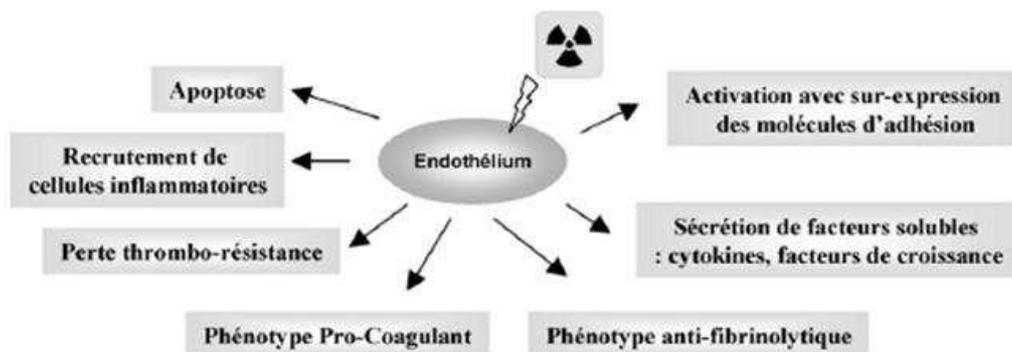


Figure n°23 : Principaux effets des radiations ionisantes sur l'endothélium vasculaire, (Milliat *et al*, 2008).

vont activer leur sécrétome inflammatoire. Notamment, il a été montré une augmentation de l'expression des Interleukines 6 et 8 dès 18h après irradiation à 2Gy et pouvant persister au-delà de 6 jours. Ces modulations sont dépendantes de la dose et du temps post-irradiation. Certains facteurs membranaires sont également modulés favorisant un phénotype pro-inflammatoire, pro-coagulant et pro-fibrosant. Par exemple, les cellules endothéliales irradiées expriment d'avantage d'ICAM-1 (pour Inter Cellular Adhesion Molecule 1), de PECAM-1 (pour Platelet Adhesion Molecule-1), de TGF- β (pour Tumoral Growth Factor- β), de P-Sélectine, de Thrombine, de PAI-1 (pour Plasminogen Activator Inhibitor-1), et moins de Thrombomoduline. Ceci favorise notamment le recrutement et l'adhésion de cellules immunitaires, de plaquettes et la stimulation de facteurs de la coagulation. Ces modulations peuvent elles aussi persister longtemps après irradiation, et l'utilisation d'anti-oxydants ou d'anti-inflammatoires peut limiter ces effets, (Gaugler *et al*, 1997 ; Van der Meeren *et al*, 1997, 1999 ; Hallahan *et al*, 1999 ; Mouthon *et al*, 2003 ; Wang *et al*, 2002, 2004 ; Milliat *et al*, 2008 ; Holler *et al*, 2009 ; Kiyohara *et al*, 2011 ; Yuan *et al*, 2013).

E. Implication de l'endothélium irradié dans les lésions radio-induites tardives

En somme, suite à l'irradiation des vaisseaux sains, deux types de réponses ont été caractérisées. Un premier type concerne une vague aiguë de mort cellulaire endothéliale dans les 24h post-irradiation dépendante de la génération de Céramide. Et, un second type de réponse, concerne l'impact sur les cellules survivantes et pouvant se traduire par : une détérioration des capillaires, une augmentation de la perméabilité, un épaissement de la membrane basale, une augmentation du volume du capillaire et des cellules, une activité pro-inflammatoire, une activité thrombotique et une activité pro-fibrotique. Tout ceci pouvant favoriser une dérégulation chronique de l'homéostasie du tissu environnant, (*e.g.* stress oxydant cellulaire, inflammation, hypoxie tissulaire, appauvrissement).

Le développement des lésions radio-induites tardives fait intervenir un ensemble de réponses cellulaires provenant de cellules différentes. Ainsi, la détermination des rôles directs de l'endothélium irradié dans la contraction de lésions tissulaires peut être difficile à établir.

Endothélium & lésions radio-induites au sein du SNC – Certaines études ont montré que l'endommagement de l'endothélium lors d'une irradiation du SNC provoque une détérioration

de la barrière hémato-encéphalique et conduit à l'apparition de lésions tissulaires. Il a été montré une apoptose dépendante du Céramide et de l'ASMase de façon dépendante de la dose d'irradiation dans les cellules endothéliales du SNC, (Peña *et al*, 2000). Les travaux suivants de Li *et coll*, ont montré que cette apoptose dans les 24h post-irradiation, conduit à une détérioration aiguë de la barrière hémato-encéphalique, suite à une irradiation de 50Gy sur la moelle épinière cervicale de la souris, (Li *et al*, 2003). Egalement, il est montré après irradiation à 25Gy du cerveau chez le rat, que les dommages vasculaires ont un rôle essentiel dans le développement de la nécrose cérébrale. Ils sont caractérisés par une chute de la population endothéliale dans les 24h post-irradiation et par un défaut de repeuplement et de restructuration tout au long des 65 semaines d'analyses, (Lyubimova, Hopewell, 2004). De plus, il est montré chez le rat, une activation de la microvascularisation cérébrale sur au moins 48h après irradiation : les cellules expriment davantage les facteurs de recrutement des leucocytes tels qu'ICAM-1, et les P- et E-sélectines, (Yuan *et al*, 2005). Dans ce sens, il est observé que l'irradiation de cellules microvasculaires cérébrales *in vitro* induit une réponse inflammatoire (ICAM-1, PAI-1), et un stress oxydant ($O_2^{\cdot-}$) via, en partie, l'activité de la NADPH oxydase, (Collins-Underwood *et al*, 2008). Egalement *in vitro*, un modèle confluent de barrière endothéliale/gliale montre une perméabilité endothéliale augmentée de façon dépendante de la dose après irradiation, et persistante sur au moins 8 jours. Ces cellules sont aussi positives pour les foyers γ H2AX mais leur nombre décroît avec le temps ; quelques foyers persistent cependant pour la plus forte dose testée de 25Gy au dernier temps expérimental de 8 jours, (Fauquette *et al*, 2011). Enfin, Ungvari *et coll*, montrent une apoptose dépendante de la dose d'irradiation chez les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de rat qui atteint 10% à 24h après 8Gy (maximum testé). Ils observent aussi une induction et un décroissement des dommages de l'ADN au cours des jours. Une semaine après irradiation, ils mesurent également une diminution de la capacité à former des tubes vasculaires, et une augmentation de la sécrétion de facteurs inflammatoires tels que l'IL6. Quatorze jours après irradiation, ils mesurent une diminution de la capacité à former des colonies, et une positivité pour la sénescence cellulaire avec un maximum testé d'environ 30% pour 8Gy. Cependant, s'ils montrent l'induction de ROS et de superoxydes mitochondriaux dans les 24h post-irradiation, ils ne montrent pas ici de persistance au jour 14, (Ungvari *et al*, 2013). De façon intéressante, cette sénescence microvasculaire après irradiation est fortement retrouvée *in vivo* lors d'une irradiation cérébrale de souris *nude* à 20Gy. De même, ces observations sont faites sur des coupes post-mortem de patient atteint de

glioblastome et traité par chirurgie et par radiothérapie à 60Gy. Les zones non-irradiées ne présentent pas de sénescence microvasculaires, (Borovski *et al*, 2013,).

Endothélium & lésions radio-induites cardiovasculaires et athérosclérotiques – L’irradiation de l’endothélium peut également être impliquée dans les dysfonctions radio-induite telles que l’athérosclérose et les troubles cardiovasculaires. Il est montré que 120 jours après irradiation de souris sur corps entier complété par transplantation de moelle osseuse, il en résulte des dommages sur la vascularisation coronaire (réduction de la densité et du diamètre de la lumière, sclérose), une fibrose péri-vasculaire, une diminution de l’expression des NOS, une augmentation du fibrinogène plasmatique, et une augmentation de cholestérol total, LDL, et triglycérides, (Baker *et al*, 2009). L’utilisation de souris ApoE^{-/-} hypercholestérolémique et pro-athérosclérotiques voient leur développement d’athérosclérose coronaire augmenté et accéléré lors d’une irradiation cardiaque à 16Gy. Ceci est associé à une augmentation des dommages microvasculaires, de l’inflammation et de la fibrose, (Gabriels *et al*, 2012). Barjaktarovic *et coll*, montrent que l’exposition locale du cœur de souris à une irradiation de 0,2 ou 2Gy provoque des modifications du protéome cardiaque observé à 4 semaines post-irradiation. En particulier, que la dose soit de 0,2 ou de 2Gy, il y a une altération du protéome lié au métabolisme du pyruvate et du cytosquelette. De plus, pour la dose de 2Gy (soit l’équivalent d’une fraction classique de radiothérapie), on observe également une augmentation des ROS, et une diminution de la respiration mitochondriale et de l’activité des complexes mitochondriaux I, II et III, sans pour autant observer d’altérations morphologiques mitochondriales. Ces modifications sont encore visibles à 40 semaines post-irradiation. Les modifications du métabolisme mitochondrial ayant été clairement établies dans les maladies cardiovasculaires, les modifications métaboliques sur le long terme ici observées après irradiation pourraient donc être également directement liées à l’apparition de maladies cardiovasculaires observées après radiothérapie, (Barjaktarovic *et al*, 2011, 2013). De façon intéressante, il est montré dans un modèle murin d’irradiation cardiaque (à 12Gy ou 3Gy/10jours) que la délétion de p53 dans les cellules endothéliales induit une sensibilisation à l’endommagement cardiaque radio-induit. Les souris « endothélium/p53- » succombent d’insuffisance cardiaque dans les 39–69 jours post-irradiation, causée par une augmentation de la perméabilité vasculaire, une ischémie, une nécrose du myocarde, une dysfonction systolique, une hypertrophie cardiaque. La délétion endothéliale de p21 a les mêmes impacts. Sur le plan mécanistique (ici *in vitro*), il est indiqué que p53 permet un arrêt du cycle post-irradiation et protège les cellules endothéliales cardiaques de la mort post-mitotique. Il est

cependant à noter que ces cellules sont utilisées à 60% de confluence et sont donc encore proliférantes au moment de l'irradiation. S'ils n'observent pas de différence de mort cellulaire à 4h post-irradiation chez les cellules pro- ou déficientes en p53, ils observent une mort cellulaire plus importante à 72h–96h chez les cellules déficientes. La délétion endothéliale de p53 empêche alors l'arrêt du cycle cellulaire et entraîne une entrée en mitose prématurée puis une catastrophe mitotique, (Lee *et al*, 2012).

Endothélium & fibrose tissulaire radio-induite – Comme nous l'avons énoncé plus haut, les fibres radiques sont retrouvées chez de nombreux organes irradiés tels que les poumons (**Figure n°24**), l'intestin, le colon, le cœur, la peau, le foie, les reins. Une minorité n'en développe pas, c'est le cas du SNC, de la moelle osseuse et des os, (Fajardo, 2005 ; Yarnold *et al*, 2010). La coexistence de dommages vasculaires et de lésions fibrotiques a été observée depuis de nombreuses années, (Law, 1985).

La fibrose se définit par un déséquilibre dans la production et le dépôt des composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène, conduisant à l'accumulation de tissu conjonctif un niveau de la lésion. Ceci conduit à une détérioration du tissu et à une destruction de l'architecture de l'organe. La fibrose est assimilable à un processus cicatriciel pathologique. En effet, lorsqu'une lésion survient, les mécanismes de réparation tissulaire sont activés et restaurent le tissu. Cependant, lorsqu'une lésion tissulaire ou vasculaire survient et est associée à une inflammation chronique, la production de matrice est supérieure à sa

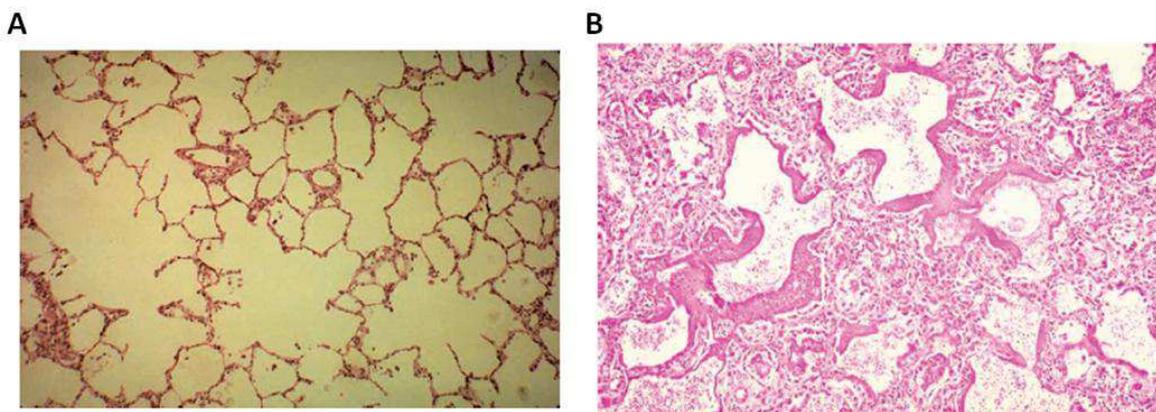


Figure n°24 : Observations histologiques de parenchyme pulmonaire, (Fajardo, 2005).

A. Marquage hématoxyline-éosine d'un parenchyme pulmonaire normal. **B.** Marquage hématoxyline-éosine d'un parenchyme pulmonaire d'un patient décédé de lésions alvéolaires diffuses, 4 mois après avoir reçu la dose de 40Gy pour traiter un lymphome d'Hodgkin. Observation d'œdème, de fibrose, de membranes hyalines denses, et d'exsudat inflammatoire.

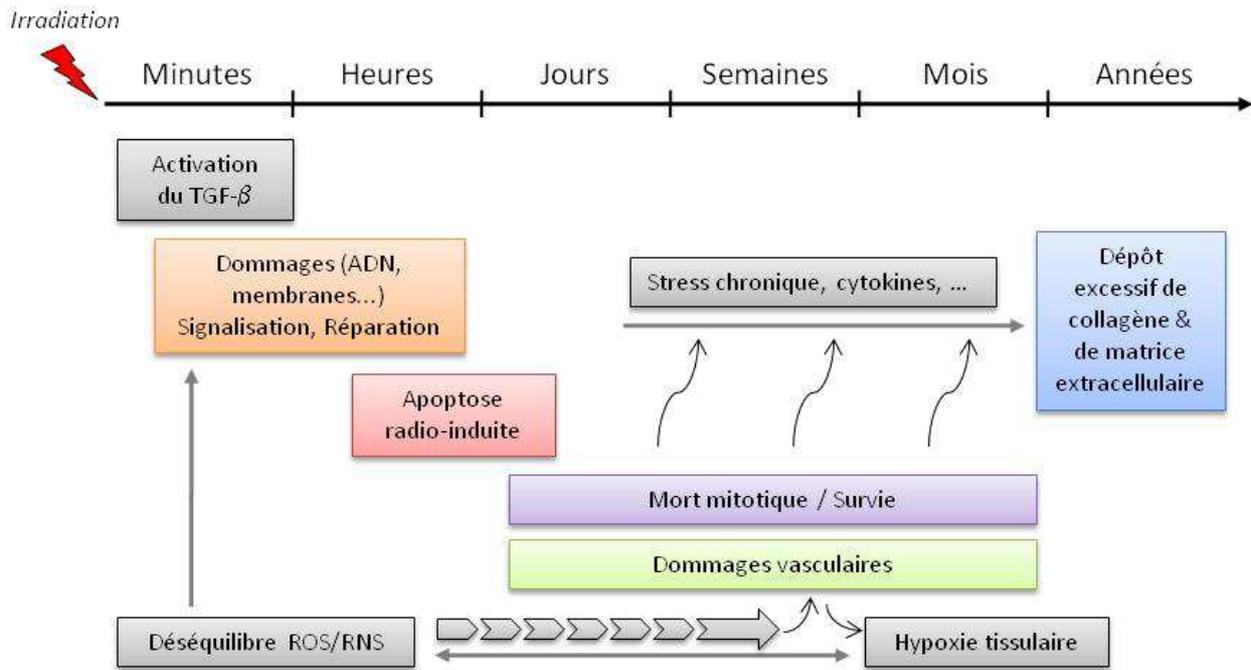


Figure n°25 : Phases du développement de la fibrose radio-induite.
Adapté de Bentzen *et al*, 2006.

dégradation, et conduit à une détérioration de la lésion, du tissu et de l'organe. Ce type de lésion est initié par l'activation des cellules endothéliales et des cellules inflammatoires, et la sécrétion de facteurs mitogéniques et pro-fibrotiques (en particulier le TGF-β). Ceci permet ensuite d'activer les cellules productrices de matrice extracellulaire : en particulier, il y aura une différenciation de fibroblastes, de cellules épithéliales, endothéliales et musculaires lisses, en myofibroblastes, qui produiront l'excès de matrice, (**Figure n°25** ; Bentzen, 2006 ; Yarnold *et al*, 2010).

Cependant, l'implication directe de l'endothélium dans le développement de la fibrose radique n'a été montrée que récemment. En particulier, l'endothélium irradié exhibe des propriétés pro-coagulantes notamment via la surproduction de PAI-1 et la réduction de Thrombomoduline, (Wang *et al*, 2002 ; Milliat *et al*, 2008). Il a été montré dans des modèles *in vivo* que l'utilisation d'Hirudine, un inhibiteur de la Thrombine, permet d'atténuer les dommages muqueux, de réduire la production de TGF-β, et le dépôt de collagène III, (Wang *et al*, 2004, 2007). Egalement, l'inhibition pharmacologique de PAI-1 ou la délétion de PAI-1 permet de réduire la production de TGF-β, de réduire les dommages microvasculaires et de réduire la fibrose radique intestinale, (Abderrahmani *et al*, 2009, 2012). Par ailleurs, la délétion du facteur inflammatoire endothélial ICAM-1 chez la souris, permet de limiter

l'infiltration leucocytaire, et de réduire la fibrose pulmonaire radio-induite et l'insuffisance respiratoire, (Hallahan *et al*, 2002 ; Kiyohara *et al*, 2011).

De façon intéressante, le stress oxydant radio-induit aiguë et chronique revêt une importance dans l'apparition de lésions tardives, (Zhao *et al*, 2007). Particulièrement, cibler ce stress revient en partie à cibler le stress oxydant endothélial, et confère un bénéfice radioprotecteur intéressant. Parmi les travaux publiés, Berbée *et coll*, en 2009, montrent que l'utilisation de Gamma-Tocotrienol, un analogue de la vitamine E à caractères antioxydants et inhibiteur d'HMG-CoA reductase, cible particulièrement les cellules endothéliales, permet une radioprotection des souris irradiées sur corps entier, et bloque les modulations moléculaires intervenant en phase aiguë. Zhang *et coll*, en 2012, montrent *in vivo* que l'utilisation de l'AEOL10150, un *scavenger* (piégeur) de ROS et de RNS, administré 2h post-irradiation thoracique, puis quotidiennement sur 4 semaines, permet de réduire considérablement la mort cellulaire des pneumocytes et des cellules endothéliales. Sur le plan moléculaire, ce traitement réduit le stress oxydant, la production de TGF- β , et permet de réduire la signalisation des voies d'apoptose (p53, Bax) mesurés tardivement à 6 semaines. Egalement, Vorotnikova *et coll*, en 2010 et Otterson *et coll*, en 2012, utilisent des mimétiques des SOD/Catalase de la famille des composés Eukarion dont l'EUK-207, afin de bloquer les dommages endothéliaux radio-induits et de rétablir les fonctions endothéliales. Plus particulièrement, Gao *et coll*, en 2012, montrent *in vivo* chez le rat sur des modèles de pneumonie et de fibrose pulmonaire radio-induite, que l'utilisation de l'EUK-207 sur un schéma de traitement débutant à 7 jours post-irradiation, permet une amélioration de la capacité respiratoire, une amélioration de la vascularisation pulmonaire, et une réduction de la fibrose radio-induite mesurée à 7 mois post-irradiation. En ce sens, les nombreux travaux d'Epperly *et coll*, (1998, 2002, 2008), ont montré que l'utilisation de SOD2 en thérapie génique permet de prévenir contre les dommages tissulaires induits tardivement après irradiation tels que la fibrose pulmonaire, la cystite, les dommages sur les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, les dommages sur les cellules oesophagiales et de la cavité orale, voire améliore la durée de vie. Une diminution de la surexpression radio-induite d'ICAM-1 et de VCAM-1 est également observée sur le long terme. L'ensemble de ces travaux suggèrent que la prévention du stress oxydant et/ou de l'inflammation peu après l'irradiation peut permettre de prévenir l'installation chronique de ces stress et le développement de lésions subséquentes.

Les travaux d'Avraham *et coll*, en 2010, portent quant à eux sur les vaisseaux lymphatiques et sur les dysfonctions lymphatiques radio-induites (fibrose, œdèmes) sur queue de souris. Ils montrent de façon intéressante que si la délétion en ASMAse permet de protéger la mort

cellulaire précoce des cellules endothéliales lymphatiques, elle ne protège pas des dysfonctions lymphatiques tardives ; et inversement, l'inhibition du TGF- β 1 n'empêche pas la mort cellulaire des cellules endothéliales lymphatiques, mais protège des dysfonctions lymphatiques tardives. Ils montrent également que les cellules lymphatiques ont la capacité d'entrer en sénescence de façon dépendante de la dose d'irradiation, et suggèrent une probable implication de ce phénotype dans le développement des dysfonctions lymphatiques tardives observées.

Endothélium, S1P & lésions radio-induites tardives – Si comme nous avons pu l'observer, le pré-traitement par S1P a des effets bénéfiques contre l'apoptose endothéliale radio-induite et la toxicité aiguë, les effets de ce traitement sur l'endothélium et les lésions radio-induites à long terme restent peu connus.

Cependant, il a été montré dans le cas de lésions pulmonaires radio-induites (RILI) dans les 6 semaines suite à une exposition thoracique entre 10 et 25Gy chez la souris, que l'expression des Sphingosine Kinases 1 et 2 est augmentée mais que le niveau de Céramide sur la S1P est élevé. Egalement, les souris déficientes pour le gène de la SK1 ou avec une expression réduite en récepteur S1P₁, S1P₂ ou S1P₃ montrent une susceptibilité augmentée pour le RILI. A l'inverse, le traitement chronique par analogues de S1P₁, connus pour leurs propriétés vasculo-protectrices, permet de limiter le RILI. Le traitement à la Simvastatine, connue pour atténuer le RILI, induit une augmentation de l'expression de la SK1 et réduit le ratio Céramide sur S1P, (Mathew *et al*, 2011,). Toutefois, le même groupe montre ensuite sur un modèle de fibrose pulmonaire radio-induite (le stade succédant le RILI) chez la souris, observée à 18 semaines suite à une irradiation thoracique à 20Gy, qu'un traitement chronique à la Myriocine, un inhibiteur de la Sérine Palmitoyltransférase (SPT), induit une atténuation de la fibrose. La SPT contrôle la biosynthèse endogène des sphingolipides. Egalement, ici la Myriocine induit une diminution de la surexpression radio-induite de SK1 et de S1P, et interfère avec la signalisation TGF- β , (Gorshkova *et al*, 2012). Il est à noter que l'irradiation induit la génération de TGF- β qui a un rôle majeur dans la fibrose radique, et que le TGF- β induit l'activité de la SK1 et favorise la signalisation de la S1P dans les cellules endothéliales, (Igarashi *et al*, 2009). Indépendamment de l'irradiation, il a également été montré dans un modèle de lésion pulmonaire induite par un traitement à la bléomycine chez la souris, une différence d'impact de l'administration d'analogues de S1P₁. A l'opposé d'une exposition courte qui permet une atténuation des dommages vasculaires aigus dans le poumon, un

traitement chronique aggrave les lésions, et augmente les dommages vasculaires et la fibrose pulmonaire. Ceci suggère qu'un traitement prolongé à la S1P ou un analogue provoque des effets délétères via la stimulation de voies pro-fibrotiques, ou qu'une sur-stimulation de S1P₁ provoque une désensibilisation des récepteurs et une interruption de la signalisation dépendante de la S1P, (Shea *et al*, 2010).

Notion émergente – Nous avons pu observer que de nombreuses pathologies tardives radio-induites coïncident, voire sont clairement associées aux dysfonctions vasculaires, faisant de l'endothélium une cible majeure en terme de radioprotection. Cependant, les mécanismes biologiques mis en jeu dans l'endothélium sont complexes à décrypter car ils font intervenir un ensemble de processus tels que l'inflammation et le stress oxydant. Toutefois, ces stress ont un caractère « chronique » qui laisse transparaître un phénotype cellulaire acquis mais cependant potentiellement réductible dès une inhibition précoce. En ce sens, la sénescence endothéliale qui, comme nous le verrons plus loin, est un phénotype acquis tardivement mais initié dès le stress cellulaire, semble être toute indiquée pour répondre à ce rôle, et être, du moins en partie, responsable du développement de lésions tardives. Elle a d'ailleurs, comme nous l'avons cité, été retrouvée dans certaines lésions, son impact direct restant cependant à être clairement déterminé.

Par ailleurs, si nous avons pu voir que le traitement à la S1P favorise la survie des cellules endothéliales dans les phases aiguës post-irradiation, son impact à long terme sur l'endothélium doit être éclairci, ainsi que les modulations selon les récepteurs mis en jeu. D'autre part, la S1P favorisant potentiellement le développement de lésions radio-induites tardives, il reste à déterminer si cet impact passe par l'endothélium, voire par une accentuation de la sénescence endothéliale radio-induite.

III. CARACTERES & MECANISMES DE LA SENESCENCE ENDOTHELIALE

A. Le phénotype « sénescence »

Les premières observations de cellules en état de sénescence ont été rapportées dès les années 60, sur des cultures de fibroblastes non-transformés, non-immortalisés, issus de différents organes, (Hayflick, Moorhead, 1961). Les auteurs observèrent un seuil limite de capacité de division en fonction du nombre de passage en culture. Ces cellules sont viables et métaboliquement actives. Si la sénescence a été décrite en premier lieu en reflet du vieillissement cellulaire lié au franchissement d'un seuil de réplication des cellules somatiques au cours du temps, on parle alors de « sénescence répllicative », il existe d'autres stimuli de la sénescence, (López-Otín *et al*, 2013). On fera donc la différence entre sénescence répllicative et une sénescence induite par un stress dite « prématurée » ou « accélérée », (SIPS pour Stress-Induced Premature Senescence), (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007 ; Campisi, 2013). Ce second type sera notamment le cas de la sénescence induite par l'irradiation, ou encore par le stress oxydant.

Ainsi, les cellules sénescences s'accumulent au cours du vieillissement naturel d'un organisme. Lors d'un stress, si la sénescence cellulaire est aussi un moyen d'empêcher la transmission de lésions à la prochaine génération de cellule, elle conduira cependant à la contraction prématurée du « vieillissement » cellulaire.

La sénescence cellulaire est un phénotype faisant intervenir des mécanismes moléculaires complexes linéaires ou chevauchants. Ces mécanismes sont encore de nos jours mal élucidés et peuvent différer selon le type cellulaire et selon le statut proliférant ou quiescent. Également, si la sénescence répllicative met en jeu une érosion des télomères à chaque division, la sénescence prématurée quant à elle, met en jeu des mécanismes différents en fonction du stress inducteur. Au cours des prochains chapitres, nous décrirons plus particulièrement les mécanismes moléculaires reconnus dans l'endothélium en sénescence répllicative et en sénescence radio-induite.

Néanmoins, bien qu'en termes de mécanisme moléculaire des différences apparaissent entre la sénescence répllicative et la sénescence prématurée, en termes de marqueurs de reconnaissance, les cellules sénescences présentent les mêmes profils phénotypiques de base, (Cho, Hwang, 2011 ; Sikora *et al*, 2011 ; Campisi, 2013). Elles présentent en particulier une morphologie élargie. Aussi, à la différence des cellules quiescentes, les cellules sénescences présentent une insensibilité aux stimuli de prolifération et sont stoppées dans leur cycle

cellulaire. Elles expriment d'ailleurs de façon permanente des protéines d'inhibition du cycle cellulaire telles que p21 et/ou p16, (Stein *et al*, 1991). Ces marqueurs sont induits que les cellules soient à la base proliférantes ou quiescentes : ils permettent donc de provoquer ou de maintenir le statut non-cyclant. L'expression de p21 est sous le contrôle de p53, et celle de p16 permet la régulation de phospho-Rb. Si l'abrogation *in vitro* de l'axe p21 ou p16 peut potentiellement permettre de bloquer la sénescence cellulaire, leur surexpression induite peut la provoquer, (Chen *et al*, 2006 ; Chen, Goligorsky, 2006). Les critères majeurs couramment utilisés pour la détection de la sénescence cellulaire seront donc en premiers lieux la morphologie élargie, l'incapacité à proliférer, et l'expression persistante de p21 et/ou p16, (Campisi, d'Adda di Fagagna, 2007). Egalement, la positivité pour le marquage de la SA- β -Galactosidase (pour Senescent Associated β -Galactosidase) a été montrée par Dimri *et coll*, (Figure n°26 ; Dimri *et al*, 1995). Cette enzyme est une β -Galactosidase lysosomale surexprimée dans les cellules sénescents et est spécifiquement active à un pH de 6. Elle n'est pas exprimée dans les cellules différenciées, quiescentes, ou immortalisées. Elle présente l'avantage de réagir avec le X-Gal (pour 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside), et de marquer les cellules sénescents en bleu, rendant une détection par microscopie optique pratique d'utilisation.

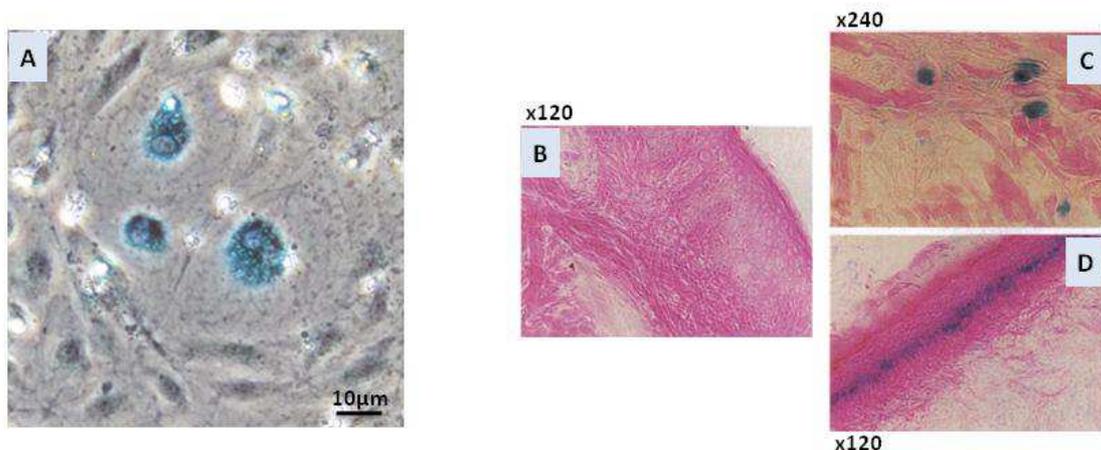


Figure n°26 : Observations microscopiques de marquages de la Senescent Associated β -Galactosidase.

- A. Observation de cellules endothéliales sénescents *in vitro* positives en bleu pour la SA β -Galactosidase.
- B. Observation d'une coupe histologique de derme et épiderme de sujet de 38 ans, (Dimri *et al*, 1995).
- C & D. Observation d'une coupe histologique de derme de sujet de 76 ans (C), et d'une coupe histologique d'épiderme de sujet de 73 ans (D), positif en bleu pour la SA β -Galactosidase, (Dimri *et al*, 1995).

D'autres marqueurs sont utilisés mais cependant, ces paramètres restent variables selon les types cellulaires et la nature de l'inducteur de la sénescence. Des observations microscopiques des cellules sénescents ont pu montrer une modification de la chromatine sur certaines régions via la formation de foyers de condensation d'hétérochromatine ou SAHF (pour Senescence-Associated Heterochromatin Foci). Les SAHF contiennent notamment des histones H3 modifiés sur lysine 9 et des protéines HP1 (pour Heterochromatin Protein 1), et sont souvent retrouvées sur des sites cibles de E2F, les bloquant ainsi et renforçant l'arrêt de croissance, (Narita *et al*, 2003, 2007). Seront potentiellement aussi observés, notamment dans le cas d'une « génotoxicité », des foyers persistants de dommages de l'ADN ou DNA-SCARS (pour DNA-Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence) correspondant à des foyers de cassures de l'ADN ou à des TIF (pour Telomere dysfunction-Induced Foci), (von Zglinicki *et al*, 2005 ; Rodier *et al*, 2011 ; Sikora *et al*, 2011 ; Campisi, 2013). Pour autant, il est à noter que la chromatine des cellules sénescents peut aussi être modifiée de façon à promouvoir l'expression génique. Il apparaît notamment des modifications de l'acétylation et de la méthylation du génome au cours du vieillissement, telles que l'hypométhylation de l'ADN, et une diminution de facteurs de désacétylation d'histones, permettant ainsi une relaxation et une expression du gène concerné, (Bahar *et al*, 2006 ; Fraga, Esteller, 2007 ; Ota *et al*, 2007, 2010 ; Heyn *et al*, 2012 ; Han, Brunet, 2012 ; Tsurumi, Li, 2012).

Les cellules sénescents peuvent potentiellement présenter des modifications mitochondriales. Ces modifications concernent une augmentation de la masse mitochondriale, une augmentation de leur volume individuel, une altération de l'activité de la chaîne respiratoire, une altération du potentiel membranaire, ou encore des dommages de l'ADN mitochondrial, (Lee *et al*, 2002 ; Moiseeva *et al*, 2009 ; Cho, Hwang, 2011). Cette augmentation de la masse mitochondriale peut s'expliquer dans le but de compenser les défauts de fonctions mitochondriales et pour assurer une respiration efficace, mais peut aussi s'expliquer par un défaut de fission, ou encore de qualité de renouvellement du réseau mitochondrial par autophagie/mitophagie, (Jendrach *et al*, 2005 ; Yoon *et al*, 2006 ; Lee *et al*, 2007 ; Yen, Klionsky, 2008).

De plus, les cellules sénescents peuvent présenter une augmentation maintenue du niveau de ROS, en particulier visible par une augmentation d' $O_2^{\cdot-}$. Ceci peut être associé aux altérations mitochondriales et/ou à un défaut dans la régulation par les anti- et pro-oxydants

endogènes, (Muller, 2009). Le stress oxydant étant connu pour être un inducteur de la sénescence, il est donc en somme à la fois cause et conséquence de la sénescence.

Les cellules sénescentes développent également des modifications de l'expression génique et de leur sécrétome. Ces modifications incluent notamment l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de facteurs de croissance et de protéases. Ces modifications phénotypiques ont été définies par le groupe de Campisi comme le SASP pour *Senescence-Associated Secretory Phenotype*, (Shelton *et al*, 1999 ; Coppé *et al*, 2008, 2010 ; Freund *et al*, 2010 ; Campisi, 2013). Ce SASP diffère selon le type cellulaire et le stress inducteur de la sénescence. Les cellules sénescentes ont donc une activité de communication cellulaire paracrine et autocrine augmentée. Selon le contexte physiologique, cette caractéristique présente des effets bénéfiques ou délétères, (Figure n°27). Le SASP peut permettre d'activer la réparation/régénération tissulaire suite à une lésion (*e.g.* TGF- β ; PDGF pour Platelet Derived Growth Factor), ou encore revêt un caractère inflammatoire d'intérêt favorisant l'élimination par le système immunitaire de cellules vieillissantes ou néoplasiques (*e.g.* cellules NK ; IL-6 et 8 (pour Interleukines-6 et 8), MIPs (pour Macrophage Inflammatory Proteins), GM-CSF (pour Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor)), (Xue *et al*, 2007 ; Krizhanovsky *et al*, 2008 ; Coppé *et al*, 2008, 2010 ; Davalos *et al*,

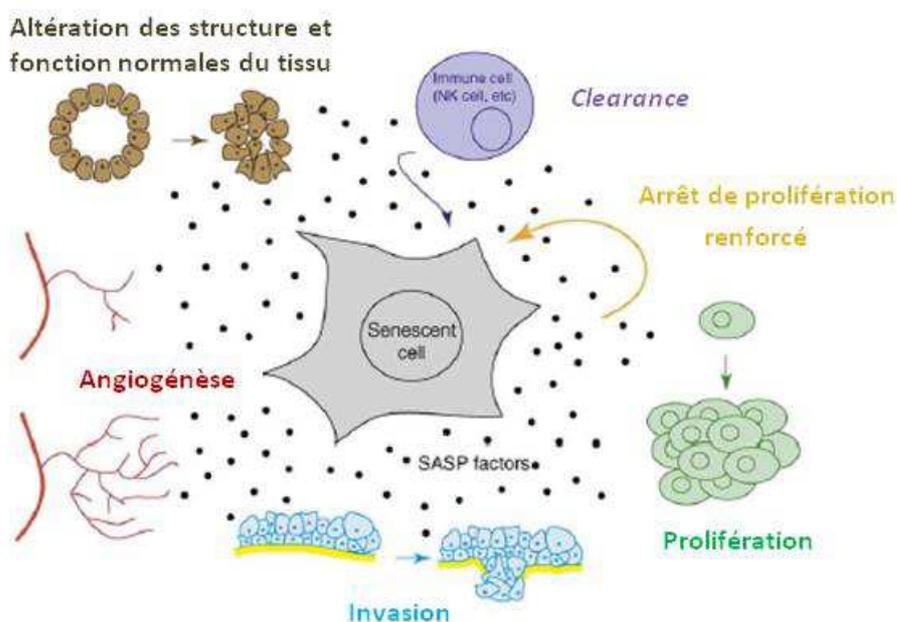


Figure n° 27 : Impacts fonctionnels du SASP.

Adapté de Freund *et al*, 2010.

2010). Cependant, il peut aussi revêtir un caractère délétère en maintenant cette inflammation de façon chronique, pouvant ainsi contribuer à altérer le tissu environnant (*e.g.* IL-6 et 8 ; TGF- β), (Coppé *et al*, 2008 ; Chung *et al*, 2009). Le SASP peut également stimuler ou inhiber les voies de prolifération et de survie, (*e.g.* GROs pour Growth Regulated Oncogenes ; IGF-1 pour Insulin Growth Factor-1 ; TNF- α pour Tumor Necrosis Factor- α), (Coppé *et al*, 2008). Il peut cependant aussi favoriser la progression tumorale via une stimulation de voies pro-angiogéniques (*e.g.* VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor), ou encore modifier la matrice extracellulaire et être pro-transition épithélio-mésenchymateuse, (*e.g.* MMPs pour Matrix MetalloProteinases ; PAI-1), (Coppé *et al*, 2008, 2010 ; Laberge *et al*, 2012). Il est intéressant de noter qu'une sénescence induite par une surexpression forcée de p21 ou de p16 ne conduira pas au développement du SASP, (Coppé *et al*, 2011). Le SASP se développe suite à une sénescence induite ou accompagnée d'une perturbation génomique ou épigénomique telles que des dommages de l'ADN, une dysfonction télomérique, une altération épigénomique, un stress oxydant, ou encore un stress mitogénique. Il a d'ailleurs été montré que le SASP se trouve, du moins en partie, sous le contrôle de voies de réponses aux dommages de l'ADN, en particulier via ATM, dont la signalisation est maintenue dans le temps ; ou encore lorsque la structure de la chromatine est remodelée via une régulation de son acétylation. De façon intéressante, si p53 est un substrat important d'ATM et que son activité contribue de façon majeure au développement de la sénescence et à l'expression de nombreux facteurs, son activité n'est en revanche pas nécessaire à l'expression de SASP classiques telles que l'IL-6 ou l'IL-8, (cf partie III-B ; Rodier *et al*, 2009 ; Coppé *et al*, 2008, 2010 ; Freund *et al*, 2010 ; Pazzoli *et al*, 2012 ; Campisi, 2013).

Autres modifications fonctionnelles, les cellules sénescents montrent une adhésion à la surface extracellulaire augmentée, et une altération des contacts cellule-cellule. Ces altérations peuvent donc entraîner un défaut dans la perméabilité d'une monocouche cellulaire, ou encore dans la communication intercellulaire, mais peuvent aussi permettre le recrutement de cellules immunitaires ou de progéniteurs endothéliaux. De plus, les cellules sénescents pouvant remodeler la matrice extracellulaire, elles modifient aussi le microenvironnement de contact des cellules voisines, favorisant ainsi une déstructuration et une dysfonction du tissu, (Chen *et al*, 2000 ; Nishio *et al*, 2005 ; Sermsathanasawadi *et al*, 2009).

Ainsi, la sénescence cellulaire représente un arrêt irréversible de la division cellulaire mais conserve les cellules métaboliquement actives. Si elle est un mécanisme de barrière lorsqu'il est question de cellules tumorales, il en est différemment lorsqu'il est question de cellules saines. En effet, elle peut permettre d'éviter une transformation néoplasique chez les cellules endommagées, et de freiner l'expansion de la tumeur en réduisant la prolifération cellulaire, et en activant le système immunitaire. Or, dans le cas de cellules saines, la sénescence peut induire des perturbations fonctionnelles maintenues sur le long terme, et peut participer au développement de lésions tissulaires, voire accélérer l'apparition de pathologies normalement liées à l'âge, (Erusalimsky, 2009 ; Collado, Serrano, 2010 ; Campisi, 2013).

B. Mécanismes moléculaires de la sénescence endothéliale

Cette partie détaillera les mécanismes de la sénescence endothéliale et les éventuelles associations *in vivo*. Seront discutés également certains mécanismes détaillés de façon plus avancées dans d'autres types cellulaires préférentiellement non-cancéreux susceptibles d'apparaître dans l'endothélium et utilisés comme bases d'investigations.

1. Sénescence endothéliale répllicative

- a Mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence endothéliale répllicative
 - i. L'érosion des télomères & mécanismes dépendants de l'ADN

Les télomères représentent en quelque sorte, « l'horloge mitotique » de la cellule. Ils sont situés à l'extrémité des chromosomes, et sont constitués d'une répétition de séquence double-brins d'acides nucléiques TTAGGG, (Moyzis *et al*, 1988). Ils forment une coiffe sur les chromosomes, empêchant ainsi leur fusion de leurs extrémités entre elles. A chaque division, les télomères sont raccourcis de quelques bases, (Harley *et al*, 1990). L'activité des nucléases liées à ce raccourcissement engendre une extrémité 3' simple-brin due au *End-replication problem*, (Levy *et al*, 1992). Cette extrémité libre a pour particularité de former une boucle avec des protéines télomériques vers la partie double-brin. Cette structure est la *t-loop*, et permet de ne pas être reconnue en tant que dommages de l'ADN. Les protéines télomériques permettant la protection du télomère forment un complexe appelé *shelterin* qui est constitué de 6 protéines : TRF1 et 2 (pour Telomere Repeat binding Factor 1 et 2), POT1

(pour Protection Of Telomere 1), TIN2 (pour TRF1 Interacting protein 2), TPP1 (pour TIN2 and POT1 interacting Protein 1), et RAP1 (pour Repressor and Activator Protein 1), (Griffith *et al*, 1999 ; de Lange, 2005 ; Palm, de Lange, 2008 ; **Figure n°28A**). Si à l'état basal, les télomères ne sont pas reconnus en tant que cassure de l'ADN, c'est grâce aux protéines TRF2 et POT1 qui ont également un rôle d'inhibition de la NHEJ et de la RH via notamment l'inhibition respective d'ATM et d'ATR, (Lazzerini Denchi *et al*, 2007). Le *shelterin* participe à la protection du télomère mais participe aussi à la synthèse d'ADN lors de l'activité de la Télomérase. La Télomérase est une transcriptase inverse permettant l'élongation des télomères. Elle est composée d'une sous-unité catalytique, la TERT (pour Telomerase Reverse Transcriptase) et d'une matrice d'ARN, la TERC (pour Telomerase RNA Component). Lorsque les télomères sont d'une longueur correcte, les *shelterins* permettent la structure en boucle et ferme l'accès à la Télomérase. Lorsque les télomères sont courts, la structure est ouverte et laisse l'accès à la Télomérase, (de Lange, 2005 ; Nandakumar, Cesh, 2013 ; **Figure n°28A**). Cependant, la Télomérase est faiblement exprimée dans les cellules somatiques, et est très exprimée dans les cellules germinales et tumorales, (Counter *et al*, 1992). D'ailleurs, l'activité de la Télomérase est absente dans les cellules fraîchement isolées d'endothélium quiescent issu d'aorte ou de veine ombilicale. Cependant, cette activité est augmentée lorsque ces cellules sont stimulées à proliférer en culture, (Kurz *et al*, 2003). L'induction de la surexpression de la Télomérase ou de sa sous-unité catalytique permet d'inhiber la sénescence endothéliale répliquative, (Yang *et al*, 1999).

Suite aux multiples divisions des cellules somatiques, les télomères sont raccourcis et ne sont plus protégés, ils sont alors reconnus et signalés comme des cassures de l'ADN. Ils feront intervenir par exemple, la protéine ATM, le complexe MRN, γ H2AX, 53BP1, les facteurs de la NHEJ, les facteurs de la RH, ATR, p53, Rb, p21, et p16. Si ces « dommages » sont non-réparables, selon le type cellulaire, la signalisation provoquera une apoptose ou une entrée en sénescence où dans ce dernier cas la signalisation est persistante, (Karlseder *et al*, 1999 ; d'Adda Di Fagagna *et al*, 2003 ; Takai *et al*, 2003 ; von Zglinicki *et al*, 2005 ; Celli, de Lange, 2005 ; de Lange, 2005 ; Lazzerini Denchi *et al*, 2007 ; Palm, de Lange, 2008 ; Fumagalli *et al*, 2012 ; **Figure n°28B**). En situation normale, l'érosion des télomères se poursuit avec l'âge dans les cellules endothéliales, (Chang *et al*, 1995). Cette sénescence est cependant d'autant plus précoce que les zones vasculaires concernées, telles que les artères coronaires, seront soumises à un flux sanguin et un renouvellement endothélial plus important. Ces zones sont notamment sujettes au développement de l'athérosclérose où de nombreux travaux ont mis à jour un raccourcissement des télomères et une sénescence des

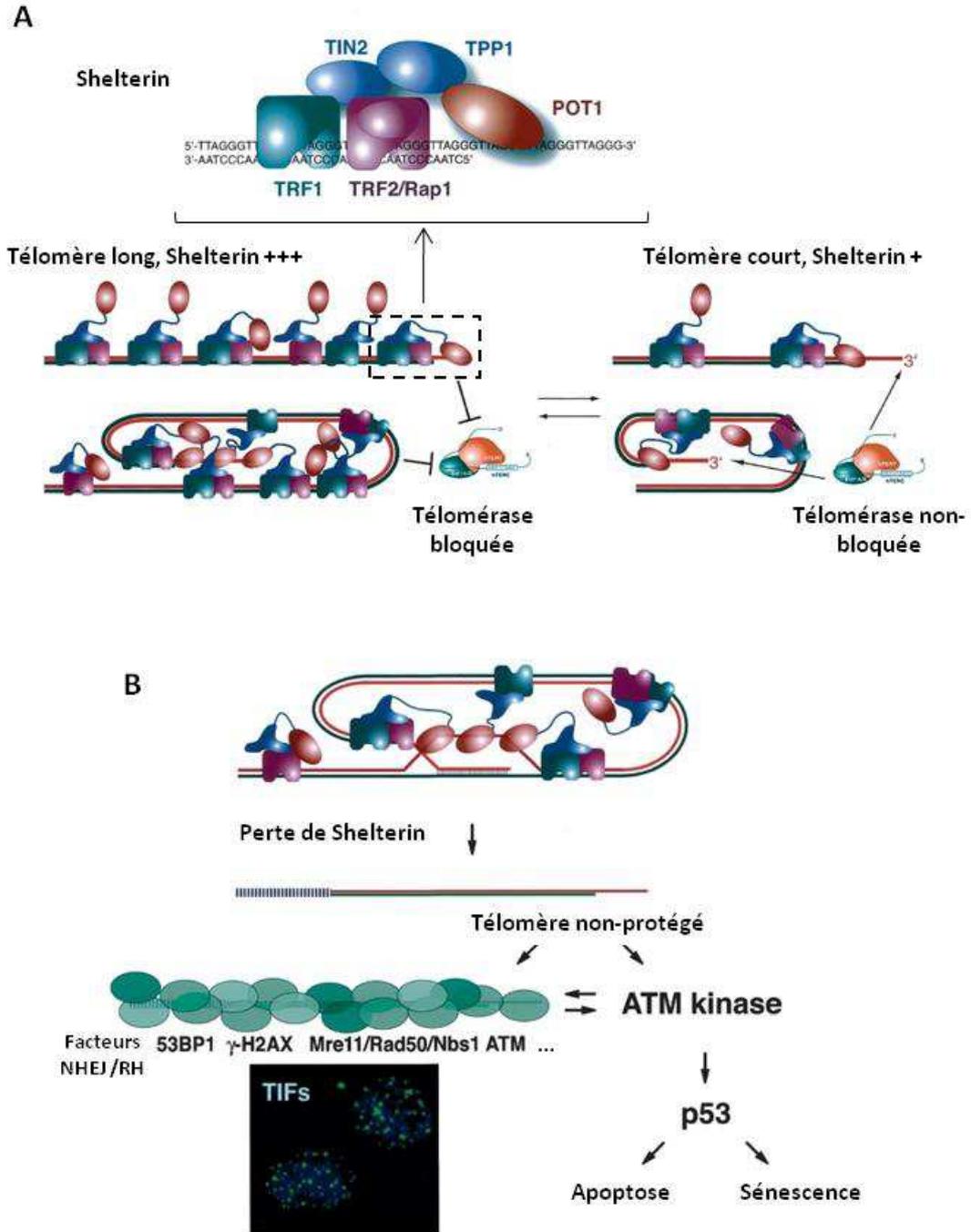


Figure n°28 : Structure du télomère et du complexe Shelterin & Mode d'action de la Télomérase, (A). Signalisation du raccourcissement et de la perte de protection des télomères, (B).

Adapté de de Lange, 2005.

cellules endothéliales, (Chang *et al*, 1995 ; Van der Loo *et al*, 1998 ; Fenton *et al*, 2001 ; Erusalimsky, Fenton, 2002 ; Ogami *et al*, 2004 ; Minamino *et al*, 2002, 2004, 2007 ; Andreassi, 2008). Il est intéressant de noter que les modèles utilisés montrent une absence

d'apoptose endothéliale avec l'âge, (Fenton *et al*, 2001). L'érosion des télomères, mais aussi l'utilisation de modèle de déficience en Télomérase, des dominants-négatifs de protéines du complexe *shelterin*, ou des mutations de protéines de la réparation de l'ADN, conduisent par ailleurs à une sénescence endothéliale accélérée et la contraction précoce de pathologies vasculaires liées à l'âge, (Minamino *et al*, 2002 ; Lombard *et al*, 2005 ; Andreassi, 2008 ; Durik *et al*, 2012). Par ailleurs, les modèles animaux mutés pour les éléments de maintenance des télomères, ou de signalisation/réparation, présentent une durée de vie plus courte et des pathologies normalement liées à l'âge, (Lombard *et al*, 2005 ; Slijepcevic, 2008). Si la déficience en p53 chez la souris peut impliquer le maintien de cellules endommagées par leur dérivation néoplasique ou leur sénescence par accumulation de dommages, les modèles animaux présentant une activation chronique de p53 peuvent aussi favoriser la sénescence cellulaire, et accélérer les phénotypes de vieillissement, (Tyner *et al*, 2002 ; Maier *et al*, 2004). Les patients atteints de certains syndromes de vieillissement prématuré (progérias), développent prématurément des dysfonctions vasculaires de type athérosclérose, des troubles cérébrovasculaires, et souvent décèdent suite à des complications du myocarde, (Martin, 2005).

De plus, l'organisation de la structure de la chromatine, ainsi que l'activité des modulateurs de cette organisation (facteurs d'acétylation, de méthylation...), peuvent participer à la maintenance des télomères. Les régions télomériques des cellules sénescents présentent en effet une relaxation augmentée de la chromatine, comparée aux cellules « jeunes » qui présentent des télomères compactés et protégés. Par ailleurs, des modifications épigénétiques de l'ADN ont été rencontrées au sein de pathologies vasculaires liées à l'âge, (Blasco *et al*, 2007 ; Sinclair, Oberdoerffer, 2009 ; Decottignies, d'Adda di Fagagna, 2011 ; Webster *et al*, 2013). En particulier, il a été montré que SIRT1 (pour Sirtuin 1 ou Silent Information Regulation 2 homolog 1), qui est une histone désacétylase de classe III à activité dépendante du NAD⁺ et peut réguler la structure de la chromatine, peut interagir avec les télomères, favoriser la désacétylation des histones télomériques, atténuer leur raccourcissement, et requiert l'activité de la Télomérase. SIRT1 est aussi capable d'interagir avec d'autres protéines comme p53, et de le désacétyler et l'inactiver, (Luo *et al*, 2001 ; Cheng *et al*, 2003). La surexpression de SIRT1 favorise l'élongation des télomères mais aussi la recombinaison homologue. Chez les souris, la surexpression de SIRT1 prolonge la durée de vie. Sa déplétion favorise le raccourcissement des télomères et le vieillissement prématuré des cellules, (Palacios *et al*, 2010). Les souris déficientes en SIRT1 présentent des dommages

télomériques augmentés, des défauts de développement, et ont une durée de vie plus courte, (Cheng *et al*, 2003 ; El Ramy *et al*, 2009). Les cellules endothéliales traitées par un inhibiteur de sirtuines, le Sirtinol, entrent en sénescence. Les cellules endothéliales sénescents peuvent présenter une expression de SIRT1 diminuée comparée aux cellules jeunes, et un traitement par Resveratrol (polyphénol ; rôle activateur de SIRT1 ; a des propriétés anti-oxydantes), permet de réduire la sénescence *in vitro* et *in vivo*, (Ota *et al*, 2007, 2010 ; Tang *et al*, 2012 ; Hwang *et al*, 2013). Par ailleurs, la surexpression de SIRT1 spécifiquement dans les cellules endothéliales de souris « pro-athérosclérose » permet de réduire le développement de lésions athérosclérotiques, (Zhang *et al*, 2008).

Également, l'expression de PATZ1 (pour POZ/BTB and AT-hook-containing zinc finger protein 1), est diminuée au cours de la sénescence des cellules HUVEC. PATZ1 a notamment un rôle de régulateur de transcription via un remodelage de la chromatine. PATZ1 est également retrouvé réduit au sein de plaques athérosclérotiques chez la souris et au sein des artères des sujets âgés. La délétion de PATZ1 sur les HUVEC jeunes accélère leur entrée en sénescence, tandis que sa surexpression sur les HUVEC âgées la réduit. Par ailleurs, cette sénescence passe par la génération de ROS provoquant des dommages de l'ADN (ATM phospho-Ser1981, γ H2AX) et l'induction de p53. La délétion de PATZ1 dans les cellules déficientes en p53 ne produit pas de sénescence. L'utilisation d'un anti-oxydant (NAC) dans les cellules déficientes en PATZ1 permet de réduire le niveau de ROS, la sénescence, et l'induction de p53, (Cho *et al*, 2012).

ii. Le stress oxydant chronique & les voies mitochondriales

Depuis de nombreuses années déjà les ROS ont été mis en cause dans le vieillissement cellulaire naturel. Une « théorie du vieillissement & radicaux libres » a été posée, (Harman, 1956). Depuis, plusieurs observations ont permis de l'étayer :

- Des cellules cultivées en faible concentration d'oxygène vivent plus longtemps (Packer, Fuehr, 1977), alors que des cellules exposées à de fortes concentrations présentent une durée de vie réduite et un raccourcissement des télomères accéléré, (Von Zglinicki *et al*, 1995).
- L'exposition à un stress oxydant chronique ou la délétion de facteurs anti-oxydants favorisent le vieillissement de l'organisme, alors que l'exposition chronique à un anti-oxydant pourrait augmenter la durée de vie (non-vérifié chez l'humain), (Paul *et al*, 2007 ; Salmon *et al*, 2010 ; Dolara *et al*, 2012 ; Marchal *et al*, 2013).

- La sénescence cellulaire est retrouvée au sein de pathologies liées à l'âge et associées au stress oxydant, (Minamino *et al*, 2002 ; Yudoh *et al*, 2005 ; Farhat *et al*, 2008 ; Cao *et al*, 2013).
- Le stress oxydant provoque la sénescence cellulaire prématurée et peut être associé à un raccourcissement des télomères, (Chen, Ames, 1994 ; Kurz *et al*, 2004 ; Richter, Von Zglinicki, 2007 ; Voghel *et al*, 2010). L'exposition à un anti-oxydant freine la sénescence, et peut potentiellement permettre d'activer la Télomérase et de freiner le raccourcissement des télomères, (Voghel *et al*, 2008 ; Zhan *et al*, 2011).
- Lors du vieillissement, il y a une accumulation de la détérioration des macromolécules compatible avec le stress oxydant : augmentation de 8-hydroxydeoxyguanosine ; une augmentation des mutations/délétions de l'ADN nucléaire et mitochondrial ; une diminution de l'efficacité de dégradation (*e.g.* protéasome) ; et une diminution de l'efficacité de réparation des dommages de l'ADN, contribuant ainsi à fixer les anomalies. De même, il y a une accumulation des marqueurs biologiques révélant une adaptation au long cours des cellules à un état pro-oxydant, par exemple : induction de gènes codant pour des enzymes anti-oxydantes ; répression de gène codant pour des éléments de la chaîne respiratoire, (Balaban *et al*, 2005 ; Trifunovic *et al*, 2008 ; Muller, 2009).
- Les cellules sénescents peuvent présenter des altérations mitochondriales : augmentation de la masse mitochondriale ; stress oxydant mitochondrial ; dysfonction de la chaîne respiratoire ; augmentation du nombre de copies du génome mitochondrial, (Lee *et al*, 2002 ; Trifunovic *et al*, 2008).
- La promotion du pouvoir anti-oxydant au sein de la mitochondrie augmente la durée de vie chez la souris, (Schriner *et al*, 2005), et peut freiner le vieillissement cellulaire, (Obukhova *et al*, 2009 ; Gruber *et al*, 2013).

Le vieillissement vasculaire et le stress oxydant sont clairement associés. La sénescence endothéliale est observée chez les souris âgées, et est retardée lorsque ces souris ont un pouvoir anti-oxydant endogène important, (Donato *et al*, 2007 ; Csiszar *et al*, 2007). De plus, la sénescence endothéliale a été maintes fois rencontrée au cours d'études de pathologies vasculaires liées à l'âge telles que l'athérosclérose ou l'hypertension, (Minamino *et al*, 2002 ; Madamanchi, Runge, 2007), où là aussi des traitements par anti-oxydants pourraient permettre de réduire ces dysfonctions, (Voghel *et al*, 2008 ; Camici *et al*, 2011).

Il est à noter que si les cellules sénescents présentent un stress oxydant chronique, ce stress oxydant peut participer à renforcer le phénotype de sénescence, voire potentiellement le diffuser. Ainsi, le stress oxydant peut être une conséquence et/ou un inducteur de la sénescence, et sera compris dans un phénotype en marge entre la sénescence répllicative et la sénescence prématurée. En effet, le stress oxydant peut en retour contribuer notamment à l'endommagement des télomères, altérer le génome nucléaire et mitochondrial, maintenir des signaux de stress, et participer au maintien à long terme des dysfonctions mitochondriales, (Carlisle *et al*, 2002 ; Muller, 2009 ; Feine *et al*, 2012).

Sur le plan mécanistique, la relation stress oxydant et sénescence endothéliale joue sur plusieurs paramètres. De nombreux facteurs peuvent être à l'origine du stress oxydant : des dysfonctions mitochondriales (*e.g.* chaîne respiratoire, ADN mitochondrial), les anti-oxydants endogènes, ou encore les protéines de la famille Bcl-2.

Notamment, concernant l'endothélium, il a été montré que les patients jeunes présentant des maladies mitochondriales sont souvent sujets à développer des complications vasculaires, (Puddu *et al*, 2005). Par ailleurs, les souris exprimant une ADN polymérase mitochondriale défectueuse vieillissent prématurément, (Trifunovic *et al*, 2004). Les mutations et les dommages de l'ADN mitochondrial corrént également avec les zones d'athérosclérose et le vieillissement, (Ballinger *et al*, 2000, 2002 ; Meissner *et al*, 2007).

D'autres altérations peuvent expliquer le stress oxydant mitochondrial. Il a pu être montré des défauts d'expression/d'activité de certains complexes de la chaîne respiratoire au cours de la sénescence endothéliale répllicative. Un modèle de cellules endothéliales d'artère pulmonaire porcine a montré un défaut d'activité du complexe IV en lien avec l'augmentation de la génération d' $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 au cours de la sénescence, (Xin *et al*, 2003). Un modèle d'aorte de rat âgé a également montré une expression et une activité réduite des complexes I, III et IV, (pas d'altération des complexes II et V), en association avec un stress oxydant mitochondrial, (Ungvari *et al*, 2008). Un modèle murin inductible pour l'expression du complexe II muté sur la sous-unité SDHC dans la cornée, confère une augmentation de la génération d' $O_2^{\cdot-}$ dans les cellules endothéliales et épithéliales. Cette augmentation est accentuée lors du vieillissement, et aggrave les dysfonctions de la cornée, (Onouchi *et al*, 2012). La déficience en SOD2 chez la souris entraîne un stress oxydant mitochondrial associé à un défaut d'activité du complexe II, à l'induction de dommages de l'ADN nucléaire, et accélère la sénescence cellulaire de la peau. Ces caractères sont retrouvés au cours du vieillissement chez la souris, (Velarde *et al*, 2012).

Egalement, l'induction de Nox4 dans les cellules HUVEC, favorise le stress oxydant mitochondrial, et entraîne une inhibition de l'expression et de l'activité du complexe I. Nox4 est augmentée dans les cellules endothéliales sénescentes, et son inhibition retarde la sénescence, (Koziel *et al*, 2013). Par ailleurs, il a été montré que l'acquisition de la confluence chez les cellules BAEC est associée à une augmentation du potentiel membranaire et à une diminution d'UCP2, (pour mitochondrial Uncoupling Protein 2, facteur découplant). La délétion d'UCP2 dans les cellules endothéliales proliférantes réduit les fonctions de prolifération et de migration, et provoque une augmentation de la génération de superoxydes mitochondriaux à long terme. Ces cellules deviennent sénescentes (mesure au 14^{ème} jour) de façon dépendante de p53. La réduction de p53 ou la complémentation par SOD2 ou UCP2 elle-même, réduisent la sénescence et restaurent les fonctions, (Shimasaki *et al*, 2013).

Concernant les facteurs anti-oxydants endogènes, il a pu être montré sur endothélium aortique issues de souris âgées, qu'une déficience en SOD2 aggrave l'augmentation du stress oxydant mitochondrial, le défaut de vasorelaxation, et l'apparition de dommages de l'ADN mitochondrial, (Ohashi *et al*, 2006 ; Liu *et al*, 2011). Par exemple, le phénotype SOD2+/- chez la souris, provoque un stress oxydant mitochondrial et des dommages de l'ADN mitochondrial, et accélère la survenue de dysfonctions vasculaires liées à l'âge, (Wenzel *et al*, 2008). Notons que les souris SOD2-/- ne sont pas viables, alors que les souris SOD2+/- et SOD1-/- sont viables mais très sensibles au stress oxydant et présentent une durée de vie réduite et/ou un déclin prématuré des fonctions organiques. Les souris GPX1-/- sont viables et ne présentent pas de réduction de la durée de vie mais seront sensibles au stress oxydant. De façon intéressante, les souris surexprimant la Catalase spécifiquement dans la mitochondrie et non dans les peroxysomes ou le noyau, présentent une durée de vie augmentée de 20%. Ces données soulignent l'importance majeure de la régulation du stress oxydant au niveau mitochondrial pour le bon fonctionnement des cellules, (Schriner *et al*, 2005 ; Salmon *et al*, 2010). L'induction de SOD2, de GPX1, ou de la Catalase peut permettre de réduire le stress oxydant et la sénescence endothéliale, (Ota *et al*, 2010 ; Miyashita *et al*, 2012 ; Higashi *et al*, 2013).

Les cellules endothéliales sénescentes peuvent présenter des modifications de la masse et du réseau mitochondrial. Il a été montré une diminution de l'expression de facteur de fission Fis1 et Drp1 dans les cellules endothéliales HUVEC sénescentes et une élongation du réseau mitochondrial, ainsi qu'un endommagement de l'ADN mitochondrial, (Jendrach *et al*, 2005 ; Mai *et al*, 2010). Cependant, un excès de fission mitochondriale a aussi été observé

sous stress oxydant dans des cellules endothéliales BAEC sénescents, (Shimasaki *et al*, 2013). Il a également été montré dans des cellules HeLa, que la déficience en Fis1, un facteur de fission mitochondrial, provoque une élongation du réseau mitochondrial et une entrée en sénescence. Ce profil est associé à une diminution du potentiel membranaire mitochondrial, à une augmentation de la génération de ROS, et à la génération de dommages de l'ADN nucléaire, (Lee *et al*, 2007).

De plus, comme énoncé plus haut, les protéines de la famille Bcl-2 pourraient tenir un rôle dans la régulation du stress oxydant mitochondrial. Bcl-2 a notamment des propriétés anti-oxydantes en localisant le glutathion à la mitochondrie (Zimmerman *et al*, 2007) et, il a été montré que Bcl-2 est moins exprimé dans les cellules endothéliales macrovasculaires en sénescence répliquative (cellules HUVEC proliférantes ou cellules endothéliales aortiques issues de souris âgées), et que ces dernières présentent un important stress oxydant mitochondrial et une diminution du potentiel membranaire mitochondrial. Ce phénotype peut être réduit par une transfection de Bcl-2 ou par traitement anti-oxydant N-acétyl cystéine (NAC, précurseur du Glutathion), et conduit une réduction du stress oxydant mitochondrial et à une récupération des fonctions endothéliales (migration, structure tubulaire). De plus,

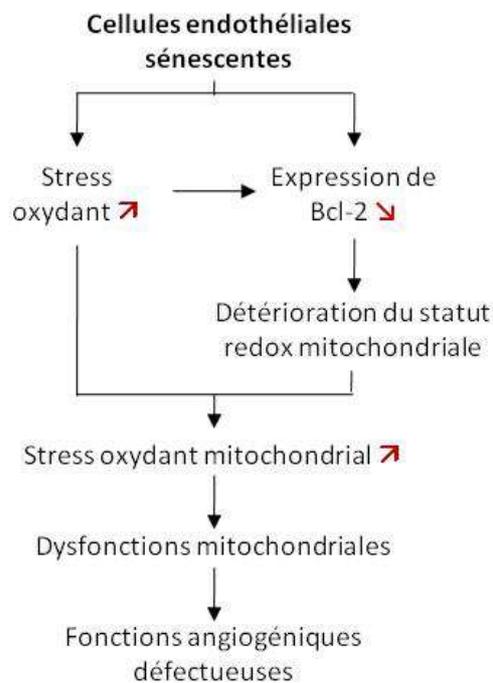


Figure n°29 : Implication de Bcl-2 et du stress oxydant mitochondrial au cours de la sénescence endothéliale répliquative.

Adapté d'Uraoka *et al*, 2011.

l'inhibition de Bcl-2 dans les cellules endothéliales jeunes provoque un stress oxydant mitochondrial, une chute du potentiel membranaire mitochondrial, et conduit aux mêmes dysfonctions endothéliales. De façon intéressante, si le traitement par NAC permet d'augmenter l'expression de Bcl-2 dans les HUVEC sénescents, le traitement par H₂O₂ de cellules HUVEC jeunes permet de diminuer l'expression de Bcl-2. La perte de Bcl-2 en sénescence conduit à un défaut de relocalisation mitochondriale du Glutathion que la transfection par Bcl-2 permet de restaurer, (**Figure n°29** ; Uraoka *et al*, 2011). Il est également montré ici une augmentation de l'expression des protéines mitochondriales SOD2 et UCP2 dans les cellules sénescents, induites probablement en réponse au stress oxydant mitochondrial, ainsi qu'une augmentation du nombre de copies de l'ADN mitochondrial et une irrégularité de la morphologie mitochondriale. Cependant l'inhibition de l'expression de Bcl-2 dans les cellules jeunes n'affecte pas l'expression de SOD2 et d'UCP2, alors que la surexpression de Bcl-2 dans ces mêmes cellules permet de les augmenter. Bcl-2 peut donc potentiellement avoir un rôle sur l'expression des protéines SOD2 et UCP2, rôle qui reste à vérifier en condition de sénescence. Il est aussi observé une augmentation de l'expression de la Catalase et une absence de modulation de GPX1, (Uraoka *et al*, 2011).

A contrario, d'autres types cellulaires (fibroblaste, carcinome de l'endomètre) ont montré qu'une surexpression de Bcl-2 peut participer à l'entrée en sénescence, (Rincheval *et al*, 2002 ; Crescenzi *et al*, 2003). Un autre modèle de fibroblaste surexprimant Bcl-2 montre une protection contre le stress oxydant par H₂O₂, mais ne protège pas de l'entrée en sénescence consécutive, (Lopez-Diazguerrero *et al*, 2006).

Il est aussi montré une modulation d'autres membres de la famille Bcl-2 lors de la sénescence endothéliale répliquative. Par exemple, il est observé une légère diminution de l'expression de Bax et une légère augmentation de Bcl-xL, (Uraoka *et al*, 2011). L'impact de ces modulations dans ce phénotype n'a pas été clairement déterminé à l'heure actuelle.

Par ailleurs, le stress oxydant, connu pour provoquer des lésions de l'ADN, est capable d'induire des dommages télomériques et d'induire une signalisation dépendante des cassures de l'ADN, comme nous l'avons énoncé lors du précédent chapitre, (Minamino, Komuro, 2007 ; Passos *et al*, 2007). En effet, le stress oxydant chronique peut causer un raccourcissement des télomères et accélérer l'entrée en sénescence des cellules endothéliales, (Kurz *et al*, 2004). A l'inverse, la suppression du stress oxydant ou l'hypoxie dans les cellules endothéliales préserve les télomères, au moins en partie via l'activité de la Télomérase, (Furomoto *et al*, 1998 ; Minamino *et al*, 2001). Cependant, si l'introduction de la Télomérase prévient la

sénescence liée à l'érosion des télomères, elle ne prévient pas la sénescence induite par un stress (*e.g.* stress oxydant, irradiation) où auront lieu d'autres altérations que les télomères, (Bodnar *et al*, 1998 ; Gorbunova *et al*, 2002). De façon intéressante, les patients ayant une dysfonction des artères coronaires associée à un syndrome métabolique, présentent des EPC aux télomères plus courts que les patients sans syndrome métabolique, eux-même présentant des EPC aux télomères plus courts que les individus sains. Les patients atteints en plus de syndrome métabolique présentent davantage de dommages oxydatifs de l'ADN, (Satoh *et al*, 2008). Egalement, les patients atteints de maladies mitochondriales ont en moyenne des télomères plus courts de 1,5kb au sein des leucocytes, (Oexle *et al*, 1997). Par ailleurs, l'utilisation du FCCP (facteur découplant), provoque une augmentation du stress oxydant mitochondrial, et accentue l'érosion des télomères, (Liu *et al*, 2002). A l'inverse, l'utilisation d'anti-oxydant à cible mitochondriale a été montré pour limiter l'érosion des télomères et augmenter la durée de vie des fibroblastes sous stress oxydant, (Saretzki *et al*, 2003).

Le stress oxydant chronique peut aussi provoquer des lésions de l'ADN non-téломérique et avoir un effet génotoxique sur le long terme, permettant potentiellement là aussi d'induire une signalisation dépendante des cassures de l'ADN, et d'accélérer l'entrée en sénescence de façon dépendante de p53, (Minamino, Komuro, 2007 ; Joyce *et al*, 2009 ; Oeseburg *et al*, 2009 ; Durik *et al*, 2012). Par ailleurs, si les dommages de l'ADN s'accumulent avec l'âge, ils sont d'autant plus retrouvés dans les zones de dysfonction vasculaire comme les zones d'athérosclérose où le stress oxydant les accentuera, (Martinet *et al*, 2002 ; Andreassi, 2008 ; Borghini *et al*, 2013). Il a pu notamment être montré que la sénescence endothéliale associée à un stress oxydant *in vitro* sur cellules HUVEC proliférantes peut être freinée par un traitement au N-acétyl cystéine ou par inhibition de l'activité d'ATM par l'inhibiteur KU55933. De même, dans le cas d'une dysfonction aortique associée à un stress oxydant *in vivo* chez la souris diabétique, suite au traitement par Streptozotocine, la sénescence endothéliale est retrouvée dans les vaisseaux aortiques chez les souris ATM^{+/+}, et est réduite chez les souris ATM^{-/-}, (Zhan *et al*, 2010). De façon intéressante, si les dommages de l'ADN s'accumulent avec le vieillissement, ils sont d'autant plus contractés dans les tissus exposés à un stress oxydant mitochondrial important comme le foie, (Wang *et al*, 2009). Par ailleurs, lors de la sénescence de fibroblastes, le maintien chronique de l'expression de p21 peut aussi provoquer un stress oxydant mitochondrial, via une boucle de signalisations empruntant notamment p53, p21, p38 et TGF- β , et provoquer ainsi des dommages de l'ADN, (Passos *et al*, 2010). L'accumulation de ROS via p21 peut survenir de façon dépendante ou

indépendante de p53. p16, quant à elle, ne permet pas l'accumulation de ROS, (Macip *et al*, 2002, 2003).

Pour autant, certaines observations indiquent des voies alternatives de la sénescence en regard du stress oxydant et de la réponse aux dommages de l'ADN. Il a pu être aussi montré que suite à un stress oxydant dans un modèle de lymphoblaste déficient pour la protéine ATM, la sénescence peut survenir de façon indépendante de la voie ATM et de la persistance de la signalisation des dommages de l'ADN. Dans ce cas, la sénescence passe par une voie dépendante de p38 et de l'accumulation de Lamine dans le noyau, (Barascu *et al*, 2012a, 2012b). Egalement, la régulation de l'organisation de la chromatine peut être impliquée lors du stress oxydant chronique. Comme nous l'énoncions plus tôt, SIRT1, qui est capable de déacétyler les histones mais aussi p53, est diminué lors de la sénescence endothéliale. La surexpression de SIRT1, prévient la sénescence endothéliale induite par H₂O₂, (Ota *et al*, 2007). SIRT1 est réduit *in vivo* au sein des vaisseaux âgés et des vaisseaux athérosclérotiques. Un traitement par Resveratrol (polyphénol, rôle activateur de SIRT1, a des propriétés anti-oxydantes), permet de réduire la sénescence endothéliale sous stress oxydant, (Ota *et al*, 2007, 2010 ; Kao *et al*, 2010 ; Tang *et al*, 2012). Egalement, un traitement hyperglycémique sur cellules endothéliales microvasculaires provoque une sénescence associée à une réduction de SIRT1 et une augmentation de p300 (histone acétyltransférase). Cette sénescence est plus précoce que sur des cellules macrovasculaires HUVEC pour le même traitement. Dans les deux cas, il y a induction de stress oxydant et diminution de l'expression de la Télomérase. Le traitement par Resveratrol ou l'inhibition de p300 permet de rétablir ces paramètres et de réduire la sénescence. De plus, *in vivo*, un modèle de diabète montrant des dysfonctions dans le rein, présente également une réduction de SIRT1 et une augmentation de p300, (Mortuza *et al*, 2013). Par ailleurs, un modèle de fibroblaste sénescé montrant une résistance à l'apoptose induite par stress oxydant massif sous H₂O₂, montre une expression élevée de Bcl-2 et une expression réduite de Bax. Ces cellules présentent aussi une augmentation de l'activité méthyltransférase sur H4K20 et une réduction de l'activité acétyltransférase sur H4K16, mais aussi globalement une réduction de l'activité histone acétyltransférase totale. En particulier, ces modifications épigénétiques globales, contrairement à Bax, ne sont pas retrouvées sur le gène Bcl-2, qui présente au contraire un enrichissement en H4K16 acétylé et une diminution en H4K20 méthylé, expliquant ainsi son expression augmentée, (Sanders *et al*, 2013).

iii. Le Céramide & Sphingosine-1-Phosphate

Peu d'études ont mis en avant un rôle des sphingolipides au cours de la sénescence endothéliale ou dans son induction, (Van Brocklyn, Williams, 2012)

Cependant, il a pu être observé par un même groupe que la quantité de Céramide augmente dans les cellules endothéliales et les fibroblastes en sénescence répliquative, (Venable *et al*, 1995, 2006) ; et que le traitement par Céramide-C6 exogène peut induire la sénescence des cellules endothéliales (HUVEC), (Venable *et al*, 2009).

Il a été également montré un rôle du Céramide-C24 endogène dans l'inhibition de la Télomérase dans les cellules humaines de neuroblastome, (Kravetska *et al*, 2003). L'addition de Céramide-C6 exogène a aussi été montrée pour participer au raccourcissement des télomères dans les cellules A549 (carcinome pulmonaire), via l'inhibition de l'association d'une GAPDH nucléaire aux télomères, et indépendamment d'une action sur la Télomérase, (Sundararaj *et al*, 2004).

Par ailleurs, l'activation constitutive de Rac1 conduit à un stress oxydant mitochondrial de façon dépendante du Céramide, et provoque une sénescence endothéliale prématurée, (Deshpande *et al*, 2003).

Egalement, les cellules endothéliales en sénescence vont exprimer davantage les récepteurs à la S1P. Notons que les récepteurs S1P1 et 2 sont davantage exprimés dans les cellules endothéliales issues de lésions athérosclérotiques et dans chez les cellules endothéliales microvasculaires issues de rats âgés. Comparées aux cellules normales, les cellules endothéliales sénescents montrent des défauts de fonctions (perméabilité, migration, formation de tubes), sous traitement à la S1P. L'inhibition du récepteur S1P₂ permet de restaurer ces fonctions, via notamment la ré-augmentation de Rac et la re-diminution de PTEN, montrant ainsi l'impact important de l'activité de S1P₂ dans les dysfonctions présentées par les cellules endothéliales sénescents, (Estrada *et al*, 2008 ; Lee *et al*, 2009 ; Lu *et al*, 2012).

b Sénescence endothéliale répliquative & processus physiopathologiques

Les changements vasculaires liés à l'âge incluent notamment une diminution de la compliance, et une augmentation de l'inflammation, pouvant ainsi promouvoir des altérations comme l'athérogénèse. Sont également observés des défauts de propriétés anti-

thrombogéniques et angiogéniques, résultant ainsi en des troubles de la coagulation et de la régénération tissulaire, (Erusalimsky, 2005, 2009 ; Higashi *et al*, 2012). La sénescence endothéliale répliquative présente ces mêmes profils phénotypiques, et a été en particulier retrouvée dans les zones de l'arbre vasculaire soumises à un flux sanguin turbulent et à un renouvellement cellulaire plus fréquent, et sensibles à l'hypertension et athérosclérose, (Chang *et al*, 1995 ; Fenton *et al*, 2001 ; Minamino *et al*, 2002 ; Voghel *et al*, 2007 ; Cho *et al*, 2012). Ce type de pathologies pouvant être amplifié prématurément par des facteurs de risque individuel tels que le tabagisme et le diabète, il est important de noter que les deux formes de sénescence, répliquative et prématurée, peuvent être alors retrouvées, (Chen, Goligorsky, 2006).

Les défauts de fonction des cellules endothéliales sénescents peuvent ainsi potentiellement avoir un rôle majeur dans l'initiation ou la progression de pathologies vasculaires. Par exemple, les cellules endothéliales sénescents montrent des défauts de relaxation (NO), (Minamino *et al*, 2002). Il a pu être aussi montré une sous-expression des protéines de jonctions telles que la VE-Cadhérine et la ZO-1 (pour Zonula Occludens-1) dans un modèle de cellules endothéliales sénescents sous inhibition de la Télomérase, et dans un modèle associé à la voie Notch, (Huang *et al*, 2010 ; Venkatesh *et al*, 2011). De la même façon, la Claudine-5 est sous-exprimée dans les cellules endothéliales sénescents, (Lee *et al*, 2010). Les cellules endothéliales sénescents montrent également une perturbation des jonctions cellule-cellule, associée à une modulation de l'expression/distribution des protéines de jonction (VE-Cadhérine, ZO-1, Occludine, Claudine-5), et un défaut de perméabilité de la monocouche endothéliale. De plus, ces altérations affectent aussi l'intégrité des jonctions inter-cellulaires avec les cellules voisines non-sénescents, (Krouwer *et al*, 2012). Elles perdent également la capacité de migration et à former des structures tubulaires *in vitro*, (Yang *et al*, 1999 ; Uraoka *et al*, 2011). De plus, de façon intéressante, les altérations de structure cellulaire liées à la sénescence sont plus marquées dans les cellules endothéliales microvasculaires que les cellules endothéliales macrovasculaires, (Cavallaro *et al*, 2000).

Il a aussi été montré que les cellules endothéliales sénescents surexpriment des facteurs de SASP pro-inflammatoires tels que l'IL-8, l'IL-6, ICAM-1, le TGF- β , des facteurs pro-coagulants tels que PAI-1, et des facteurs de dégradation de la matrice extracellulaire tels que MMP-9, (Comi *et al*, 1995 ; Shelton *et al*, 1999 ; Minamino *et al*, 2002 ; Csiszar *et al*, 2003 ; Huang *et al*, 2010). Egalement, il a pu être montré que les cellules endothéliales sénescents présentent au sein des lésions athérosclérotiques surexpriment ces facteurs, en

particulier, ICAM-1 y sera surexprimé de façon dépendante de p53, (Csiszar *et al*, 2003 ; Gorgoulis *et al*, 2005). Par ailleurs, comme nous le verrons plus bas, l'induction des facteurs pro-inflammatoire peut être étroitement lié aux DNA-SCARS, et il a été montré une accumulation de dommages au cours du vieillissement *in vivo*, et lors de pathologies liés à l'âge comme l'athérosclérose, (Andreassi, 2008 ; Wang *et al*, 2009).

Il est intéressant de noter que, si la sénescence endothéliale répliquative après raccourcissement des télomères favorise la production de facteurs SASP pro-inflammatoire tels que l'IL-8, et que ceci favorise l'apparition de dysfonctions endothéliales, l'IL-8 elle-même favorise le développement du phénotype sénescence (via un mécanisme qui reste à être déterminé), montrant ainsi que le sécrétome sénescence peut permettre l'entretien du phénotype, (Medina *et al*, 2013).

Ainsi, les cellules sénescence endothéliales seraient susceptibles d'entretenir leur statut, et de favoriser certains processus tels que la coagulation et les processus de recrutement et de passage de cellules immunitaires, participant ainsi au maintien de l'inflammation tissulaire.

2. Sénescence endothéliale prématurée radio-induite

a Limites des modèles expérimentaux

Les altérations vasculaires au sein de lésions radio-induites ont été mises en évidence depuis de nombreuses années. Pour autant, l'implication directe de la sénescence prématurée des cellules endothéliales dans leur développement n'a jamais été clairement établie, même si elle y a été retrouvée. Car en effet, il s'agit de pouvoir répondre à la question suivante : est-ce que la sénescence radio-induite est une cause ou une conséquence de l'altération du tissu irradié ?

Auparavant, l'hypertrophie observée après irradiation des cellules endothéliales était souvent associée à un effet de compensation de l'espace laissé par les cellules mortes, et ce afin de maintenir la confluence et la stabilité de la monocouche cellulaire, (Johnson *et al*, 1982). Cependant, l'engagement d'un processus de sénescence peut également expliquer cette observation, voire également expliquer les dysfonctions vasculaires et les dysfonctions tissulaires observées.

L'étude de la sénescence radio-induite des cellules endothéliales est encore limitée à l'heure actuelle. De plus, ces études utilisent pour la plupart des modèles macrovasculaires. Si

ces modèles reflètent les effets des radiations sur des vaisseaux artériels ou veineux, ils ne reflètent pas précisément les effets sur la microcirculation qui compose pourtant majoritairement la vascularisation intra-organes. Par ailleurs, les études utilisent souvent des cellules endothéliales macrovasculaires ou progénitrices en prolifération, alors que comme nous l'énoncions plus tôt, les cellules endothéliales sont quiescentes à quelques exceptions près. Si ces études montrent cependant une sénescence endothéliale radio-induite, les mécanismes moléculaires associés peuvent donc largement varier selon « l'âge » des cellules et le statut dans le cycle cellulaire, notamment du point de vue de l'impact des dommages de l'ADN, (Igarashi *et al*, 2007, 2008 ; Sermsathanasawadi *et al*, 2009 ; Mendonca *et al*, 2011).

Toutefois, quelques études utilisent des modèles macrovasculaires quiescents *in vitro*. Ces études utilisent notamment le modèle HUVEC, qui, comme énoncé plus haut, reste difficilement associable aux observations physiopathologiques, puisque d'origine ombilicale. Les modèles issus de macrovaisseaux aortiques, (*e.g.* BAEC ou HAEC pour Bovine ou Human Aortic Endothelial Cell), sont aussi utilisés, mais ne restent représentatifs que dans le cas par exemple, d'une sénescence associée à une pathologie artérielle. Ces études montrent cependant que l'irradiation induit une sénescence endothéliale et cela de façon dépendante de la dose d'irradiation, (Gajdusek *et al*, 2001 ; Oh *et al*, 2001 ; Igarashi *et al*, 2007, 2008 ; Imaizumi *et al*, 2010). Elles permettent également d'approcher les mécanismes moléculaires impliqués.

Enfin, très peu d'études *in vitro* utilisent un modèle microvasculaire bien que, comme nous l'avons énoncé précédemment, ces cellules composent la majorité de la vascularisation des tissus sains, et que l'altération radio-induite de la microcirculation ait été montré depuis plusieurs années. Si la confirmation doit encore être faite sur modèle quiescent, il a été montré en culture *in vitro*, une sénescence endothéliale microvasculaire après irradiation mesurée après 14 jours avec un maximum testé d'environ 30% pour 8Gy, (Ungvari *et al*, 2013). Ce n'est que récemment qu'il a été montré une sénescence endothéliale microvasculaires radio-induite *in vivo*. Cette sénescence microvasculaire après irradiation est fortement retrouvée lors d'une irradiation cérébrale de souris nude à 20Gy, ainsi que sur des coupes post-mortem de patients atteints de glioblastome et traités par chirurgie et par radiothérapie à 60Gy. Les zones non-irradiées ne présentent pas de sénescence microvasculaire, (Borovski *et al*, 2013).

Cependant, la question de la chronologie *in vivo* reste posée. Afin, de savoir à quel niveau la sénescence endothéliale est impliquée dans le développement de lésions radio-induites tardives, autrement dit, si elle est cause ou conséquence, il est nécessaire d'en

comprendre ses mécanismes moléculaires. Pour cela, il s'agit de passer par une approche *in vitro* afin d'en déterminer les facteurs essentiels, pour ensuite pouvoir les cibler *in vivo* afin d'observer un éventuel impact sur les altérations tissulaires radio-induites tardives.

b Mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence endothéliale prématurée radio-induite

i. Les voies de réponses aux dommages de l'ADN

Si l'activation des voies de réponses aux dommages de l'ADN suite au raccourcissement des télomères constitue une activation de la sénescence, l'endommagement de l'ADN non-téломérique par des agents génotoxiques comme les radiations permet également une induction de la sénescence dépendante de la signalisation des dommages de l'ADN. Suite aux radiations, certaines études ont ainsi pu montrer une sénescence endothéliale dépendante de la génération de dommages de l'ADN et d'une persistance de leurs signalisations.

Il a été montré sur modèles macrovasculaires aortiques quiescents que les dommages de l'ADN radio-induits sont majoritairement réparés dans les 2 premières heures suivant l'irradiation. Il est montré aussi une apoptose précoce (~10% au cours des 10 premières heures après 10Gy), ainsi que l'expression des marqueurs d'arrêt de cycle et une morphologie atypique des cellules survivantes suggérant la sénescence. Egalement, une augmentation de l'expression de p53 est observée de façon dépendante de la dose dès les premières heures post-irradiation et persistante au moins à 24h, (Gajdusek *et al*, 2001). Le phénotype sénescence radio-induite sera confirmé peu après, et montrera une augmentation en fonction de la dose d'irradiation et du temps, (Oh *et al*, 2001). Il a été également montré une sénescence radio-induite des cellules HUVEC confluentes impliquant une augmentation soutenue de p53 et p21, et montrant une disparition des foyers de cassures de l'ADN (γ H2AX) après 24h, (Imaizumi *et al*, 2010). Les travaux suivants d'Igarashi *et coll*, ont comparé la sénescence induite sur cellules endothéliales macrovasculaires BAEC en phase exponentielle de prolifération et cellules en confluence. Ils ont ainsi pu observer que les cellules proliférantes deviennent rapidement et massivement sénescences après 5 jours suite à une exposition à 8Gy, (~85%). A l'opposé, les cellules à confluence irradiées montrent moins de sénescence. Cependant, le repiquage de ces cellules immédiatement après irradiation provoque une augmentation de ce niveau de sénescence. Cet effet est largement diminué lorsque les cellules sont repiquées 72h post-irradiation. Ces travaux montrent alors que les cellules confluentes

réparent plus efficacement leurs dommages de l'ADN, et que la stimulation de la prolifération exacerbe l'impact des dommages de l'ADN et favorise la sénescence. Ils montrent également que la réparation des dommages passe par les voies ATM et DNA-PK. L'utilisation de la Wortmannine (inhibiteur des PI3KK et de la réparation des cassures double-brin), sur cellules confluentes au moment de l'irradiation ou peu après, favorise la persistance de cassures et la sénescence après repiquage, (Igarashi *et al*, 2007, 2008).

Cependant, si la sénescence après irradiation des cellules endothéliale microvasculaire a été montrée (Borovski *et al*, 2013 ; Ungvari *et al*, 2013), la mise en cause des voies dépendantes des dommages de l'ADN n'a pas encore été établie. Il apparaît par ailleurs, que ces dommages sont majoritairement réparés dans ces cas.

Ainsi, l'implication des mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN dans la sénescence endothéliale radio-induite demande à être éclaircie. Dans la mesure où peu d'études décryptent de façon détaillée le processus moléculaire de sénescence endothéliale radio-induite, les mécanismes empruntés dans d'autres modèles cellulaires non-immortalisés assurent une base d'investigation.

De façon intéressante, Campisi *et coll*, ont montré sur un modèle de fibroblastes proliférants irradiés à 10Gy, un développement de la sénescence radio-induite dépendante de la signalisation persistante des dommages de l'ADN (DNA-SCARS) et de p53. En particulier, la persistance de la signalisation de la voie dépendante d'ATM joue un rôle majeur. L'activation d'ATM emprunte l'activité de Nbs1, de l'axe p53/p21 et de Chk2, et est visible par la persistance de foyers de cassures double-brin de l'ADN. Egalement, la persistance du signal ATM (mais pas de p53) conditionne le développement de composés du SASP, en particulier l'IL-6 et l'IL-8. En effet, la persistance de foyers et l'expression d'IL-6 et 8 sont corrélées, et l'inhibition de la voie ATM, ainsi que celle de Nbs1 ou Chk2, et non celles de p53, ou d'ATR, réduisent ces sécrétions. Ces observations sont corrélées *in vivo* au sein de lésions malignes. De plus, il est montré que le milieu conditionné par les cellules irradiées sénescentes proficientes pour ATM a un pouvoir pro-invasif sur les cellules tumorales supérieur à celui des cellules déficientes pour ATM. La persistance de foyers de dommages au niveau des télomères participe aussi à l'augmentation des IL-6 et 8, que ce soit sous irradiation ou en réplicatif, et l'induction de la Télomérase la réduit. Cependant, les foyers persistants ne résidant pas qu'au niveau des télomères, cette réduction reste partielle, alors que l'inhibition d'ATM permet une réduction totale de la sécrétion d'IL-6 et 8. Les auteurs

montrent aussi une action à double tranchant de p53 : son activité est requise pour l'entrée de la cellule en sénescence, or, il est observé dans ce modèle que la restriction de p53 induit une augmentation supérieure des foyers persistants et une augmentation supérieure et accélérée de facteurs du SASP potentiellement pro-inflammatoires ou pro-tumoraux. Ainsi, si l'entrée en sénescence radio-induite dépend ici des dommages de l'ADN persistants et de p53, le SASP est quant à lui un caractère associé qui dépend des dommages persistants mais pas de « l'arrêt en sénescence » en lui-même, qui va au contraire freiner le SASP en limitant les dommages. Il est d'ailleurs à noter que la sénescence induite par une surexpression de p16 hors irradiation ne permet pas le développement de SASP et est indépendant de la présence de foyers de signalisation de dommages de l'ADN. De plus, si l'induction de la sénescence par l'oncogène Ras est effective dans les cellules proficientes ou déficientes pour ATM et implique la formation de foyers de dommages de l'ADN, seules les cellules déficientes pour ATM montreront une restriction de l'augmentation de l'IL-6 et 8, (Rodier *et al*, 2009, 2011 ; Le *et al*, 2010 ; Coppé *et al*, 2008, 2010, 2011 ; **Figure n°30**).

Les DNA-SCARS, bien que positifs pour les marqueurs classiques de la signalisation et la réparation des cassures, ne montrent pas de réparation en soit. En plus d'ATM, Nbs1, p53 et

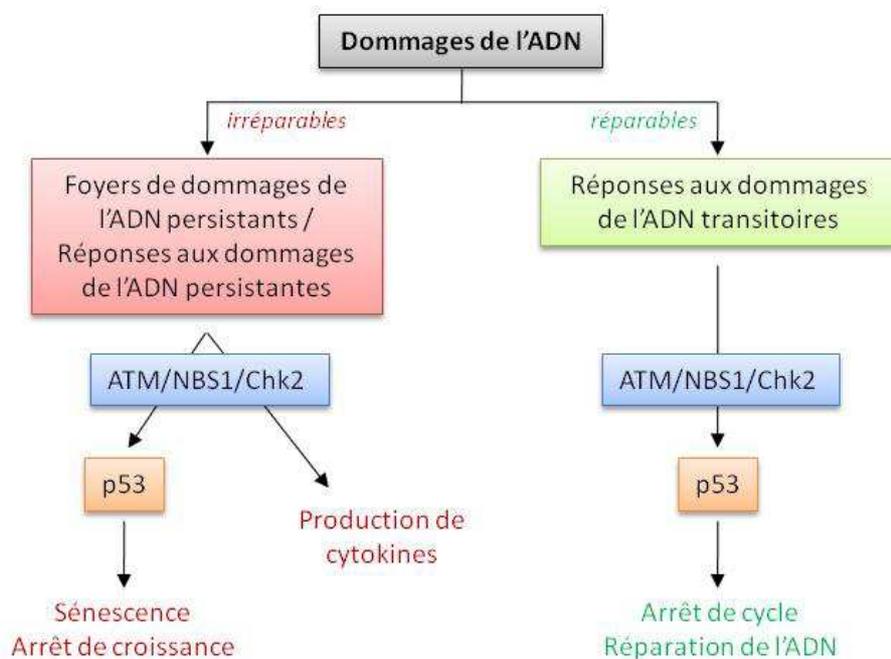


Figure n°30 : Modèle de mécanisme d'induction du SASP sous la dépendance de la réponse aux dommages de l'ADN.

Adapté de Rodier *et al*, 2009.

Chk2, leur composition peut comprendre notamment 53BP1, PML, γ H2AX, MDC1, MRE11, et ne comprend pas Rad51 et RPA70. Les cellules déficientes pour ATM, ATR ou encore Nbs1, développent quand même des DNA-SCARS. Si la déficience en p53 ou Rb provoque une réduction de l'arrêt en sénescence, elle n'empêche pas le développement de DNA-SCARS. A l'inverse, la déficience en γ H2AX perturbe la structure des DNA-SCARS, et interfère avec le recrutement de Chk2 et MDC1 (et non 53BP1), et réduit la sénescence dépendante de p53, ainsi que le SASP, (Rodier *et al*, 2011).

Concernant l'endothélium, rappelons commé énoncé dans la partie précédente, que l'irradiation favorise la sécrétion de nombreux facteurs dits d'activation, pouvant être exprimés à long terme, (Van der Meeren *et al*, 1997). Ces facteurs sont retrouvés dans les profils de SASP laissant supposer que la sénescence endothéliale radio-induite est également soumise au SASP. Cependant, il n'a été que récemment montré une acquisition du SASP (au moins en partie, et comprenant l'IL-6) chez les cellules endothéliales microvasculaires sénescents à 8 jours après irradiation à 6Gy, (Ungvari *et al*, 2013), et sur cellules HUVEC sénescents après irradiation à 4Gy, (Kim *et al*, 2013). Dans les deux cas, les dommages de l'ADN radio-induits ont été détectés, pouvant ainsi indiquer une contribution de leur signalisation au cours de la sénescence endothéliale radio-induite, mais leur relation au SASP n'a pas été clairement définie.

De façon intéressante, Zhan *et coll*, ont montré que la sénescence endothéliale prématurée induite sous stress oxydant par H₂O₂ *in vitro* sur cellules HUVEC proliférantes est dépendante de la signalisation dépendante d'ATM via p53. En effet, l'utilisation de pré-traitement par anti-oxydant, le N-acétyl cystéine, ou par inhibiteur d'ATM, le KU55933, ou encore par *siRNA* contre ATM, permet de réduire le niveau de sénescence endothéliale *in vitro*. Il en est de même dans le cas d'une dysfonction aortique *in vivo* chez la souris diabétique suite au traitement par Streptozotocine. La sénescence endothéliale est alors retrouvée au sein des vaisseaux aortiques chez les souris ATM^{+/+}, et est réduite chez les souris ATM^{-/-}, (Zhan *et al*, 2010).

Cependant, il a été montré récemment le développement de la sénescence prématurée après irradiation ou traitement radio-mimétique sur fibroblastes AT, de façon indépendante d'ATM. Si ces cellules sont très radiosensibles à forte dose, elles sont en revanche résistantes aux faibles doses. Or, du fait de leur défaut de réparation, ces cellules accumulent des dommages de l'ADN, activent p53 après 24h, entrent en arrêt de cycle, et en sénescence. A faible dose, ces cellules sont défectueuses pour l'activation de Bax et de la Caspase-3, et ne

montrent pas d'apoptose. Ces données montrent ainsi la possibilité d'une entrée en sénescence radio-induite en absence d'ATM, (Park *et al*, 2013).

L'ensemble de ces données met en évidence une redondance dans certains mécanismes moléculaires empruntés au cours de la sénescence induite sous des stress différents. Cependant, ces données indiquent potentiellement une nouvelle fois les différences d'impacts des dommages de l'ADN et de leur signalisation en regard du niveau de stress, du type cellulaire, et du statut proliférant versus non-proliférant des cellules. Ainsi, dans la mesure où peu d'études fournissent le détail de l'implication des dommages de l'ADN et de leur signalisation à long terme après irradiation de l'endothélium sain, il apparaît important que ces analyses soient effectuées au cours de la sénescence endothéliale radio-induite.

Cependant, les radiations favorisent aussi d'autres types d'altérations de l'ADN tels qu'une réorganisation de la chromatine pouvant avoir un impact sur la sénescence.

Il a été montré que quelques foyers de dommages de l'ADN positifs pour γ H2AX persistent à 5 jours après irradiation d'une population de fibroblastes positive pour la sénescence. Ces foyers colocalisent avec ATM phospho-Ser1981 et p53 phospho-Ser15, et ne colocalisent pas avec les télomères. Ils augmentent en fonction de la dose d'irradiation. Ils sont plus larges que les foyers primaires, et peuvent représenter des altérations de la chromatine plus que des cassures à proprement parlé. En effet, si on peut supposer que ces foyers résultent de dommages irréparables, il est observé que le signal persiste au sein de ponts chromosomiques où l'ADN est relié, (Suzuki *et al*, 2006a, 2006b ; Noda *et al*, 2012). Rappelons par ailleurs qu'il a précédemment été montré la possibilité d'activer les voies de réponses aux dommages de l'ADN en absence de cassures en provoquant une association stable de facteurs de la réparation à la chromatine, (Soutoglou, Misteli, 2008). Ainsi, la réorganisation de la chromatine pourrait en elle-même constituer à la fois une protection contre l'aggravation des dommages et contre l'apparition d'une instabilité génomique, mais aussi constituer le siège de signaux persistants participant à l'entrée en sénescence dont l'activation de p53, (Costes *et al*, 2010 ; Noda *et al*, 2012 ; Sulli *et al*, 2012). Par ailleurs, il a pu être également récemment montré une sénescence endothéliale prématurée chez des EPC issues de patients fumeurs atteints de pneumopathie chronique obstructive. Ces cellules sénescents présentent des dommages de l'ADN et l'entrée en sénescence peut être réduite en inhibant la voie ATM mais aussi en activant SIRT1 (Resveratrol). L'inhibition d'ATM conduit d'ailleurs à la ré-augmentation de SIRT1. Ceci indique ainsi l'importance des

régulations épigénomiques sur le développement de la sénescence, potentiellement au-delà des régulations par les voies de réparation, (Paschalaki *et al*, 2013). Par ailleurs, une diminution de l'expression de SIRT1 a également été observée dans des cellules endothéliales d'artère pulmonaire en sénescence après une irradiation à 10Gy *in vitro*, (Panganiban *et al*, 2013). De façon intéressante, il a également été observé récemment que l'utilisation de divers inhibiteurs d'HDAC (Trichostatine A, Butyrate de Sodium) provoque un remodelage de la chromatine induisant la sénescence cellulaire en absence de cassures de l'ADN, (Place *et al*, 2005 ; Pospelova *et al*, 2009), ainsi que l'induction du SASP, (Pazzoli *et al*, 2012). De plus, si l'induction du SASP sous inhibiteur d'HDAC comprend une dépendance d'ATM pour la sécrétion de l'IL-6 et 8, en revanche l'inhibition seule de l'HDAC-1 suffit à augmenter la sécrétion de l'Ostéopontine indépendamment des voies de signalisation de dommages de l'ADN, révélant ainsi des variations dans le mécanisme d'induction des différents composés du SASP. De plus, les fibroblastes traités par inhibiteur d'HDAC favorisent la progression tumorale *in vivo*, et, l'Ostéopontine est augmentée tandis que l'HDAC-1 est réduite au sein des cellules stromales de tumeurs du sein, montrant ainsi le potentiel pouvoir pro-tumoral du SASP, (Pazzoli *et al*, 2012).

ii. Le stress oxydant chronique radio-induit & les voies mitochondriales

Si le stress oxydant a été mis en cause dans le vieillissement naturel des cellules, leur induction importante sous irradiation a été également mise très tôt en avant afin d'expliquer le vieillissement cellulaire prématuré radio-induit, et les pathologies développées à long terme, (Harman, 1956 ; Epperly *et al*, 2008 ; Azzam *et al*, 2012). De nombreux travaux ont mis en évidence le bénéfice des traitements anti-oxydants contre les troubles tissulaires contractés après irradiation, (cf partie II-E). Ces effets positifs mettent en avant l'existence d'un stress oxydant chronique après irradiation. Les cellules sénescents présentent classiquement un stress oxydant augmenté, ainsi la sénescence induite prématurément après irradiation est susceptible d'être associée à ce stress oxydant et d'être la cible de ces traitements anti-oxydants. Un effet bénéfique des traitements anti-oxydants des modèles de sénescence radio-induite a été montré. Parmi ces traitements anti-oxydants, on retrouve le N-acetyl cystéine, la Catalase, SOD2, et les métalloporphyrines à manganèse à activité SOD-mimétique telles que le MnTBAP (pour Manganese 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin), qui peut se localiser à la mitochondrie et substituer à SOD2 dans des modèles déficients, (Melov *et al*, 1998 ; Patel *et al*, 1999, 2003 ; Li *et al*, 2001 ; Quagliari *et al*, 2005). Il a ainsi notamment été

montré que la sénescence radio-induite dans les cellules souches mésenchymale dérivées de cordon ombilical est réduite par un traitement à la Catalase, (Ko *et al*, 2012). De même, l'utilisation d'un dérivé de MnTBAP ou de N-acetyl cystéine, permet de bloquer la suppression à long terme de la moelle osseuse de souris irradiées sur corps entier à 6,5Gy. Cet effet passe par la réduction spécifique de la sénescence radio-induite des cellules souches hématopoïétiques associée à la persistance de ROS et de dommages de l'ADN (mesurés à 30 jours post-irradiation), (Li *et al*, 2011 ; Wang *et al*, 2010). Dans un modèle similaire, (souris irradiées sur corps entier à 7,5Gy), il est montré que l'utilisation de Resveratrol (pré-traitement de 7 jours et post-traitement de 30 jours) permet de limiter les dommages radio-induits sur la moelle osseuse à moyen et long-terme, et d'améliorer la survie. Cette protection passe par la réduction de la sénescence des cellules souches hématopoïétiques qui dépend d'un stress oxydant chronique. De façon intéressante, la protection par le Resveratrol passe par ses propriétés anti-oxydantes (augmentation de SOD2 et de GPX1, diminution de Nox4), et activatrice de SIRT1. En effet, l'utilisation d'Ex527, un inhibiteur de SIRT1, contrecarre les effets radioprotecteurs du Resveratrol, (Zhang *et al*, 2013).

Les cellules endothéliales microvasculaires irradiées sont aussi susceptibles de contracter un stress oxydant après irradiation, qu'un traitement anti-oxydant permet de réduire, (Collins-Underwood *et al*, 2008). S'il a pu être montré que les cellules endothéliales microvasculaires peuvent devenir sénescents après irradiation, il n'a cependant pas été décrit à ce jour de stress oxydant chronique dans ces cellules, (Ungvari *et al*, 2013).

De même, il a été montré des altérations potentiellement durables des fonctions mitochondriales après irradiation, tels que des troubles de la respiration et de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire. Il a également été montré des dommages de l'ADN mitochondrial, et une modification de la masse/structure du réseau mitochondrial, (cf partie I-A-3-a-iii ; Yamamori *et al*, 2012 ; Kam, Banati, 2013). Ces différentes modifications peuvent entraîner un stress oxydant, et peuvent être rencontrées au cours de la sénescence endothéliale répllicative, (cf partie III-B-1-a-ii). Cependant, ces altérations mitochondriales n'ont pas été déterminées au cours de la sénescence endothéliale radio-induite. Or, si l'irradiation cause une première vague de stress oxydant, les mitochondries altérées pourraient ensuite être responsables d'une seconde vague durable et participer à l'installation d'un stress chronique et d'un entretien de la sénescence, (Leach *et al*, 2001 ; Pham *et al*, 2001 ; Ogura *et al*, 2009 ; Yamamori *et al*, 2012).

Des modulations post-irradiation à long terme des voies mitochondriales des protéines de la famille Bcl-2 sont encore à confirmer au sein des cellules endothéliales, ([Gajdusek et al, 2001](#) ; [Nubel et al, 2006](#) ; [Mendonca et al, 2011](#)). Leur impact lors de la sénescence endothéliale radio-induite est inconnu.

Récemment, il a été observé que l'irradiation cérébrale (2Gy) chez la souris provoque, à long terme (2 et 12 mois), des lésions tissulaires, où sont retrouvés des défauts de réparation des dommages de l'ADN et une sénescence prématurée liés à la persistance d'un stress oxydant. Ce modèle montre, également à long terme, une augmentation de p53 et de Bax, et une réduction de Bcl-2, ([Suman et al, 2013](#)).

HYPOTHESES & OBJECTIFS

A l'heure actuelle, les bénéfices de la radiothérapie reposent sur la balance mettant en jeu l'impact sur le tissu tumoral et l'impact sur les tissus sains périphériques. Si le premier reste le mieux appréhendé et ciblé, il reste très difficile de réduire l'impact sur les tissus sains et d'empêcher l'apparition d'effets secondaires. Comprendre les mécanismes d'apparition de ces effets revêt donc une importance majeure. En particulier, si les effets secondaires aigus peuvent être limités par une diminution de la dose et l'utilisation de traitements complémentaires, les effets secondaires tardifs ont une évolution plus complexe à déchiffrer, et restent difficilement prévisibles et difficilement traitables.

L'importance majeure de la réponse endothéliale sur les effets aigus a déjà été montrée, et de nombreuses observations physiopathologiques indiquent que l'endothélium joue également un rôle essentiel dans le développement des effets tardifs.

En particulier, notre hypothèse générale est que l'établissement après irradiation de la sénescence microvasculaire et la persistance de signaux de stress contribuent à ces troubles chroniques, (**Figure n°31**). Cependant, au regard des études *in vivo*, il n'existe à l'heure actuelle aucune preuve de la sénescence endothéliale radio-induite en tant que « cause ». Effectivement, si les liens directs entre radiation & sénescence endothéliale, radiation & pathologie, et sénescence endothéliale & pathologie, sont bien établis, le lien direct radiation/sénescence endothéliale/pathologie reste à être confirmé. En effet, le problème réside dans le contrôle de la chronologie du développement de la pathologie radio-induite. La question restera : la sénescence endothéliale favorise-t-elle la lésion, ou la lésion favorise-t-elle la sénescence endothéliale ?

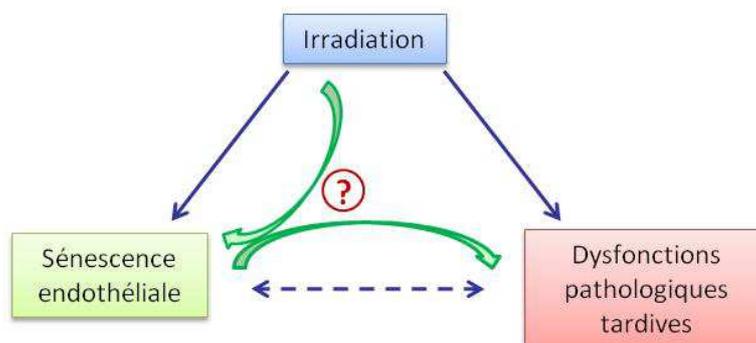


Figure n°31 : Hypothèse générale.

Pour répondre à cette question, avant tout, il s'agit d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence endothéliale radio-induite *in vitro* avant de les transférer *in vivo*. Cependant, concernant les études *in vitro* précédentes, les modèles utilisés comprennent souvent des cellules de macrovaisseaux en état répliatif. Si les origines et les mécanismes moléculaires de la sénescence endothéliale répliatif sont relativement bien décrits, il reste encore beaucoup de voies à explorer concernant les mécanismes impliqués dans la sénescence endothéliale radio-induite. En particulier, le choix du modèle d'étude a son importance dans la mesure où cette sénescence prématurée radio-induite concerne majoritairement des cellules endothéliales microvasculaires quiescentes au sein des tissus sains irradiés.

Dans notre cas d'étude, nous avons souhaité nous rapprocher d'avantage de la physiologie de l'endothélium sain en optant pour un modèle d'irradiation unique de cellules endothéliales microvasculaire HMVEC-L (pour Human Microvascular Endothelial Cell – Lung) placées en monocouche confluyente stable, (**Figure n°32**).

Au cours de ce travail de thèse, **les objectifs de cette étude *in vitro* ont été de mesurer la sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite, et de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans son développement.** Après un examen de la littérature, nous avons pris pour cibles des mécanismes potentiellement responsables de stress persistant après irradiation. Nous avons alors analysé différents axes : l'activité des voies de réponses aux dommages de l'ADN, les axes dépendants de p53, les axes dépendant du stress oxydant mitochondrial, et les protéines majeures de la famille Bcl-2. Nous avons également analysé certains paramètres fonctionnels à potentiel impact microenvironnemental : l'activation, la perméabilité et la respiration mitochondriale.

De plus, dans la mesure où notre équipe a précédemment identifié un radioprotecteur de la toxicité aiguë : la Sphingosine-1-Phosphate (S1P), **nous avons également testé l'hypothèse d'un effet à long terme du pré-traitement à la S1P sur la sénescence et/ou sur les événements moléculaires associés.** Comme nous l'avons énoncé dans l'introduction, le pré-traitement à la S1P, en protégeant les cellules de la mort cellulaire radio-induite aiguë, peut potentiellement favoriser la persistance des dommages de l'ADN. Ainsi, il pourrait provoquer une augmentation de la sénescence par cette voie. Egalement, la S1P peut avoir des effets alternatifs (*e.g.* inflammation, perméabilité). En ce sens, nous avons contrôlé les effets de la S1P sur les différents paramètres moléculaires analysés.

Cette étude est une première étape dans le développement de cibles contre la sénescence microvasculaire radio-induite. Le but par la suite, est de pouvoir contrôler cette sénescence et de vérifier ses implications *in vivo*. Nous espérons, à terme, pouvoir utiliser la S1P en association avec un inhibiteur pharmacologique contre une des cibles définies au cours de cette thèse, afin de limiter les effets secondaires aussi bien aigus que tardifs induits par la radiothérapie.

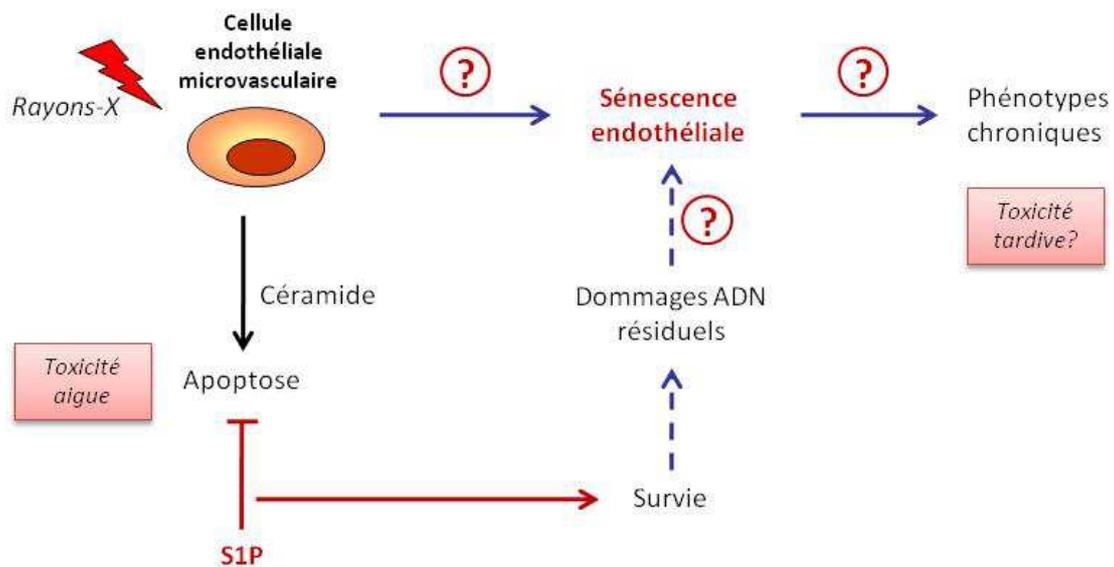


Figure n°32 : Questions de l'étude.

- Quel est le niveau sénescence endothéliale microvasculaire après irradiation aux rayons X, et quels sont les mécanismes moléculaires impliqués ?
- La protection par un pré-traitement à la S1P de la mort cellulaire aiguë radio-induite accentue-t-elle le niveau de sénescence et/ou les mécanismes associés ?
- La sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite est-elle associée à des troubles fonctionnels ?

RESULTATS

Partie I: Article – L’irradiation induit la sénescence des cellules endothéliales microvasculaires non-proliférantes indépendamment de l’inhibition de l’apoptose par la S1P.

Radiation induces senescence in non-dividing microvascular endothelial cells independently of inhibition of apoptosis by S1P.

Ces travaux font l’objet d’un article soumis pour publication dans le journal *Cancer Research*.

Résumé de l’article – Nous avons précédemment montré que l’utilisation d’un pré-traitement par sphingolipide Sphingosine-1-Phosphate (S1P), permet de limiter l’apoptose radio-induite aiguë des cellules endothéliales microvasculaires quiescentes, cependant sans prendre en compte l’induction potentielle d’effets à long terme. En effet, ces cellules endothéliales protégées par la S1P présentent des dommages de l’ADN persistants sur quelques jours. Les dommages de l’ADN peuvent contribuer à l’entrée en sénescence des cellules. Ainsi, cette étude propose d’évaluer le niveau de sénescence après irradiation aux rayons X des cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMVEC-L) quiescentes, ainsi que de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués, au sein d’une population cellulaire pré-traitée ou non par la S1P. Dans un premier temps, nous avons montré que l’irradiation induit une augmentation, équivalente avec ou sans S1P, de la sénescence des cellules HMVEC-L en fonction de la dose et du temps, associée à un phénotype pro-inflammatoire persistant dans le temps. La non-implication des dommages de l’ADN persistants lors d’un traitement par S1P est confirmée par l’absence de maintien de la signalisation des dommages de l’ADN, et la non-réduction de la sénescence lors d’un traitement chronique post-irradiation par KU55933, un inhibiteur d’ATM. De façon intéressante, nous avons observé une augmentation de l’expression et de l’activité de p53 en fonction de la dose d’irradiation et persistante dans le temps. Egalement, nous avons détecté un maintien de l’augmentation de la génération de superoxydes mitochondriaux, et un défaut de la respiration mitochondriale. De même, l’expression des anti-oxydants endogènes SOD2 et GPX1 est augmentée en fonction de la dose d’irradiation, et est maintenue dans le temps. L’utilisation de la Pifithrin- α , un inhibiteur de l’activité de p53, ou de MnTBAP, une porphyrine à manganèse à activité SOD-mimétique, de façon

chronique post-irradiation, permet de réduire la sénescence radio-induite des cellules HMVEC-L. Par ailleurs, le traitement par MnTBAP, mais pas par Pifithrin- α , permet de rétablir la respiration mitochondriale, indiquant ainsi que p53 est en aval des dysfonctions mitochondriales. En conclusion, nous montrons une voie d'induction de la sénescence des cellules endothéliales microvasculaires quiescentes dépendante de l'induction d'une dysfonction mitochondriale et de l'axe p53, et indépendante de la modulation de l'apoptose par la SIP. Cette dissociation permet d'envisager de nouvelles stratégies afin de moduler les effets aigus d'une part et les effets tardifs radio-induits d'autre part.

Approches & limites expérimentales – Les cellules endothéliales microvasculaires primaires HMVEC-L ont été utilisées à confluence stable en reflet de la physiologie vasculaire. Ces cellules ont ensuite été irradiées ou non à 1, 5 ou 15Gy et maintenues en culture à long terme jusqu'à 7, 14, 21, ou 28 jours. A terme, nous avons évalué le niveau de sénescence endothéliale radio-induite, ainsi que les mécanismes moléculaires, et les phénotypes tardifs associés. Les cellules ont également été soumises ou non à un pré-traitement de radioprotection de la mort cellulaire précoce par SIP afin d'identifier un potentiel effet à long terme. Afin d'identifier les axes moléculaires clés dans le développement de la sénescence, des traitements chroniques post-irradiation ont été appliqués contre les cibles d'intérêt.

En termes de limites expérimentales, ces travaux ont reposé sur l'utilisation de cultures de cellules primaires particulièrement rares et coûteuses. Ces cellules sont fragiles et demandent une utilisation mesurée. Elles ne sont utilisables que du passage p4 à p7 à un repiquage à 5000-8000 cellules/cm², et nécessitent environ 7 jours pour atteindre la confluence. De plus, chaque expérience requiert près d'1 mois depuis la mise en culture jusqu'au dernier temps testé. Chaque expérience a donc dû être organisée et élaborée avec soin. Egalement, le « projet sénescence » du laboratoire a été amorcé avec ces travaux de thèse, ainsi, chaque procédure expérimentale a nécessité un développement ou une ré-adaptation particulière pour ce modèle cellulaire.

**Radiation induces senescence in non-dividing microvascular endothelial cells
independently of inhibition of apoptosis by S1P**

Audrey Lafargue^{1,2,3}, Claire Pecqueur^{1,2,3}, Marie Konarzewski^{1,2,3}, Sophia Gruissem^{1,2,3},
François Vallette^{1,2,3,4}, Marie-Hélène Gaugler^{1,2,3}, and François Paris^{1,2,3,4,5}

Authors' Affiliations:

¹Inserm, UMR892, Nantes, F-44000, France.

²Université de Nantes, Nantes, F-44000, France.

³CNRS, UMR 6299, Nantes, F-44000, France.

⁴Institut de Cancérologie de l'Ouest, Saint-Herblain, F-44800, France.

⁵Corresponding author

No potential conflicts of interest were disclosed

Running title
Endothelial cell senescence induced by ionizing radiation

Keywords: endothelial cell, senescence, ionizing radiation, sphingosine 1-phosphate, oxidative stress, p53

Abstract

We previously demonstrated that the sphingolipid, Sphingosine 1-Phosphate (S1P), is mitigating rapid quiescent endothelial cell apoptosis induced by ionizing radiation, disregarding long-term responses. However, S1P-radioprotected endothelial cells are displaying DNA damage for few days. DNA damage is able to enhance cell senescence in proliferative cells from different origins. This present study is evaluating radiation-induced senescence in quiescent endothelial cells, by deciphering molecular pathway in regards to the acute radioprotection by S1P and the remaining DNA damage. First, we showed that irradiation of non-proliferative primary microvascular endothelial cells, HMVEC-L, induces a dose- and time-dependent senescence, associated with inflammatory phenotype independently of S1P pretreatment. The non-contribution of remaining DNA damage in the radiation-induced senescence was confirmed by the lack of long-term activation of DNA damage response and of senescence inhibition by the ATM inhibitor KU55933. Interestingly, p53 stress pathway and oxidative stress regulators such as SOD2 and GPX1, were induced in regards to mitochondrial superoxide generation and mitochondrial dysfunctions. Pharmacological inhibition of p53 activity by pifithrin- α and enhancement of mitochondrial oxidative stress detoxication by a SOD mimetic MnTBAP, strongly reduce endothelial cell senescence. Also, MnTBAP, but not pifithrin- α , restore mitochondrial respiration, showing that p53 is downstream of mitochondrial dysfunction. In conclusion, we clearly demonstrate a specific radiation-induced senescence pathway in non-proliferative microvascular endothelial cell, which is independent of the apoptotic process inhibited by S1P. This new senescence pathway might open new strategy to modulate late radiation-induced cellular dysfunction.

Introduction

Radiation therapy is a standard treatment to fight cancer. Despite improvement of the tumor area targeting by new stereotaxic radiotherapy devices, radiotoxicity of peritumoral healthy tissues remains a limit for the escalate of the radiation dose and for antitumoral efficacy (1). Deciphering the multicellular and molecular mechanisms in endothelial senescence will allow new strategies for the protective and mitigating drugs against those radiation toxicities.

Within the complexity of molecular and cellular mechanisms, endothelial cell compartment is regarded as one of the major player in acute and chronic toxicities (2, 3). Microvascular endothelial apoptosis constitutes a primary lesion involved in high radiation dose-induced acute organ failure including gastrointestinal syndrome (4), blood-spinal cord brain barrier breakdown (5), central nervous syndrome (6), and parotid gland hypo-salivation (7).

Radiation-induced pro-thrombotic and anti-fibrinolytic endothelial phenotypes lead to inflammatory cells adhesion, platelets aggregation on the vessel walls and thrombi as such are revealed in chronic radiation pathogenesis including fibrosis, atrophy, atherosclerosis or heart failure (8).

Radiation-induced death is triggered by the sphingolipid ceramide generation upon the hydrolysis of plasma membrane sphingomyelin by acid sphingomyelinase (ASM). Genetic invalidation of ASM blocked the radiation-induced microvascular endothelial cell apoptosis, inhibiting small intestine necrosis (e.g. GI syndrome) and ultimately to mice death (4). Moreover, intravenous injection of sphingosine 1-phosphate (S1P), a ceramide metabolite with antagonist properties mimics ASM invalidation in mice inhibiting endothelial cell apoptosis, small intestine necrosis and death (9). S1P can be considered as a relevant mitigator to high dose-induced acute radiation toxicity. However, the continuum between acute and late toxicity has never been clearly defined. If it exists, S1P should inhibit radiation-induced long term endothelial radiation toxicity.

Senescence is one of these long-term cell dysfunctions, contributing to aged-related diseases (10). Senescent cells are characterized by undifferentiated and enlarged morphology and by the up-regulation of senescence-activated β -galactosidase (SA β -gal) (10). Senescence occurs after high number of cell division leading to mitosis exhaustion and telomere shortening (replicative senescence). Moreover, senescence can also appear rapidly in response to genotoxic or oncogenic stress (premature senescence). Senescence-induced cell cycle arrest is under the control of the p53 and/or p16^{INK4a} anti-oncogenes activation leading to respective p21^{WAF1} over-expression of and retinoblastoma hypo-phosphorylation. Another senescent hallmark is the extracellular secretion of pro-inflammatory cytokines, including interleukin-1, -6 and -8 and TNF- α (a.k.a. senescence-associated secretory phenotype or SASP). SASP is not considered as an acute response to radiation, but persists in time and contributes to the maintenance of a chronic inflammation. SASP may occur after the establishment of persistent DNA damage response (DDR) signaling (11). DDR is initiated by the activation/phosphorylation of the phosphoinositol 3-kinase-like protein kinases (ATM, ATR and DNA-PKcs) phosphorylating in return the γ H2AX histone, the cell cycle modulator CHK1 and CHK2 proteins, and p53 (12).

Replicative senescence has been already observed in aged macrovascular endothelial cells and is dependent of Bcl-2 repression modifying the mitochondrial redox state (13). Moreover, prematured endothelial cell senescence has also been monitored after different genotoxic

stresses including ionizing radiation and is involving the DDR (14-16). However, endothelial cell senescence has been essentially studied on proliferative macrovascular cell models with limiting significance to physiopathology. In fact, cell division in normal tissue occurs rarely, every 1 to 3 years (17). Furthermore, organs are essentially constituted of micro-, but not macro-vessels. Genotoxic drug-induced senescence in quiescent microvascular endothelial cells remains unknown and may involve different molecular actors than those described in proliferative macrovascular endothelial cells. The aim of the present study is to validate and to decipher radiation-induced quiescent microvascular endothelial cell senescence. Because the continuum between acute and chronic responses to radiation remains unknown, the long-term endothelial cell senescence will be study in regards to the modulation of radiation-induced early apoptosis by S1P.

Materials & Methods

Cell culture and Treatments

Human lung microvascular endothelial cell, HMVEC-L, were seeded at 5000 cells/cm² in EBM-2 with 5% FBS and EGM-2 supplement (all products, Lonza) until reaching confluence. Medium was changed for low serum EBM-2 with 0.1% FBS 18h before irradiation. One μ M S1P (Aventi Lipids) or its vehicle (PET; prepared as described (18)) was added 2h before irradiation ranging to 15Gy with a CP-160 irradiator (Faxitron X-ray Corp.). Deprived medium was replaced by complete EBM-2 2h after irradiation, and then weekly. Cell cultures were maintained for 28 days. Non-toxic concentration of pifithrin- α (10 μ M; Sigma-Aldrich), KU55933 (5 μ M; Selleckchem), N-acetyl-cystein (1mM; Sigma-Aldrich), or MnTBAP (1 μ M; Merck) were added at day 4, 7, 10, 13, 16, 19, and 21 post-irradiation.

SA β -gal assay

As described (19), 4% paraformaldehyde-fixed cells in 6-well plates were incubated overnight without CO₂ at 37°C with SA β -gal solution (1mg/ml X-gal; 5mM potassium ferrocyanide; 2mM MgCl₂; 150mM NaCl; 40mM citric acid; 12mM 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).

Western-Blotting

HMVEC-L proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore). Western-Blocking Reagent (Roche)-saturated membranes were hybridized overnight at 4°C with a primary antibody (list of primary antibodies: supplementary method), and with a HRP-coupled secondary antibody. Proteins of interest were revealed by Enhanced Chemi-Luminescence (Roche).

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).

Superoxide anions quantification

As described by the company's protocol, the release of fluorescence of oxidative MitoSOX™ Red (M36008, Invitrogen) by superoxide was measured by FACS Calibur in alive cells then analyzed with Cellquest (both BD).

Mitochondrial respiration analysis

HMVEC-L were seeded at 5000 cells/cm² in 24-well XF microplate until reaching confluency. Oxygen consumption (OCR) was measured 7 days later using XF24 Analyzer (Seahorse), as described (20). After cell equilibration in bicarbonate-free DMEM buffer with 25mM glucose, 1mM pyruvate and 2mM glutamine (all Sigma-Aldrich), OCR was measured at baseline and after respectively 0.6µM oligomycin, 0.6µM CCCP, 0.6µM rotenone and 0.6µM antimycin-A treatments to determine mitochondrial parameters. All measurements were done in 5 wells per condition.

Mitochondrial morphology and mass quantification

HMVEC-L were incubated with Mitotracker™ CMXRos Red (Invitrogen) for 30min at 37°C before 4% paraformaldehyde fixation. Mitochondria morphology was examined on slides counterstained Prolong Gold DAPI (Sigma) under confocal microscope (Nikon, 630x magnification). Mitochondrial mass per cell were assessed on 15000 cells by FACS Calibur and Cellquest analysis.

Animal protocol

Eight- to 12-week-old C57Bl/6 male mice (Charles River) were housed in our animal core facility according to ongoing national regulations issues by INSERM and the French

Department of Agriculture. Irradiation and S1P treatment were delivered as previously described (9).

DNA damage evaluation

Phospho- γ H2Ax immunostaining was assessed in 5 μ m sections from 15 Gy-irradiated mouse intestines. After Triton X100 permeabilization, γ H2Ax (20E3; Cell Signaling) and CD31 (MabA393, Millipore) were incubated overnight at 4°C, then detected respectively by Alexa488 anti-rabbit and Alexa568 anti-rat F(ab')₂ and counterstained with prolong Gold DAPI. Images were captured under fluorescent microscopy (Axiovert 200 Zeiss; x200 magnification). Endothelial cell DNA damage quantification was estimated by the ration between the nucleus surface covered by γ H2Ax and by DAPI in the CD31-positive cells. The quantification was processed by Image J on 9 fields in 3 different slides per experimental condition representing at least 600 endothelial cells.

Statistical Analysis

Three independent experiments were performed per study. Student's t test and ANOVA with 95% confidence estimation were performed with StatView 6.0 package.

Results

S1P treatment extends DNA damage induced by radiation

Remaining DNA damage has been previously observed 24h after irradiation in SV40-transformed microvascular cell model, HMEC-1 (21). To validate this observation, DNA damage and its repair have been assessed *in vivo* in microvascular cells during the well-defined high dose radiation-induced GI syndrome. Duodenum sections from 15 Gy-irradiated and/or S1P-treated C57Bl/6 mice were co-immunostained for γ H2Ax DNA damage marker, and CD31 endothelial cell marker (respectively green and red staining; Fig 1.A). Because of the high amount of DNA double strand breaks after 15 Gy-irradiation, counting γ H2Ax foci was not feasible. DNA repair kinetic per CD31 positive endothelial cell was assessed with a previously validated technique (22), estimating the ratio the nucleus surface covered by γ H2Ax. Maximum γ H2Ax surface coverage was observed within 1h after irradiation, and in the same extend in S1P- or PET-treated mice (respectively 72.7% \pm 1.2 versus 72.1% \pm 1.5; mean \pm SEM: n.s. P>0.5; Fig.1B). If γ H2AX staining decreases within the 24h post-irradiation, 34% higher amount of remaining DNA double strand breaks is observed in

endothelial cells from S1P-treated, as compared to PET-treated mice (respectively 10% \pm 1.5 versus 15.3% \pm 1.2; mean \pm SEM: * $P < 0.01$; Fig. 1B). Finally, γ H2Ax surface coverage was significantly not different in both conditions after 72h post-radiation (respectively 7.3% \pm 0.8 versus 7.9% \pm 1.2; mean \pm SEM: n.s. $P > 0.5$; Fig. 1B).

Radiation induces microvascular endothelial cell senescence independently of S1P treatment

Because DDR leads to cellular aging, irradiation- and S1P-induced senescence was evaluated in primary microvascular endothelial cell HMVEC-L at quiescent stage, a cellular model relevant for normal tissue physiology (Fig. 2A). The percentage of senescent HMVEC-L expressing SA β -gal (blue staining) increased in a dose- and time-dependent manner and reached 63.9% \pm 3.5, day 28 after 15 Gy (mean \pm SEM, $n=3$, * $P < 0.01$; Fig. 2B). However, a pretreatment with 1 μ M S1P did not modulate the amount of senescence induced by any dose of irradiation (n.s. $P > 0.5$). To confirm those results, other senescence markers were assessed. p21^{WAF1} expression in irradiated HMVEC-L was induced in a dose-dependent manner by 7 days and was sustained at least for 28 days, end of our experiment (represented times : 7 and 21 days post-radiation; Fig. 2C). Again, S1P did not modulate p21^{WAF1} expression after exposure to ionizing radiation. Pro-inflammatory Il-8, a well-described SASP cytokine, was also over-secreted in HMVEC-L medium in a dose-dependent manner all along the experiment irreverently of S1P pretreatment (mean \pm SEM, $n=3$, * $P < 0.01$; Fig. 2D).

DDR is not observed during radiation-induced quiescent endothelial cell senescence

Because of their involvement in radiation- and oxidative stress-induced senescence, DDR actors were studied. First, the reactivity of the different actors of this pathway in HMVEC-L was validated by western blot 30min after irradiation (Fig. S1). Then, the expression of the DDR actors and their phosphorylation was checked weekly for 4 weeks after radiation. ATM, ATR, CHK1, CHK2 and γ H2Ax were not activated since they were not phosphorylated in irradiated quiescent HMVEC-L (Fig. 3A). If DNA-PKcs was phosphorylated upon irradiation, the expression was modulated without correlation with the enhancement of senescence or with S1P treatment. The fact that the total forms of DNA-PKcs, ATM and the Ku70/Ku80 heterodimer binding DNA double strand breaks were not modulated during the weeks after irradiation confirmed the non-activation of the DDR. S1P pretreatment seemed inactive on the long activation of those molecules as observed by the lack of modulation of the expression of

DDR proteins. Finally, the irrelevance of the prolonged DDR in quiescent endothelial cell senescence was validated by quantifying SA β -gal-positive HMVEC-L after 15 Gy and subsequent chronic KU55933 treatment, an ATM inhibitor. Indeed, KU55933 did not inhibit, but significantly increased endothelial senescence by 18% (vs. sham control; mean \pm SEM; *P<0.01; Fig. 3B).

Radiation-induced senescence is under the control of p53 activation

p53 is a key event of the radiation stress response. In long-term response to irradiation, we observed by western blot a persistent over-expression of p53 protein in a dose-dependent manner in HMVEC-L, irrelevantly of S1P pretreatment (Fig. 4A). The p53 activation was confirmed by the concomitant expression of its downstream effector MDM2. The contribution of p53 in endothelial cell senescence was evaluated by SA β -gal assay in HMVEC-L chronically treated with pifithrin- α , a p53 activity inhibitor, after irradiation at 15 Gy. The pifithrin- α inhibited radiation-induced quiescent endothelial senescence by 28% (vs. sham control; mean \pm SEM; * P<0.01; Fig. 4B), definitely validating the involvement of p53 in quiescent microvascular endothelial cell senescence.

Radiation-induced senescence is associated with mitochondria dysfunction

Mitochondrial dysfunctions have also been described in replicative and premature senescence. We first evaluated the oxygen consumption rate (OCR) by XF24 analyzer on 15 Gy-irradiated HMVEC-L at day 7. Consecutive injections of oligomycin, CCCP, rotenone and antimycin-A during oxygen measurement allow the respective calculation of ATP production, maximum mitochondrial respiration and activity of complex I and II. Basal OCR was measured before any treatment. Complete OCR study showed no major difference in the respiratory profile from basal to CCCP OCR (Fig.5A). Rotenone addition in unirradiated cells inhibited by almost 90% oxygen consumption, but complex II activity was still easily detectable. However, 15 Gy decreased the activity of this complex by 69% (vs. 0Gy; mean \pm SEM; * P<0.01; Fig. 5B), when complex I activity was not modulated after irradiation. Because of irradiation-induced respiration dysfunction, mitochondrial network morphology was observed by Mitotracker staining under confocal microscopy. Qualitative observation showed a spread network in HMVEC-L 21 days after exposure to 15 Gy as compared to control (Fig. 5C). To further validate, Facs analysis of Mitotracker showed a 28% increase of the mitochondrial mass in 15 Gy-irradiated HMVEC-L (vs. sham-control; mean of fluorescence \pm SEM, * P<0.01; Fig. 5D).

Radiation-induced senescence is under the control of superoxide anions generation

Radiation induces long-term mitochondrial respiration dysfunctions, which may lead to mitochondrial ROS generation. First, the perturbation of ROS detoxication enzymes was studied by western blot. Mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD2) and glutathione peroxidase (GPX1) expressions were increased in a dose-dependent manner and maintained all along the experiment as shown in Fig. 6A. However, the expression of catalase, an other detoxication enzyme, was not modulated by radiation, proving a specific response of SOD2 and GPX1. These over-expressions might be due to an increase of mitochondrial ROS triggered by the dysfunction of complex II. Facs analysis using MitoSOX allowed to quantify the release of superoxide in 15 Gy-irradiated HMVEC-L (Fig. 6B). During the early step of senescence, a 42.5% increase of superoxide was quantified in 15 Gy-irradiated HMVEC-L (vs. sham control at day 7; mean \pm SEM; * $P < 0.01$; Fig. 6C). The oxidative status of irradiated endothelial cells was confirmed at day 21 with a 68% increase of superoxide (vs. sham control; * $P < 0.01$; Fig. 6C). Again, S1P does not modulate superoxide generation after exposure to ionizing radiation. Finally, the involvement of superoxide in endothelial cell senescence was determined in 15 Gy-irradiated HMVEC-L chronically treated with MnTBAP, a manganese metalloporphyrin SOD-mimetic with high anti-oxidant properties. In fact, MnTBAP inhibited endothelial senescence by 3 fold (vs. sham control; mean \pm SEM; * $P < 0.01$; Fig. 6D), validating the involvement of superoxide in quiescent microvascular endothelial cell senescence after irradiation.

Superoxide anions lead to mitochondrial dysfunctions and p53 activation

The use of pifithrin- α and MnTBAP demonstrate a role for p53 and superoxide in radiation-induced mitochondrial dysfunction and quiescent endothelial senescence. In order to find a potential interconnection between these actors, western blot analyses were performed in presence of inhibitors. Pifithrin- α partially blocked the p53 stabilization at day 7 and 21 after irradiation (Fig.7A), validating the pharmacological property of the drug. Interestingly, p53 expression was also slightly down-regulated by MnTBAP (Fig.7B), proving that superoxide may induce p53 expression. Furthermore, both treatments reduced the expression of the senescence marker, p21^{WAF1}, confirming their inhibitory properties on senescence (Fig. 7A, B). To determine if superoxide and/or p53 were upstream or downstream of mitochondrial dysfunction, activity of complex II was assessed using the XF24 analyzer on irradiated

HMVEC-L treated with pifithrin- α or MnTBAP. As presented in Fig.5B, a 67% inhibition of the complex II is observed in 15 Gy-irradiated HMVEC-L at day 7. Pifithrin- α did not rescue complex II activity (4.4% \pm 1.1 for 15 Gy vs. 6% \pm 2.2 for 15 Gy + pifithrin- α ; mean \pm SEM; n.s. $P>0.5$; Fig. 7C). However, MnTBAP prevented respiratory complex II dysfunction (4.4% \pm 1.1 for 15 Gy vs. 9.2% \pm 4.6 for 15 Gy + MnTBAP; mean \pm SEM; * $P<0.5$; Fig. 7D) since complex II activity was similar to the one of control cells (9.8% \pm 3.6 for 0 Gy + MnTBAP vs 15 Gy + MnTBAP; n.s. $P>0.5$). These data clearly demonstrated that superoxide generation was involved in irradiation-induced mitochondrial dysfunctions through complex II inhibition and p53 activation, ultimately leading to senescence in quiescent microvascular endothelial cells.

Discussion

Our previous studies highlight the mechanism of non-proliferating endothelial cell apoptosis after exposure to ionizing radiation related to acute toxicity and tumor regression (4, 23). Endothelial cell apoptosis is mediated by a rapid generation of ceramide and is blocked by S1P (9, 21). However, molecular and cellular responses involved in long-term radiation toxicity remain unclear, limiting counteracted pharmacological strategy. In this study, we establish that confluent endothelial cells respond to radiation by activating a senescence program through p53 activation and mitochondrial dysfunctions, independently of the S1P modulation of apoptosis.

Endothelial cell senescence has already been described in endothelial cells (24). However, those models studying aging in proliferating macrovascular HUVEC and BAEC reflect poorly the normal physiology. First, the microvascular network composes the major part of tissue irrigation and plays a key role in tissue homeostasis. Secondly, endothelial cells in most normal tissues are barely not dividing (17). We already demonstrate that irradiated microvascular endothelial cells die by different mechanism depending of their proliferating status (21). Quiescent endothelial cells die within hours through the ceramide generation, independently of DNA damage. Proliferating endothelial cells may die by the same mechanism, but also within days through a mitotic death triggered by misrepaired DNA breaks. In the present study, we demonstrated that non-proliferating irradiated microvascular endothelial cells are aging through a senescence process described by 3 different set of experiments (SA β -gal, p21^{WAF1} expression and SASP's component Il-8). We observed this process in the dose range between 1 to 15 Gy.

DDR long-term activation induced by remaining DNA breaks is considered central in irradiation and oxidative stress-induced senescence in different proliferating cellular models including endothelial cells (11, 15, 16). In non-dividing HMVEC-L, the lack of DDR activation, observed respectively by western blot and senescence modulation by ATM inhibitor treatment, may demonstrate a discrepancy of aging process in proliferating versus quiescent cells. We previously observed by γ H2Ax FACS analysis that a significant amount of DNA damage remained in S1P-, but not in vehicle-treated SV40-transformed microvascular HMEC-1 24h exposed to 15 Gy. We validate this observation *in vivo*. S1P delays DNA breaks repair in microvascular endothelial cells in mouse small intestines 24h after 15 Gy (Fig. 1). However, we were not able to correlate those remaining DNA breaks neither with an excess of senescence nor with a long-term DDR activation in irradiated quiescent primary microvascular endothelial cells. This indicates that remaining DNA breaks are effectively slowly repaired without impacting long-term response. Senescence without detectable DDR signaling has been already observed without telomere erosion. For example, oncogenic-driver senescence induced by PTEN loss in MEF is not associated with DDR (25). However, in our knowledge, we report, for the first time, an irradiation-induced premature senescence independent of the DNA damage and DDR activation. Again, this specific mechanism may be due by the non-dividing status of the endothelial cells.

p53 anti-oncogene is enhanced during H₂O₂-induced proliferating macrovascular endothelial cell senescence through p21^{WAF1} expression (16). We also observed the expression of p53 and its effector MDM2 during irradiation-induced quiescent microvascular senescence. The fact that pifithrin- α is significantly blocking HMVEC-L senescence proves a direct role of p53 in premature aging by radiation. After irradiation or exogenous ROS, p53 is mainly under the control of the DDR, especially ATM or ATR. In quiescent endothelial cell senescence, DDR is no longer activated day 7 post-radiation (Fig. 3). This result does not support a link between the p53 chronic expression and DDR acute activation.

p53 can also be activated by ROS. They can be generated rapidly by H₂O radiolysis or mitochondrial dysfunctions. We exclude here a role for the rapid generation of ROS within millisecond after irradiation. Chronic post-irradiation treatment with the ROS scavenger, N-acetyl-cystein, is sufficient to inhibit SA β -gal-positive senescent HMVEC-L (Fig. S2). Our data are in agreement with those showing that exposure with buthionine sulfoxamine, a glutathione synthesis inhibitor, in replicative HUVEC increased intracellular ROS and accelerated senescence (26). ROS may be generated by mitochondria dysfunctions. A higher

number of mitochondria is observed in senescent HMVEC-L after Mitotracker followed by FACS and confocal microscopy. Mitochondria mass gain is associated with a significant decrease of complex II activity and the superoxide generation. Mitochondrial complexes I and III are the predominant superoxide generating components (27). However, recent studies demonstrate that succinate-driven oxidation via complex II has a significant contribution towards the high rates of ROS production by mitochondria (28). The superoxide appearance is correlated with the expression SOD2 and GPX1, but not catalase, mitochondrial detoxication enzymes (Fig. 5). Interestingly, SOD2 and GPX1, but not catalase, are transcriptionally regulated by p53 (29). The persistence of mitochondrial stress and upregulation of detoxication enzymes suggest a cell inability to counteract the radiation deleterious act (30). Mitochondrial dysfunctions triggered by superoxide have already been observed in replicative macrovascular endothelial cell senescence induced by a down-expression of survival factor Bcl-2 protein (13). Bcl-2 transfection is counteracting the loss of glutathione into mitochondria of senescent endothelial cell, and to reduce superoxide production (13, 31). In our model, irradiation also induced a persistent down-regulation of Bcl-2 during senescence of quiescent HMVEC-L (data not shown). This result may demonstrate some redundancy of the pathways observed in senescence in dividing and non-dividing endothelial cell. However, we were not able to correlate Bcl-2 down-regulation and senescence in quiescent endothelial cells due to high toxicity of genetic or pharmacologic Bcl-2 invalidation.

p53 may also orchestrate mitochondrial redox signaling by coordinating endogenous regulators such as SOD2, GPX1, and the ROS generator p66shc (32). MnTBAP, but not with pifithrin- α treatment, was limiting mitochondrial dysfunction, proving that mitochondrial impairment is triggered by superoxide, but not p53. Because p53 activation was slightly limited by MnTBAP, primary superoxide are inducing mitochondrial dysfunction and might participate to p53 stabilization. Mitochondrial impairment must also generate new superoxide, increasing in return mitochondrial dysfunction. The upstream event leading to primary superoxide may be dependent of irradiation-induced mitochondrial DNA (mtDNA) damage (33). However, mtDNA damage could be either the cause or the consequence of mitochondrial dysfunctions (34). Moreover, regulation of mitochondrial fission and fusion modulate ROS production and cellular senescence (35). Mitochondrial elongation in senescent HUVECs is under the control of the down-regulation of Drp-1 and Fis-1 GTPase proteins and the expression of PINK1 protein kinase. PINK1 activation leads to the Trap1 phosphorylation, limiting the toxicity driven by oxidative stress (36). Further investigation

must decipher the upstream event leading to primary superoxide and premature senescence of quiescent endothelial cells.

p53, mitochondrial oxidative stress and dysfunction events described in quiescent endothelial cell senescence, are also potential apoptotic actors induced by radiation response to many cell types. Interconnection between apoptosis and senescence outcomes is still under investigation. Bcl-2 survival factor turns rat embryo fibroblast apoptosis into a senescent-like phenotype blocked in G2 phase, demonstrating that apoptosis inhibition could be crucial for the commitment to replicative senescence (37). Whereas endothelial cells are committed to radiation-induced apoptosis, they may switch to senescence once their apoptosis pathway is inhibited. S1P blocks irradiation-induced apoptosis of quiescent microvascular endothelial cells both *in vitro* and *in vivo* (9). In the present study, we were not able to modulate any defined senescence markers of senescence, including p53 and p21^{WAF1}, when apoptosis is inhibited by S1P in irradiated microvascular endothelial cell. This result seems consistent with the role of p53 in late, but not acute, endothelial cell response to radiation. If senescence is blocked by p53 inhibition, endothelial cell apoptosis is not inhibited in small intestines from p53-invalidated mice (4). This result proves that radiation-induced acute apoptosis and long-term senescence are mediated by two separated pathways, which was not yet proven in our knowledge.

Cell signaling discrepancy between apoptosis and senescence may give opportunity to new pharmacological strategies to mitigate acute and late radiopathologies. Pretreatment with S1P before 15 Gy inhibits endothelial cell apoptosis and related acute small intestines necrosis in mice (9). Irradiation-induced endothelial cell senescence impaired vascular functions, e.g. pro-inflammatory cytokines secretion, vasotonicity, migration, angiogenesis or permeability (38, 39). Also, senescence is observed in chronic pathologies, including lung and intestines fibroses or atherosclerosis that are frequently encountered during aging or radiation toxicity. In this context, S1P in irradiated quiescent HMVEC-L does not inhibit senescence markers, defined by SA- β -gal assay, p21^{WAF1} expression and Il-8 secretion or other markers of endothelial dysfunctions, such as increase of pro-inflammatory factor, ICAM-1, and decrease of intercellular junction protein, VE-Cadherin, (Fig. S3). On the other hand, modulating superoxide/SOD2 or p53 activity blocks radiation-induced quiescent endothelial cell senescence. In this context, modulating superoxide generation or p53, but not S1P, should participate to the protection against late radiation toxicity. Pharmacological strategy inhibiting p53 *in vivo* remains difficult because of its anti-oncogenic activity prone to tumor development. Inhibiting superoxide by delivering SOD2 with plasmid-liposome or adenovirus

prevent lung inflammatory alveolitis and fibrosis in irradiated C57BL/6J or Nu/J mice (40). However, further studies must be done to better investigate SOD2 or other agents limiting mitochondrial oxidative impairment on microvascular endothelial cell senescence related to chronic radiation toxicity.

Acknowledgment

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

Grant support

Project « ProVasc » Région Pays de la Loire, Electricité de France, Ligue Nationale Contre le Cancer, Association de la Recherche sur le Cancer

Reference

1. Bernier J, Hall EJ, Giaccia A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer*. 2004 Sep;4(9):737-47.
2. Wang J, Boerma M, Fu Q, Hauer-Jensen M. Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World J Gastroenterol*. 2007 Jun 14;13(22):3047-55.
3. Corre I, Guillonnet M, Paris F. Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):22678-96.
4. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science*. 2001 Jul 13;293(5528):293-7.
5. Li YQ, Chen P, Haimovitz-Friedman A, Reilly RM, Wong CS. Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res*. 2003 Sep 15;63(18):5950-6.
6. Pena LA, Fuks Z, Kolesnick RN. Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res*. 2000 Jan 15;60(2):321-7.
7. Xu J, Yan X, Gao R, Mao L, Cotrim AP, Zheng C, et al. Effect of irradiation on microvascular endothelial cells of parotid glands in the miniature pig. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Nov 1;78(3):897-903.
8. Gaugler MH. A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? *BJR Suppl*. 2005;27:100-5.
9. Bonnaud S, Niaudet C, Legoux F, Corre I, Delpon G, Saulquin X, et al. Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis. *Cancer Res*. 2010 Dec 1;70(23):9905-15.
10. Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo*. 2000 Jan-Feb;14(1):183-8.
11. Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009 Aug;11(8):973-9.

12. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008 Dec 2;6(12):2853-68.
13. Uraoka M, Ikeda K, Kurimoto-Nakano R, Nakagawa Y, Koide M, Akakabe Y, et al. Loss of bcl-2 during the senescence exacerbates the impaired angiogenic functions in endothelial cells by deteriorating the mitochondrial redox state. *Hypertension.* 2011 Aug;58(2):254-63.
14. Igarashi K, Miura M. Inhibition of a radiation-induced senescence-like phenotype: a possible mechanism for potentially lethal damage repair in vascular endothelial cells. *Radiat Res.* 2008 Oct;170(4):534-9.
15. Kim KS, Kim JE, Choi KJ, Bae S, Kim DH. Characterization of DNA Damage-Induced Cellular Senescence by Ionizing Radiation in Endothelial Cells. *Int J Radiat Biol.* 2013 Oct 29.
16. Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem.* 2010 Sep 17;285(38):29662-70.
17. Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer.* 1984 Apr;49(4):405-13.
18. Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, et al. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med.* 2000 Oct;6(10):1109-14.
19. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 26;92(20):9363-7.
20. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011 Apr 15;435(2):297-312.
21. Bonnaud S, Niaudet C, Pottier G, Gaugler MH, Millour J, Barbet J, et al. Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death. *Cancer Res.* 2007 Feb 15;67(4):1803-11.
22. Potiron VA, Abderrahmani R, Giang E, Chiavassa S, Di Tomaso E, Maira SM, et al. Radiosensitization of prostate cancer cells by the dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 under normoxic and hypoxic conditions. *Radiother Oncol.* 2013 Jan;106(1):138-46.
23. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science.* 2003 May 16;300(5622):1155-9.
24. Zhang J, Patel JM, Block ER. Enhanced apoptosis in prolonged cultures of senescent porcine pulmonary artery endothelial cells. *Mech Ageing Dev.* 2002 Mar 31;123(6):613-25.
25. Alimonti A, Nardella C, Chen Z, Clohessy JG, Carracedo A, Trotman LC, et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2010 Mar;120(3):681-93.
26. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2004 May 1;117(Pt 11):2417-26.
27. Grivennikova VG, Vinogradov AD. Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta.* 2006 May-Jun;1757(5-6):553-61.

28. Moreno-Sanchez R, Hernandez-Esquivel L, Rivero-Segura NA, Marin-Hernandez A, Neuzil J, Ralph SJ, et al. 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.* 2013 Feb;280(3):927-38.
29. Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, et al. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 2004 Apr 1;64(7):2350-6.
30. Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett.* 2012 Dec 31;327(1-2):48-60.
31. Zimmermann AK, Loucks FA, Schroeder EK, Bouchard RJ, Tyler KL, Linseman DA. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J Biol Chem.* 2007 Oct 5;282(40):29296-304.
32. Pani G, Galeotti T. Role of MnSOD and p66shc in mitochondrial response to p53. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Sep 15;15(6):1715-27.
33. Prithivirajsingh S, Story MD, Bergh SA, Geara FB, Ang KK, Ismail SM, et al. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett.* 2004 Jul 30;571(1-3):227-32.
34. Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, et al. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol.* 2007 May;5(5):e110.
35. Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, et al. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem.* 2007 Aug 3;282(31):22977-83.
36. Mai S, Klinkenberg M, Auburger G, Bereiter-Hahn J, Jendrach M. Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J Cell Sci.* 2010 Mar 15;123(Pt 6):917-26.
37. Rincheval V, Renaud F, Lemaire C, Godefroy N, Trotot P, Boulo V, et al. Bcl-2 can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G1/S transition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Oct 25;298(2):282-8.
38. Mathew B, Jacobson JR, Siegler JH, Moitra J, Blasco M, Xie L, et al. Role of migratory inhibition factor in age-related susceptibility to radiation lung injury via NF-E2-related factor-2 and antioxidant regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013 Aug;49(2):269-78.
39. Ungvari Z, Podlutzky A, Sosnowska D, Tucsek Z, Toth P, Deak F, et al. Ionizing radiation promotes the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype and impairs angiogenic capacity in cerebrovascular endothelial cells: role of increased DNA damage and decreased DNA repair capacity in microvascular radiosensitivity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013 Dec;68(12):1443-57.
40. Epperly M, Bray J, Kraeger S, Zwacka R, Engelhardt J, Travis E, et al. Prevention of late effects of irradiation lung damage by manganese superoxide dismutase gene therapy. *Gene Ther.* 1998 Feb;5(2):196-208.

Legends

Figure 1

S1P delays DNA damage repair in microvascular endothelial cells of small intestines exposed to 15 Gy. A. γ H2Ax (green) and CD31 (red) co-immunostaining of duodenum sections

from 15 Gy-irradiated and/or S1P-treated C57Bl/6 mice at different time points. Sections were counterstained with DAPI (blue). Scale Bar: 50 μ m. B. DNA repair kinetic per CD31-positive endothelial cell estimated by the ratio of γ H2Ax coverage in the whole nucleus surface defined by DAPI. The surface quantification was obtained by Image J (mean \pm SEM, * P<0.01; n=3).

Figure 2

Irradiation induces endothelial cell senescence irrelevantly of S1P. A. Senescent HMVEC-L (blue cells) assessed by SA β -gal assay under optical microscopy, day 28 after 15 Gy and/or S1P. Scale Bar: 20 μ m. B. Percentage of senescent HMVEC-L in function of dose, time and S1P pretreatment (mean \pm SEM, * P<0.01, n=3). C. p21^{WAF1} expression evaluated by Western blot in irradiated and S1P-treated HMVEC-L (n=3, a representative blot). D. Cumulative IL-8 secretion in medium of irradiated and/or S1P-treated HMVEC-L in function of time (mean \pm SEM, * P<0.01, n=3).

Figure 3

Senescence is independent of DDR. A. DNA sensor and repair proteins expression in irradiated and/or S1P-treated HMVEC-L evaluated by Western blot in function of time post-radiation (a representative blot, n=3). Conditions “+” represent proliferative endothelial cells stopped at 30min after 15 Gy irradiation, and represent positive control of signal. B. Percentage of senescent HMVEC-L treated with ATM inhibitor, KU55933, day 21 post-15 Gy (mean \pm SEM, * P<0.01, n=3).

Figure 4

Senescence is under the dependence of p53 activity. A. p53 and downstream effector MDM2 expression in irradiated and/or S1P-treated HMVEC-L assessed by Western blot in function of time post-radiation (a representative blot, n=3). B. Percentage of senescent HMVEC-L treated with pifithrin- α , day 21 post-15 Gy (mean \pm SEM, * P<0.01, n=3).

Figure 5

Ionizing radiation induces long-term mitochondria dysfunction. A. Oxygen consumption rate (OCR) in irradiated HMVEC-L. Basal OCR was measured before oligomycin treatment (mean \pm SEM, n=3+ P<0.01). B. Ration of the mitochondrial complexes I and II activities in

HMVEC-L, day 7 post-irradiation. Respiration was calculated by subtraction of the mean of the 3 measures of non-mitochondrial respiration (after antimycine-A) from total basal respiration (before oligomycin). Complex II activity was calculated as the subtraction of OCR after rotenone to basal OCR (Mean \pm SEM, n=3). C. Mitochondrial network by Mitotracker immunostaining in HMVEC-L, day 21 post-15 Gy. Cells were counterstained with DAPI (blue). Scale Bar: 20 μ m. D. Mitochondria mass per cell quantified by Mitotracker assay on Facs in HMVEC-L, day 21 post-15 Gy (mean of fluorescence \pm SEM, * P<0.01, n=3). Insert Mitotracker distribution in function of the cell population analyzed Facs (a representative experiment, n=3).

Figure 6

Senescence is under the control of mitochondrial oxidative response. A. SOD2, GPX1 and catalase expression evaluated by Western blot in irradiated and/or S1P-treated HMVEC-L in function of dose and time (a representative blot, n=3). B. Mitochondrial superoxide distribution by MitoSOX in function of the cell population analyzed Facs (a representative experiment; positive control 50 μ M antimycin-A). C. Mitochondrial superoxide quantification by MitoSOX and analyzed by Facs in HMVEC-L, day 7 and 21 post-15 Gy and/or S1P (mean of fluorescence \pm SEM, * P<0.01, n=3). D. Percentage of senescent HMVEC-L treated by MnTBAP, day 21 post-15 Gy (mean \pm SEM, * P<0.01, n=3).

Figure 7

Superoxide anion generation leads to mitochondria dysfunction and p53 expression. A-B. p53 and p21^{WAF1} expression evaluated by Western blot in pifithrin- α - (A) and in MnTBAP-treated (B) HMVEC-L, day 7 and 21 post-15 Gy (a representative blot, n=3). C-D. Respiratory complex I and II activities in pifithrin- α - (C) and in MnTBAP-treated (D) HMVEC-L 7 day post-15 Gy (mean \pm SEM, n=3).

Lafargue *et al.*

Figure 1

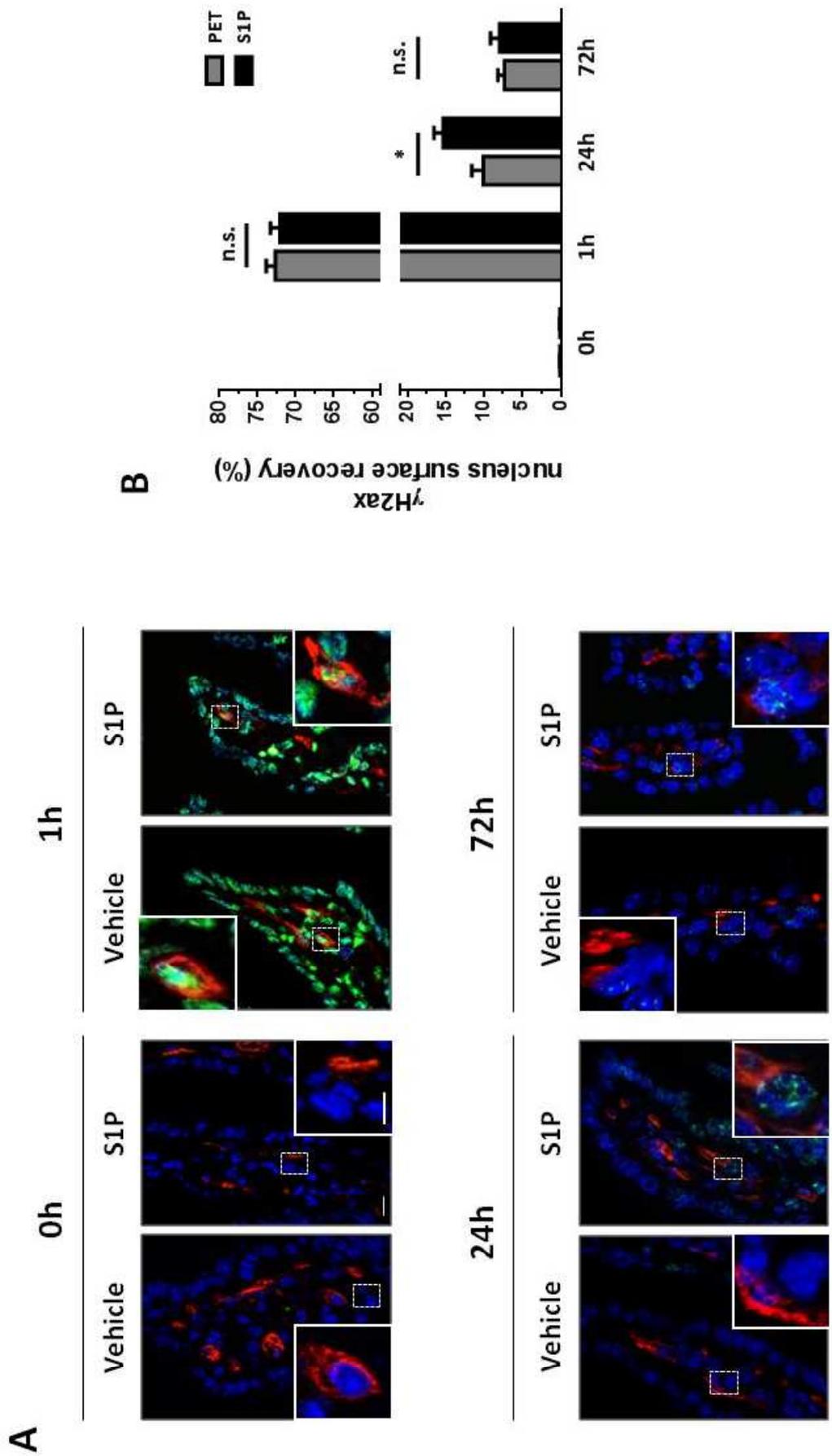


Figure 2

Lafargue *et al.*

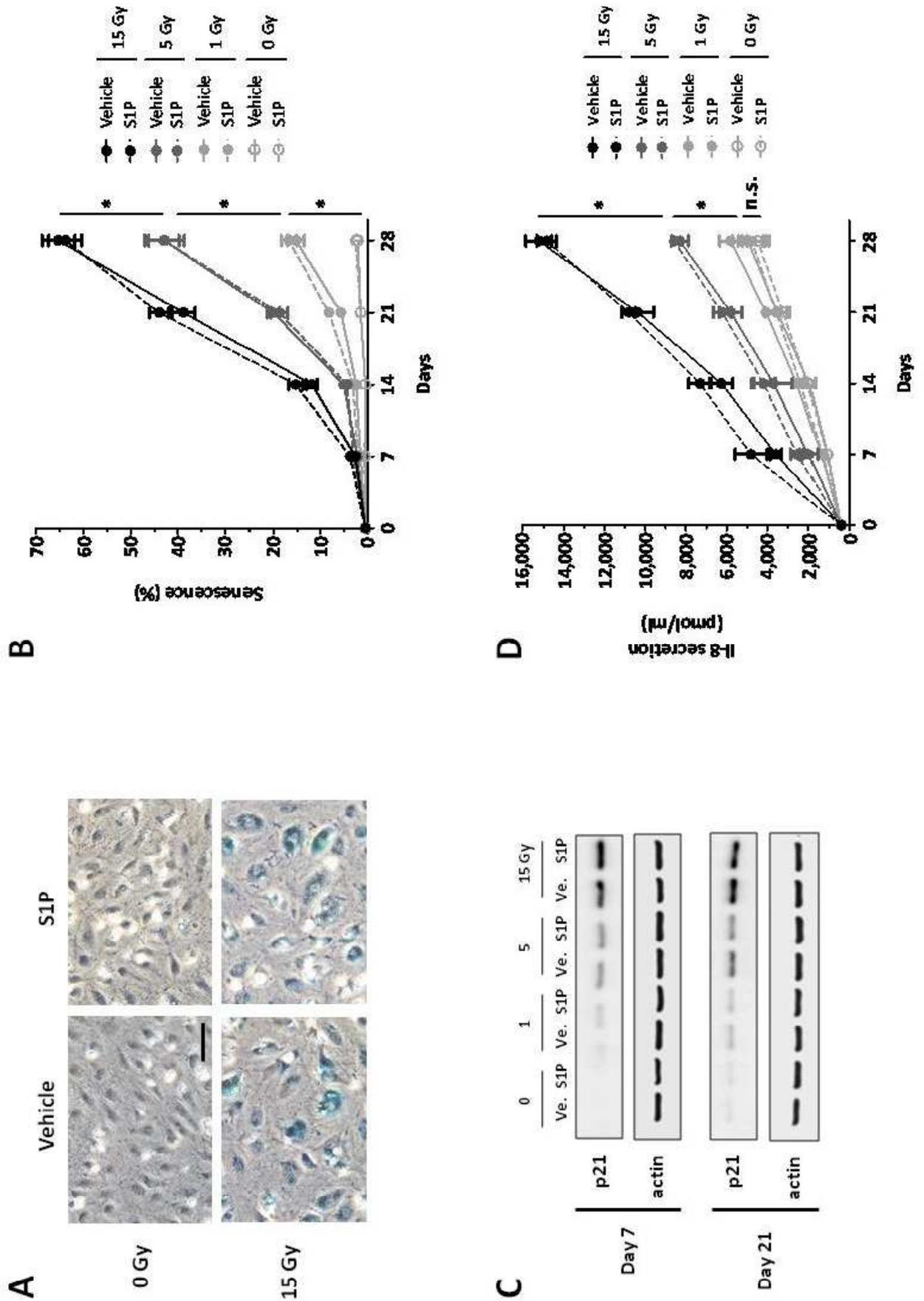
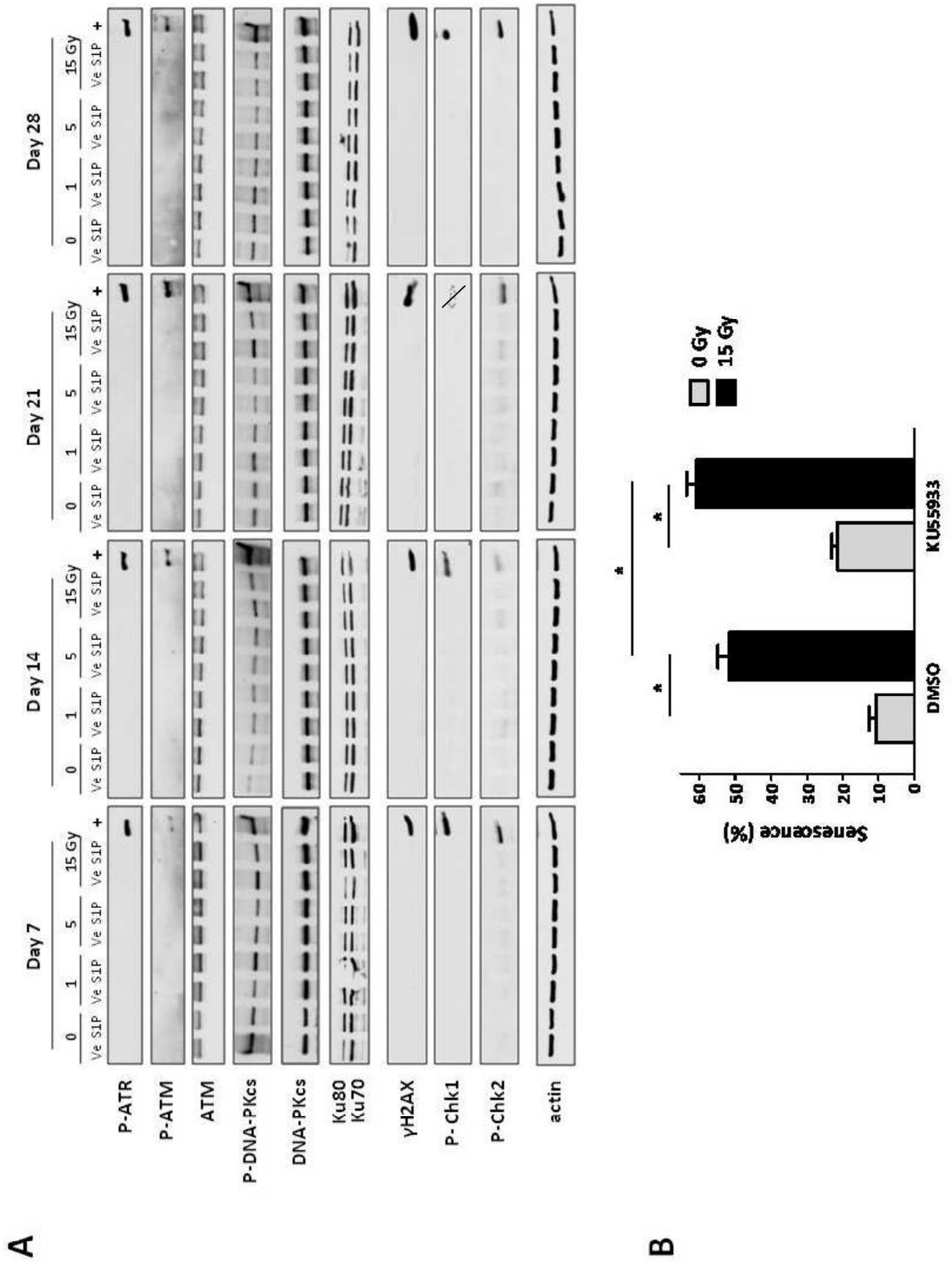


Figure 3

Lafargue *et al.*



Lafargue *et al.*

Figure 4

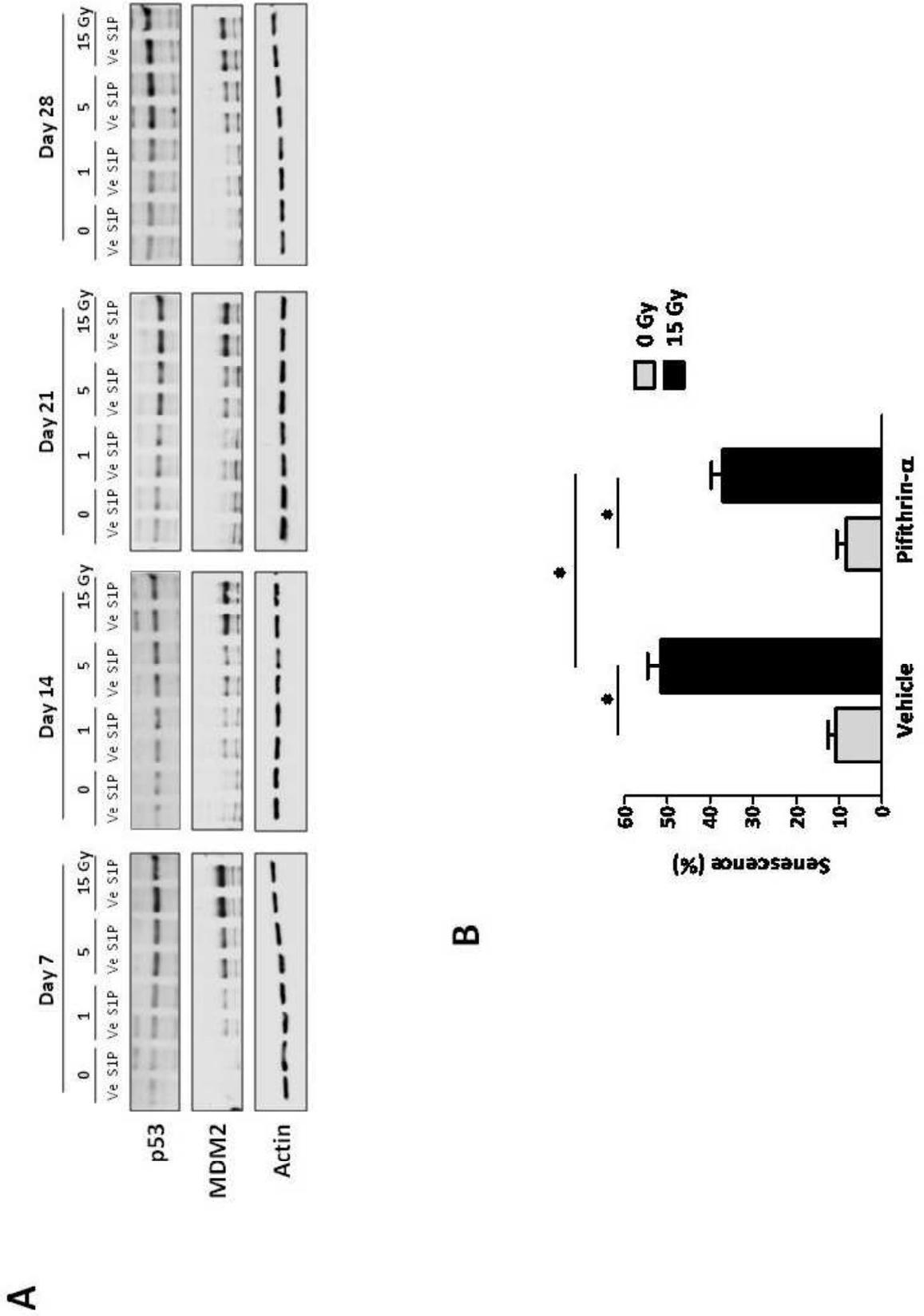
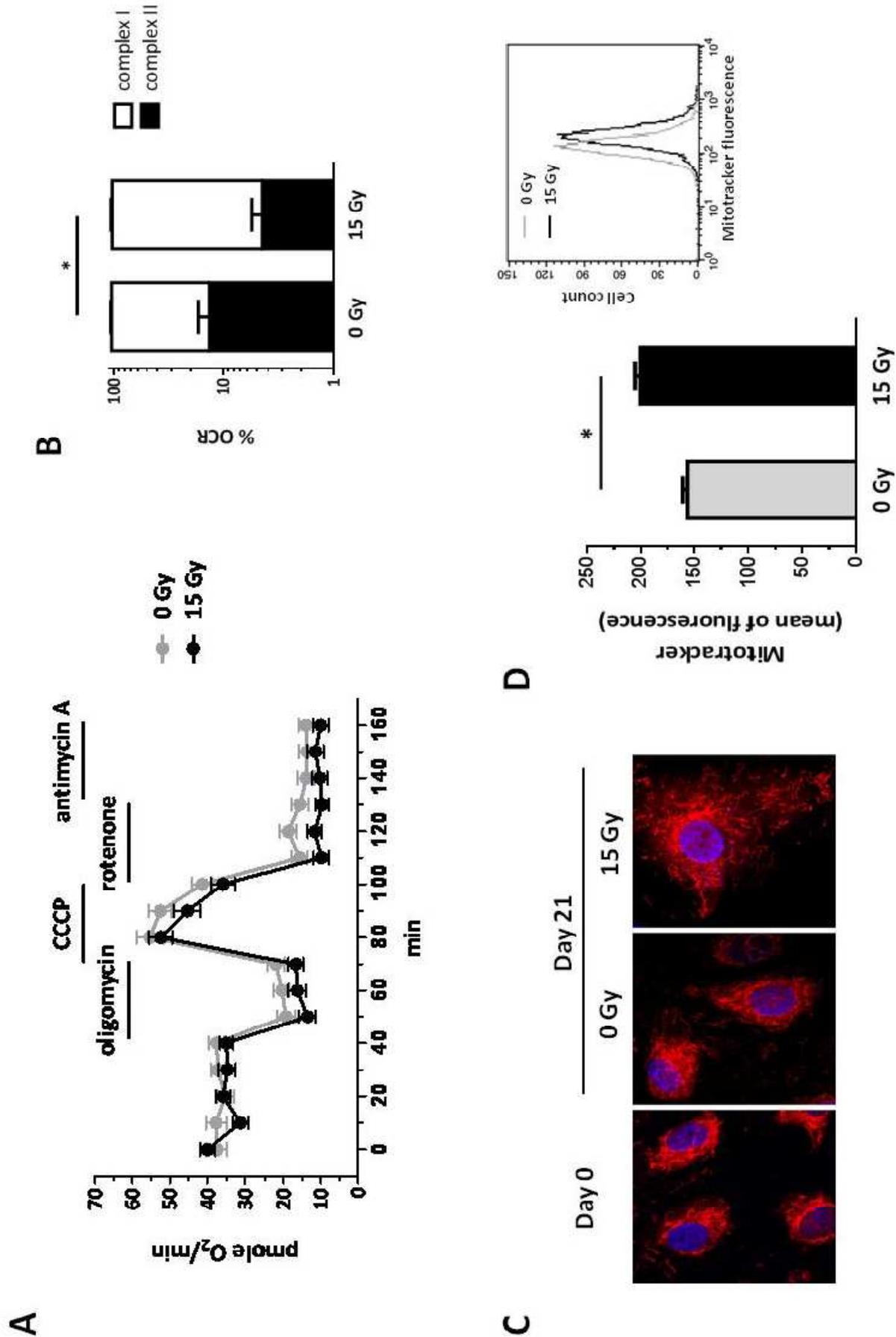


Figure 5

Lafargue *et al.*



Lafargue *et al.*

Figure 6

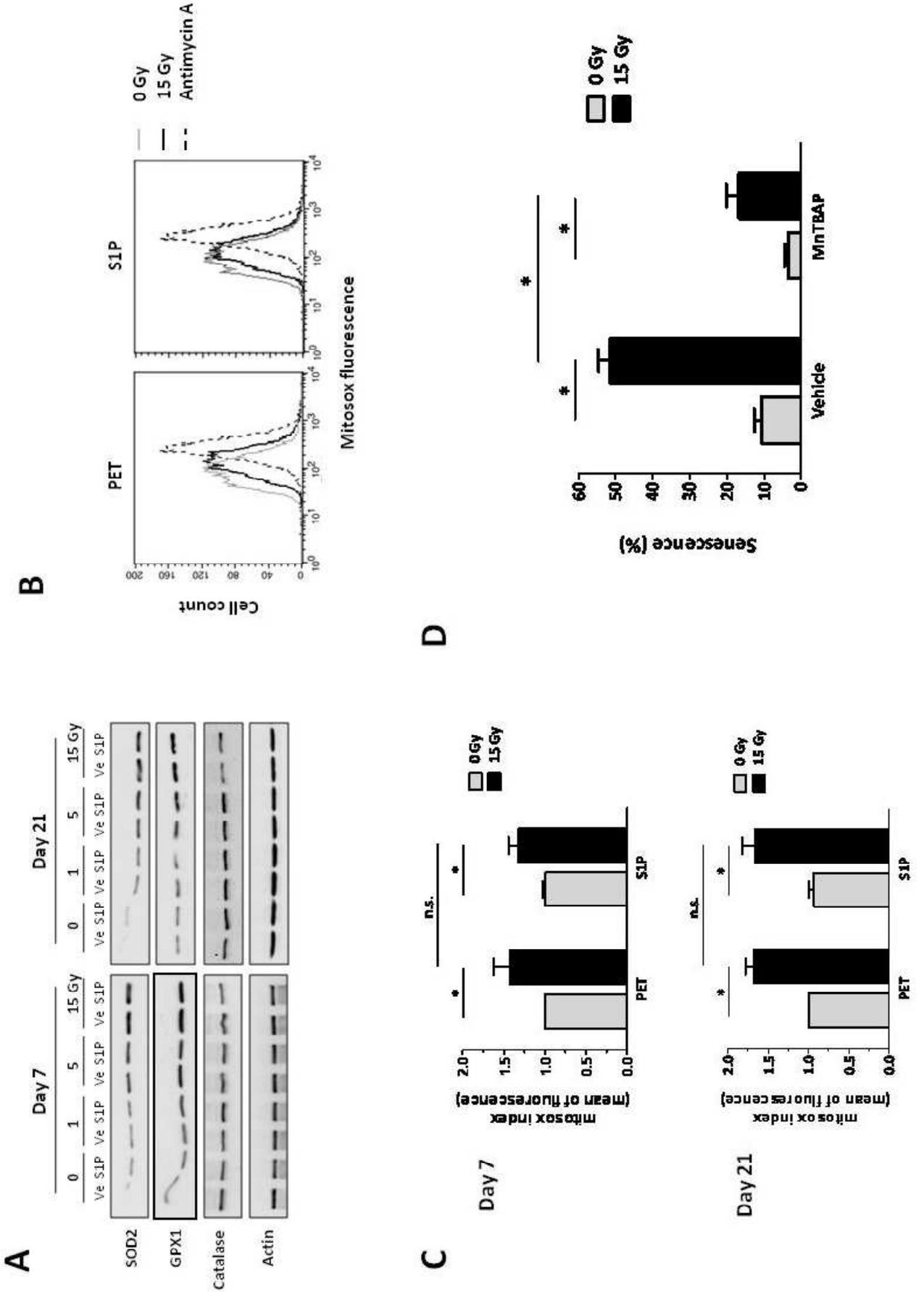
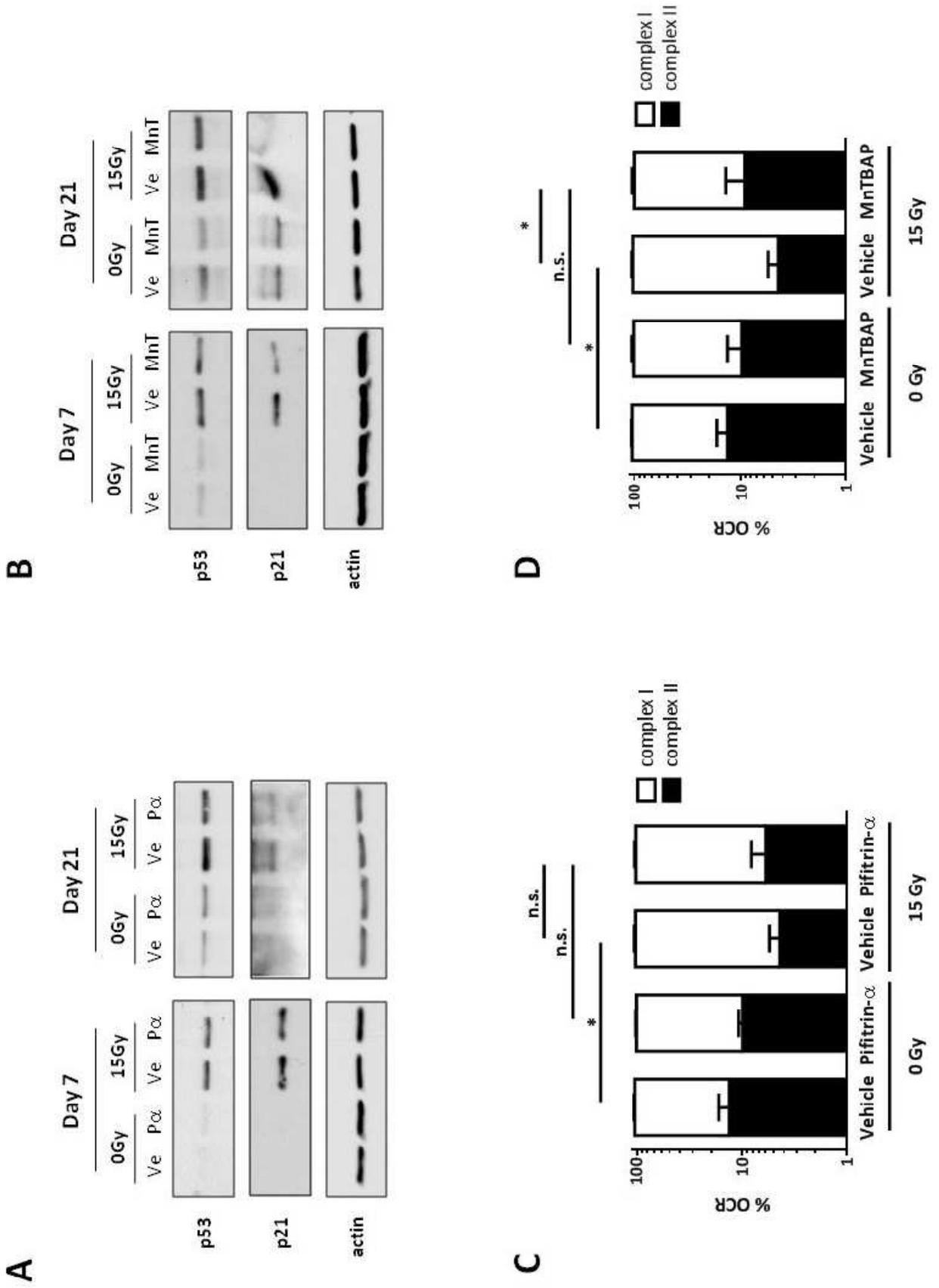


Figure 7

Lafargue *et al.*



Supplementary method:

Primary antibodies used in Western Blot were directed against p21^{WAF1} (556430, BD); p53 (M7001, Dako); γ H2AX (05-636, Millipore); MDM2 (AF1244, R&D); ATM (GTX70103, GenTex); phospho-Ser1981 ATM (DR1002, Calbiochem); total and phospho-Ser2056 DNA-PKcs (respectively ab1832, ab18192, Abcam); phospho-Ser428 ATR (2853, Cell Signaling); Ku70 and Ku80 (respectively MS-329, MS-285, Cell Signaling); Phospho-Ser345 Chk1 and phospho-Thr68 Chk2 (respectively, 2348, 2661, Cell Signaling); SOD2, GPX1 and catalase (respectively ab13533, ab22604, ab16731, Abcam); Actin (MAB1501, Millipore).

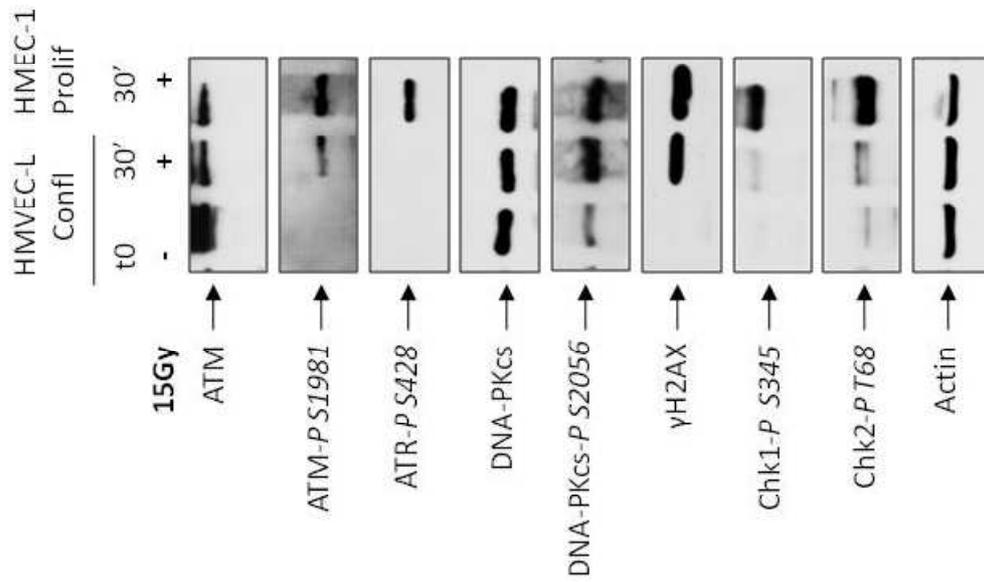


Figure S1: Responsiveness of DNA damage signaling proteins in HMVEC-L cells. DNA sensor and repair proteins expression in 15 Gy-irradiated confluent HMVEC-L and positive-control proliferative SV40-transformed microvascular endothelial cell HMEC-1 evaluated by Western blot 30 min post-radiation.

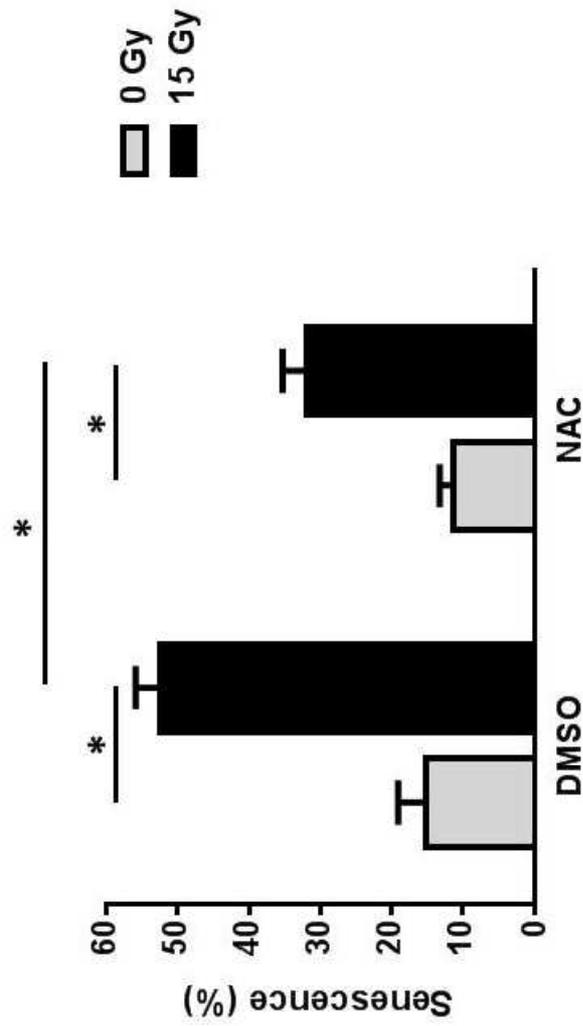


Figure S2: Senescence is under the control of reactive oxygen species. Percentage of senescence evaluated at 21 days post-irradiation by SA- β -Gal staining on 15 Gy-irradiated HMVEC-L chronically treated with the ROS scavenger NAC, (mean \pm SEM, n=3 in triplicate, * P < 0.01).

Lafargue *et al.*

Figure S3



Figure S3: Modulation of interacting proteins in long term irradiated HMVEC-L cells A. ICAM-1 protein (4915 Ab, Cell Signaling) and B. VE-Cadherin protein (2200 Ab, Cell Signaling) expression evaluated by Western blot in HMVEC-L at day 21 post-radiation (0, 1, 5 or 15Gy).

Résultats complémentaires

Profil d'expression de p16 et phospho-Rb, autres marqueurs de l'arrêt en sénescence –

Comme nous l'avons énoncé, la sénescence fait appel au maintien de l'expression de facteurs d'arrêt de cycle comme p21. Nous avons ici également analysé l'expression de deux autres marqueurs p16 et Rb hypophosphorylé dans notre modèle de sénescence des cellules HMVEC-L à J21 après irradiation ou non à 1, 5 ou 15Gy, (**Figure n°33**).

Nous avons pu constater que le profil d'expression de p16 suit celui de p21, et qu'il est augmenté après irradiation dès la dose de 1Gy et persiste dans le temps. Nous avons également observé que Rb est exprimé de façon stable et est hypophosphorylé de façon persistante, du moins sur les sites S807/811. Ces deux marqueurs vont dans le sens du profil de sénescence des cellules endothéliales microvasculaires après irradiation.

Ici aussi, nous avons pu constater l'absence de modulation par le pré-traitement à la S1P, confirmant une nouvelle fois son absence d'impact sur le long terme sur les paramètres associés à la sénescence.

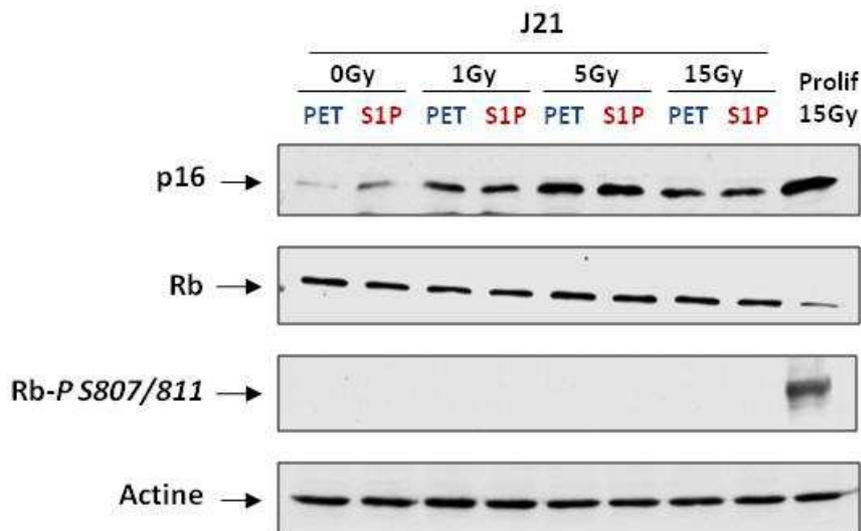


Figure n°33 : Mesure à 21 jours post-irradiation sur les cellules endothéliales HMVEC-L, de l'expression protéique de p16, Rb, et Rb phospho-Ser807/811, en fonction de la dose d'irradiation, avec ou sans S1P.

Western-Blot utilisant les anticorps anti-p16 (554079, BD Biosciences), anti-Rb (MS107P1, Neomarkers), anti-Rb phospho-Ser807/811 (9308, Cell Signaling Technologies), et anti-Actine (MAB1501, Millipore).

Compléments d'analyse des fonctions endothéliales dans le modèle de sénescence radio-induite des cellules HMVEC-L – Nous avons également analysé certains paramètres fonctionnels susceptibles « d'alimenter » l'implication physiopathologique des cellules endothéliales sénescentes après irradiation.

Nous avons étudié l'expression de la protéine ICAM-1 (pour Intercellular Molecule Adhesion-1) par Western-Blot, dans notre modèle de sénescence des cellules HMVEC-L, ici montré à J21, après irradiation ou non à 1, 5 ou 15Gy, avec ou sans S1P, (**Figure n°34**, n=3). ICAM-1 est un marqueur d'activation des cellules endothéliales connu pour permettre l'interaction des cellules circulantes avec les cellules endothéliales. Il est aussi connu pour être surexprimé après irradiation et peut être maintenu, (*Gaugler et al, 1997*). Dans notre modèle, l'expression d'ICAM-1 est augmentée en fonction de la dose et maintenue dans le temps. Ceci indique que, dans le même sens que la surexpression persistante de l'IL-8, la surexpression persistante d'ICAM-1 marque le caractère activé des cellules endothéliales à long terme après irradiation. Ce profil va dans le sens d'une participation de la sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite dans le maintien d'une inflammation chronique. Ici aussi, nous retrouvons une absence de modulation par le pré-traitement à la S1P, indiquant son absence d'impact sur le long terme sur l'activation radio-induite des cellules endothéliales HMVEC-L.

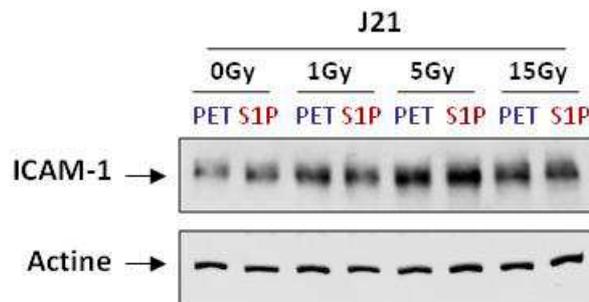


Figure n°34 : Mesures post-irradiation sur les cellules endothéliales HMVEC-L, de l'expression protéique d'ICAM-1 en fonction de la dose d'irradiation et du temps, avec ou sans S1P.

Western-Blot utilisant les anticorps anti-ICAM-1 (4915, Cell Signaling Technologies), et anti-Actine (MAB1501, Millipore).

Nous avons aussi souhaité analyser la stabilité de la monocouche de cellules endothéliales HMVEC-L après irradiation. Pour cela, nous avons étudié l'expression de la protéine VE-Cadhérine (pour Vascular Endothelial-Cadherin) par Western-Blot, dans notre

modèle de sénescence des cellules HMVEC-L, ici montré à J21 et J28, après irradiation ou non à 1, 5 ou 15Gy, avec ou sans S1P, (**Figure n°35A**, n=3). La VE-Cadhérine est un marqueur de jonction cellule-cellule des cellules endothéliales. Dans notre modèle, nous observons une diminution de l'expression de la VE-Cadhérine en fonction de la dose d'irradiation. Ce profil est présent dès J7 et est maintenue tout au long de l'expérience. Le pré-traitement à la S1P ne modifie pas ces observations. Ce résultat suggère que les cellules endothéliales HMVEC-L irradiées perdent leur cohésion. Cette altération étant maintenue à long terme, elle est susceptible de participer à une altération de la perméabilité des cellules endothéliales, et de participer au développement de dysfonctions tissulaires tardives.

Ainsi, dans un second temps, nous avons analysé la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales HMVEC-L à long terme après irradiation, avec ou sans S1P, (**Figure n°35B**, n=3). Nous avons pour cela utilisé un système de culture en *transwell* (Corning 12mm Transwell®, pore de 0.4µm, insert à membrane polyester). Les cellules HMVEC-L sont cultivées jusqu'à confluence sur le puit supérieur. Après traitements, le milieu de culture du puit supérieur est remplacé par du milieu de culture supplémenté par 1mg/mL de Fluorescein isothiocyanate–Dextran (FITC-Dextran ; FD40, Sigma-Aldrich ; poids moléculaire moyen 40000g/mol, ex/em 485nm/538nm) et 1mg/mL de Tetramethylrhodamine isothiocyanate–Dextran (TRITC-Dextran ; T1037, Sigma-Aldrich ; poids moléculaire moyen 4400g/mol, ex/em 544nm/590nm), (**Ludwig et al, 2011**). Nous mesurons ensuite la cinétique de passage des deux composés fluoromarkés par fluorométrie, (Ascent Software for fluoroskan (Thermoscientific)), en prélevant des échantillons dans le puits inférieur à 0, 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h et 24h. Les échantillons de 150µL sont immédiatement remplacés par 150µL de milieu complet pour rééquilibrer les volumes. La fluorescence obtenue au point 8h est en fin de phase exponentielle et précède la phase de saturation. Les intensités obtenues à ce temps expérimental permettent donc de comparer les différentes conditions entre elles. La lecture de la fluorescence permet de déterminer la quantité de dextran qui diffuse à travers la monocouche, ce qui reflète l'état de sa perméabilité : plus l'intensité est grande, plus la perméabilité est importante. Pour chaque expérience, les intensités de fluorescence ont été normalisées par rapport à la valeur de fluorescence des puits vides du jour correspondant, et par rapport au point contrôle 0Gy PET (considérée comme égale à 1). Les conditions ont été statistiquement analysées par tests de Student, seules les probabilités d'erreur inférieures à 5% sont considérées comme significatives.

Nos résultats ont ainsi montré une similitude pour les deux types de dextrans de 40kDa (non-montré) et 4,4kDa (montré) Ils diffusent sous les mêmes proportions et à la même vitesse.

Ainsi, l'irradiation entraîne une augmentation de la diffusion des dextrans à travers la monocouche, indiquant une augmentation de la perméabilité. Nous observons ainsi que la perméabilité de la monocouche endothéliale n'est pas modifiée aux temps J7 et J14 (non-montrés), et est significativement augmentée dès 5Gy à J21 et dès 1Gy à J28 (montrés ici). Le pré-traitement à la SIP ne modifie pas ces résultats. Ces résultats suggèrent que plus la sénescence est importante, plus les dysfonctions sont marquées.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'irradiation induit une diminution de l'expression de la VE-Cadhérine dans notre modèle de sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite, qui est associée à un défaut de la perméabilité marquée pour les conditions où la sénescence est importante. Ces données confirment les altérations de la stabilité de la monocouche endothéliale après irradiation en corrélation avec l'augmentation de la sénescence radio-induite des cellules HMVEC-L.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats appuie l'hypothèse que la sénescence radio-induite des cellules endothéliales produit des défauts de fonctions. Ces défauts pourront se traduire par un maintien chronique de l'inflammation du compartiment tissulaire irradié, ainsi que par des troubles de son irrigation. Ces altérations pourraient *in vivo* participer à la contraction d'effets secondaires radio-induits tardifs. La SIP ne modifiant pas cette réponse, ceci nous conforte dans l'idée qu'elle n'accentuerait pas non plus ces troubles.

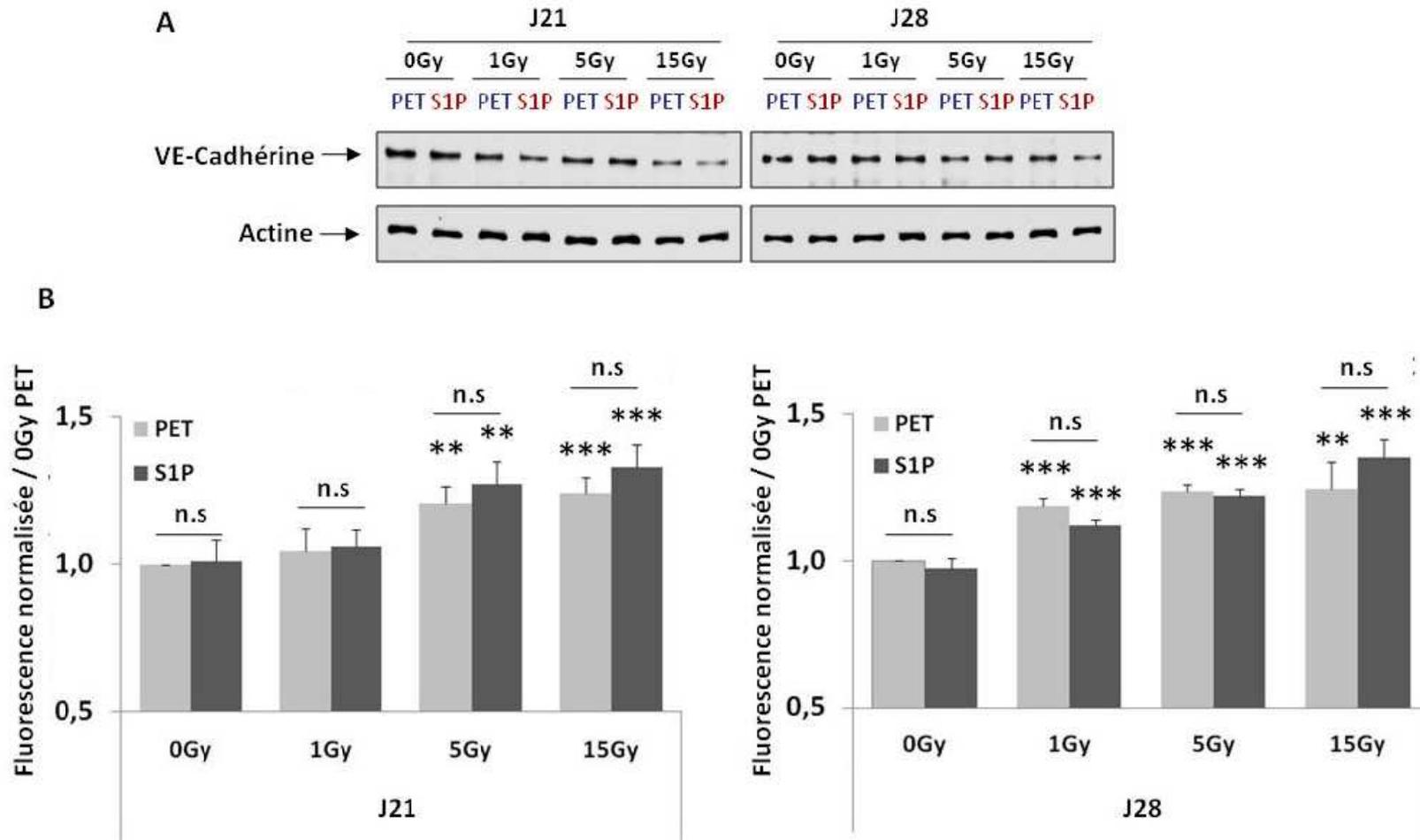


Figure n°35 : Mesures post-irradiation sur les cellules endothéliales HMVEC-L, de l'expression protéique de la VE-Cadhérine (A) et de la perméabilité (B), en fonction de la dose d'irradiation et du temps, avec ou sans S1P.

(A) Western-Blot utilisant les anticorps anti-VE-Cadhérine (2500, Cell Signaling Technologies), et anti-Actine (MAB1501, Millipore). (B) Test de perméabilité, normalisation de la quantité de passage de Dextran-TRITC au temps 8h par rapport à la condition contrôle 0Gy PET.

Partie II : Implication des protéines de la famille Bcl-2 dans la sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite.

La stabilisation de p53 dans notre modèle *in vitro* de sénescence endothéliale radio-induite, indique la persistance d'un stress intracellulaire. Ceci pouvant provenir d'un « dysfonctionnement mitochondrial », nous nous sommes intéressés aux voies liées à la signalisation mitochondriale étant impliquées dans la balance survie/mort et dans le métabolisme oxydatif. Notamment, l'expression des protéines pro/anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak) est à l'étude. En effet, l'activité de p53 régule l'expression et l'activité de ces protéines. p53 a une activité pro-apoptotique notamment en stimulant l'expression de Bax et Bak et en réprimant l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL. Il peut aussi contrôler leur activité par interaction notamment en liant et inhibant Bcl-2 ou Bcl-xL, ou en liant et activant Bax ou Bak. Il a d'autre part été montré que la surexpression de Bcl-2 peut permettre de bloquer l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales en stimulant une voie dépendante de la survivine, et en inhibant l'accumulation de p53 et l'activation de p38 (Kumar *et al*, 2007). En ce sens, il est possible qu'*a contrario*, une inhibition de l'expression de Bcl-2 favorise l'accumulation de p53. Par ailleurs, de façon intéressante, Bcl-2 a des propriétés anti-oxydantes en localisant le glutathion à la mitochondrie (Zimmerman *et al*, 2007). Uraoka *et coll*, ont notamment montré que Bcl-2 est moins exprimé dans les cellules endothéliales macrovasculaires en sénescence répllicative, et que ces dernières présentent un important stress oxydant mitochondrial. Ce phénotype peut être réduit par une transfection de Bcl-2 et conduit à une récupération des fonctions endothéliales, (Uraoka *et al*, 2011). Bax quant à lui, est connu pour avoir une activité pro-oxydante en favorisant la génération de superoxide mitochondriaux, mais le mécanisme reste à être déterminé, (Kirkland *et al*, 2002, 2010).

En accord avec ces données, nos résultats précédents ont montré une augmentation de la génération d'ions superoxide mitochondriaux, et une réduction de la respiration mitochondriale dépendante du complexe II. De plus, nous avons observé que l'expression des protéines de régulation du stress oxydant SOD2 et GPX1 (et GPX4, non montré), dont l'expression peut également être régit par l'activité de p53, est augmentée de façon dépendante de la dose et persistante dans le temps. Le taux augmenté et persistant d'ions superoxides mitochondriaux peut indiquer une dysfonction d'origine mitochondriale, et la persistance des facteurs de régulation peut potentiellement indiquer une incapacité de la cellule à répondre entièrement à ce stress. Ainsi, il est important d'analyser l'état d'expression

des protéines majeures de la famille Bcl-2. En particulier, nous nous sommes concentrés sur les protéines Bcl-2, Bcl-xL, Bax et Bak, afin de voir si une dérégulation de leur expression peut en partie expliquer le déséquilibre oxydant observé, et si ce déséquilibre passe par une modulation de p53 et/ou de ces cibles anti-oxydantes telles que SOD2.

Approches expérimentales & Résultats – Comme précédemment, nous avons utilisé le modèle de sénescence endothéliale radio-induite sur cellules primaires HMVEC-L cultivées en confluence stable. Les doses d'irradiation utilisées sont de 0, 1, 5 ou 15Gy, et les cellules sont maintenues en culture jusqu'au jour 7, 14, 21, ou 28. Là aussi, avant irradiation, les cellules ont été soumises ou non à un traitement par S1P afin d'identifier un potentiel effet à long terme.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'expression des protéines Bcl-2, Bcl-xL, Bax et Bak par Western-Blot, (**Figure n°36**). Nos résultats ont montré une diminution de l'expression de Bcl-2 de façon dépendante de la dose d'irradiation et maintenue dans le temps. A l'inverse, l'expression de Bcl-xL est augmentée, de même que celle de Bax, là aussi de façon dépendante de la dose et maintenue dans le temps. Concernant Bak, son niveau d'expression reste inchangé quelque soit la dose et le temps expérimental. Le pré-traitement à la S1P ne modifie pas ces modulations d'expression, indiquant ici aussi son absence d'impact à long terme sur ces paramètres. Il est intéressant de noter que les modulations observées sont rencontrées dès la plus faible dose testée de 1Gy, et que cette dose est suffisante pour les maintenir à long terme.

Ces résultats ne semblent favoriser ni un signal anti-apoptotique, ni un signal pro-apoptotique. Nous pouvons toutefois souligner que la diminution de Bcl-2 et l'augmentation de Bax concordent avec l'augmentation de l'expression de p53, même si ce n'est pas le cas pour Bcl-xL et Bak. Cependant, il est à noter que ces résultats ne mettent pas en évidence les éventuelles modulations de localisation et d'interactions de ces protéines, paramètres connus pour avoir un impact majeur sur leur activité apoptotique. Concernant plus particulièrement Bcl-2, il est intéressant d'observer que cette diminution d'expression coïncide avec les résultats d'Uraoka *et coll*, sur leur modèle de sénescence endothéliale répllicative, (Uraoka *et al*, 2011). La diminution d'expression de Bcl-2 peut conduire à une diminution du pouvoir anti-oxydant de la cellule et expliquer l'augmentation du stress oxydant mitochondrial au cours de la sénescence. Dans le même sens, l'augmentation de l'expression de Bax peut aussi expliquer l'augmentation de la génération de superoxydes mitochondriaux.

Ainsi, dans un second temps, nous avons souhaité mesurer l'impact de l'inhibition constitutive ou induite de Bcl-2 sur le niveau de sénescence, à savoir, répondre à la question d'une augmentation du niveau de sénescence lors d'une inhibition accentuée de Bcl-2, soit d'une inhibition accentuée de la régulation du stress oxydant et une augmentation de l'accumulation de p53. Pour cela, nous avons tenté de placer les cellules sous le contrôle d'un *sh*-RNA contre Bcl-2. Malheureusement, comme souvent constaté, les cellules primaires microvasculaires HMVEC-L sont fragiles et supportent mal les manipulations génétiques comme la transduction. Nous avons également tenté d'utiliser une inhibition induite de Bcl-2/Bcl-xL via l'utilisation d'un agent exogène inhibiteur : l'ABT-737, (0,5 μ M ; *Abbott Laboratories*). Comme les précédentes expériences, cet inhibiteur est utilisé de façon chronique post-irradiation dès J4, puis tous les 3 jours jusqu'à J21. Malheureusement là aussi, le traitement par ABT-737 est toxique à long terme pour les cellules HMVEC-L. Nous ne pouvons donc pas répondre ici à la question de l'impact de Bcl-2 sur le niveau de sénescence, le stress oxydant, ou encore sur l'expression de p53. En revanche, nous avons pu tester les effets de l'inhibition de l'activité de p53 par Pifithrin- α (10 μ M ; *Sigma-Aldrich*), et les effets du SOD-mimétique, MnTBAP (1 μ M ; *Calbiochem*), sur l'expression protéique de Bcl-2 mesurée par Western-Blot, (**Figure n°37**). Il est à noter que l'utilisation d'un autre inhibiteur de p53, la Pifithrin- μ (1 μ M ; *Sigma-Aldrich*), ciblant spécifiquement son activité anti-apoptotique par liaison aux protéines Bcl-2 et Bcl-xL, est également toxique à long terme pour les cellules HMVEC-L. La Pifithrin- α et le MnTBAP ont été également utilisés de façon chronique post-irradiation (0Gy vs 15Gy) dès J4, puis tous les 3 jours jusqu'à J7 ou J21. Nos précédents résultats ont montré que l'utilisation de Pifithrin- α et de MnTBAP permet de réduire le développement de la sénescence et, dans le cas du MnTBAP, de restaurer les capacités respiratoires mitochondriales dépendantes du complexe II. Nous avons également montré qu'ils permettent de réduire partiellement l'expression de p53 et de p21. Ici, nos résultats montrent que l'inhibition de p53 par la Pifithrin- α de façon chronique post-irradiation à 15Gy ne provoque pas de modulation de l'expression de Bcl-2 que ce soit à J7 ou J21. De la même façon, l'accentuation chronique de l'activité SOD par le MnTBAP, ne module pas l'expression de Bcl-2. En somme, Bcl-2 reste diminué bien que des effets positifs sur la sénescence et sur la respiration mitochondriale soient observés avec ces inhibiteurs. Cela peut indiquer que Bcl-2 est diminué en réponse à l'irradiation mais n'a pas d'impact sur la sénescence et ses mécanismes moléculaires. Ou, au contraire, cela peut indiquer que la diminution de Bcl-2 se produit en amont de la modulation de p53 et des dysfonctions

mitochondriales, et que l'utilisation de Pifithrin- α ou de MnTBAP permet de réduire la sénescence et les dysfonctions mitochondriales en agissant sur un niveau intermédiaire du mécanisme moléculaire de la sénescence endothéliale radio-induite.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'expression protéique de SOD2 en réponse aux traitements chroniques post-irradiation (0Gy vs 15Gy) par Pifithrin- α ou MnTBAP jusqu'à J7 ou J21, (**Figure n°38**). Nous avons précédemment, montré que l'expression de SOD2, une SOD mitochondriale, est augmentée de façon dépendante de la dose d'irradiation et persistante dans le temps. Ce même profil a été rencontré par *Uraoka et coll*, qui ont montré une augmentation de SOD2 lors de la sénescence endothéliale répliquative où Bcl-2 est diminué. Pour autant, l'inhibition de Bcl-2 dans des cellules jeunes ne modifie pas l'expression de SOD2, alors que l'induction de Bcl-2 induit une augmentation de SOD2, (*Uraoka et al*, 2011). Le lien Bcl-2-SOD2 en sénescence endothéliale radio-induite doit donc encore être vérifié. Toutefois, les cellules endothéliales microvasculaires irradiées à 10Gy soumises à un traitement SOD-Catalase mimétique par EUK-207 possèdent une meilleure activité SOD, augmentent Bcl-2 et réduisent Bax, améliorent la survie cellulaire à 10 jours, et restaurent les fonctions endothéliales, (*Otterson et al*, 2012). Ainsi, nous avons souhaité analyser l'expression de SOD2 en cas de sénescence endothéliale radio-induite traitée par MnTBAP. Nous montrons ici que le traitement chronique par MnTBAP, ne provoque pas de modification dans l'augmentation de SOD2 dans les conditions traitées à 15Gy que ce soit J7 ou J21. Ainsi, l'accentuation de l'activité SOD, bien qu'ayant un pouvoir de diminution du niveau de sénescence et d'amélioration de la respiration mitochondriale, ne permet pas de contrebalancer l'induction de la surexpression de SOD2.

En revanche, nos résultats montrent que l'inhibition chronique de p53 provoque une augmentation de l'expression de SOD2 à 0Gy et 15Gy. Or, p53 est capable d'activer ou de réprimer la transcription de SOD2, (*Perwez-Hussain et al*, 2004). La différence de « choix » reposerait sur le niveau de stress oxydant et/ou sur le niveau d'expression/activité de p53, (*Liu, Xu*, 2011). Si ce résultat ne permet pas de conclure directement sur le lien SOD2-p53, on peut supposer qu'une inhibition partielle de l'activité de p53 favorise tout de même l'expression de SOD2 et le pouvoir anti-oxydant de la cellule. Cette surexpression de SOD2 sous Pifithrin- α pourrait permettre de réduire le stress oxydant mitochondrial, et ainsi réduire la sénescence radio-induite.

Conclusions – Comme nous l'énoncions, le processus de sénescence fait appel à des mécanismes moléculaires complexes. Nous constatons que, au moins partiellement, l'inhibition des axes dépendants de l'activité de p53 par la Pifithrin- α et l'activité SOD du MnTBAP permettent de réduire la sénescence endothéliale radio-induite et, dans le cas du MnTBAP, de restaurer la respiration mitochondriale dépendante du complexe II. Néanmoins, ces traitements ne permettent pas de restaurer complètement toutes les altérations moléculaires observées telles que la modulation de l'expression de Bcl-2. La diminution de Bcl-2 peut donc avoir un rôle clé potentiellement situé à un stade en amont dans le processus de sénescence. Toutefois, des explorations doivent être poursuivies afin de répondre à cette question. Les rôles de Bax et de Bcl-xL demandent aussi à être approfondis. Il est enfin intéressant de noter que si l'activité de p53 et le statut mitochondrial jouent un rôle clé dans le développement de la sénescence endothéliale radio-induite, la question de l'origine de « l'altération cellulaire » déclenchant l'ensemble des processus moléculaires impliqués au cours de la sénescence ne reste pas entièrement résolue.

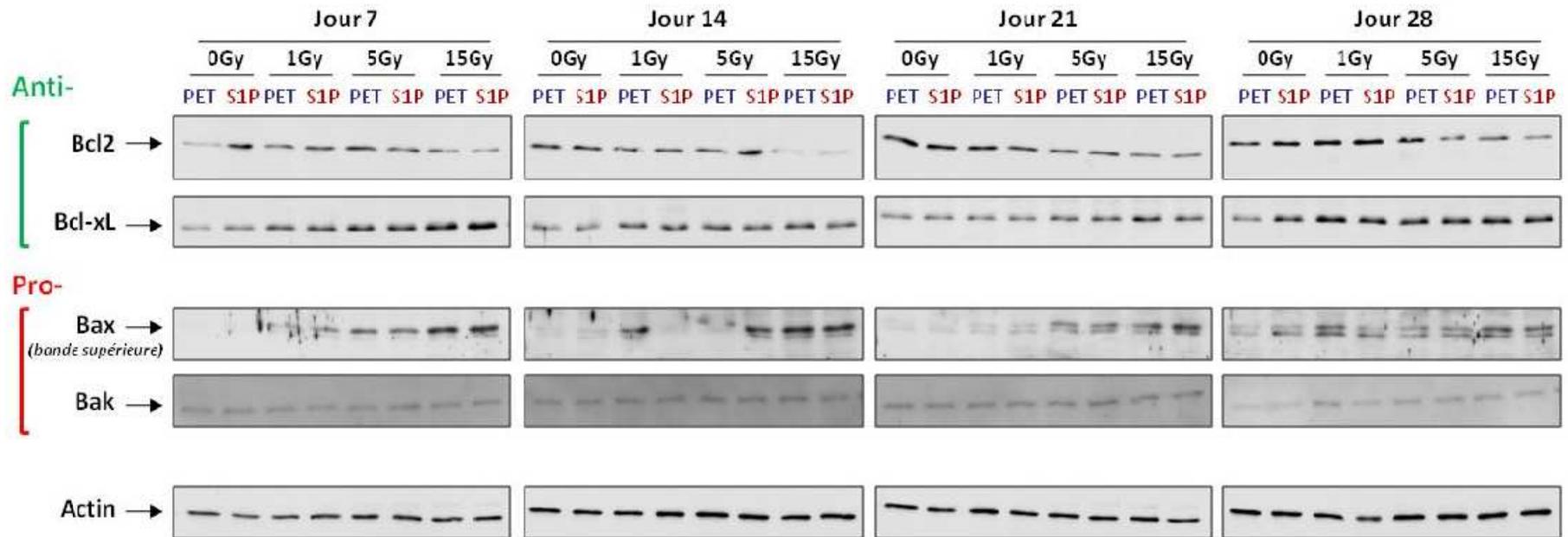


Figure n°36 : Mesures post-irradiation sur les cellules endothéliales HMVEC-L, de l'expression protéique de Bcl-2, Bcl-xL, Bax et Bak en fonction de la dose d'irradiation et du temps, avec ou sans S1P.
 Western-Blot utilisant les anticorps anti-Bcl-2 (ab692, Abcam), anti-Bcl-xL (556361, BD Bioscience), anti-Bax (AD1-AAM-140, Enzo Life Science), anti-Bak (556396, BD Bioscience), et anti-Actine (MAB1501, Millipore).

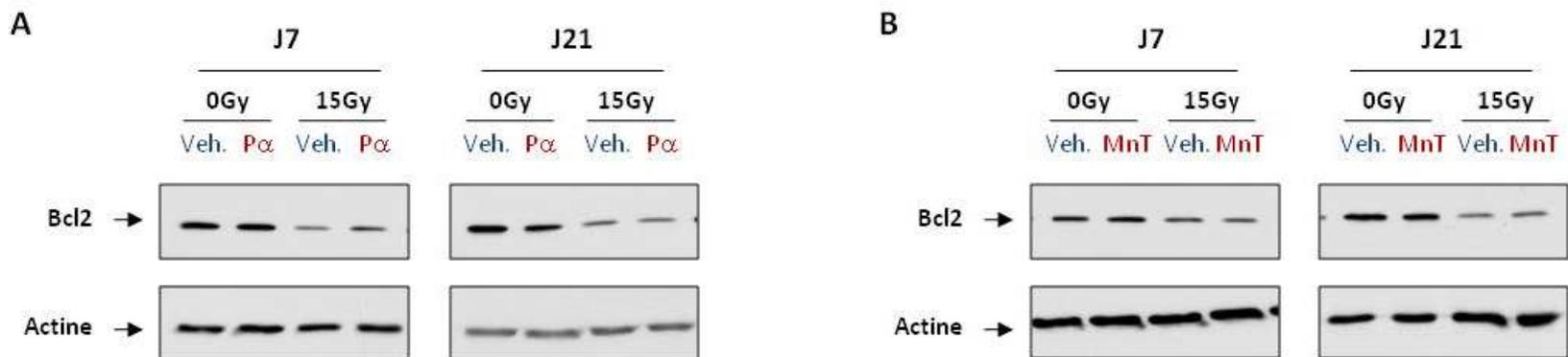


Figure n°37 : Effet des traitements chroniques par Pifithrin- α et par MnTBAP sur l'expression protéique de Bcl-2 des cellules endothéliales HMVEC-L, aux jours 7 et 21 post-irradiation à 15Gy.

Western-Blot utilisant les anticorps anti-Bcl-2 (ab692, Abcam), et anti-Actine (MAB1501, Millipore).

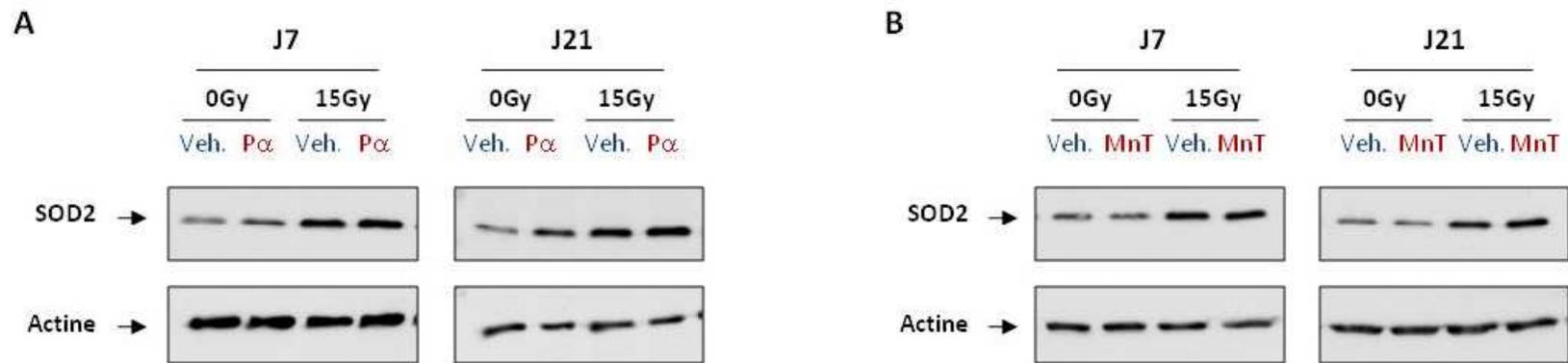


Figure n°38 : Effet des traitements chroniques par Pifithrin- α et par MnTBAP sur l'expression protéique de SOD2 des cellules endothéliales HMVEC-L, aux jours 7 et 21 post-irradiation à 15Gy.

Western-Blot utilisant les anticorps anti-SOD2 (ab13533, Abcam), et anti-Actine (MAB1501, Millipore).

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Le développement de la radiothérapie, traitement de référence contre le cancer, est limitée par les toxicités aiguës (nécrose) et/ou tardives (fibrose radique, athérosclérose), induites aux organes vitaux proches des zones tumorales, (Stewart *et al*, 2012). Notre équipe a précédemment montré que l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales microvasculaires quiescentes suite à la génération du sphingolipide Céramide, favorise la mort des cellules clonogéniques épithéliales, la destruction des villosités, et la nécrose intestinale, (Paris *et al*, 2001). Cette radiotoxicité aiguë est bloquée par un traitement à la sphingosine-1-phosphate (S1P), antagoniste de la voie du Céramide, en inhibant l'apoptose des cellules endothéliales, (Bonnaud *et al*, 2007, 2010). Cependant, la S1P n'agit pas sur la réparation des dommages de l'ADN. Des cassures persistent au moins 48-72 heures après irradiation et leurs conséquences sur le devenir des cellules irradiées reste inconnue, (Bonnaud *et al*, 2007 ; Lafargue *et al*, article soumis). Récemment, il a été montré que la persistance de ces dommages de l'ADN dans des fibroblastes HCA2 irradiés bloque leur prolifération et induit une sénescence radio-induite associée à la sécrétion de nombreux facteurs pro-inflammatoires, (Rodier *et al*, 2009). De manière générale, la sénescence cellulaire survient suite à l'érosion des télomères lors du vieillissement (sénescence « répllicative ») ou suite à un stress comme l'irradiation (sénescence « prématurée »). Ces cellules deviennent larges, et expriment des marqueurs d'arrêt de cycle et des facteurs inflammatoires, (Campisi, 2013). La sénescence cellulaire est induite lors de nombreux processus pathologiques tels que la fibrose, (Avraham *et al*, 2010) ou l'athérosclérose, (Minamino *et al*, 2002) ; pathologies fréquemment contractées à long terme après irradiation, (Stewart *et al*, 2012). L'irradiation induit la sénescence de cellules endothéliales macrovasculaires, (Oh *et al*, 2001 ; Igarashi *et al*, 2007, 2008). Or, très peu d'études montrent l'incidence de la sénescence après irradiation dans des modèles de cellules endothéliales microvasculaires quiescentes, bien que ces cellules jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie des tissus sains irradiés, (Ungvari *et al*, 2013 ; Borovski *et al*, 2013).

La S1P en protégeant les cellules endothéliales de l'apoptose radio-induite favorise potentiellement la stabilisation de dommages de l'ADN et/ou de leur signalisation, pouvant favoriser ainsi le développement de la sénescence prématurée. **L'objectif de mes travaux de thèse a donc été de mesurer et caractériser la sénescence des cellules endothéliales microvasculaires après exposition aux rayonnements ionisants. Nous avons cherché à**

comprendre les voies moléculaires impliquées, ainsi que les impacts fonctionnels vasculaires qui en résultent à long terme. Nous avons alors mesuré l'incidence du traitement anti-apoptotique S1P sur cette sénescence microvasculaire, ainsi que sur les mécanismes associés.

Dans un premier temps, j'ai mis en place un modèle de cellules endothéliales primaires microvasculaires humaines (HMVEC-L) quiescentes à confluence, et j'ai caractérisé la sénescence après irradiation. Contrairement aux modèles de cellules macrovasculaires (HUVEC, BAEC,...), ce modèle microvasculaire quiescent reflète la physiologie vasculaire des tissus sains ciblés lors d'une radiothérapie (Gimbrone *et al*, 1974). Ainsi, des cellules HMVEC-L ont été pré-traitées à la S1P (1 μ M) ou son diluant (PET), puis, irradiées aux rayons X à 0, 1, 5 ou 15 Gy. La sénescence a été ensuite évaluée par différents marqueurs (morphologie, SA- β -Galactosidase, p21, p16) à 0, 7, 14, 21, et 28 jours post-traitement. J'ai ainsi montré l'acquisition d'un phénotype sénescence dès 7 jours, augmentant en fonction de la dose et du temps, en corrélation avec l'apparition d'un phénotype d'activation (IL-8 et ICAM-1). Par ailleurs, un test fonctionnel de perméabilité à l'aide de dextrans fluomarqués sur monocouche endothéliale irradiée en *transwell*, a montré que la sénescence endothéliale radio-induite est associée à une augmentation de la perméabilité intercellulaire. Ce résultat est appuyé par la diminution d'expression de la protéine de jonction intercellulaire VE-Cadhérine en fonction de la dose et maintenu dans le temps. En somme, ces caractères pro-inflammatoires et pro-perméant pourraient être le siège d'altérations tissulaires telles qu'observées lors pathologies radio-induites.

Bien que les cellules irradiées et traitées par S1P aient plus de dommages de l'ADN résiduels sur les premiers jours post-irradiation, nous n'avons pas pu montrer une accentuation du niveau de sénescence, ni de l'activation, ni du défaut de fonction. Ces résultats, en contradiction avec ceux de Rodier *et coll*, (Rodier *et al*, 2009), ont été confirmés par la non-persistance de l'activation des voies de réponses aux cassures de l'ADN, (dont ATM, γ H2AX, DNA-PKcs, Ku70/80, ATR, et Chk1/2), quelle que soit la dose et tout au long de l'expérience. En effet, bien que ces facteurs soient activés en réponse aux dommages dès les premières minutes, aucun d'entre eux ne reste activé à long terme. Autrement dit, les cassures de l'ADN radio-induites sont réparées et leur signalisation n'a pas d'influence sur le niveau de sénescence. De plus, l'inhibition chronique post-irradiation d'ATM par le KU55933, ne réduit pas ici le niveau de sénescence, mais au contraire, l'augmente. Cette

augmentation pourrait indiquer que l'inhibition chronique d'ATM favorise la stabilisation de cassures endogènes, et une entrée en sénescence médiée par ces dommages additionnels.

Cependant, nous observons une stabilisation de la protéine p53 de façon dépendante de la dose et persistante dans le temps dans notre modèle. Le même profil est observé pour Mdm2 dont l'expression dépend de p53 et dont le rôle consiste à induire la dégradation de ce dernier.

Nous avons pu alors montrer à l'aide d'un traitement chronique à la Pifithrin- α , que **l'inhibition, au moins partielle, de l'activité de p53 permet de réduire le niveau de sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite.**

Comme nous l'énoncions en introduction, le stress oxydant est induit par l'irradiation. S'il est connu pour être une cause de dommages cellulaires et pour induire la sénescence, il est aussi une conséquence de la sénescence, notamment dans le cas où elle est associée à une dysfonction mitochondriale, ou à une dérégulation de l'expression des facteurs anti-oxydants. Dans notre modèle, nous avons effectivement pu observer une augmentation du taux d'ions superoxide mitochondriaux, une augmentation de la masse mitochondriale, et une altération de la respiration mitochondriale dépendante du complexe II. De plus, nous avons observé que l'expression de protéines de régulation endogène du stress oxydant (SOD2 (ou MnSOD), GPX1) est augmentée dès J7 de façon dépendante de la dose et persistante dans le temps. Si le taux augmenté et persistant d'ions superoxide mitochondriaux peut indiquer une dysfonction d'origine mitochondriale, la surexpression de ces facteurs endogènes indique potentiellement une incapacité à y répondre de façon efficace et définitive.

Nous avons pu alors montrer à l'aide d'un traitement chronique au MnTBAP, une porphyrine SOD-mimétique à manganèse, que **l'accentuation de l'activité anti-oxydante SOD permet de réduire le niveau de sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite de façon importante.** Cette donnée est intéressante dans la mesure où plusieurs travaux ont précédemment montré que le traitement par surexpression de SOD2 *in vivo* permet de contrecarrer le développement de lésions tissulaires tardives radio-induites, (Epperly *et al*, 1998, 2002, 2008).

De façon intéressante, rappelons que p53 est un facteur de transcription dont les cibles comprennent SOD2, (activation ou répression) et GPX1, (activation). D'ailleurs, la Catalase qui n'est pas modulée dans notre modèle ne figure pas parmi les cibles de p53, (Perwez-

Hussain *et al*, 2004 ; Pani *et al*, 2011). Si le lien direct reste à être clairement démontré dans notre modèle, nous pouvons émettre l’hypothèse que notre modèle de sénescence endothéliale radio-induite passe par un stress oxydant chronique, où le maintien à long terme de la réponse anti-oxydante se fait, au moins en partie, sous le contrôle de l’activité de p53, (Liu, Xu, 2011). En effet, le traitement à la Pifithrin- α permet d’augmenter l’expression de SOD2, tandis que le traitement au MnTBAP permet de réduire partiellement l’expression de p53. Ainsi, le stress oxydant mitochondrial pourrait être régulé via p53 par une régulation des cibles anti-oxydantes, et pourrait être réduit directement par le MnTBAP, réduisant ainsi la stimulation consécutive de l’axe p53. En conséquence, dans notre modèle, ceci positionnerait le stress oxydant mitochondrial en amont de p53, et positionnerait SOD2 en soupape intermédiaire, (Figure n°39). De plus, l’utilisation du MnTBAP, et non de la Pifithrin- α , a permis d’améliorer la respiration mitochondriale dépendante du complexe II, suggérant ainsi que la réduction du stress oxydant mitochondrial permet de rétablir les fonctions mitochondriales, et indique à nouveau que l’action de p53 se situe en aval de la dysfonction mitochondriale. Dans notre modèle, des mesures de production de superoxydes mitochondriaux lors d’un traitement par Pifithrin- α ou MnTBAP pourraient permettre de répondre à cette question.

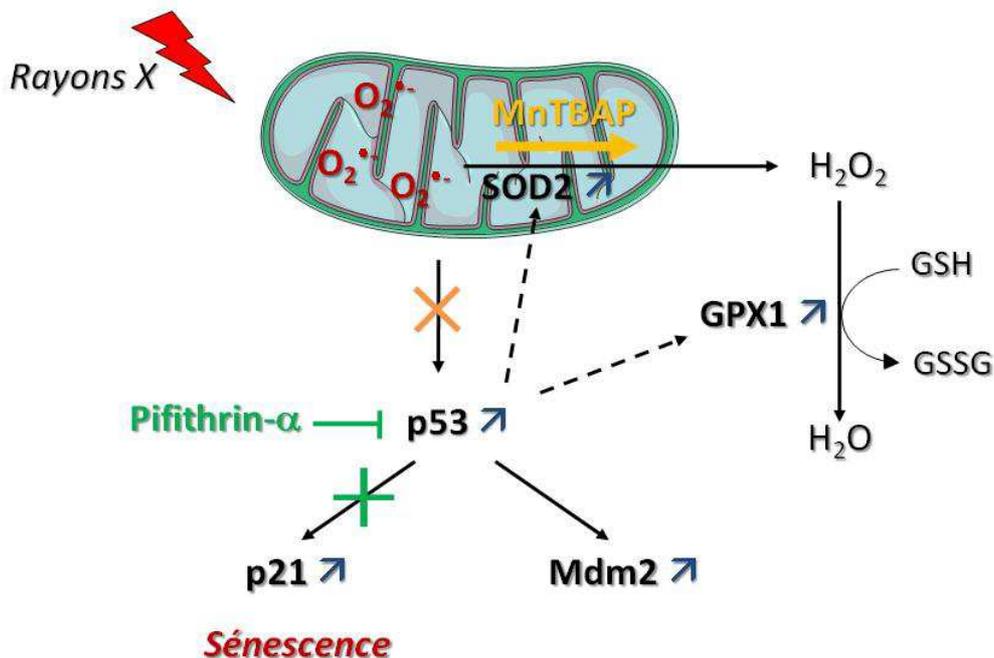


Figure n°39 : Proposition de modèle n°1.

Enfin, nos différents résultats montrent que le traitement par S1P, bien que permettant la persistance de dommages de l'ADN résiduels sur quelques jours, n'a pas davantage d'impact sur l'apparition de la sénescence, ni sur l'activation, ni sur l'ensemble des facteurs moléculaires étudiés. En inhibant l'apoptose précoce dépendante de la voie du Céramide, la S1P semble donc être un bon candidat pour traiter la radiotoxicité aiguë sans modifier la radiotoxicité tardive. Ceci permet également de mettre en évidence que si l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales est dépendante de la voie du Céramide et indépendante de p53, p53 tient un rôle majeur ultérieurement dans la sénescence, dissociant ainsi les voies d'apoptose et de sénescence après irradiation.

Ainsi, nous avons pu déterminer que la sénescence radio-induite des cellules endothéliales microvasculaires quiescentes implique, de façon originale, non pas la persistance de la signalisation des dommages de l'ADN, mais un stress oxydant mitochondrial chronique et l'activité maintenue de p53. Nous avons aussi pu montrer qu'un prétraitement à la S1P n'accentue pas ce phénotype, ni les modulations moléculaires qui y sont associées, (Lafargue *et al*, article soumis).

*

Cependant, ici nous ne répondons pas à la question de l'origine du stress oxydant mitochondrial persistant après irradiation. De façon intéressante, il a été montré récemment, dans un modèle cellulaire de carcinome pulmonaire, que l'induction du stress oxydant dans différents compartiments provoque des devenir cellulaires différents. Ainsi, le traitement par H₂O₂ exogène à forte dose provoque des dommages de l'ADN et la mort cellulaire, tandis que le traitement à dose moyenne ou l'induction modérée d'O₂^{•-}/H₂O₂ spécifiquement à la mitochondrie par inhibition du complexe III (Antimycine A), provoque l'entrée en sénescence, sans générer de dommages de l'ADN, (Panieri *et al*, 2013). Notre modèle concorde avec ce profil, mais le mécanisme de l'origine d'induction et du maintien du stress oxydant mitochondrial reste à être éclairci. On peut supposer que la régulation de l'expression de certains facteurs soit régie par des altérations/contraintes génomiques nucléaires et/ou mitochondriales, ou encore des altérations/contraintes épigénomiques, initiées après l'irradiation puis persistantes. De plus, le stress oxydant chronique induit par la suite pourrait à son tour altérer l'ADN, et ainsi renforcer et maintenir ces altérations/contraintes.

D'une part, si l'irradiation entraîne une première vague de dommages et de stress oxydant, les mitochondries endommagées pourraient être responsables d'une seconde vague de stress oxydant chronique. Rappelons que les protéines des complexes de la chaîne respiratoire sont codées par le génome nucléaire et/ou mitochondrial, et que l'irradiation peut induire des altérations de l'ADN dans ces deux compartiments. Un défaut d'activité des complexes I, II, et III, après irradiation, conduit à un maintien d'un stress oxydant et/ou une altération du métabolisme pouvant perdurer dans le temps, (Pearce *et al*, 2001 ; Dayal *et al*, 2009 ; Barjaktarovic *et al*, 2011 ; Azzam *et al*, 2012 ; Kam, Banati, 2013). Les cellules $\rho^{(0)}$, dépourvue d'ADN mitochondrial et donc de chaîne respiratoire complète, sont plus résistante au stress oxydant mais sont cependant capables de produire davantage de SOD2, dont la surexpression confère une radio-protection dans de nombreux modèles, (Epperly *et al*, 1998, 2002, 2008 ; Park *et al*, en 2004 ; Kam, Banati, 2013). Il a été montré que la stimulation de la génération de superoxide suite à une altération spécifique de la chaîne respiratoire mitochondriale par traitement à la Roténone (inhibiteur du complexe I) ou par Antimycine A (inhibiteur de complexe III), provoque une augmentation de l'expression de p53, et une sénescence dépendante de p53 dans des cellules HCT116, (Behrend *et al*, 2005). Egalement, rappelons que des altérations de l'expression et de l'activité des complexes I, II, III, IV ont été retrouvés dans certains modèles *in vitro* et *in vivo* de sénescence endothéliale répllicative, (Xin *et al*, 2003 ; Ungvari *et al*, 2008 ; Onouchi *et al*, 2012 ; Velarde *et al*, 2012 ; Koziel *et al*, 2013). Dans notre modèle de sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite, nous avons pu identifier une altération de la respiration mitochondriale liée à l'activité du complexe II. Cette dysfonction peut participer au stress oxydant mitochondrial, ou en être la conséquence, et s'avère être réversible en présence d'anti-oxydant MnTBAP.

D'autre part, le stress oxydant et la stabilisation de p53 peuvent aussi être liés à la persistance d'un dysfonctionnement des voies mitochondriales pro/anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, (Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak). p53 est connu pour avoir un rôle important dans leur répression/activation. Il a été montré que la surexpression de Bcl-2 peut permettre de bloquer l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales notamment en inhibant l'accumulation de p53, (Kumar *et al*, 2007). *A contrario*, il est donc possible qu'une inhibition de l'expression de Bcl-2 favorise l'accumulation de p53. De plus, rappelons que Bcl-2 peut être inhibé par p53, et a des propriétés anti-oxydantes en localisant le glutathion à la mitochondrie (Zimmerman *et al*, 2007). Il a aussi été montré que la sous-expression de Bcl-2 dans les

cellules endothéliales macrovasculaires en sénescence répliquative est associée à un important stress oxydant mitochondrial, (Uraoka *et al*, 2011). Nous avons pu observer le même profil dans notre modèle, sans pour autant établir un lien direct avec le développement de la sénescence. En effet, ni l'inhibition de l'activité de p53 sous Pifithrin- α , ni le SOD-mimétique MnTBAP, n'ont permis de ré-augmenter l'expression de Bcl-2 bien que nous soyons en mesure de réduire la sénescence. Il se peut toutefois que la Pifithrin- α ou le MnTBAP agissent à un niveau intermédiaire du mécanisme moléculaire de la sénescence endothéliale radio-induite, et que Bcl-2 occupe un rôle alternatif, ou en amont dans la signalisation.

En somme, nous avons pu observer que si l'utilisation chronique d'agents pharmacologiques Pifithrin- α ou MnTBAP, permet de réduire, au moins partiellement, la sénescence endothéliale radio-induite, ils ne permettent pas de rétablir complètement l'ensemble des modulations moléculaires observées, (cas de p53, Bcl-2, SOD2, et potentiellement le SASP). Ces observations montrent alors que la sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite repose sur plusieurs « pivots », dont p53 et le stress oxydant mitochondrial, et qu'inhiber un d'entre eux suffit à réduire le phénotype. Cependant, dans la mesure où l'inhibition de la sénescence ne permet pas de résoudre toutes les modulations moléculaires, ceci soulève la question de l'origine de leur pérennité, et laisse aussi entrevoir un autre niveau de régulation des modulations associées à la sénescence situé en amont.

Il est alors intéressant de noter que l'activation de p53 sous irradiation peut adopter différentes dynamiques, et donner lieu à un devenir cellulaire différent. Cette réponse peut dépendre du stress inducteur et/ou du type cellulaire et/ou de son statut dans le cycle cellulaire. Ceci pourrait notamment être important concernant des cellules à faible renouvellement : autrement dit, afin d'échapper à une instabilité génomique, on peut supposer qu'une cellule qui peut être renouvelée entrera en apoptose, tandis qu'une cellule à faible renouvellement, c'est le cas de l'endothélium, entrera en sénescence afin, avant tout, de préserver les fonctions vasculaires et l'intégrité du tissu. Ce qui orientera l'activité de p53 dans un sens ou dans l'autre est ici à déterminer.

En ce sens, il a été montré que l'irradiation par UV-B de MEF proficientes pour p53 entraîne leur mort par apoptose, tandis que les cellules exprimant une forme de p53 inactive pour l'activation des voies d'apoptose, entrent en sénescence. Ces cellules conservent leurs capacités d'arrêt de cycle et de réparation des dommages de l'ADN, (Tavana *et al*, 2010). Il a

également été mis en évidence une différence de réponse entre un traitement par inhibiteur de Topoisomérase ou par irradiation dans certaines lignées cellulaires de cancer du sein. Si les deux induisent des dommages de l'ADN, seul le premier est capable d'induire la mort cellulaire, alors que le second induit la sénescence. Dans les deux cas, il y a activation de p53 et translocation de ce dernier à la mitochondrie. Dans les deux cas également, il y a activation des protéines p21, Bax et Puma. L'addition de p53 sauvage lors d'un traitement par irradiation permet d'induire l'apoptose. Ceci permet de conclure que la translocation de p53 à la mitochondrie ne constitue pas en soit une activation de la mort cellulaire. Cela permet aussi de conclure que selon le stress inducteur, même si la cible est identique (ici, l'ADN), mais aussi potentiellement selon le niveau ou le format d'expression de p53, les réponses cellulaires sont adaptées et différentes, (Essmann *et al*, 2005).

Les travaux récents de Purvis *et coll*, ont quant à eux montré que la dynamique d'expression de p53 conditionne le devenir cellulaire sous un stress radio-induit. Si l'activité de p53 est impliquée lors des devenirs transitoires tels que l'arrêt de cycle et la réparation des dommages de l'ADN, elle est aussi impliquée dans les devenirs terminaux tels que l'apoptose et la sénescence. Si l'activation sous une dynamique « pulsatile » de p53 (oscillation) provoque l'activation des gènes associés aux devenirs transitoires, l'activation sous une dynamique « soutenue » de p53 provoque l'activation des gènes associés aux devenirs terminaux. De façon intéressante, dans ce modèle (MCF-7) sous irradiation γ , ni la dynamique pulsée de p53 (1 irradiation γ), ni la dynamique soutenue de façon artificielle (1 irradiation γ + traitement par Nutlin-3 contrôlé) n'induisent l'apoptose, contrairement à une irradiation UV, qui provoque directement une dynamique soutenue de p53 mais des cibles différentes. Ceci indiquant les différences d'impacts et de cibles selon le stress radio-induit, (Purvis *et al*, 2012). Ces données sont appuyées par des travaux précédents montrant que l'irradiation γ permet une augmentation supérieure et plus précoce de l'expression de p21 comparée aux UV. Les deux formes d'irradiation n'ont pas de différence dans la dégradation par le protéasome, ou sur la qualité de liaison sur le promoteur de p21, ou de PUMA, une autre cible de p53. En revanche, p53 est retenu plus longtemps sur le promoteur de p21 sous irradiation γ . Ceci dépendant notamment d'une augmentation de l'acétylation des histones H4 sur le promoteur de p21 lors d'une irradiation γ , (Hill *et al*, 2008).

Dans le cas de l'irradiation γ , la dynamique pulsée de p53 favorise l'arrêt de cycle et la reprise de la croissance, alors que la dynamique soutenue favorise l'entrée en sénescence. Par exemple, 1 jour après irradiation γ à 2,5Gy, <10% des cellules seront sénescentes en dynamique pulsée, contre ~50% pour la dynamique soutenue. De même, 3 jours sont

nécessaires lors d'une dynamique pulsée alors qu'1 jour est nécessaire lors d'une dynamique soutenue, pour obtenir une sénescence équivalente sous 10Gy. Ainsi, la dynamique pulsée requiert une dose supérieure pour l'entrée en sénescence comparée à la dynamique soutenue, indiquant que ce n'est pas la quantité de dommages induits mais la dynamique de p53 qui conditionne l'induction de la sénescence. Par ailleurs, l'expression de p53 est plus importante sous une dynamique soutenue que sous une dynamique pulsée, or, pour une même quantité d'expression de p53 dans chaque dynamique, la dynamique soutenue favorisera toujours davantage et plus précocément ses cibles que la dynamique pulsée, confirmant ici que c'est bien le format de la dynamique qui importe, (Purvis *et al*, 2012, 2013).

En ce sens, selon les modèles cellulaires, la sénescence radio-induite dépendante de l'expression de p53 pourrait dépendre soit du passage d'une dynamique pulsée à une dynamique soutenue, soit d'une dynamique pulsée de longue durée en fonction de la dose, (l'augmentation de la dose ne modifiant ni la fréquence, ni l'amplitude des pulsations), que nous pourrions définir « *sustained-like* ». Dans les deux cas, elles permettraient l'accumulation de cibles nécessaires à l'arrêt en sénescence telles que p21.

Cependant, l'événement en amont permettant ce choix d'expression de p53 reste à déterminer. Il pourrait s'agir d'une persistance de dommages de l'ADN, ou encore d'une modification de la « qualité » des dommages ou du génome globalement. De telles altérations sont susceptibles de provenir d'une réorganisation de la chromatine suite à des modifications épigénomiques maintenues au long cours.

L'hypothèse des modifications épigénomiques est intéressante dans notre modèle dans la mesure où, contrairement aux travaux de Purvis *et coll*, nous sommes à des temps expérimentaux très tardifs et où nous ne détectons pas de persistance de la signalisation des dommages de l'ADN. Ici, les deux formes, le maintien de pulsations de l'expression de p53 ou la contraction d'une dynamique soutenue, peuvent être envisagées. Leur induction pourrait éventuellement dépendre de l'irradiation elle-même et de son effet direct sur la chromatine, et/ou du stress oxydant mitochondrial subséquent persistant qui peut à son tour agir sur l'équilibre de la chromatine. De plus, il est à noter que si ce mécanisme d'induction est valable pour p53, il est tout autant envisageable pour d'autres facteurs modulés au cours de la sénescence radio-induite. Il serait alors intéressant de questionner la dynamique d'expression des facteurs susceptibles d'être responsables du maintien du stress oxydant mitochondrial.

Par ailleurs, l'hypothèse de la persistance de contraintes épigénomiques est appuyée par le fait que l'irradiation induit des modifications de l'organisation de la chromatine

pouvant perdurer dans le temps, notamment par une régulation de l'acétylation des histones et une régulation de la méthylation des histones et de l'ADN. Les mécanismes exacts n'ont pas été encore clairement étudiés. Il apparaît globalement qu'après irradiation, l'ADN est hypométhylé, (potentiellement via une réduction de l'expression des méthyltransférases de l'ADN), ce qui est en faveur d'une relaxation de la chromatine. Concernant les histones, ils apparaissent globalement hypométhylés et acétylés, ce qui est en faveur d'une relaxation, hormis sur les sites de cassures où, à l'inverse, il y a une méthylation et une désacétylation, en faveur d'une condensation, (Ilnytskyi *et al*, 2011). Cependant peu de données existent concernant les relations entre modifications épigénétiques radio-induites et sénescence radio-induite chez les cellules endothéliales en particulier.

Ce type de modifications de l'organisation de la chromatine est observé au cours de la sénescence cellulaire, et semble dépendre du modèle d'étude. Il apparaît une redistribution de l'hétérochromatine, comprenant une réduction globale de l'hétérochromatine, en faveur d'une relaxation, mais aussi cependant la relocalisation de l'hétérochromatine, notamment au niveau des SAHF sur des sites spécifiques dont les sites dépendants d'E2F, (Narita *et al*, 2003, 2007 ; Tsurumi, Li, 2011 ; Rai, Adams, 2011). De plus, si les dommages de l'ADN persistants ont été montrés pour être accumulés au cours du vieillissement et au cours de la sénescence radio-induite, (Rodier *et al*, 2009, 2011), il a récemment été mis en avant dans un modèle de cellules souches de follicule capillaire, que la persistance de foyers positifs pour 53BP1 lors du vieillissement ou après irradiation, ne sont, dans ce cas, pas des foyers persistants de dommages de l'ADN à proprement parler, mais représentent en fait des foyers persistants d'hétérochromatine suite à une réorganisation de la chromatine, (Shuler, Rube, 2013).

Il est à noter que le stress oxydant est susceptible de modifier l'organisation de la chromatine notamment via la régulation de l'expression/activité des facteurs d'acétylation et de méthylation, (Weitzman *et al*, 1994 ; Rahman *et al*, 2004). Ces modifications sont aussi retrouvées *in vivo* au sein de pathologies impliquant le stress oxydant, dont des pathologies vasculaires. Le stress oxydant, s'il favorise aussi les dommages de l'ADN et l'apparition de foyers, favorise aussi la relaxation de la chromatine et l'expression de certains gènes, dont en particulier l'expression de facteurs liés à la réponse inflammatoire chronique, (Rexhaj *et al*, 2011 ; Sundar *et al*, 2012 ; Feng *et al*, 2012).

Une étude récente a par ailleurs montré sur un modèle de fibroblastes sénescents un profil conditionnel des modifications épigénétiques selon le gène. Dans cette étude, l'ADN est globalement hypoacétylé et méthylé, ce qui est plutôt en faveur d'une condensation, sauf sur certains gènes tels que Bcl-2, qui est surexprimé dans leur cas, et confère aux cellules une

résistance à l'apoptose induite sous une forte dose d' H_2O_2 , (Sanders *et al*, 2013). Il a aussi été montré que des fibroblastes sénescents après réplication ou après stress oxydant par H_2O_2 , ont une expression augmentée de p66shc, un facteur pro-oxydant ciblant la mitochondrie et pouvant être régulé par p53. L'analyse épigénétique montre que l'ADN du promoteur du gène de p66shc est hypométhylé, et que les histones du promoteur et du gène sont acétylés et hypométhylés. Les sites modifiés ne sont pas strictement identiques selon le format de sénescence mais conduisent tous deux à une relaxation et une expression du gène maintenue dans le temps, pouvant ainsi contribuer au maintien d'un stress oxydant mitochondrial, (Zhang *et al*, 2010). De plus, l'acétylation de la chromatine sous stress oxydant ou l'inhibition d'HDAC par Trichostatine A seule peut engendrer une surexpression de facteurs inflammatoires tels que l'IL-8, (Rahman *et al*, 2002, 2004). Ceci pouvant expliquer la contraction du SASP. De façon intéressante, il a récemment été observé que l'inhibition d'HDAC (par Trichostatine A, Butyrate de Sodium) provoque un remodelage de la chromatine induisant la sénescence cellulaire en absence de cassures de l'ADN, (Place *et al*, 2005 ; Pospelova *et al*, 2009), ainsi que l'induction de certains facteurs du SASP, (Pazzoli *et al*, 2012).

Les altérations épigénomiques sont retrouvées au cours de pathologies vasculaires et de la sénescence endothéliale induites par un stress oxydant chronique. En effet, de façon intéressante, il a été décrit à de multiples reprises une restriction de SIRT1 (HDAC dépendante du NAD, Hwang *et al*, 2013), lors de la sénescence endothéliale répliquative et lors de la sénescence endothéliale accélérée sous irradiation ou stress oxydant, (Ota *et al*, 2007 ; Panganiban *et al*, 2013). La surexpression de SIRT1, prévient la sénescence endothéliale induite par H_2O_2 , (Ota *et al*, 2007). SIRT1 est réduit *in vivo* au sein des vaisseaux âgés et des vaisseaux athérosclérotiques. Un traitement par Resveratrol, qui active SIRT1 et est anti-oxydant, permet de réduire la sénescence endothéliale sous stress oxydant, (Ota *et al*, 2007, 2010 ; Kao *et al*, 2010 ; Tang *et al*, 2012), et permet aussi de réduire la sénescence radio-induite dans d'autres modèles cellulaires, (Hong *et al*, 2012). Egalement, le Resveratrol, et le Ex527, qui est spécifique de SIRT1, permettent de réduire des lésions radio-induites de la moelle osseuse à moyen/long terme, (Zhang *et al*, 2013). La sénescence induite par traitement hyperglycémique sur des cellules endothéliales microvasculaires est associée à un stress oxydant, mais aussi à une réduction de l'expression de SIRT1 et à une augmentation de l'expression de l'HAT p300. Le traitement par Resveratrol ou par inhibition de p300 permet de rétablir ces paramètres, et de réduire la sénescence, (Mortuza *et al*, 2013).

Par ailleurs, SIRT1 est connu pour avoir un rôle de désacétylation et d'inactivation de la protéine p53, (Luo *et al*, 2001). En réciproque, p53 actif est capable de réguler négativement l'expression de SIRT1, (Nemoto *et al*, 2004). SIRT1 favorise la longévité, et les souris déficientes pour SIRT1 présentent des défauts de développement et présentent une hyperacétylation de p53. L'utilisation de Trichostatine A augmente également l'acétylation de p53. Les thymocytes de ces souris montrent une hypersensibilité aux radiations, (Cheng *et al*, 2003). Egalement, l'irradiation UV de fibroblastes du derme est associée à une augmentation de MMP1 participant au photo-vieillessement de la peau. Ces fibroblastes irradiés montrent aussi une activation de p53, une augmentation de l'acétylation des histones H3, une réduction globale de l'activité HDAC, et une augmentation globale de l'activité HAT. L'utilisation d'Acide Anacardique (inhibiteur d'HAT) reverse l'ensemble de ces paramètres, ainsi que l'expression de MMP1, en réduisant la présence de p53, de p300, et de H3 acétylés au niveau du promoteur de MMP1, (Kim *et al*, 2009).

Par conséquent, dans notre modèle, l'ensemble de ces observations indiquent que la sénescence endothéliale microvasculaire induite par irradiation pourrait être conditionnée par une modification de l'organisation de la chromatine et un stress oxydant, contribuant ainsi à maintenir ou réprimer certains facteurs comme p53. Il est possible aussi qu'au moment de l'irradiation des cellules endothéliales microvasculaires non proliférantes, l'activation de p53 lors de la signalisation des dommages de l'ADN, induise une répression de facteurs de désacétylation comme SIRT1. Ce type de régulation pourrait ensuite favoriser un maintien des modifications de la chromatine et favoriser l'expression de facteurs de réponse au stress dont les facteurs pro-inflammatoires et les facteurs liés au stress oxydant mitochondrial. De plus, dans la mesure où le développement de la sénescence est associé à l'installation d'un stress oxydant mitochondrial chronique, ce stress oxydant peut agir à son tour sur le maintien des modifications de l'organisation de la chromatine et des signaux de stress, et provoquer ainsi un maintien à long terme des modulations d'expression des facteurs clés de la sénescence.

Ainsi, on peut favorablement supposer que notre phénotype de sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite soit régi par une altération cellulaire globale persistante. Un remodelage de la chromatine nucléaire et/ou une altération mitochondriale, contribuant au dysfonctionnement et au stress oxydant mitochondrial subséquent, pourraient en être le siège, et pourraient s'auto-entretenir, (Figure n°40).

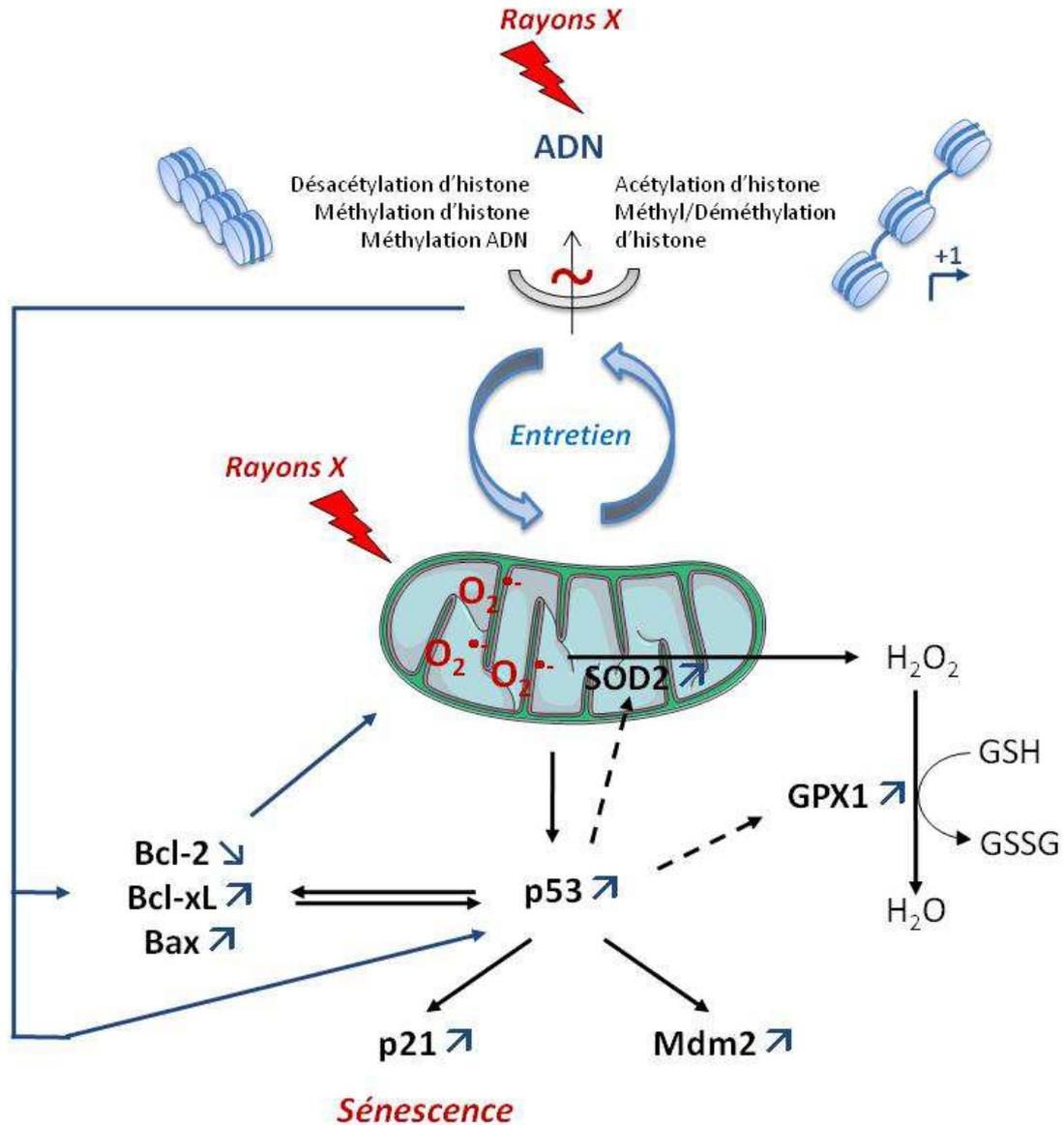


Figure n°40 : Proposition de modèle n°2.

Les prochaines recherches devront donc être orientées dans ce sens : analyser l'acétylation et la méthylation globale de la chromatine ou spécifiquement sur les gènes des cibles d'intérêt ; analyser l'expression et l'activité des HAT, des HDAC, des méthyltransférases, et des déméthylases ; étudier la présence de dommages sur le génome mitochondrial. L'importance de chacun de ces paramètres dans notre modèle pourra être mesurée via, par exemple, l'utilisation de traitements chroniques d'Acide Anacardique, (inhibiteur d'HAT), de Trichostatine A (inhibiteur d'HDAC), de Resveratrol (polyphénol activateur de SIRT1), de Roténone (inhibiteur du complexe I), de TTFA (pour

Thenoyltrifluoroacetone, inhibiteur du complexe II), ou d'Antimycine A, (inhibiteur du complexe III). Sous ces divers traitements, les mesures quantitatives de sénescence, de production de superoxydes mitochondriaux, de respiration mitochondriale, et d'expression protéique notamment de p53, p21, SOD2 et Bcl-2, permettront de savoir si ces paramètres sont effectivement dérégulés de façon chronique, et s'ils sont effectivement à l'origine de l'arrêt en sénescence et des caractères associés. Egalement, il est intéressant de passer par des traitements exogènes dans la mesure où il s'agit, à terme, de cibler pharmacologiquement la sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite et ses effets *in vivo*.

*

Sur le plan physiologique, si la sénescence endothéliale est un fait avéré *in vitro* et *in vivo*, l'impact sur les tissus de la sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite précisément reste difficile à confirmer *in vivo*, en partie du fait d'un contrôle difficile de la chronologie d'apparition des lésions tardives.

Certains résultats ont montré que la sénescence radio-induite des HUVEC favorise l'adhésion des EPC, pouvant ainsi potentiellement favoriser le *homing* des EPC et la néovascularisation, (Sermsathanasawadi *et al*, 2009). Les cellules endothéliales microvasculaires irradiées présentent également un phénotype sécrétoire pro-inflammatoire (SASP) maintenu à long terme, (Ungvari *et al*, 2013), observation que nous avons pu également constater et associer à une perte de la cohésion inter-cellulaire et une augmentation de la perméabilité de la monocouche endothéliale.

L'ensemble de ces dysfonctions pourrait donc participer *in vivo* à la contraction de lésions tissulaires tardives après radiothérapie.

Afin de pouvoir conclure quant à l'impact direct de la sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite sur les effets secondaires tardifs de la radiothérapie, les facteurs moléculaires clés mis en évidence *in vitro* doivent être recherchés dans des modèles caractéristiques *in vivo*. En particulier, deux modèles de pathologies radio-induites tardives, où la réponse du réseau microvasculaire tient un rôle important, peuvent être proposées : la fibrose intestinale et la fibrose pulmonaire. En effet, le traitement par radiothérapie des tumeurs abdomino-pelviennes est limitée par la dose délivrée à l'intestin et les effets secondaires induits, qui sont en partie caractérisés par des dommages sur le réseau microvasculaire. De même, l'irradiation des tumeurs thoraciques est limitée par la dose

délivrée aux tissus pulmonaires et cardiovasculaires alentours, (Stewart *et al*, 2012). La fibrose intestinale chez une souris irradiée en loco-régional sur une anse intestinale extériorisée par chirurgie, se marque dès 14 jours post-irradiation à 19Gy (Abderrahmani *et al*, 2009). La fibrose pulmonaire chez la souris s'étudie après 120 jours suite à une irradiation thoracique à 20Gy avec une protection de la tête, du cou, et de la zone sous-diaphragme, (Epperly *et al*, 1999, 2004).

Les zones de fibrose et les lésions tissulaires intestinales sont détectées par analyse histologique via coloration Hematoxyline/Eosine et coloration au rouge Sirius ou au Trichrome de Masson, (marquage des zones fibrotiques, dont notamment les fibres de collagène).

Si le contrôle de la chronologie des événements est une première difficulté majeure *in vivo*, le contrôle de la localisation de l'irradiation en est une seconde. Classiquement, l'irradiation du petit animal est effectuée sur corps entier, sur une partie du corps à l'aide de protections par lames de plomb, ou encore, sur un organe mis à jour après chirurgie, comme exposé ci-avant avec l'anse intestinale du grêle. Autant de pratiques qui peuvent potentiellement conférer un biais dans l'interprétation des résultats car éloignés des procédés médicaux, ou, car imposant un risque important dans la survie et l'état de santé de l'animal, notamment dans le cas de la chirurgie. Pour palier à ces contraintes, de nouveaux accélérateurs ont été mis au point au cours de ces dernières années. Depuis peu, notre laboratoire s'est équipé d'un irradiateur dédié au petit animal, le X-Rad (Model XRad225Cx, Precision X-Ray Inc. North Branford CT). A l'image d'un irradiateur conventionnel dédié aux patients, cet équipement permet d'améliorer la balistique d'irradiation en utilisant des faisceaux pouvant cibler une zone de minimum 1mm (2,5mm pour l'X-Rad de Nantes) de diamètre, à maximum 10cm de côté pour un faisceau carré. Il permet également un contrôle précis de la zone d'irradiation à l'aide d'une assistance par scanner. L'intensité et la dose d'irradiation est mieux contrôlée et se rapproche davantage de celle des irradiateurs médicaux. Ce type d'irradiateur permet ainsi de délimiter précisément la zone d'irradiation et évite la lourde étape de la chirurgie pré-irradiation. Il serait donc très intéressant d'utilisation, notamment dans le cas d'une fibrose radique pulmonaire où il permettrait par exemple de cibler un lobe pulmonaire sur les deux, voire une portion de lobe. Le second lobe pouvant être alors potentiellement utilisé comme un contrôle interne si exclu du champ d'irradiation. Ainsi, nous pourrions observer l'évolution de la fibrose au cours du temps depuis le foyer d'irradiation, mais aussi voir s'il y a une étendue vers les zones moins exposées voire non-exposées. Nous pourrions alors mesurer également la sénescence cellulaire au sein de la fibrose et détecter la présence de sénescence endothéliale.

La détection de la sénescence endothéliale peut se faire notamment par double marquage histologique CD31 et p21, en association ou non avec un marquage de la SA- β -Galactosidase. Cependant, ces marquages sur tissu fibrotique ne sont pas toujours suffisamment fins pour discriminer les sous-structures tissulaires. Ainsi, l'utilisation de nouveaux modèles murins en cours de mise au point par le groupe de Campisi peuvent permettre d'améliorer le procédé. La caractéristique de ces modèles transgéniques est de posséder un promoteur de p21 ou p16 associé à un fluorochrome permettant ainsi de distinguer, à long terme post-irradiation, les cellules en sénescence. Un couplage avec un promoteur spécifique du type cellulaire peut également être effectué, notamment via le CD31 pour détecter les cellules endothéliales sous un second fluorochrome. Seulement, les protéines p21 et p16 ne sont bien entendu pas induites qu'au cours de la sénescence et sont aussi induites notamment au cours d'un arrêt de cycle précédant une mort cellulaire. Les souris auront alors également ce type de promoteur avec la Caspase 3 afin de distinguer les cellules en voie de mort, des cellules sénescents. Ainsi, l'utilisation de ce type de modèle permettra un meilleur suivi chronologique de la sénescence et une meilleure discrimination inter-type cellulaire. Ce modèle pourrait par ailleurs être utilisé afin de valider les effets radioprotecteurs aigus de la S1P, de confirmer la dissociation entre le mécanisme de mort cellulaire et la sénescence radio-induite des microvaisseaux, et de confirmer l'absence d'effets à long terme de la S1P sur la radiotoxicité tardive.

Aussi, ce modèle permettrait de valider *in vivo* les voies moléculaires impliquées dans la sénescence endothéliale microvasculaire radio-induite par marquage avec les cibles d'intérêts déterminées (ou suggérées) *in vitro* (p53, SOD2, complexe II mitochondrial, Bcl-2, HDAC, HAT...). Il permettrait également de voir l'impact de leur restriction/activation forcée sur le niveau de sénescence et/ou sur les lésions radio-induites tardives. Il serait possible d'utiliser un système Cre-Lox afin de faire exprimer ou réprimer, de façon inductible post-irradiation puis chronique, une de ces cibles uniquement dans les cellules endothéliales ; par exemple, par l'expression de la Cre-recombinase sous la dépendance d'un promoteur de CD31 inductible par un agent exogène administré par injection ou voie orale. En effet, il est préférable de ne pas passer par des souris classique *KO* dans la mesure où il s'agit pour la plupart de cibles essentielles au bon développement de l'organisme, ou encore qui sont nécessaires lors de la réponse aiguë aux rayonnements ionisants. Il s'agit aussi de contrôler le niveau de restriction/activation de ces cibles afin de retomber à un niveau basal, et d'éviter une extinction totale ou une surexpression trop importante, qui pourraient être néfastes, (cas de p53 par exemple). En ce sens, il serait intéressant de voir si une régulation d'un des

facteurs clé de la sénescence est spécifique des microvaisseaux, et si sa régulation *on/off* hors irradiation suffit à engendrer la sénescence et les lésions tissulaires tels qu'observés après irradiation. S'il est peu probable que seule la sénescence microvasculaire suffit à provoquer complètement une lésion de type radio-induite, cette démarche peut néanmoins permettre d'identifier à quelle phase et sur quels paramètres du processus de développement de la lésion joue la sénescence microvasculaire. Enfin, des agents pharmacologiques d'intérêt pourraient alors être développés et utilisés chroniquement dans ce modèle *in vivo* afin de bloquer la sénescence endothéliale radio-induite, et par conséquent, l'apparition de lésions radio-induites tardives.

*

Pour conclure, nous avons établi un modèle cellulaire de sénescence endothéliale microvasculaire radioinduite, reflétant ainsi l'impact de l'irradiation sur le compartiment endothélial résidant au sein des tissus sains exposés aux rayonnements ionisants lors de la radiothérapie. Nous avons alors mesuré l'impact fonctionnel qui en résulte et décrit les voies moléculaires d'intérêt modulées dans notre modèle avec ou sans pré-traitement par S1P. En particulier, nous avons pu mettre en avant les rôles clés du stress oxydant mitochondrial et de l'activité de p53. Les altérations cellulaires et les mécanismes moléculaires à l'origine de cette sénescence demandent encore à être approfondis, notamment dans la recherche de modifications génomiques et/ou épigénomiques persistantes. Ces résultats vont dans le sens d'un effet délétère chronique de la sénescence endothéliale sur le microenvironnement adjacent et doivent être validés *in vivo*. Ces travaux sont une première étape dans le développement de traitement contre les effets indésirables tardifs de la radiothérapie dépendants de l'endothélium. Nous espérons, par la suite, pouvoir utiliser la S1P en association avec un agent pharmacologique, dirigé contre un des acteurs définis au cours de cette thèse et ciblant la sénescence endothéliale radio-induite, afin de prévenir les effets secondaires aussi bien aigus que tardifs au cours de la radiothérapie.

REFERENCES

- Abderrahmani, R., François, A., Buard, V., Benderitter, M., Sabourin, J.-C., Crandall, D.L., and Milliat, F. (2009). Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *74*, 942–948.
- Abderrahmani, R., François, A., Buard, V., Tarlet, G., Blirando, K., Hneino, M., Vaurijoux, A., Benderitter, M., Sabourin, J.-C., and Milliat, F. (2012). PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury. *PLoS ONE* *7*, e35740.
- Achanta, G., Sasaki, R., Feng, L., Carew, J.S., Lu, W., Pelicano, H., Keating, M.J., and Huang, P. (2005). Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J.* *24*, 3482–3492.
- 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.
- Aleman, B.M.P., van den Belt-Dusebout, A.W., De Bruin, M.L., van 't Veer, M.B., Baaijens, M.H.A., de Boer, J.P., Hart, A.A.M., Klokman, W.J., Kuenen, M.A., Ouwens, G.M., et al. (2007). Late cardiotoxicity after treatment for Hodgkin lymphoma. *Blood* *109*, 1878–1886.
- Andreassi, M.G. (2008). DNA damage, vascular senescence and atherosclerosis. *J. Mol. Med.* *86*, 1033–1043.
- Autsavapromporn, N., Suzuki, M., Plante, I., Liu, C., Uchihori, Y., Hei, T.K., Azzam, E.I., and Murakami, T. (2013). Participation of gap junction communication in potentially lethal damage repair and DNA damage in human fibroblasts exposed to low- or high-LET radiation. *Mutat. Res.*
- Avraham, T., Yan, A., Zampell, J.C., Daluvoy, S.V., Haimovitz-Friedman, A., Cordeiro, A.P., and Mehrara, B.J. (2010). Radiation therapy causes loss of dermal lymphatic vessels and interferes with lymphatic function by TGF-beta1-mediated tissue fibrosis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *299*, C589–605.
- Aykin-Burns, N., Slane, B.G., Liu, A.T.Y., Owens, K.M., O'Malley, M.S., Smith, B.J., Domann, F.E., and Spitz, D.R. (2011). Sensitivity to low-dose/low-LET ionizing radiation in mammalian cells harboring mutations in succinate dehydrogenase subunit C is governed by mitochondria-derived reactive oxygen species. *Radiat. Res.* *175*, 150–158.
- 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.
- Bahar, R., Hartmann, C.H., Rodriguez, K.A., Denny, A.D., Busuttil, R.A., Dollé, M.E.T., Calder, R.B., Chisholm, G.B., Pollock, B.H., Klein, C.A., et al. (2006). Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* *441*, 1011–1014.
- Baker, J.E., Fish, B.L., Su, J., Haworth, S.T., Strande, J.L., Komorowski, R.A., Migrino, R.Q., Doppalapudi, A., Harmann, L., Allen Li, X., et al. (2009). 10 Gy total body irradiation increases risk of coronary sclerosis, degeneration of heart structure and function in a rat model. *Int. J. Radiat. Biol.* *85*, 1089–1100.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499–506.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* *120*, 483–495.
- Ballinger, S.W., Patterson, C., Yan, C.N., Doan, R., Burow, D.L., Young, C.G., Yakes, F.M., Van Houten, B., Ballinger, C.A., Freeman, B.A., et al. (2000). Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ. Res.* *86*, 960–966.

- Ballinger, S.W., Patterson, C., Knight-Lozano, C.A., Burow, D.L., Conklin, C.A., Hu, Z., Reuf, J., Horaist, C., Lebovitz, R., Hunter, G.C., et al. (2002). Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* *106*, 544–549.
- Bao, S., Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Fang, Y., Richardson, D.A., Ali, A., Chen, S.M., Abraham, R.T., and Wang, X.F. (2001). ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* *411*, 969–974.
- Barascu, A., Le Chalony, C., Pennarun, G., Genet, D., Imam, N., Lopez, B., and Bertrand, P. (2012a). Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J.* *31*, 1080–1094.
- Barascu, A., Le Chalony, C., Pennarun, G., Genet, D., Zaarour, N., and Bertrand, P. (2012b). Oxidative stress alters nuclear shape through lamins dysregulation: a route to senescence. *Nucleus* *3*, 411–417.
- 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.
- Barjaktarovic, Z., Shyla, A., Azimzadeh, O., Schulz, S., Haagen, J., Dörr, W., Sarioglu, H., Atkinson, M.J., Zischka, H., and Tapio, S. (2013). Ionising radiation induces persistent alterations in the cardiac mitochondrial function of C57BL/6 mice 40 weeks after local heart exposure. *Radiother Oncol* *106*, 404–410.
- Barnett, G.C., West, C.M.L., Dunning, A.M., Elliott, R.M., Coles, C.E., Pharoah, P.D.P., and Burnet, N.G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 134–142.
- Bartke, N., and Hannun, Y.A. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S91–96.
- Beckham, T.H., Cheng, J.C., Marrison, S.T., Norris, J.S., and Liu, X. (2013). Interdiction of sphingolipid metabolism to improve standard cancer therapies. *Adv. Cancer Res.* *117*, 1–36.
- Behrend, L., Mohr, A., Dick, T., and Zwacka, R.M. (2005). Manganese superoxide dismutase induces p53-dependent senescence in colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 7758–7769.
- Bektas, M., Jolly, P.S., Müller, C., Eberle, J., Spiegel, S., and Geilen, C.C. (2005). Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene* *24*, 178–187.
- Bektas, M., Johnson, S.P., Poe, W.E., Bigner, D.D., and Friedman, H.S. (2009). A sphingosine kinase inhibitor induces cell death in temozolomide resistant glioblastoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *64*, 1053–1058.
- Bencokova, Z., Kaufmann, M.R., Pires, I.M., Lecane, P.S., Giaccia, A.J., and Hammond, E.M. (2009). ATM activation and signaling under hypoxic conditions. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 526–537.
- Benderitter, M., Vincent-Genod, L., Pouget, J.P., and Voisin, P. (2003). The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation. *Radiat. Res.* *159*, 471–483.
- Bentzen, S.M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 702–713.
- Berbée, M., Fu, Q., Boerma, M., Wang, J., Kumar, K.S., and Hauer-Jensen, M. (2009). gamma-Tocotrienol ameliorates intestinal radiation injury and reduces vascular oxidative stress after total-body irradiation by an HMG-CoA reductase-dependent mechanism. *Radiat. Res.* *171*, 596–605.
- Bernier, J., Hall, E.J., and Giaccia, A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 737–747.
- Bionda, C., Portoukalian, J., Schmitt, D., Rodriguez-Lafresse, C., and Ardail, D. (2004). Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem. J.* *382*, 527–533.

- Bionda, C., Hadchity, E., Alphonse, G., Chapet, O., Rousson, R., Rodriguez-Lafrasse, C., and Ardail, D. (2007). Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering. *Free Radic. Biol. Med.* *43*, 681–694.
- Blank, M., and Shiloh, Y. (2007). Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* *6*, 686–695.
- Blasco, M.A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 299–309.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* *279*, 349–352.
- Bollinger, C.R., Teichgräber, V., and Gulbins, E. (2005). Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* *1746*, 284–294.
- 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, W.M., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Sedelnikova, O.A., Solier, S., and Pommier, Y. (2008). GammaH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 957–967.
- Borghini, A., Cervelli, T., Galli, A., and Andreassi, M.G. (2013). DNA modifications in atherosclerosis: from the past to the future. *Atherosclerosis* *230*, 202–209.
- 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.
- Bouquet, F., Ousset, M., Biard, D., Fallone, F., Dauvillier, S., Frit, P., Salles, B., and Muller, C. (2011). A DNA-dependent stress response involving DNA-PK occurs in hypoxic cells and contributes to cellular adaptation to hypoxia. *J. Cell. Sci.* *124*, 1943–1951.
- Bowers, D.C., Liu, Y., Leisenring, W., McNeil, E., Stovall, M., Gurney, J.G., Robison, L.L., Packer, R.J., and Oeffinger, K.C. (2006). Late-occurring stroke among long-term survivors of childhood leukemia and brain tumors: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin. Oncol.* *24*, 5277–5282.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 297–308.
- Caldecott, K.W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 619–631.
- Camici, G.G., Shi, Y., Cosentino, F., Francia, P., and Lüscher, T.F. (2011). Anti-aging medicine: molecular basis for endothelial cell-targeted strategies - a mini-review. *Gerontology* *57*, 101–108.
- Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* *75*, 685–705.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 729–740.
- Cao, S., Walker, G.B., Wang, X., Cui, J.Z., and Matsubara, J.A. (2013). Altered cytokine profiles of human retinal pigment epithelium: oxidant injury and replicative senescence. *Mol. Vis.* *19*, 718–728.
- Carlisle, R., Rhoads, C.A., Aw, T.Y., and Harrison, L. (2002). Endothelial cells maintain a reduced redox environment even as mitochondrial function declines. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *283*, C1675–1686.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249–257.

- Cavallaro, U., Castelli, V., Del Monte, U., and Soria, M.R. (2000). Phenotypic alterations in senescent large-vessel and microvascular endothelial cells. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* *4*, 117–121.
- Celli, G.B., and de Lange, T. (2005). DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat. Cell Biol.* *7*, 712–718.
- Chang, E., and Harley, C.B. (1995). Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *92*, 11190–11194.
- Chen, J., and Goligorsky, M.S. (2006). Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *290*, H1729–1739.
- Chen, Q., and Ames, B.N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 4130–4134.
- Chen, B.P.C., Uematsu, N., Kobayashi, J., Lerenthal, Y., Krempler, A., Yajima, H., Löbrich, M., Shiloh, Y., and Chen, D.J. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J. Biol. Chem.* *282*, 6582–6587.
- 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.
- Chen, Q.M., Tu, V.C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., and Dilley, T. (2000). Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J. Cell. Sci.* *113* (Pt 22), 4087–4097.
- Cheng, H.-L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J.P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F.W., and Chua, K.F. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 10794–10799.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010–1014.
- Cho, S., and Hwang, E.S. (2011). Fluorescence-based detection and quantification of features of cellular senescence. *Methods Cell Biol.* *103*, 149–188.
- Cho, J.H., Kim, M.J., Kim, K.J., and Kim, J.-R. (2012). POZ/BTB and AT-hook-containing zinc finger protein 1 (PATZ1) inhibits endothelial cell senescence through a p53 dependent pathway. *Cell Death Differ.* *19*, 703–712.
- Chung, H.Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A.Y., Carter, C., Yu, B.P., and Leeuwenburgh, C. (2009). Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* *8*, 18–30.
- 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.
- Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, E., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., et al. (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* *366*, 2087–2106.
- Clifton Ling, C., Gerweck, L.E., Zaider, M., and Yorke, E. (2010). Dose-rate effects in external beam radiotherapy redux. *Radiother Oncol* *95*, 261–268.
- Coleman, C.N., Blakely, W.F., Fike, J.R., MacVittie, T.J., Metting, N.F., Mitchell, J.B., Moulder, J.E., Preston, R.J., Seed, T.M., Stone, H.B., et al. (2003). Molecular and cellular biology of moderate-dose (1-10 Gy) radiation and potential mechanisms of radiation protection: report of a workshop at Bethesda, Maryland, December 17-18, 2001. *Radiat. Res.* *159*, 812–834.

- 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.
- Collins-Underwood, J.R., Zhao, W., Sharpe, J.G., and Robbins, M.E. (2008). NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 929–938.
- Comi, P., Chiaramonte, R., and Maier, J.A. (1995). Senescence-dependent regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor in human vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 219, 304–308.
- Cooper, J.S., Fu, K., Marks, J., and Silverman, S. (1995). Late effects of radiation therapy in the head and neck region. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31, 1141–1164.
- 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.
- Corre, I., Niaudet, C., and Paris, F. (2010). Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutat. Res.* 704, 61–67.
- Costes, S.V., Chiolo, I., Pluth, J.M., Barcellos-Hoff, M.H., and Jakob, B. (2010). Spatiotemporal characterization of ionizing radiation induced DNA damage foci and their relation to chromatin organization. *Mutat. Res.* 704, 78–87.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11, 1921–1929.
- Cremesti, A., Paris, F., Grassmé, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E., and Kolesnick, R. (2001). Ceramide enables fas to cap and kill. *J. Biol. Chem.* 276, 23954–23961.
- Crescenzi, E., Palumbo, G., and Brady, H.J.M. (2003). Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem. J.* 375, 263–274.
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Koller, A., Edwards, J.G., and Kaley, G. (2003). Aging-induced proinflammatory shift in cytokine expression profile in coronary arteries. *FASEB J.* 17, 1183–1185.
- Csiszar, A., Labinskyy, N., Zhao, X., Hu, F., Serpillon, S., Huang, Z., Ballabh, P., Levy, R.J., Hintze, T.H., Wolin, M.S., et al. (2007). Vascular superoxide and hydrogen peroxide production and oxidative stress resistance in two closely related rodent species with disparate longevity. *Aging Cell* 6, 783–797.
- Cuadrado, M., Martinez-Pastor, B., Murga, M., Toledo, L.I., Gutierrez-Martinez, P., Lopez, E., and Fernandez-Capetillo, O. (2006). ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *J. Exp. Med.* 203, 297–303.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., and Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800–803.
- D’Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.

- D'Avella, D., Ciccirello, R., Angileri, F.F., Lucerna, S., La Torre, D., and Tomasello, F. (1998). Radiation-induced blood-brain barrier changes: pathophysiological mechanisms and clinical implications. *Acta Neurochir. Suppl.* 71, 282–284.
- 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, P.F., Remuzzi, A., Gordon, E.J., Dewey, C.F., Jr, and Gimbrone, M.A., Jr (1986). Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 2114–2117.
- Davis, A.J., So, S., and Chen, D.J. (2010). Dynamics of the PI3K-like protein kinase members ATM and DNA-PKcs at DNA double strand breaks. *Cell Cycle* 9, 2529–2536.
- 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.
- Decottignies, A., and d'Adda di Fagagna, F. (2011). Epigenetic alterations associated with cellular senescence: a barrier against tumorigenesis or a red carpet for cancer? *Semin. Cancer Biol.* 21, 360–366.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 21, 3192–3200.
- Deshpande, S.S., Qi, B., Park, Y.C., and Irani, K. (2003). Constitutive activation of rac1 results in mitochondrial oxidative stress and induces premature endothelial cell senescence. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, e1–6.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9363–9367.
- Ding, H., and Greenberg, M.M. (2007). Gamma-radiolysis and hydroxyl radical produce interstrand cross-links in DNA involving thymidine. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1623–1628.
- Dolara, P., Bigagli, E., and Collins, A. (2012). Antioxidant vitamins and mineral supplementation, life span expansion and cancer incidence: a critical commentary. *Eur J Nutr* 51, 769–781.
- Donato, A.J., Eskurza, I., Silver, A.E., Levy, A.S., Pierce, G.L., Gates, P.E., and Seals, D.R. (2007). Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ. Res.* 100, 1659–1666.
- Donnelly, E.H., Nemhauser, J.B., Smith, J.M., Kazzi, Z.N., Farfán, E.B., Chang, A.S., and Naeem, S.F. (2010). Acute radiation syndrome: assessment and management. *South. Med. J.* 103, 541–546.
- Durik, M., Kavousi, M., van der Pluijm, I., Isaacs, A., Cheng, C., Verdonk, K., Loot, A.E., Oeseburg, H., Bhaggoe, U.M., Leijten, F., et al. (2012). Nucleotide excision DNA repair is associated with age-related vascular dysfunction. *Circulation* 126, 468–478.
- El Ramy, R., Magroun, N., Messadecq, N., Gauthier, L.R., Boussin, F.D., Kolthur-Seetharam, U., Schreiber, V., McBurney, M.W., Sassone-Corsi, P., and Dantzer, F. (2009). Functional interplay between Parp-1 and SirT1 in genome integrity and chromatin-based processes. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3219–3234.
- Eldridge, A., Fan, M., Woloschak, G., Grdina, D.J., Chromy, B.A., and Li, J.J. (2012). Manganese superoxide dismutase interacts with a large scale of cellular and mitochondrial proteins in low-dose radiation-induced adaptive radioprotection. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1838–1847.
- Epperly, M., Bray, J., Kraeger, S., Zwacka, R., Engelhardt, J., Travis, E., and Greenberger, J. (1998). Prevention of late effects of irradiation lung damage by manganese superoxide dismutase gene therapy. *Gene Ther.* 5, 196–208.
- Epperly, M.W., Travis, E.L., Sikora, C., and Greenberger, J.S. (1999). Manganese [correction of Magnesium] superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposome pulmonary radioprotective gene therapy: modulation of

- irradiation-induced mRNA for IL-1, TNF-alpha, and TGF-beta correlates with delay of organizing alveolitis/fibrosis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 5, 204–214.
- Epperly, M.W., Sikora, C.A., DeFilippi, S.J., Gretton, J.A., Zhan, Q., Kufe, D.W., and Greenberger, J.S. (2002). Manganese superoxide dismutase (SOD2) inhibits radiation-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial membrane. *Radiat. Res.* 157, 568–577.
- Epperly, M.W., Guo, H., Shields, D., Zhang, X., and Greenberger, J.S. (2004). Correlation of ionizing irradiation-induced late pulmonary fibrosis with long-term bone marrow culture fibroblast progenitor cell biology in mice homozygous deletion recombinant negative for endothelial cell adhesion molecules. *In Vivo* 18, 1–14.
- Epperly, M.W., Dixon, T., Wang, H., Schlesselman, J., Franicola, D., and Greenberger, J.S. (2008). Modulation of radiation-induced life shortening by systemic intravenous MnSOD-plasmid liposome gene therapy. *Radiat. Res.* 170, 437–443.
- Erusalimsky, J.D. (2009). Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J. Appl. Physiol.* 106, 326–332.
- Erusalimsky, J.D., and Fenton, M. (2002). Further in vivo evidence that cellular senescence is implicated in vascular pathophysiology. *Circulation* 106, e144; author reply e144.
- Erusalimsky, J.D., and Kurz, D.J. (2005). Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp. Gerontol.* 40, 634–642.
- Essmann, F., Pohlmann, S., Gillissen, B., Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K., and Jänicke, R.U. (2005). Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280, 37169–37177.
- Estrada, R., Zeng, Q., Lu, H., Sarojini, H., Lee, J.-F., Mathis, S.P., Sanchez, T., Wang, E., Kontos, C.D., Lin, C.-Y., et al. (2008). Up-regulating sphingosine 1-phosphate receptor-2 signaling impairs chemotactic, wound-healing, and morphogenetic responses in senescent endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 283, 30363–30375.
- Evans, M.L., Graham, M.M., Mahler, P.A., and Rasey, J.S. (1986). Changes in vascular permeability following thorax irradiation in the rat. *Radiat. Res.* 107, 262–271.
- Fajardo, L.F. (2005). The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. *Acta Oncol* 44, 13–22.
- Farhat, N., Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Villeneuve, L., Mamarbachi, M., Perrault, L.P., Carrier, M., and Thorin, E. (2008). Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 86, 761–769.
- Faucher, K., Rabinovitch-Chable, H., Cook-Moreau, J., Barrière, G., Sturtz, F., and Rigaud, M. (2005). Overexpression of human GPX1 modifies Bax to Bcl-2 apoptotic ratio in human endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 277, 81–87.
- Fauquette, W., Amourette, C., Dehouck, M.-P., and Diserbo, M. (2012). Radiation-induced blood-brain barrier damages: an in vitro study. *Brain Res.* 1433, 114–126.
- Feine, I., Pinkas, I., Salomon, Y., and Scherz, A. (2012). Local oxidative stress expansion through endothelial cells--a key role for gap junction intercellular communication. *PLoS ONE* 7, e41633.
- Feng, B., Ruiz, M.A., and Chakrabarti, S. (2013). Oxidative-stress-induced epigenetic changes in chronic diabetic complications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91, 213–220.
- Fenton, M., Barker, S., Kurz, D.J., and Erusalimsky, J.D. (2001). Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 220–226.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst.)* 3, 959–967.

- Flaks, B., and Bresloff, P. (1966). Some observations on the fine structure of the lutein cells of x-irradiated rat ovary. *J. Cell Biol.* 30, 227–236.
- Fraga, M.F., and Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* 23, 413–418.
- Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 16, 238–246.
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J.M., Bucci, G., Dobрева, M., Matti, V., Beausejour, C.M., et al. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat. Cell Biol.* 14, 355–365.
- Furumoto, K., Inoue, E., Nagao, N., Hiyama, E., and Miwa, N. (1998). Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci.* 63, 935–948.
- Fyrst, H., and Saba, J.D. (2010). An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat. Chem. Biol.* 6, 489–497.
- Gabriels, K., Hoving, S., Seemann, I., Visser, N.L., Gijbels, M.J., Pol, J.F., Daemen, M.J., Stewart, F.A., and Heeneman, S. (2012). Local heart irradiation of ApoE(-/-) mice induces microvascular and endocardial damage and accelerates coronary atherosclerosis. *Radiother Oncol* 105, 358–364.
- Gabryś, D., Greco, O., Patel, G., Prise, K.M., Tozer, G.M., and Kanthou, C. (2007). Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 69, 1553–1562.
- 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.
- Ganesan, V., and Colombini, M. (2010). Regulation of ceramide channels by Bcl-2 family proteins. *FEBS Lett.* 584, 2128–2134.
- Gao, F., Fish, B.L., Szabo, A., Doctrow, S.R., Kma, L., Molthen, R.C., Moulder, J.E., Jacobs, E.R., and Medhora, M. (2012). Short-term treatment with a SOD/catalase mimetic, EUK-207, mitigates pneumonitis and fibrosis after single-dose total-body or whole-thoracic irradiation. *Radiat. Res.* 178, 468–480.
- 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.
- García-Ruiz, C., Colell, A., Marí, M., Morales, A., and Fernández-Checa, J.C. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.* 272, 11369–11377.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuäsen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.-B., Bartek, J., et al. (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 278, 14806–14811.
- 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., Neunlist, M., Bonnaud, S., Aubert, P., Benderitter, M., and Paris, F. (2007). Intestinal epithelial cell dysfunction is mediated by an endothelial-specific radiation-induced bystander effect. *Radiat. Res.* 167, 185–193.
- Gianicolo, M.E., Gianicolo, E.A.L., Tramacere, F., Andreassi, M.G., and Portaluri, M. (2010). Effects of external irradiation of the neck region on intima media thickness of the common carotid artery. *Cardiovasc Ultrasound* 8, 8.

- Gimbrone, M.A., Jr, Cotran, R.S., and Folkman, J. (1974). Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J. Cell Biol.* *60*, 673–684.
- Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., Chea, V., Matsukuma, K., Gilchrist, D., Wang, H., and Chan, C. (1998). H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J. Cell. Sci.* *111 (Pt 21)*, 3209–3220.
- Gorbunova, V., Seluanov, A., and Pereira-Smith, O.M. (2002). Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J. Biol. Chem.* *277*, 38540–38549.
- Gorgoulis, V.G., Pratsinis, H., Zacharatos, P., Demoliou, C., Sigala, F., Asimacopoulos, P.J., Papavassiliou, A.G., and Kletsas, D. (2005). p53-dependent ICAM-1 overexpression in senescent human cells identified in atherosclerotic lesions. *Lab. Invest.* *85*, 502–511.
- Gorshkova, I., Zhou, T., Mathew, B., Jacobson, J.R., Takekoshi, D., Bhattacharya, P., Smith, B., Aydogan, B., Weichselbaum, R.R., Natarajan, V., et al. (2012). Inhibition of serine palmitoyltransferase delays the onset of radiation-induced pulmonary fibrosis through the negative regulation of sphingosine kinase-1 expression. *J. Lipid Res.* *53*, 1553–1568.
- Gottlieb, T.M., and Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* *72*, 131–142.
- Grassmé, H., Cremesti, A., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2003). Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* *22*, 5457–5470.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* *97*, 503–514.
- Gruber, J., Fong, S., Chen, C.-B., Yoong, S., Pastorin, G., Schaffer, S., Cheah, I., and Halliwell, B. (2013). Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. *Biotechnol. Adv.* *31*, 563–592.
- Grzelińska, E., Bartosz, G., Gwoździński, K., and Leyko, W. (1979). A spin-label study of the effect of gamma radiation on erythrocyte membrane. Influence of lipid peroxidation on membrane structure. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* *36*, 325–334.
- Gujral, D.M., Chahal, N., Senior, R., Harrington, K.J., and Nutting, C.M. (2013). Radiation-induced carotid artery atherosclerosis. *Radiother Oncol.*
- 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.
- Hait, N.C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G.M., Harikumar, K.B., Singh, S.K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., et al. (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* *325*, 1254–1257.
- Hallahan, D.E., and Virudachalam, S. (1999). Accumulation of P-selectin in the lumen of irradiated blood vessels. *Radiat. Res.* *152*, 6–13.
- Hallahan, D.E., Geng, L., and Shyr, Y. (2002). Effects of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) null mutation on radiation-induced pulmonary fibrosis and respiratory insufficiency in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* *94*, 733–741.
- Han, S., and Brunet, A. (2012). Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol.* *22*, 42–49.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hari, D., Beckett, M.A., Sukhatme, V.P., Dhanabal, M., Nodzenski, E., Lu, H., Mauceri, H.J., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. (2000). Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* *3*, 277–282.

- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.
- HARMAN, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300.
- Harms, K., Nozell, S., and Chen, X. (2004). The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 822–842.
- Haydont, V., and Vozenin-Brotans, M.-C. (2007). Maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis: cellular and molecular features. *World J. Gastroenterol.* 13, 2675–2683.
- HAYFLICK, L., and MOORHEAD, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H.J., Moran, S., Pisano, D.G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J.V., Setien, F., Carmona, F.J., et al. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10522–10527.
- Higashi, Y., Kihara, Y., and Noma, K. (2012). Endothelial dysfunction and hypertension in aging. *Hypertens. Res.* 35, 1039–1047.
- Higashi, Y., Pandey, A., Goodwin, B., and Delafontaine, P. (2013). Insulin-like growth factor-1 regulates glutathione peroxidase expression and activity in vascular endothelial cells: Implications for atheroprotective actions of insulin-like growth factor-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1832, 391–399.
- Hill, R., and Lee, P.W.K. (2010). The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell Cycle* 9, 3460–3469.
- Hill, R., Bodzak, E., Blough, M.D., and Lee, P.W.K. (2008). p53 Binding to the p21 promoter is dependent on the nature of DNA damage. *Cell Cycle* 7, 2535–2543.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374.
- Holler, V., Buard, V., Gaugler, M.-H., Guipaud, O., Baudelin, C., Sache, A., Perez, M. del R., Squiban, C., Tamarat, R., Milliat, F., et al. (2009). Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1280–1291.
- Hong, E.-H., Lee, S.-J., Kim, J.-S., Lee, K.-H., Um, H.-D., Kim, J.-H., Kim, S.-J., Kim, J.-I., and Hwang, S.-G. (2010). Ionizing radiation induces cellular senescence of articular chondrocytes via negative regulation of SIRT1 by p38 kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 1283–1295.
- Houtgraaf, J.H., Versmissen, J., and van der Giessen, W.J. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med* 7, 165–172.
- Huang, W., Rha, G.B., Chen, L., Seelbach, M.J., Zhang, B., András, I.E., Bruemmer, D., Hennig, B., and Toborek, M. (2010). Inhibition of telomerase activity alters tight junction protein expression and induces transendothelial migration of HIV-1-infected cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H1136–1145.
- Hwang, J.-W., Yao, H., Caito, S., Sundar, I.K., and Rahman, I. (2013). Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. *Free Radic. Biol. Med.* 61C, 95–110.
- Igarashi, K., and Miura, M. (2008). Inhibition of a radiation-induced senescence-like phenotype: a possible mechanism for potentially lethal damage repair in vascular endothelial cells. *Radiat. Res.* 170, 534–539.
- Igarashi, J., Shoji, K., Hashimoto, T., Moriue, T., Yoneda, K., Takamura, T., Yamashita, T., Kubota, Y., and Kosaka, H. (2009). Transforming growth factor-beta1 downregulates caveolin-1 expression and enhances sphingosine 1-phosphate signaling in cultured vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 297, C1263–1274.
- 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.

- Ilnytsky, Y., and Kovalchuk, O. (2011). Non-targeted radiation effects-an epigenetic connection. *Mutat. Res.* 714, 113–125.
- Imaizumi, N., Monnier, Y., Hegi, M., Mirimanoff, R.-O., and Rüegg, C. (2010). Radiotherapy suppresses angiogenesis in mice through TGF-betaRI/ALK5-dependent inhibition of endothelial cell sprouting. *PLoS ONE* 5, e11084.
- Italiano, D., Lena, A.M., Melino, G., and Candi, E. (2012). Identification of NCF2/p67phox as a novel p53 target gene. *Cell Cycle* 11, 4589–4596.
- Jendrach, M., Pohl, S., Vöth, M., Kowald, A., Hammerstein, P., and Bereiter-Hahn, J. (2005). Morpho-dynamic changes of mitochondria during ageing of human endothelial cells. *Mech. Ageing Dev.* 126, 813–821.
- Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Vöth, M., and Bereiter-Hahn, J. (2008). Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* 8, 293–304.
- Johnson, L.K., Longenecker, J.P., and Fajardo, L.F. (1982). Differential radiation response of cultured endothelial cells and smooth myocytes. *Anal Quant Cytol* 4, 188–198.
- Joyce, N.C., Zhu, C.C., and Harris, D.L. (2009). Relationship among oxidative stress, DNA damage, and proliferative capacity in human corneal endothelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 2116–2122.
- Kam, W.W.-Y., and Banati, R.B. (2013). The Effects of Ionizing Radiation on Mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*
- Kao, C.-L., Chen, L.-K., Chang, Y.-L., Yung, M.-C., Hsu, C.-C., Chen, Y.-C., Lo, W.-L., Chen, S.-J., Ku, H.-H., and Hwang, S.-J. (2010). Resveratrol protects human endothelium from H₂O₂-induced oxidative stress and senescence via SirT1 activation. *J. Atheroscler. Thromb.* 17, 970–979.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321–1325.
- Kashkar, H., Wiegmann, K., Yazdanpanah, B., Haubert, D., and Krönke, M. (2005). Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 280, 20804–20813.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323.
- Kato, T.A., Okayasu, R., and Bedford, J.S. (2008). Comparison of the induction and disappearance of DNA double strand breaks and gamma-H2AX foci after irradiation of chromosomes in G1-phase or in condensed metaphase cells. *Mutat. Res.* 639, 108–112.
- Kim, H.J., Mun, J.Y., Chun, Y.J., Choi, K.H., and Kim, M.Y. (2001). Bax-dependent apoptosis induced by ceramide in HL-60 cells. *FEBS Lett.* 505, 264–268.
- Kim, K.S., Kim, J.E., Choi, K.J., Bae, S., and Kim, D.H. (2013). Characterization of DNA Damage-Induced Cellular Senescence by Ionizing Radiation in Endothelial Cells. *Int. J. Radiat. Biol.*
- Kim, M.-K., Shin, J.-M., Eun, H.C., and Chung, J.H. (2009). The role of p300 histone acetyltransferase in UV-induced histone modifications and MMP-1 gene transcription. *PLoS ONE* 4, e4864.
- Kirkland, R.A., Windelborn, J.A., Kasprzak, J.M., and Franklin, J.L. (2002). A Bax-induced pro-oxidant state is critical for cytochrome c release during programmed neuronal death. *J. Neurosci.* 22, 6480–6490.
- Kirkland, R.A., Saavedra, G.M., Cummings, B.S., and Franklin, J.L. (2010). Bax regulates production of superoxide in both apoptotic and nonapoptotic neurons: role of caspases. *J. Neurosci.* 30, 16114–16127.
- Kirsch, D.G., Santiago, P.M., di Tomaso, E., Sullivan, J.M., Hou, W.-S., Dayton, T., Jeffords, L.B., Sodha, P., Mercer, K.L., Cohen, R., et al. (2010). p53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis. *Science* 327, 593–596.

- Kiyohara, H., Ishizaki, Y., Suzuki, Y., Katoh, H., Hamada, N., Ohno, T., Takahashi, T., Kobayashi, Y., and Nakano, T. (2011). Radiation-induced ICAM-1 expression via TGF- β 1 pathway on human umbilical vein endothelial cells; comparison between X-ray and carbon-ion beam irradiation. *J. Radiat. Res.* 52, 287–292.
- Kleniewska, P., Piechota, A., Skibska, B., and Gorąca, A. (2012). The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 60, 277–294.
- Ko, E., Lee, K.Y., and Hwang, D.S. (2012). Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells undergo cellular senescence in response to oxidative stress. *Stem Cells Dev.* 21, 1877–1886.
- Kobashigawa, S., Suzuki, K., and Yamashita, S. (2011). Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 795–800.
- Kogot-Levin, A., and Saada, A. (2013). Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie.*
- Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22, 5897–5906.
- Kolesnick, R.N., Haimovitz-Friedman, A., and Fuks, Z. (1994). The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, Fas, and ionizing radiation. *Biochem. Cell Biol.* 72, 471–474.
- Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Wang, K., Christov, K., Golovkina, T.V., Goldblum, J.R., and Gudkov, A.V. (2004). Dual effect of p53 on radiation sensitivity in vivo: p53 promotes hematopoietic injury, but protects from gastro-intestinal syndrome in mice. *Oncogene* 23, 3265–3271.
- Kozieł, R., Pircher, H., Kratochwil, M., Lener, B., Hermann, M., Dencher, N.A., and Jansen-Dürr, P. (2013). Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4. *Biochem. J.* 452, 231–239.
- Kraveka, J.M., Li, L., Bielawski, J., Obeid, L.M., and Ogretmen, B. (2003). Involvement of endogenous ceramide in the inhibition of telomerase activity and induction of morphologic differentiation in response to all-trans-retinoic acid in human neuroblastoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 110–119.
- Krizhanovsky, V., Xue, W., Zender, L., Yon, M., Hernando, E., and Lowe, S.W. (2008). Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73, 513–522.
- Krouwer, V.J.D., Hekking, L.H.P., Langelaar-Makkinje, M., Regan-Klapisz, E., and Post, J.A. (2012). Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability. *Vascular Cell* 4, 12.
- Kurz, E.U., and Lees-Miller, S.P. (2004). DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair (Amst.)* 3, 889–900.
- Kurz, D.J., Hong, Y., Trivier, E., Huang, H.-L., Decary, S., Zang, G.H., Lüscher, T.F., and Erusalimsky, J.D. (2003). Fibroblast growth factor-2, but not vascular endothelial growth factor, upregulates telomerase activity in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 748–754.
- 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.
- Laberge, R.-M., Awad, P., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron* 5, 39–44.
- De Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 19, 2100–2110.
- Langley, R.E., Bump, E.A., Quartuccio, S.G., Medeiros, D., and Braunhut, S.J. (1997). Radiation-induced apoptosis in microvascular endothelial cells. *Br. J. Cancer* 75, 666–672.
- Law, M.P. (1985). Vascular permeability and late radiation fibrosis in mouse lung. *Radiat. Res.* 103, 60–76.

- Lazzerini Denchi, E., and de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 448, 1068–1071.
- Le, O.N.L., Rodier, F., Fontaine, F., Coppe, J.-P., Campisi, J., DeGregori, J., Laverdière, C., Kokta, V., Haddad, E., and Beauséjour, C.M. (2010). Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell* 9, 398–409.
- Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., and Mikkelsen, R.B. (2001). Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* 61, 3894–3901.
- Leach, J.K., Black, S.M., Schmidt-Ullrich, R.K., and Mikkelsen, R.B. (2002). Activation of constitutive nitric-oxide synthase activity is an early signaling event induced by ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 277, 15400–15406.
- 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. (2012a). 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., Rimmer, 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.
- Lee, H.-C., Yin, P.-H., Chi, C.-W., and Wei, Y.-H. (2002). Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J. Biomed. Sci.* 9, 517–526.
- Lee, J.-F., Gordon, S., Estrada, R., Wang, L., Siow, D.L., Wattenberg, B.W., Lominadze, D., and Lee, M.-J. (2009). Balance of S1P1 and S1P2 signaling regulates peripheral microvascular permeability in rat cremaster muscle vasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H33–42.
- Lee, J.U., Hosotani, R., Wada, M., Doi, R., Kosiba, T., Fujimoto, K., Miyamoto, Y., Tsuji, S., Nakajima, S., Nishimura, Y., et al. (1999a). Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells. *Eur. J. Cancer* 35, 1374–1380.
- Lee, M.J., Thangada, S., Claffey, K.P., Ancellin, N., Liu, C.H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R.I., and Hla, T. (1999b). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99, 301–312.
- Lee, P., Kim, J., Williams, R., Sandhir, R., Gregory, E., Brooks, W.M., and Berman, N.E.J. (2012b). Effects of aging on blood brain barrier and matrix metalloproteases following controlled cortical impact in mice. *Exp. Neurol.* 234, 50–61.
- Lee, S., Jeong, S.-Y., Lim, W.-C., Kim, S., Park, Y.-Y., Sun, X., Youle, R.J., and Cho, H. (2007). Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J. Biol. Chem.* 282, 22977–22983.
- Lees-Miller, S.P., Sakaguchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E., and Anderson, C.W. (1992). Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5041–5049.
- Leu, J.I.-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 443–450.
- Levy, M.Z., Allsopp, R.C., Futcher, A.B., Greider, C.W., and Harley, C.B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 225, 951–960.
- Li, H., Wang, Y., Pazhanisamy, S.K., Shao, L., Batinic-Haberle, I., Meng, A., and Zhou, D. (2011). 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, Q.Y., Pedersen, C., Day, B.J., and Patel, M. (2001). Dependence of excitotoxic neurodegeneration on mitochondrial aconitase inactivation. *J. Neurochem.* 78, 746–755.

- Li, Y.-Q., Chen, P., Haimovitz-Friedman, A., Reilly, R.M., and Wong, C.S. (2003). Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res.* *63*, 5950–5956.
- Liao, W.C., Haimovitz-Friedman, A., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Ehleiter, D., Zhang, N., Gatei, M., Lavin, M., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (1999). Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *J. Biol. Chem.* *274*, 17908–17917.
- Liu, B., and Hannun, Y.A. (1997). Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J. Biol. Chem.* *272*, 16281–16287.
- Liu, D., and Xu, Y. (2011). p53, oxidative stress, and aging. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 1669–1678.
- Liu, Obeid, and Hannun (1997). Sphingomyelinases in cell regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* *8*, 311–322.
- Liu, B., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Zhang, P., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (1998). Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor- α -induced cell death. *J. Biol. Chem.* *273*, 11313–11320.
- Liu, C., Ogando, D., and Bonanno, J.A. (2011). SOD2 contributes to anti-oxidative capacity in rabbit corneal endothelial cells. *Mol. Vis.* *17*, 2473–2481.
- Liu, L., Trimarchi, J.R., Smith, P.J.S., and Keefe, D.L. (2002). Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. *Aging Cell* *1*, 40–46.
- Lombard, D.B., Chua, K.F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., and Alt, F.W. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* *120*, 497–512.
- Van der Loo, B., Fenton, M.J., and Erusalimsky, J.D. (1998). Cytochemical detection of a senescence-associated beta-galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels. *Exp. Cell Res.* *241*, 309–315.
- López-Diazguerrero, N.E., López-Araiza, H., Conde-Perezprina, J.C., Bucio, L., Cárdenas-Aguayo, M.C., Ventura, J.L., Covarrubias, L., Gutiérrez-Ruíz, M.C., Zentella, A., and Königsberg, M. (2006). Bcl-2 protects against oxidative stress while inducing premature senescence. *Free Radic. Biol. Med.* *40*, 1161–1169.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* *153*, 1194–1217.
- Lovejoy, C.A., and Cortez, D. (2009). Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair (Amst.)* *8*, 1004–1008.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., and Housman, D.E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* *74*, 957–967.
- Lozano, J., Menendez, S., Morales, A., Ehleiter, D., Liao, W.C., Wagman, R., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2001). Cell autonomous apoptosis defects in acid sphingomyelinase knockout fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *276*, 442–448.
- Lu, H., Yuan, H., Chen, S., Huang, L., Xiang, H., Yang, G., Deng, H., and Zhou, J. (2012). Senescent endothelial dysfunction is attributed to the up-regulation of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in aged rats. *Mol. Cell. Biochem.* *363*, 217–224.
- Lucke, S., and Levkau, B. (2010). Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate. *Cell. Physiol. Biochem.* *26*, 87–96.
- Ludwig, A., Sommer, A., and Uhlig, S. (2011). Assessment of endothelial permeability and leukocyte transmigration in human endothelial cell monolayers. *Methods Mol. Biol.* *763*, 319–332.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2 α promotes cell survival under stress. *Cell* *107*, 137–148.

- Lyubimova, N., and Hopewell, J.W. (2004). Experimental evidence to support the hypothesis that damage to vascular endothelium plays the primary role in the development of late radiation-induced CNS injury. *Br J Radiol* 77, 488–492.
- Macip, S., Igarashi, M., Fang, L., Chen, A., Pan, Z.-Q., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (2002). Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* 21, 2180–2188.
- Macip, S., Igarashi, M., Berggren, P., Yu, J., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (2003). Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8576–8585.
- Madamanchi, N.R., and Runge, M.S. (2007). Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ. Res.* 100, 460–473.
- Mai, S., Klinkenberg, M., Auburger, G., Bereiter-Hahn, J., and Jendrach, M. (2010). Decreased expression of Drp1 and Fis1 mediates mitochondrial elongation in senescent cells and enhances resistance to oxidative stress through PINK1. *J. Cell. Sci.* 123, 917–926.
- Maier, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M., and Scoble, H. (2004). Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* 18, 306–319.
- Maillet, A., and Pervaiz, S. (2012). Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: a subtle balance. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1285–1294.
- Maj, J.G., Paris, F., Haimovitz-Friedman, A., Venkatraman, E., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2003). Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. *Cancer Res.* 63, 4338–4341.
- Marathe, S., Schissel, S.L., Yellin, M.J., Beatini, N., Mintzer, R., Williams, K.J., and Tabas, I. (1998). Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 4081–4088.
- Marchal, J., Pifferi, F., and Aujard, F. (2013). Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1290, 67–73.
- Martin, G.M. (2005). Genetic modulation of senescent phenotypes in *Homo sapiens*. *Cell* 120, 523–532.
- Martin, O.A., Ivashkevich, A., Choo, S., Woodbine, L., Jeggo, P.A., Martin, R.F., and Lobachevsky, P. (2013). Statistical analysis of kinetics, distribution and co-localisation of DNA repair foci in irradiated cells: Cell cycle effect and implications for prediction of radiosensitivity. *DNA Repair (Amst.)*.
- Martinet, W., Knaapen, M.W.M., De Meyer, G.R.Y., Herman, A.G., and Kockx, M.M. (2002). Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 106, 927–932.
- Mathew, B., Jacobson, J.R., Berdyshev, E., Huang, Y., Sun, X., Zhao, Y., Gerhold, L.M., Siegler, J., Evenoski, C., Wang, T., et al. (2011). Role of sphingolipids in murine radiation-induced lung injury: protection by sphingosine 1-phosphate analogs. *FASEB J.* 25, 3388–3400.
- Matissek, K.J., Mossalam, M., Okal, A., and Lim, C.S. (2013). The DNA binding domain of p53 is sufficient to trigger a potent apoptotic response at the mitochondria. *Mol. Pharm.* 10, 3592–3602.
- Medina, R.J., O'Neill, C.L., O'Doherty, T.M., Chambers, S.E.J., Guduric-Fuchs, J., Neisen, J., Waugh, D.J., Simpson, D.A., and Stitt, A.W. (2013). Ex vivo expansion of human outgrowth endothelial cells leads to IL-8-mediated replicative senescence and impaired vasoreparative function. *Stem Cells* 31, 1657–1668.
- Meissner, C. (2007). Mutations of mitochondrial DNA - cause or consequence of the ageing process? *Z Gerontol Geriatr* 40, 325–333.
- Melov, S., Schneider, J.A., Day, B.J., Hinerfeld, D., Coskun, P., Mirra, S.S., Crapo, J.D., and Wallace, D.C. (1998). A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 18, 159–163.

- 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.
- Mikkelsen, R.B., and Wardman, P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* *22*, 5734–5754.
- Milliat, F., Sabourin, J.-C., Tarlet, G., Holler, V., Deutsch, E., Buard, V., Tamarat, R., Atfi, A., Benderitter, M., and François, A. (2008). Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *Am. J. Pathol.* *172*, 691–701.
- Minamino, T., and Komuro, I. (2007). Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ. Res.* *100*, 15–26.
- Minamino, T., Mitsialis, S.A., and Kourembanas, S. (2001). Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 3336–3342.
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H., and Komuro, I. (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* *105*, 1541–1544.
- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Tateno, K., Kunieda, T., and Komuro, I. (2004). Vascular cell senescence and vascular aging. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *36*, 175–183.
- Miyashita, H., Watanabe, T., Hayashi, H., Suzuki, Y., Nakamura, T., Ito, S., Ono, M., Hoshikawa, Y., Okada, Y., Kondo, T., et al. (2012). Angiogenesis inhibitor vasohibin-1 enhances stress resistance of endothelial cells via induction of SOD2 and SIRT1. *PLoS ONE* *7*, e46459.
- 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.
- MONTGOMERY, P.O., KARNEY, D., REYNOLDS, R.C., and MCCLENDON, D. (1964). CELLULAR AND SUBCELLULAR EFFECTS OF IONIZING RADIATIONS. *Am. J. Pathol.* *44*, 727–746.
- Morita, Y., Perez, G.I., Paris, F., Miranda, S.R., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Xie, Z., Reed, J.C., Schuchman, E.H., et al. (2000). Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat. Med.* *6*, 1109–1114.
- Morieue, T., Igarashi, J., Yoneda, K., Nakai, K., Kosaka, H., and Kubota, Y. (2008). Sphingosine 1-phosphate attenuates H₂O₂-induced apoptosis in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *368*, 852–857.
- Mortuza, R., Chen, S., Feng, B., Sen, S., and Chakrabarti, S. (2013). High glucose induced alteration of SIRT6 in endothelial cells causes rapid aging in a p300 and FOXO regulated pathway. *PLoS ONE* *8*, e54514.
- Mouthon, M.-A., Vereycken-Holler, V., Van der Meeren, A., and Gaugler, M.-H. (2003). Irradiation increases the interactions of platelets with the endothelium in vivo: analysis by intravital microscopy. *Radiat. Res.* *160*, 593–599.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., and Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 6622–6626.
- Muller, M. (2009). Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 59–98.
- Murley, J.S., Kataoka, Y., Weydert, C.J., Oberley, L.W., and Grdina, D.J. (2006). Delayed radioprotection by nuclear transcription factor kappaB -mediated induction of manganese superoxide dismutase in human microvascular endothelial cells after exposure to the free radical scavenger WR1065. *Free Radic. Biol. Med.* *40*, 1004–1016.
- Nam, E.A., and Cortez, D. (2011). ATR signalling: more than meeting at the fork. *Biochem. J.* *436*, 527–536.

- Nandakumar, J., and Cech, T.R. (2013). Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 69–82.
- Narita, M. (2007). Cellular senescence and chromatin organisation. *Br. J. Cancer* *96*, 686–691.
- Narita, M., Nunez, 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.
- Nemoto, S., Fergusson, M.M., and Finkel, T. (2004). Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* *306*, 2105–2108.
- Nguyen, V., Gaber, M.W., Sontag, M.R., and Kiani, M.F. (2000). Late effects of ionizing radiation on the microvascular networks in normal tissue. *Radiat. Res.* *154*, 531–536.
- Niedernhofer, L.J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A.F., de Wit, J., Jaspers, N.G.J., Beverloo, H.B., Hoeijmakers, J.H.J., et al. (2004). The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5776–5787.
- Niemöller, O., and Belka, C. (2009). Targeting death-receptors in radiation therapy. *Results Probl Cell Differ* *49*, 219–239.
- Nishio, K., and Inoue, A. (2005). Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. *Histochem. Cell Biol.* *123*, 263–273.
- Noda, A., Hirai, Y., Hamasaki, K., Mitani, H., Nakamura, N., and Kodama, Y. (2012). Unrepairable DNA double-strand breaks that are generated by ionising radiation determine the fate of normal human cells. *J. Cell. Sci.* *125*, 5280–5287.
- Newshean, S., and Yang, E.S. (2012). The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Exp. Oncol.* *34*, 243–254.
- Nübel, T., Damrot, J., Roos, W.P., Kaina, B., and Fritz, G. (2006). Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin. Cancer Res.* *12*, 933–939.
- Obukhova, L.A., Skulachev, V.P., and Kolosova, N.G. (2009). Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 inhibits age-dependent involution of the thymus in normal and senescence-prone rats. *Aging (Albany NY)* *1*, 389–401.
- Oeseburg, H., Iusuf, D., van der Harst, P., van Gilst, W.H., Henning, R.H., and Roks, A.J.M. (2009). Bradykinin protects against oxidative stress-induced endothelial cell senescence. *Hypertension* *53*, 417–422.
- Oexle, K., and Zwirner, A. (1997). Advanced telomere shortening in respiratory chain disorders. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 905–908.
- Ogami, M., Ikura, Y., Ohsawa, M., Matsuo, T., Kayo, S., Yoshimi, N., Hai, E., Shirai, N., Ehara, S., Komatsu, R., et al. (2004). Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 546–550.
- Ogura, A., Oowada, S., Kon, Y., Hirayama, A., Yasui, H., Meike, S., Kobayashi, S., Kuwabara, M., and Inanami, O. (2009). Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Lett.* *277*, 64–71.
- Oh, C.W., Bump, E.A., Kim, J.S., Janigro, D., and Mayberg, M.R. (2001). Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation. *Radiat. Res.* *156*, 232–240.
- Ohashi, M., Runge, M.S., Faraci, F.M., and Heistad, D.D. (2006). MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 2331–2336.
- Okamoto, H., Takuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematsu, H., and Takuwa, Y. (2000). Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 9247–9261.

- Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., and Spiegel, S. (1999). Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J. Cell Biol.* *147*, 545–558.
- Onouchi, H., Ishii, T., Miyazawa, M., Uchino, Y., Yasuda, K., Hartman, P.S., Kawai, K., Tsubota, K., and Ishii, N. (2012). Mitochondrial superoxide anion overproduction in Tet-mev-1 transgenic mice accelerates age-dependent corneal cell dysfunctions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *53*, 5780–5787.
- Ota, H., Akishita, M., Eto, M., Iijima, K., Kaneki, M., and Ouchi, Y. (2007). Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *43*, 571–579.
- Ota, H., Eto, M., Kano, M.R., Ogawa, S., Iijima, K., Akishita, M., and Ouchi, Y. (2008). Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1634–1639.
- Ota, H., Eto, M., Kano, M.R., Kahyo, T., Setou, M., Ogawa, S., Iijima, K., Akishita, M., and Ouchi, Y. (2010a). Induction of endothelial nitric oxide synthase, SIRT1, and catalase by statins inhibits endothelial senescence through the Akt pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 2205–2211.
- Ota, H., Eto, M., Ogawa, S., Iijima, K., Akishita, M., and Ouchi, Y. (2010b). SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* *17*, 431–435.
- Otterson, M.F., Nie, L., Schmidt, J.L., Link, B.J., Jovanovic, N., Lyros, O., and Rafiee, P. (2012). EUK-207 protects human intestinal microvascular endothelial cells (HIMEC) against irradiation-induced apoptosis through the Bcl2 pathway. *Life Sci.* *91*, 771–782.
- Pabla, N., Huang, S., Mi, Q.-S., Daniel, R., and Dong, Z. (2008). ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *283*, 6572–6583.
- Packer, L., and Fuehr, K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* *267*, 423–425.
- Paik, J.H., Chae Ss, Lee, M.J., Thangada, S., and Hla, T. (2001). Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J. Biol. Chem.* *276*, 11830–11837.
- Palacios, J.A., Herranz, D., De Bonis, M.L., Velasco, S., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2010). SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. *J. Cell Biol.* *191*, 1299–1313.
- Pall, M.L. (2008). Post-radiation syndrome as a NO/ONOO- cycle, chronic fatigue syndrome-like disease. *Med. Hypotheses* *71*, 537–541.
- Palm, W., and de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* *42*, 301–334.
- Panganiban, R.A.M., Mungunsukh, O., and Day, R.M. (2013). X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells. *Int. J. Radiat. Biol.* *89*, 656–667.
- Pani, G., and Galeotti, T. (2011). Role of MnSOD and p66shc in mitochondrial response to p53. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 1715–1727.
- Pani, G., Bedogni, B., Anzevino, R., Colavitti, R., Palazzotti, B., Borrello, S., and Galeotti, T. (2000). Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Res.* *60*, 4654–4660.
- Panieri, E., Gogvadze, V., Norberg, E., Venkatesh, R., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2013). Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radic. Biol. Med.* *57*, 176–187.

- 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.
- Paris, F., Perez, G.I., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., Nguyen, H., Bose, M., Ilagan, A., Hunt, P.A., Morgan, W.F., Tilly, J.L., et al. (2002). Sphingosine 1-phosphate preserves fertility in irradiated female mice without propagating genomic damage in offspring. *Nat. Med.* 8, 901–902.
- 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.
- Park, M.-T., Oh, E.-T., Song, M.-J., Lee, H., and Park, H.J. (2012). Radio-sensitivities and angiogenic signaling pathways of irradiated normal endothelial cells derived from diverse human organs. *J. Radiat. Res.* 53, 570–580.
- Park, S.Y., Chang, I., Kim, J.-Y., Kang, S.W., Park, S.-H., Singh, K., and Lee, M.-S. (2004). Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 279, 7512–7520.
- Paschalaki, K.E., Starke, R.D., Hu, Y., Mercado, N., Margariti, A., Gorgoulis, V.G., Randi, A.M., and Barnes, P.J. (2013). Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and COPD patients due to increased DNA damage and senescence. *Stem Cells*.
- Passos, J.F., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (2007). DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 35, 7505–7513.
- 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, M.N. (2003). Metalloporphyrins improve the survival of Sod2-deficient neurons. *Aging Cell* 2, 219–222.
- Patel, M., and Day, B.J. (1999). Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 359–364.
- Paul, A., Belton, A., Nag, S., Martin, I., Grotewiel, M.S., and Duttaroy, A. (2007). Reduced mitochondrial SOD displays mortality characteristics reminiscent of natural aging. *Mech. Ageing Dev.* 128, 706–716.
- Pazolli, E., Alspach, E., Milczarek, A., Prior, J., Piwnica-Worms, D., and Stewart, S.A. (2012). Chromatin remodeling underlies the senescence-associated secretory phenotype of tumor stromal fibroblasts that supports cancer progression. *Cancer Res.* 72, 2251–2261.
- Pchejetski, D., Kunduzova, O., Dayon, A., Calise, D., Seguelas, M.-H., Leducq, N., Seif, I., Parini, A., and Cuvillier, O. (2007). Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ. Res.* 100, 41–49.
- Pearce, L.L., Epperly, M.W., Greenberger, J.S., Pitt, B.R., and Peterson, J. (2001). Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide* 5, 128–136.
- 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.
- Perera, M.N., Ganesan, V., Siskind, L.J., Szulc, Z.M., Bielawski, J., Bielawska, A., Bittman, R., and Colombini, M. (2012). Ceramide channels: influence of molecular structure on channel formation in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1291–1301.
- Perwez-Hussain, S., Amstad, P., He, P., Robles, A., Lupold, S., Kaneko, I., Ichimiya, M., Sengupta, S., Mechanic, L., Okamura, S., et al. (2004). p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 64, 2350–2356.

- Petrache, I., Petrusca, D.N., Bowler, R.P., and Kamocki, K. (2011). Involvement of ceramide in cell death responses in the pulmonary circulation. *Proc Am Thorac Soc* 8, 492–496.
- Pham, N.A., and Hedley, D.W. (2001). Respiratory chain-generated oxidative stress following treatment of leukemic blasts with DNA-damaging agents. *Exp. Cell Res.* 264, 345–352.
- Place, R.F., Noonan, E.J., and Giardina, C. (2005). HDACs and the senescent phenotype of WI-38 cells. *BMC Cell Biol.* 6, 37.
- Pospelova, T.V., Demidenko, Z.N., Bukreeva, E.I., Pospelov, V.A., Gudkov, A.V., and Blagosklonny, M.V. (2009). Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle* 8, 4112–4118.
- Prise, K.M., Schettino, G., Folkard, M., and Held, K.D. (2005). New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol.* 6, 520–528.
- Pritchard, D.M., Potten, C.S., Korsmeyer, S.J., Roberts, S., and Hickman, J.A. (1999). Damage-induced apoptosis in intestinal epithelia from bcl-2-null and bax-null mice: investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo. *Oncogene* 18, 7287–7293.
- Pritchard, D.M., Print, C., O'Reilly, L., Adams, J.M., Potten, C.S., and Hickman, J.A. (2000). Bcl-w is an important determinant of damage-induced apoptosis in epithelia of small and large intestine. *Oncogene* 19, 3955–3959.
- Puddu, P., Puddu, G.M., Galletti, L., Cravero, E., and Muscari, A. (2005). Mitochondrial dysfunction as an initiating event in atherogenesis: a plausible hypothesis. *Cardiology* 103, 137–141.
- Purvis, J.E., and Lahav, G. (2013). Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell* 152, 945–956.
- Purvis, J.E., Karhohs, K.W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A., and Lahav, G. (2012). p53 dynamics control cell fate. *Science* 336, 1440–1444.
- Pyne, N.J., and Pyne, S. (2010). Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 489–503.
- Quagliari, L., Piconi, L., Assaloni, R., Da Ros, R., Maier, A., Zuodar, G., and Ceriello, A. (2005). Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis* 183, 259–267.
- Rahman, I., Gilmour, P.S., Jimenez, L.A., and MacNee, W. (2002). Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol. Cell. Biochem.* 234-235, 239–248.
- Rahman, I., Marwick, J., and Kirkham, P. (2004). Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1255–1267.
- Rai, T.S., and Adams, P.D. (2012). Lessons from senescence: Chromatin maintenance in non-proliferating cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 322–331.
- Reed, A.B. (2011). The history of radiation use in medicine. *J. Vasc. Surg.* 53, 3S–5S.
- Rexhaj, E., Bloch, J., Jayet, P.-Y., Rimoldi, S.F., Dessen, P., Mathieu, C., Tolsa, J.-F., Nicod, P., Scherrer, U., and Sartori, C. (2011). Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: role of epigenetic mechanisms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H247–252.
- Richter, T., and von Zglinicki, T. (2007). A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 42, 1039–1042.
- Rincheval, V., Renaud, F., Lemaire, C., Godefroy, N., Trotot, P., Boulo, V., Mignotte, B., and Vayssière, J.-L. (2002). Bcl-2 can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G1/S transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 282–288.

- 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*, 68–81.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* *146*, 905–916.
- Rolland, S.G., and Conradt, B. (2010). New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 852–858.
- Roth, N.M., Sontag, M.R., and Kiani, M.F. (1999). Early effects of ionizing radiation on the microvascular networks in normal tissue. *Radiat. Res.* *151*, 270–277.
- 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*, 1786–1790.
- 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.
- Rotolo, J.A., Maj, J.G., Feldman, R., Ren, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Cheng, E.H.-Y., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2008). Bax and Bak do not exhibit functional redundancy in mediating radiation-induced endothelial apoptosis in the intestinal mucosa. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *70*, 804–815.
- Rousseau, M., Gaugler, M.-H., Rodallec, A., Bonnaud, S., Paris, F., and Corre, I. (2011). RhoA GTPase regulates radiation-induced alterations in endothelial cell adhesion and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *414*, 750–755.
- Salmon, A.B., Richardson, A., and Pérez, V.I. (2010). Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radic. Biol. Med.* *48*, 642–655.
- Sanchez, T., Skoura, A., Wu, M.T., Casserly, B., Harrington, E.O., and Hla, T. (2007). Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 1312–1318.
- Sanders, Y.Y., Liu, H., Zhang, X., Hecker, L., Bernard, K., Desai, L., Liu, G., and Thannickal, V.J. (2013). Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox Biol.* *1*, 8–16.
- Santana, P., Peña, L.A., Haimovitz-Friedman, A., Martin, S., Green, D., McLoughlin, M., Cordon-Cardo, C., Schuchman, E.H., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (1996). Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* *86*, 189–199.
- Saretzki, G., Murphy, M.P., and von Zglinicki, T. (2003). MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging Cell* *2*, 141–143.
- Satoh, M., Ishikawa, Y., Takahashi, Y., Itoh, T., Minami, Y., and Nakamura, M. (2008). Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* *198*, 347–353.
- SCHOLES, G., and WEISS, J. (1953). Chemical action of x-rays on nucleic acids and related substances in aqueous systems. I. Degradation of nucleic acids, purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides by x-rays and by free radicals produced chemically. *Biochem. J.* *53*, 567–578.
- Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., et al. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* *308*, 1909–1911.

- Schuler, N., and Rube, C.E. (2013). Accumulation of DNA damage-induced chromatin alterations in tissue-specific stem cells: the driving force of aging? *PLoS ONE* 8, e63932.
- Schwartz, S.M., and Benditt, E.P. (1976). Clustering of replicating cells in aortic endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 651–653.
- Sermathanasawadi, N., Ishii, H., Igarashi, K., Miura, M., Yoshida, M., Inoue, Y., and Iwai, T. (2009). Enhanced adhesion of early endothelial progenitor cells to radiation-induced senescence-like vascular endothelial cells in vitro. *J. Radiat. Res.* 50, 469–475.
- Shea, B.S., Brooks, S.F., Fontaine, B.A., Chun, J., Luster, A.D., and Tager, A.M. (2010). Prolonged exposure to sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists exacerbates vascular leak, fibrosis, and mortality after lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 43, 662–673.
- Sheard, M.A., Vojtesek, B., Janakova, L., Kovarik, J., and Zaloudik, J. (1997). Up-regulation of Fas (CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation. *Int. J. Cancer* 73, 757–762.
- Sheard, M.A., Uldrijan, S., and Vojtesek, B. (2003). Role of p53 in regulating constitutive and X-radiation-inducible CD95 expression and function in carcinoma cells. *Cancer Res.* 63, 7176–7184.
- Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., and Funk, W.D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.* 9, 939–945.
- Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 197–210.
- Shimasaki, Y., Pan, N., Messina, L.M., Li, C., Chen, K., Liu, L., Cooper, M.P., Vita, J.A., and Keaney, J.F., Jr (2013). Uncoupling protein 2 impacts endothelial phenotype via p53-mediated control of mitochondrial dynamics. *Circ. Res.* 113, 891–901.
- Sikora, E., Arendt, T., Bennett, M., and Narita, M. (2011). Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res. Rev.* 10, 146–152.
- Sinclair, D.A., and Oberdoerffer, P. (2009). The ageing epigenome: damaged beyond repair? *Ageing Res. Rev.* 8, 189–198.
- Singleton, P.A., Dudek, S.M., Chiang, E.T., and Garcia, J.G.N. (2005). Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB J.* 19, 1646–1656.
- Siskind, L.J., Kolesnick, R.N., and Colombini, M. (2006). Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 6, 118–125.
- Siskind, L.J., Feinstein, L., Yu, T., Davis, J.S., Jones, D., Choi, J., Zuckerman, J.E., Tan, W., Hill, R.B., Hardwick, J.M., et al. (2008). Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins Disassemble Ceramide Channels. *J. Biol. Chem.* 283, 6622–6630.
- 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.
- Slijepcevic, P. (2008). DNA damage response, telomere maintenance and ageing in light of the integrative model. *Mech. Ageing Dev.* 129, 11–16.
- Smith, E.L., and Schuchman, E.H. (2008). Acid sphingomyelinase overexpression enhances the antineoplastic effects of irradiation in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 16, 1565–1571.
- Somosy, Z. (2000). Radiation response of cell organelles. *Micron* 31, 165–181.
- Soutoglou, E., and Misteli, T. (2008). Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science* 320, 1507–1510.

- 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.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* *19*, 2109–2117.
- Stewart, F.A., Akleyev, A.V., Hauer-Jensen, M., Hendry, J.H., Kleiman, N.J., Macvittie, T.J., Aleman, B.M., Edgar, A.B., Mabuchi, K., et al. (2012). ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs--threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Ann ICRP* *41*, 1–322.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* *64*, 2390–2396.
- Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., and McBride, W.H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol.* *4*, 529–536.
- Le Stunff, H., Galve-Roperh, I., Peterson, C., Milstien, S., and Spiegel, S. (2002). Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis. *J. Cell Biol.* *158*, 1039–1049.
- Sulli, G., Di Micco, R., and d'Adda di Fagagna, F. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 709–720.
- Sullivan, J.M., Jeffords, L.B., Lee, C.-L., Rodrigues, R., Ma, Y., and Kirsch, D.G. (2012). p21 protects “Super p53” mice from the radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Radiat. Res.* *177*, 307–310.
- Suman, S., Rodriguez, O.C., Winters, T.A., Fornace, A.J., Jr, Albanese, C., and Datta, K. (2013). Therapeutic and space radiation exposure of mouse brain causes impaired DNA repair response and premature senescence by chronic oxidant production. *Aging (Albany NY)* *5*, 607–622.
- Sun, X., Shikata, Y., Wang, L., Ohmori, K., Watanabe, N., Wada, J., Shikata, K., Birukov, K.G., Makino, H., Jacobson, J.R., et al. (2009). Enhanced interaction between focal adhesion and adherens junction proteins: involvement in sphingosine 1-phosphate-induced endothelial barrier enhancement. *Microvasc. Res.* *77*, 304–313.
- Sundar, I.K., Yao, H., and Rahman, I. (2013). Oxidative stress and chromatin remodeling in chronic obstructive pulmonary disease and smoking-related diseases. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 1956–1971.
- Sundararaj, K.P., Wood, R.E., Ponnusamy, S., Salas, A.M., Szulc, Z., Bielawska, A., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., and Ogretmen, B. (2004). Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* *279*, 6152–6162.
- Suzuki, M., Suzuki, K., Kodama, S., and Watanabe, M. (2006a). Interstitial chromatin alteration causes persistent p53 activation involved in the radiation-induced senescence-like growth arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *340*, 145–150.
- Suzuki, M., Suzuki, K., Kodama, S., and Watanabe, M. (2006b). Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation. *Radiat. Res.* *165*, 269–276.
- Taha, T.A., Osta, W., Kozhaya, L., Bielawski, J., Johnson, K.R., Gillanders, W.E., Dbaibo, G.S., Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2004). Down-regulation of sphingosine kinase-1 by DNA damage: dependence on proteases and p53. *J. Biol. Chem.* *279*, 20546–20554.
- Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* *13*, 1549–1556.

- Tan, M., Li, S., Swaroop, M., Guan, K., Oberley, L.W., and Sun, Y. (1999). Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J. Biol. Chem.* *274*, 12061–12066.
- Taneja, N., Tjalkens, R., Philbert, M.A., and Rehemtulla, A. (2001). Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene* *20*, 167–177.
- Tang, Y., Xu, J., Qu, W., Peng, X., Xin, P., Yang, X., Ying, C., Sun, X., and Hao, L. (2012). Resveratrol reduces vascular cell senescence through attenuation of oxidative stress by SIRT1/NADPH oxidase-dependent mechanisms. *J. Nutr. Biochem.* *23*, 1410–1416.
- Tavana, O., Benjamin, C.L., Puebla-Osorio, N., Sang, M., Ullrich, S.E., Ananthaswamy, H.N., and Zhu, C. (2010). Absence of p53-dependent apoptosis leads to UV radiation hypersensitivity, enhanced immunosuppression and cellular senescence. *Cell Cycle* *9*, 3328–3336.
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., and Abraham, R.T. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* *13*, 152–157.
- Trifunovic, A., and Larsson, N.-G. (2008). Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J. Intern. Med.* *263*, 167–178.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* *429*, 417–423.
- Tsurumi, A., and Li, W.X. (2012). Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics* *7*, 680–688.
- Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., et al. (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* *415*, 45–53.
- Uematsu, N., Weterings, E., Yano, K., Morotomi-Yano, K., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., Mari, P.-O., van Gent, D.C., Chen, B.P.C., and Chen, D.J. (2007). Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* *177*, 219–229.
- Ungvari, Z., Labinsky, 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*, H2121–2128.
- Ungvari, Z., Podlutzky, A., Sosnowska, D., Tucsek, Z., Toth, P., Deak, F., Gautam, T., Csiszar, A., and Sonntag, W.E. (2013). Ionizing Radiation Promotes the Acquisition of a Senescence-Associated Secretory Phenotype and Impairs Angiogenic Capacity in Cerebromicrovascular Endothelial Cells: Role of Increased DNA Damage and Decreased DNA Repair Capacity in Microvascular Radiosensitivity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*
- Uraoka, M., Ikeda, K., Kurimoto-Nakano, R., Nakagawa, Y., Koide, M., Akakabe, Y., Kitamura, Y., Ueyama, T., Matoba, S., Yamada, H., et al. (2011). Loss of bcl-2 during the senescence exacerbates the impaired angiogenic functions in endothelial cells by deteriorating the mitochondrial redox state. *Hypertension* *58*, 254–263.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y. (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* *22*, 5612–5621.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., and Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* *15*, 1153–1162.
- Van Brocklyn, J.R., and Williams, J.B. (2012). The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* *163*, 26–36.

- Van Brocklyn, J.R., Young, N., and Roof, R. (2003). Sphingosine-1-phosphate stimulates motility and invasiveness of human glioblastoma multiforme cells. *Cancer Lett.* *199*, 53–60.
- Van der Meeren, A., Bertho, J.M., Vandamme, M., and Gaugler, M.H. (1997). Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediators Inflamm.* *6*, 185–193.
- Van Der Meeren, A., Squiban, C., Gourmelon, P., Lafont, H., and Gaugler, M.H. (1999). Differential regulation by IL-4 and IL-10 of radiation-induced IL-6 and IL-8 production and ICAM-1 expression by human endothelial cells. *Cytokine* *11*, 831–838.
- Velarde, M.C., Flynn, J.M., Day, N.U., Melov, S., and Campisi, J. (2012). Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany NY)* *4*, 3–12.
- Venable, M.E., and Yin, X. (2009). Ceramide induces endothelial cell senescence. *Cell Biochem. Funct.* *27*, 547–551.
- 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.
- Venable, M.E., Webb-Froehlich, L.M., Sloan, E.F., and Thomley, J.E. (2006). Shift in sphingolipid metabolism leads to an accumulation of ceramide in senescence. *Mech. Ageing Dev.* *127*, 473–480.
- Venkatesh, D., Fredette, N., Rostama, B., Tang, Y., Vary, C.P.H., Liaw, L., and Urs, S. (2011). RhoA-mediated signaling in Notch-induced senescence-like growth arrest and endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 876–882.
- Verheij, M., van Blitterswijk, W.J., and Bartelink, H. (1998). Radiation-induced apoptosis--the ceramide-SAPK signaling pathway and clinical aspects. *Acta Oncol* *37*, 575–581.
- Vit, J.-P., and Rosselli, F. (2003). Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* *22*, 8645–8652.
- Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Nguyen, A., Villeneuve, L., Mamarbachi, A.M., Fortier, A., Perrault, L.P., Carrier, M., and Thorin, E. (2007). Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech. Ageing Dev.* *128*, 662–671.
- Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Mamarbachi, A.M., Villeneuve, L., Fortier, A., Perrault, L.P., Carrier, M., and Thorin, E. (2008). Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech. Ageing Dev.* *129*, 261–270.
- Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Mamarbachi, A.M., Villeneuve, L., Mallette, F.A., Ferbeyre, G., Farhat, N., Perrault, L.P., Carrier, M., and Thorin, E. (2010). Endogenous oxidative stress prevents telomerase-dependent immortalization of human endothelial cells. *Mech. Ageing Dev.* *131*, 354–363.
- Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., and Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* *220*, 186–193.
- Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., and Jackson, S.P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.* *126*, 111–117.
- Vorotnikova, E., Rosenthal, R.A., Tries, M., Doctrow, S.R., and Braunhut, S.J. (2010). Novel synthetic SOD/catalase mimetics can mitigate capillary endothelial cell apoptosis caused by ionizing radiation. *Radiat. Res.* *173*, 748–759.
- Wang, C., and Lees-Miller, S.P. (2013). Detection and repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks: new developments in nonhomologous end joining. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *86*, 440–449.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* *8*, 311–323.

- 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., Zheng, H., Ou, X., Albertson, C.M., Fink, L.M., Herbert, J.-M., and Hauer-Jensen, M. (2004). Hirudin ameliorates intestinal radiation toxicity in the rat: support for thrombin inhibition as strategy to minimize side-effects after radiation therapy and as countermeasure against radiation exposure. *J. Thromb. Haemost.* *2*, 2027–2035.
- Wang, J., Boerma, M., Fu, Q., and Hauer-Jensen, M. (2007). Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World J. Gastroenterol.* *13*, 3047–3055.
- Wang, Y., Liu, L., Pazhanisamy, S.K., Li, H., Meng, A., and Zhou, D. (2010). Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. *Free Radic. Biol. Med.* *48*, 348–356.
- Waselenko, J.K., MacVittie, T.J., Blakely, W.F., Pesik, N., Wiley, A.L., Dickerson, W.E., Tsu, H., Confer, D.L., Coleman, C.N., Seed, T., et al. (2004). Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Ann. Intern. Med.* *140*, 1037–1051.
- Waters, C.M., Taylor, J.M., Molteni, A., and Ward, W.F. (1996). Dose-response effects of radiation on the permeability of endothelial cells in culture. *Radiat. Res.* *146*, 321–328.
- Webster, A.L.H., Yan, M.S.-C., and Marsden, P.A. (2013). Epigenetics and cardiovascular disease. *Can J Cardiol* *29*, 46–57.
- Wenzel, P., Schuhmacher, S., Kienhöfer, J., Müller, J., Hortmann, M., Oelze, M., Schulz, E., Treiber, N., Kawamoto, T., Scharffetter-Kochanek, K., et al. (2008). Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc. Res.* *80*, 280–289.
- Wright, S.C., Zheng, H., and Zhong, J. (1996). Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of sphingomyelinase and the 24 kDa apoptotic protease (AP24). *FASEB J.* *10*, 325–332.
- Xin, M.-G., Zhang, J., Block, E.R., and Patel, J.M. (2003). Senescence-enhanced oxidative stress is associated with deficiency of mitochondrial cytochrome c oxidase in vascular endothelial cells. *Mech. Ageing Dev.* *124*, 911–919.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovskiy, 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.
- Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., and Inanami, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 260–270.
- Yang, J., Chang, E., Cherry, A.M., Bangs, C.D., Oei, Y., Bodnar, A., Bronstein, A., Chiu, C.P., and Herron, G.S. (1999). Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J. Biol. Chem.* *274*, 26141–26148.
- Yarnold, J., and Brotons, M.-C.V. (2010). Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol* *97*, 149–161.
- Yen, W.-L., and Klionsky, D.J. (2008). How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology (Bethesda)* *23*, 248–262.
- Yip, K.W., and Reed, J.C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* *27*, 6398–6406.
- Yoon, Y.-S., Yoon, D.-S., Lim, I.K., Yoon, S.-H., Chung, H.-Y., Rojo, M., Malka, F., Jou, M.-J., Martinou, J.-C., and Yoon, G. (2006). Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *J. Cell. Physiol.* *209*, 468–480.

- Young, E.F., and Smilenov, L.B. (2011). Impedance-based surveillance of transient permeability changes in coronary endothelial monolayers after exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 176, 415–424.
- Yuan, H., Goetz, D.J., Gaber, M.W., Issekutz, A.C., Merchant, T.E., and Kiani, M.F. (2005). Radiation-induced up-regulation of adhesion molecules in brain microvasculature and their modulation by dexamethasone. *Radiat. Res.* 163, 544–551.
- Yuan, Y., Lee, S.H., and Wu, S. (2013). The role of ROS in ionizing radiation-induced VLA-4 mediated adhesion of RAW264.7 cells to VCAM-1 under flow conditions. *Radiat. Res.* 179, 62–68.
- Yudoh, K., Nguyen, van T., Nakamura, H., Hongo-Masuko, K., Kato, T., and Nishioka, K. (2005). Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res. Ther.* 7, R380–391.
- 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., Zhai, Z., Wang, Y., Zhang, J., Wu, H., Wang, Y., Li, C., Li, D., Lu, L., Wang, X., et al. (2013). Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice. *Free Radic. Biol. Med.* 54, 40–50.
- Zhang, Q.-J., Wang, Z., Chen, H.-Z., Zhou, S., Zheng, W., Liu, G., Wei, Y.-S., Cai, H., Liu, D.-P., and Liang, C.-C. (2008). Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc. Res.* 80, 191–199.
- Zhang, W., Ji, W., Yang, L., Xu, Y., Yang, J., and Zhuang, Z. (2010). Epigenetic enhancement of p66Shc during cellular replicative or premature senescence. *Toxicology* 278, 189–194.
- Zhang, Y., Zhang, X., Rabbani, Z.N., Jackson, I.L., and Vujaskovic, Z. (2012). Oxidative stress mediates radiation lung injury by inducing apoptosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 83, 740–748.
- Zhao, W., Diz, D.I., and Robbins, M.E. (2007). Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. *Br J Radiol* 80 *Spec No 1*, S23–31.
- Zhou, L., Yuan, R., and Sergio, L. (2003). Molecular mechanisms of irradiation-induced apoptosis. *Front. Biosci.* 8, d9–19.
- Zigdon, H., Kogot-Levin, A., Park, J.-W., Goldschmidt, R., Kelly, S., Merrill, A.H., Jr, Scherz, A., Pewzner-Jung, Y., Saada, A., and Futerman, A.H. (2013). Ablation of ceramide synthase 2 causes chronic oxidative stress due to disruption of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 288, 4947–4956.
- Zimmermann, A.K., Loucks, F.A., Schroeder, E.K., Bouchard, R.J., Tyler, K.L., and Linseman, D.A. (2007). Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. *J. Biol. Chem.* 282, 29296–29304.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542–1548.
- Zundel, W., and Giaccia, A. (1998). Inhibition of the anti-apoptotic PI(3)K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes Dev.* 12, 1941–1946.

ANNEXES

Annexe n°1 : Abstract communication orale pour le « *Biology of Ionizing Radiation, Workshop* », Berder, France, 2010.

Mechanisms of Radio-Induced Endothelial Cell Senescence.

A. Lafargue, S. Supiot, MH. Gaugler, F. Paris – *INSERM U892, CRCNA, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44000, Nantes, France.*

Dysfunctions of the endothelium are clearly involved in early and late pathologies induced by radiotherapy [1]. Senescence, one of the alternative becoming of cells after radiation, is defined by cell cycle blockage and also by an increase of metabolic activity. Senescence presents therapeutic benefits by lowering the tumor progression and drawbacks by inducing vascular dysfunctions. Molecular pathways inducing radiation-induced senescence remain unclear, but may involve the generation of reactive oxygen species and the induction of DNA damage.

Previously, our team describes a differential endothelial death response in function of the dividing cell status. Proliferating cells died after exposure to ionizing radiation through either a Ceramide generation-induced premitotic apoptotic or a DNA damage-induced mitotic death. Non-dividing cells keep the ability to die by the ceramide-induced apoptosis, but not mitotic death. In fact, sphingosine-1-Phosphate, inhibitor of ceramide-dependent signaling pathway, blocks death of quiescent, but not proliferating endothelial cells [2]. However, consequences of DNA damage and their potential roles remain to be clarified.

In consequence, our hypothesis is that remaining DNA-damage provokes radio-induced senescence on quiescent endothelial cells, which comprise the vascular functions in healthy tissues. This hypothesis will be verified by underlining X-rays-induced senescence *in vitro* (HUVEC & HMVEC-L) and *in vivo* (mouse & patient) on quiescent endothelial cells using Senescence-associated β -Galactosidase staining. Next, involvement of ceramide and DNA-repair pathways in senescence progression will be explored.

REFERENCES

[1] Milliat F, et al. Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages. *Ann Cardiol Angeiol.* 2008 ; 57 : 139-148.

[2] Bonnaud S, et al. Sphingosine-1-Phosphate Protects Proliferating Endothelial Cells from Ceramide-Induced Apoptosis but not from DNA Damage-Induced Mitotic Death. *Cancer Res.* 2007 ; 67: (4) : 1803-1811.

Annexe n°2 : Abstract communication par affiche pour « *La Journée annuelle de l'Ecole Doctorale Biologie-Santé de Nantes-Angers* », Angers, France, 2012.

Étude mécanistique & fonctionnelle de la sénescence radioinduite des cellules endothéliales microvasculaires, impact de la Sphingosine-1-Phosphate.

A. Lafargue*, MH. Gaugler, F. Paris – Université de Nantes ; INSERM U892, CRCNA. IRT1, Équipe « Radiobiologie & Ciblage de l'endothélium », Nantes, France.

Bien que les dysfonctions endothéliales soient clairement associées à la toxicité radioinduite, l'implication de la sénescence endothéliale, caractérisée par une morphologie élargie et par un phénotype sécrétoire, reste mal définie. Mon projet consiste à définir la sénescence endothéliale microvasculaire radioinduite, décrypter ses mécanismes moléculaires, et déterminer l'impact fonctionnel. Ainsi, notre modèle *in vitro* présente une sénescence dépendante de la dose d'irradiation et du temps, associée à un phénotype inflammatoire, une dysfonction des jonctions cellulaires, et une augmentation de la perméabilité cellulaire. Ces caractéristiques peuvent expliquer l'apparition d'effets secondaires radioinduits tardifs. De plus, nous montrons de façon originale l'implication de voies moléculaires liées au stress oxydant, à la signalisation mitochondriale, ainsi qu'une indépendance des voies de réponses aux dommages de l'ADN. L'implication directe de ces facteurs dans la sénescence sera confirmée prochainement à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques et d'une approche par *shRNA*. Enfin, ces résultats seront validés *in vivo* sur un modèle d'effet secondaire radioinduit tardif : la fibrose intestinale radioinduite. Par ailleurs, nos résultats montrent que le traitement par Sphingosine-1-Phosphate, (qui inhibe l'apoptose endothéliale radioinduite dépendante de la voie du Céramide, et permet ainsi de freiner la radiotoxicité aigue), n'a pas d'avantage d'impact sur l'apparition de la sénescence, ni sur l'activation, ni sur l'ensemble des facteurs moléculaires étudiés. Ainsi, l'utilisation de la S1P en combinaison avec un inhibiteur de la sénescence endothéliale pourrait potentiellement permettre de freiner la radiotoxicité aigue ainsi que la radiotoxicité tardive.

Annexe n°3 : Abstract communication orale pour « *La journée mondiale contre le cancer* », pour *La Ligue Contre le Cancer, Nantes, France, 2013.*

Vulgarisation scientifique pour le grand public, participation au dossier de presse.

Thématique de Recherche de l'équipe « Radiobiologie & Ciblage de l'endothélium »

Aujourd'hui, la radiothérapie est un traitement anti-cancéreux de référence, utilisant les rayonnements ionisants pour détruire les cellules tumorales. Si l'efficacité de cette approche n'est plus à démontrer, elle présente néanmoins des limites liées aux effets toxiques qu'elle provoque sur les tissus non-cancéreux. Augmenter le bénéfice anti-tumoral de la radiothérapie en limitant au maximum la toxicité sur les organes sains est le challenge de la recherche menée au sein de l'Equipe « Radiobiologie & Ciblage de l'endothélium ». Nous nous intéressons particulièrement aux cellules endothéliales, constituant majeur de la paroi interne des vaisseaux sanguins, et dont la participation à la réponse aux radiations des tissus tumoraux mais aussi des tissus sains est désormais connue. Notre équipe regroupe des chercheurs en radiobiologie fondamentale et en ingénierie des anticorps, des physiciens médicaux et des médecins radiothérapeutes qui travaillent à décrypter précisément le rôle des cellules endothéliales lors de la radiothérapie. A terme, nous espérons pouvoir offrir aux patients de nouveaux protocoles de radiothérapie associés à des molécules pharmacologiques ciblant les cellules endothéliales et améliorant à la fois l'éradication tumorale et la protection des tissus sains. Ce projet, développé dans le Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers Inserm UMR892, est effectué en partenariat avec l'Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO René Gauducheau).

Projet de thèse d'Audrey Lafargue.

« Étude mécanistique & fonctionnelle de la sénescence radioinduite des cellules endothéliales microvasculaires, Impact de la Sphingosine-1-Phosphate »

Les effets secondaires tardifs de la radiothérapie sur les tissus sains sont caractérisés par des lésions tissulaires établies plusieurs mois/années après traitement. Ils surviennent chez un nombre considérable (5 à 10%) de patients traités par radiothérapie et sont difficilement prévisibles. Dans le meilleur des cas, ils conduisent à une altération de la qualité de vie, au pire, le pronostic vital peut être engagé. Comprendre les mécanismes d'apparition de ces effets secondaires tardifs sur les tissus normaux afin de pouvoir les limiter permettrait

d'améliorer les protocoles de radiothérapie. La sénescence est un état cellulaire particulier connu pour être induit par les radiations, et est caractérisé par une incapacité de multiplication, une morphologie cellulaire élargie, et une production de molécules inflammatoires. Notre hypothèse de travail est que la sénescence des cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins présents dans les tissus sains, joue un rôle important dans l'apparition des effets secondaires tardifs après radiothérapie. Nous avons développé au laboratoire un modèle de sénescence *in vitro* des cellules endothéliales après irradiation aux rayons X. Nous avons alors montré que les radiations induisent une sénescence endothéliale, accompagnée d'une perturbation des fonctions endothéliales pouvant être à l'origine de l'apparition d'effets secondaires tardifs. Nous cherchons désormais à comprendre le mécanisme moléculaire impliqué dans l'apparition de la sénescence endothéliale. Nos résultats mettent à jour un mécanisme moléculaire original, actuellement en cours de validation, qui pourrait devenir la cible de molécules thérapeutiques à visée « anti-sénescence », afin de bloquer l'apparition d'effets secondaires tardifs des traitements de radiothérapie.

Annexe n°4 : Abstract communication par affiche pour le « 40th annual meeting of the European Radiation Research Society », Dublin, Irlande, 2013.

IRRADIATION-INDUCED MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELL SENEESCENCE IS UNDER THE CONTROL OF P53 AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION

A. Lafargue¹, MH. Gaugler¹, C. Pecqueur¹, F. Paris¹

*¹Université de Nantes, INSERM U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Recherche en Santé 1, 8 quai Moncoussu, 44007, Nantes, France.
audrey.lafargue@inserm.fr*

Early and late toxicities of irradiated peritumoral normal tissues limit the enhancement of the dose of radiotherapy. Radiation-induced acute small intestine necrosis involves a rapid endothelial cell apoptosis before epithelial cell death (Paris *et al*, 2001). Endothelial cell death is under control of the proapoptotic sphingolipid factor ceramide and its prosurvival metabolite S1P (Bonnaud *et al*, 2007). In fact, S1P treatment blocks intestinal necrosis through the inhibition of quiescent microvascular endothelial cell death, despite the persistence of some DNA double-strand breaks few days after irradiation (Bonnaud *et al*, 2010). The persistence of DNA damage sensor ATM and its effectors in irradiated proliferating fibroblasts is proposed to regulate cell senescence (Rodier *et al*, 2009, 2011), biological process appearing during late radiation-induced tissue dysfunction (Wang *et al*, 2006).

Most of the studies on senescence are reported on proliferating cells, whereas endothelial cells are not dividing in most of normal tissues. Our objective was to investigate radiation-induced endothelial cell senescence and long-term effects of radioprotector S1P.

Our results show that senescence demonstrated by SA- β -Galactosidase and p21 expressions of quiescent primary human microvascular HMVEC-L endothelial cells occurs in radiation dose and time dependant manner. Senescence is associated with high secretion of IL-8, characteristic of an inflammatory phenotype, and dysfunction of the endothelial monolayer permeability. S1P radioprotector treatment inducing DNA damage persistence does not interfere on the genesis of endothelial cell senescence and its related dysfunctions. The non involvement of DNA damage in senescence was confirmed by lack of late activation of DNA damage effectors and absence of senescence modulation by ATM inhibitor. Molecular pathway driving radiation-induced senescence was deciphered by western blot showing a p53 over-expression, and a modulation of Bcl2 family members including Bcl2,

Bcl-xL and Bax, in relationship with mitochondrial dysfunctions and superoxide anion release. MnTBAP, a SOD2 mimetic, N-acetylcystein, a reactive oxygen species scavenger, or pifithrin- α , a p53 inhibitor, prevents radiation-induced senescence. Better characterization and ordering of the molecular cascade will permit the development of new strategies to limit endothelial senescence and late tissue toxicity.

Annexe n°5 : Article en collaboration, *Oliver Lisa et al, 2012.*

Réponse liée à la différenciation des cellules souches mésenchymales humaines suite aux cassures de l'ADN

Differentiation Related Response to DNA Breaks in Human Mesenchymal Stem Cells

Lisa Oliver^{1,2,3}, Erika Hue^{1,2}, Quentin Séry^{1,2,4}, Audrey Lafargue^{1,2}, Claire Pecqueur^{1,2}, François Paris^{1,2,4} & François M. Vallette^{1,2,4}.

¹CRCNA - INSERM UMR 892 - CNRS UMR 6299, Nantes F44007 France; ²Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes F44007 France; ³Centre Hospitalier-Universitaire (CHU) de Nantes, Nantes F44007 France; ⁴Institut de Cancérologie de l'Ouest – René Gauducheau, St Herblain

Mots-clés : Irradiation ; Réparation de l'ADN ; γ H2AX ; cellules souches mésenchymales.

La différenciation des cellules souches mésenchymales humaines *in vitro* est accompagnée par une augmentation de la sensibilité à l'apoptose. Cependant, le mécanisme responsable de ce changement est inconnu. Cet article montre que la réparation des cassures double-brin de l'ADN est plus rapide dans les cellules souches mésenchymales indifférenciées que dans les ostéoblastes différenciés ; ceci étant mesuré par le décroissement du nombre de foyers γ H2AX nucléaires après induction de dommages de l'ADN par irradiation. De plus, ces cellules présentent une augmentation marquée et prolongée de l'expression nucléaire de Ku70 et de la phosphorylation de DNA-PKcs. Egalement, les cellules présentent une augmentation de la phosphorylation d'ATM. Ceci suggère donc que la réparation des dommages de l'ADN après irradiation dans les cellules souches mésenchymales humaines passe par une jonction des extrémités non-homologue (NHEJ). Cependant, lorsque les cellules souches mésenchymales humaines sont induites à différenciées suivant une voie ostéogénique ou adipogénique, l'irradiation cause une mort cellulaire rapide et importante, principalement apoptotique. Ceci est en contraste avec les cellules souches mésenchymales humaines indifférenciées qui sont hautement résistantes aux dommages de l'ADN induits par irradiation et/ou au Témzolomide. De plus, ces dernières survivent à 95%. Ces travaux suggèrent que l'apoptose et la réparation des dommages de l'ADN sont des mécanismes majeurs de protection dans le contrôle de la différenciation des cellules souches mésenchymales humaines après dommages de l'ADN.

STEM CELLS®

TISSUE-SPECIFIC STEM CELLS

Differentiation Related Response to DNA Breaks in Human Mesenchymal Stem Cells

Lisa Oliver^{1,2,3}, Erika Hue^{1,2}, Quentin Séry^{1,2,4}, Audrey Lafargue^{1,2}, Claire Pecqueur^{1,2}, François Paris^{1,2,4} & François M. Vallette^{1,2,4}.

¹CRCNA - INSERM UMR 892 - CNRS UMR 6299, Nantes F44007 France; ²Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes F44007 France; ³Centre Hospitalier-Universitaire (CHU) de Nantes, Nantes F44007 France; ⁴Institut de Cancérologie de l'Ouest - René Gauducheau, St Herblain

Key words. irradiation • DNA repair • ©-H2AX • Mesenchymal stem cells

Abbreviations: DNA damage repair: DDR; DNA double strand breaks: DSBs; Hematopoietic stem cells: HSCs; histone 2A: H2AX; Homologous recombination: HR; Human mesenchymal stem cells: hMSCs; Non-homologous end joining: NHEJ; single strand DNA: ssDNA; Temozolomide: TMZ.

ABSTRACT

We have recently shown that the *in vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) was accompanied by an increased sensitivity toward apoptosis; however, the mechanism responsible for this shift is not known. Here, we show that the repair of DNA double-strand breaks (DSBs) was more rapid in undifferentiated hMSCs than in differentiated osteoblasts by quantification of the disappearance γ -H2AX foci in the nuclei after γ -irradiation-induced DNA damage. In addition, there was a marked and prolonged increase in the level of nuclear Ku70 and an increased phosphorylation of DNA-PKcs. This was accompanied by an augmentation in the

phosphorylation of ATM in hMSCs post-irradiation suggesting the NHEJ repair mechanism. However, when hMSCs were induced to differentiate along the osteogenic or adipogenic pathways; irradiation of these cells caused an expeditious and robust cell death, which was primarily apoptotic. This was in sharp contrast to undifferentiated hMSCs, which were highly resistant to irradiation and/or temozolomide-induced DSBs. In addition, we observed a 95% recovery from DSB in these cells. Our results suggest that apoptosis and DNA repair are major safeguard mechanisms in the control of hMSCs differentiation after DNA damage.

INTRODUCTION

DNA repair is essential for cell survival and function [1]. Recent studies have indicated that stem cells respond to DNA damage by increasing DNA repair activity [2]. This property might favor long-term survival but also results in an accumulation of mutations in stem cells and as such might promote

tumorigenesis [3]. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs) are long-lived cells that can differentiate into mesenchymal cells (e.g. adipocytes, chondrocytes, osteoblasts and hepatocytes) as well as transdifferentiate *in vitro* into other cell types such as neural cells [4]. Recently hMSCs have received much attention because of their potential use as therapeutic agents for either

Author contributions: L.O: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation and writing. E.H, Q.S, A.L, C.P: collection and assembly of data; F.P: data analysis and interpretation; F.V: conception and design, data analysis and interpretation and writing

Corresponding author: Dr François M. Vallette, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes Angers, INSERM UMR 892 CNRS UMR 6299 Université de Nantes, 8, Quai Moncoussu BP 70721, 44007 CEDEX 1 Nantes France Tel: 33-228080324; Fax: 33-228080329-mail: francois.vallette@inserm.fr; Received June 07, 2012; accepted for publication November 25, 2012; available online without subscription through the open access option. 1066-5099/2013/\$30.00/0 doi: 10.1002/stem.1336

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/stem.1336

regeneration of wound tissue or targeting diseases such as cancer [5]. Human MSCs constitute a niche in the stromal compartment of the bone marrow where these cells play an essential role in the control of the function of the hematopoietic stem cells (HSCs) [6]. It has been suggested that hMSCs could also participate to the tumoral microenvironment in several types of cancers [5,6].

Most cancer patients receive irradiation and chemotherapy as standard treatments in order to eliminate dividing malignant cells through DNA damage. However, these treatments also affect normal tissue, in particular the bone marrow, inducing severe side effects following irradiation [7]. It is not well understood how hMSCs in either the bone marrow or the microenvironment of a tumor, will be affected by cancer therapies [8]. Contradictory results have been published on the survival of hMSCs after irradiation or chemotherapy but it is usually assumed that hMSCs are resistant to γ -irradiation even at high doses [9,10]. In fact studies have shown that hMSCs from patients, exposed to whole body irradiation followed by allogenic bone marrow transplantation, expressed a complete host profile suggesting that the hMSCs in their niches were most probably radio-resistant [11,12]. In addition, it has been postulated that hMSCs could protect the patient against irradiation-induced hematopoietic failure [13]. A better understanding of the response of hMSCs to DNA damage could provide new insights into the effects of cancer treatments, as well as into the development of treatment-associated side effects. This question is also important in the understanding of how the DNA damage, which accumulates with age leading to either cell death or, gene silencing that could affect the capacity of hMSCs to regenerate tissues after injury [14]. Indeed, unrepaired DNA double-stranded breaks (DSBs) result in toxic lesions, chromosomal aberrations and genomic instability that could give rise to cancers [15]. We have recently shown that hMSCs are resistant to apoptosis when undifferentiated and became sensitive to cell death during the early steps of differentiation [16]. This could be related to the fact that caspases are implicated both in apoptosis and in cell

differentiation [17]. Understanding the conditions, under which hMSCs acquire a sensitivity toward cell death is also crucial, both in the development of hMSCs as a therapeutic tool and in the advancement of our understanding of the role of tumor stroma during cancer progression [18].

In the present study, we have investigated the induced DNA damage response (DDR) in hMSCs to ionizing irradiation at a dose used in the treatment of gliomas. Cell death, proliferation and differentiation were analyzed either in undifferentiated hMSCs or during osteogenic differentiation of these cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Unless stated otherwise, all cell culture material was obtained from Gibco (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) and chemicals were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The bone marrow samples used in this study were obtained from healthy donors operated at the Department of Orthopedics at "Centre Hospitalier Universitaire de Nantes". The average age of patients was 41 ± 3 yrs (ranging from 25 to 56 yrs; 6 males and 8 females). All human samples were obtained according to the recommendations of the French national ethics committee.

Methods

Human MSC isolation and cell culture. The bone marrow cells were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll). The cells collected at the interface were cultured in alpha-MEM containing with ribonucleosides and deoxyribonucleosides supplemented with 20% fetal calf serum, with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (complete hMSC medium) in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity. Human MSC cultures were used between passage 2 and 10 passage. Cultures were kept at subconfluent levels (about 75% confluency) and passaged every 5-7 days. The glioblastoma U251 cell line was cultured in DMEM (4.5 g/L glucose) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin in an atmosphere of 5%

CO₂ and 95% humidity. γ -irradiation was carried out in a Faxitron CP160 irradiator (Faxitron X-ray Corporation) at a dose rate of 1.48 Gy/min. Human fibroblasts were obtained and cultured as described early [16, 19]. Cells were cultured under hypoxia (1% O₂, 5% CO₂ and 37°C) using a Sci-tive Hypoxia Workstation (Awel International, Blain, France).

Differentiation of hMSCs. Human MSCs differentiation into osteoblasts was induced *in vitro* by culturing the cells in NH OsteoDiff medium (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) for 21 days. Osteogenic differentiation was detected by staining with alizarin red, which binds to mineralized bone. For adipogenic differentiation the cells were cultured for three weeks in hMSC Adipogenic Bullet kit (Lonza, Slough, UK). Adipogenic differentiation was detected by staining the cells with Red Oil O.

Western blotting. Total proteins were extracted in 1% NP-40, 0.5% sodium-deoxycholate, 0.1% SDS supplemented with protease inhibitor cocktail from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). The protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Protein extracts were separated on SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane (Millipore, St. Quentin-Yvelines, France) and revealed by Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore). Primary antibodies were used at 1/1000 dilution: mouse monoclonal anti-actin (clone C4, MAB1501, Millipore), mouse monoclonal anti-phospho-ATM^{Ser1981} (DR1002, Millipore), rabbit polyclonal anti-phospho-DNA-PKcs^{Ser2066} (ab18192 Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-Ku70 (MS-329-P1, Thermo Scientific, France) and mouse monoclonal anti-Ku80 (MS-285-P1, Thermo Scientific). HRP-conjugated secondary antibodies were from Bio-Rad. Quantification was performed with the software ImageJ.

Immunocytochemistry. Cells were grown on gelatin-coated glass cover slips. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilized with 0.1% SDS for 10 min,

blocked with 3% BSA for 20 min, and then incubated with primary antibodies for 1 h followed by secondary Alexa antibodies (Molecular Probes-Life Technologies) for 1 h. Cells were finally mounted with Mowiol polymerizing solution, and observed under a confocal microscope (Leica TCS-SP1). Primary mouse monoclonal anti-H2AX^{Ser139} was obtained from Millipore (05-636). The number of γ -H2AX foci was determined using ImageJ and the 3D object counter plugin. Briefly, the acquisition of images was done using a z-stack of 0.25 μ m per image. The stack was opened and threshold determined so that each foci was equal to or more than 15x15 pixels (1 μ m²).

Senescence. Senescence was assessed by x-gal staining using the Senescence Cell histochemical staining kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

FACSscan Analysis. The phenotype of hMSCs was monitored by flow cytometry. For phenotypic analysis, conjugated and non-conjugated antibodies were used (cf. **Table S1**). For non-conjugated antibodies, the corresponding secondary antibody was used. Briefly, 2x10⁵ cells were resuspended in complete medium for 30 min at 4°C. For intracellular staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized in PBS containing 0.5% saponin. The cells were incubated with the primary antibody for 30 min at 4°C in PBS, 0.25% saponin and then, where necessary, the secondary antibody was added for 30 min at 4°C. Cells were washed twice in PBS before analyzed on a FACScalibur (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) using Cell Quest Pro software. The appropriate isotype controls were included and a minimum of 10 000 events were acquired for each condition. The debris was excluded from the analysis according to their FSC/SSC properties. BD ApoAlert APO 2.7-phycoerythrin (BD Biosciences) was used to determine the percentage of apoptotic cells according to the manufacturer's instructions.

For cell cycle analyses, the cells were pulsed with BrdU for 20 min at 37°C. After ethanol fixation and acidic DNA denaturation, cells

were stained with an anti-BrdU FITC antibody (51-33284X, BD Biosciences) and propidium iodide and then analyzed by flow cytometry.

RESULTS

Acquisition of sensitivity to irradiation

during the differentiation of hMSCs *in vitro*

Human MSCs were isolated from healthy human donors as previously described [16]. Cells were isolated from human bone marrow aspirates and cultured as described by Pittenger *et al.* [4]. After 2 weeks of culture, the cell population was characterized by flow cytometric analysis for the expression of CD105, CD90 and CD44 markers and the absence of markers of the hematopoietic lineage, including the lipopolysaccharide receptor CD14, CD34, and the leukocyte common antigen CD45. Flow cytometry parameters used in this study are listed in **Table S1**. Osteogenesis was induced and visualized as described in materials and methods section. Of note, after one week in the osteogenic medium, no morphological signs of differentiation were visible as yet (**Figure 1A**) and complete differentiation was observed only after 3 weeks of culture (**Figure 1B**). Human MSCs cultured in differentiation medium for one week will be further referred to as pre-differentiated (pre-diff.) hMSCs and after 3 weeks of culture as differentiated (diff.) hMSCs.

Undifferentiated and pre-differentiated hMSCs were irradiated with a single dose of 5 Gy as described in materials and methods. This dose has been shown to efficiently trigger apoptosis in hematopoietic progenitor cells [20]. Quantification of cell death showed that pre-differentiated hMSCs were sensitive to apoptosis as compared to undifferentiated hMSCs, which were resistant to irradiation-induced cell death (**Figure 1C**). Note that differentiated hMSCs were sensitive to cell death inducers such as staurosporine or etoposide as previously described [16], as well as γ -irradiation.

To verify if this effect was related to the type of cellular differentiation, we repeated this experiment with hMSCs differentiated along

the adipogenic pathway (**Figure 2A**). As illustrated in **Figure 2B**, hMSCs pre-differentiated into adipocytes were sensitive to γ -irradiation. To verify if factors present in the differentiation culture medium were capable of protecting the cells against radiation, hMSCs pre-differentiated into either osteoblasts or adipocytes for one week were cultured in complete hMSCs medium and then γ -irradiated. We did not find any difference in the number of cell death observed over the first 48h (**data not shown**) ruling out a possible effect of the different media in radio-resistance. However, as shown in **Figure 2C**, the surviving pre-differentiated hMSCs appeared to be more senescent when cultured in complete hMSC media.

To evaluate a possible “niche” effect, we analyzed the effect of hypoxia on the response of hMSCs to γ -irradiation. We found that hypoxia (i.e. 1% O₂) provided a limited effect on hMSCs survival after γ -irradiation (**Figure S1**). Finally, we asked if the use of primary cultures was important in the response to γ -irradiation, we study the response of human fibroblasts cultured in hMSCs culture medium. As illustrated in **Figure 2D**, unlike hMSCs, human fibroblasts were sensitive to γ -irradiation even in the presence of complete hMSC medium. Altogether, these results suggest that the differentiation related to γ -irradiation sensitivity was specific to hMSCs.

Differential induction of γ -H2AX foci in undifferentiated and pre-differentiated hMSCs upon irradiation

The response to DNA damage resulting in DSBs involves an orchestrated assembly of proteins that has been used to develop DSBs detection assays [21,22]. Once DNA damage is detected, there is activation of the DNA damage response (DDR), the components of which can be divided into four functional groups: the DNA damage sensors, the signal transducers, the repair effectors and the cell arrest or death effectors.

γ -H2AX foci analyses take advantage of an early event in DNA damage response, namely the phosphorylation of the histone H2AX [21,22]. This assay is highly sensitive and can

potentially detect all induced DSBs [22] and as such is generally used as a surrogate marker of DSBs. Immunofluorescence was used to visualize and quantify DDR kinetics using γ -H2AX foci in two different models: undifferentiated hMSCs and the human glioma cell line U251. As shown in **Figure 3**, γ -H2AX foci increased after irradiation in both cultures but the amount of γ -H2AX foci decreased in hMSCs (**Figure 3A**) after 12 h while the number in the human glioma cell line U251 (**Figure 3B**) remained constant over time (**Figure 3C**). Contrary to hMSCs, cell death was induced in U251 cells 12 h post-irradiation, suggesting a correlation between the failure of DNA repair and the induction of cell death (**data not shown**) [23].

Cells repair DNA damage after irradiation primarily by two mechanisms. non-homologous end joining (NHEJ) repair or homologous recombination (HR) repair. We thus determined in hMSCs the mechanism of repair of DSB. Since two protein complexes made up of Ku80/Ku70/DNA-PKcs/Artemis and XRCC4/Ligase IV/XLF effectuate NHEJ repair of DSB, we analyzed the expression of Ku80, Ku70 and DNA-PKcs in hMSCs after γ -irradiation. As shown in **Figure 4** the expression of Ku70 increased in hMSCs after irradiation while that of Ku80 remained constant. The increase in the expression of Ku70 was visible at 30 min and peaked at 2 h and remained at this level until 24 h. Note that the expression of phospho-DNA-PKcs^{Ser2056} increased after 30 min and then returned to basal levels after 2 h. Furthermore the level of phospho-ATM^{Ser1981} followed the same pattern of expression of that of phospho-DNA-PKcs^{Ser2056}.

Next, we asked if pre-differentiated hMSCs responded in a similar way to irradiation as undifferentiated hMSCs. As shown in **Figure 5A**, a 5 Gy γ -irradiation induced an accumulation of γ -H2AX foci with a similar intensity and kinetics between undifferentiated and pre-differentiated hMSCs since in both cases, a peak was observed after 1 h. However, the number of foci decreased more expeditiously in undifferentiated hMSCs than in pre-differentiated cells: after 24 h the

amount of γ -H2AX foci remained high in the surviving pre-differentiated hMSCs (**Figure 5B**) and returned to normal only after 72 h in the surviving cells (**data not shown**) while in undifferentiated hMSCs, no foci could be observed after 24 h (**Figure 5A**).

Recent results have suggested a link between DNA repair and differentiation, in particular on the unanticipated roles of DDR in the regulation of precursor or stem cell differentiation [24]. We thus examined the effect of irradiation on the osteogenic differentiation of hMSCs. As shown in **Figure 5C**, irradiated hMSCs were cultured for 6 days in differentiation medium. Within one week, these irradiated hMSCs underwent massive and rapid cell death even in absence of additional apoptotic inducers. These results suggest that hMSCs cannot sustain survival upon differentiation after irradiation and that acquisition of sensitivity to apoptosis is concomitant of early differentiation. As depicted in **Figure 5D** analyses of the cell cycle showed that 24 h after irradiation there were significantly less cells in phase S (con vs. irradiated: 9 vs. 2.9; $p > 0.0005$) and more cells in G2/M (con vs. irradiated: 7.6 vs. 10.9; $p = 0.007$).

DDR response of hMSCs and U251 cells to TMZ and γ -irradiation

Several studies have shown that hMSCs can survive irradiation but little is known about its survival upon the combination of chemical- and radiation-induced DNA damage, a classical therapeutic regimen in the treatment of brain tumors [26]. This question is significant since hMSCs are precursors of the stroma associated with many cancers, and as such could modulate the immune system and produce tumor-associated myofibroblasts [27]. We analyzed the response of hMSCs to another DNA damaging agent, temozolomide (TMZ) an oral alkylating agent, which is used in the treatment of Grade IV astrocytoma, the most aggressive brain tumor in adult [26]. Temozolomide rapidly methylates DNA, causing DNA damage whereby triggering cell death [26].

First, we analyzed the effect of TMZ and/or γ -irradiation on the viability of U251 glioma cells and on the formation of DSBs visualized by the formation of γ -H2AX foci (**Figure 6**). TMZ at 25 μ M, a concentration close to the therapeutic dose, was added to U251 cells and as shown in **Figure 6A**, triggered the formation of γ -H2AX foci, which increased over time after 8 h until 48 h were cell death became dominant. Similar results were obtained when U251 cells were subjected to 5 Gy irradiation; however, treatment of a combination of irradiation and TMZ resulted in a significant increase ($p = 0.0019$) in cell death (**Figure 6B**) as compared to irradiation alone or TMZ alone, as previously described [17]. Next we analyzed the effect of these treatments to DNA repair and cell death induction in hMSCs cultures (**Figure 6**). A treatment of hMSCs with 25 μ M TMZ induced a limited number of γ -H2AX foci that persisted after 6 h. However, when hMSCs were treated with 25 μ M TMZ prior to γ -irradiation, the induction of γ -H2AX foci was less important than that induced by irradiation alone (**Figure 7A**). However, in all cases no difference in the induction of cell death was observed between the different treatments suggesting that apoptosis was efficiently blocked in these cells (**Figure 7B**). These results suggest that the combination of treatment (i.e. TMZ and γ -irradiation), which is usually used in the treatment of gliomas, does not affect the survival of hMSCs.

DISCUSSION

It has been postulated that aging and cancer are the consequences of unrepaired DNA damage due mainly to the accumulation of reactive oxygen species from cellular metabolism and ultraviolet light from the sun [28]. Nuclear DNA damage might contribute to aging by increasing cell death, cellular senescence or more generally by decreasing cell functions [26]. When cells avoid the latter processes and accumulate DNA mutations, they are at greater risk to undergo oncogenic transformation [29]. In proliferating cells, DNA damage can also be limited through several mechanisms that ensure DNA replication fidelity [30]. In addition another major concern in cancer and

cancer therapies is genomic instability and recently this problem has also become an obstacle in regenerative medicine therapies. It has been shown that hMSCs propagated in culture develop aneuploidy and other DNA rearrangements over time that renders these cells unsuitable for clinical use [31]. Thus, it is important to understand the mechanisms required to maintain genomic stability. The source of DNA damage and the type of breaks produced would determine the kind of DDR activated. DNA damage may be identified by changes in the chromatin structure after DSBs. DDR components would be recruited to the sites of DNA damage after the formation of foci. In the case of DSBs, the ATM-ATR-DNA PK pathway induces the phosphorylation of the histone variant γ -H2AX on the chromatin at DSB sites. This results in ubiquitin mediated recruitment of DSB repair factors and additional chromatin modifying factors, which act to amplify the DNA damage signal, recruiting even more repair associated proteins [32,33]. The form of DSB repair with the highest fidelity is HR repair, which uses homologous sequences from a sister chromosome as a template for repairing damaged DNA. Non-homologous end joining represents a more error prone form of DNA repair with faster repair kinetics than HR repair. A recent study by the group of Valerie [34] showed that neural progenitors used the NHEJ DNA repair and that the rate of NHEJ progressively increased while the fidelity of repair decreased during the differentiation into astrocytes.

The latter processes are obviously less available in slow or non-dividing cells, such as stem cells. Thus, adult stem cells are thought to accumulate DNA damage during their quiescent or resting state *in vivo* [2,29]. However, there is a certain heterogeneity of the apoptotic response to DNA damage among of stem cells as some die rapidly after irradiation while others are resistant even to high intensity radiations [29]. We have recently shown that adult hMSCs are highly resistant to apoptosis unless they are engaged into differentiation [16]. Recent results have shown that HSCs are radio-protected by different mechanisms during quiescent and proliferating stages.

However, in quiescent HSCs, DNA damage is associated with genomic rearrangements and as such HSCs are more susceptible to error-prone DNA repair and mutagenesis [3].

In this study, we have shown that adult hMSCs isolated from bone marrow are resistant to radiation unless differentiation is induced (**Figures 1 & 2**). We found that in undifferentiated hMSCs possess a high DNA double strand break repair activity (DSB) as viewed by γ -H2AX foci (**Figure 3**). When engaged into differentiation, hMSCs lose this capacity and DNA breaks are followed by cell death (**Figure 5**). We also analyzed the response of hMSCs to another type of DNA damage, e.g. that induced by TMZ, and as shown in **Figure 6**, similar results were found. This result suggests that hMSCs possess an intrinsic resistance to DNA damage. Of note, irradiated hMSCs undergo apoptosis when differentiation is induced (**Figure 5**). Taken together, our data suggest that irradiation induced DNA damage is readily repaired in hMSCs but impaired their differentiation through the induction of apoptosis. NHEJ can occur at any point in the cell cycle. This mechanism of repair is initiated by recognition and processing of the DSBs by the Ku80/Ku70/DNA-PKcs/Artemis heterodimer. This activates DNA-PKcs, which mediates recruitment of end processing enzymes and polymerase. DNA ligase IV mediates re-ligation of the broken ends of the DNA. This method of repair is error prone and results in sequence deletion and mutations. As oppose to HR repair (active in the U251 cells), which uses the sister chromatid as the template for

repair and therefore can only occur during S phase or G2. HR is initiated by the MRE11-RAD50-NBS1 complex, which binds to and processes the ends of the damaged DNA, generating ssDNA. The ssDNA invades the template and repair is mediated by polymerase, nuclease, helicase and ligase activity, followed by resolution of the structure. This process can be considered as a safeguard against unwanted mutagenesis and that inhibition of apoptosis in hMSCs will enhance the risk of oncogenesis may be more than DNA damage itself. In addition, our results show that the regimen used for the treatment of gliomas, which involves both radiation- and chemo-induced DNA damages, has no affect on hMSCs survival. Human MSCs possess ambivalent roles toward tumoral growth because of their capacity to participate in the non-neoplastic compartment, their immuno-modulatory properties and/or secretory activity [17]. Based on our results, one can postulate that irradiated hMSCs could still be used as therapeutic vehicle but would not be able to differentiate in the tumoral microenvironment.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Emeline Brocard for technical assistance, Philippe Hulin from the “Cellular and Tissular Imaging Core Facility (MicroPICell), Université de Nantes” for his aid with all the microscopic analyses. A special program from “Equipe Labellisée la Ligue Contre le Cancer” supported this study. The authors state the existence of no competing financial interest.

REFERENCES

- Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120:497-512.
- Blanpain C, Mohrin M, Panagiota A, Sotitropoulou PA, Passegué E. (2011). DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 8:16-29.
- Mohrin M, Bourke E, Alexander D, Wae MR, Barry-Holson K, Le Beau M, Morrison CG, Passegué E. (2010). Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* 7:174-185.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Phinney DG. (2007). Biochemical Heterogeneity of Mesenchymal Stem Cell populations: clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle* 6:2884-2889.
- Schraufstatter IU, Discipio RG, Khaldoyanidi S. (2011). Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Front Biosci* 17:2271-2288.
- Yarnold J, & Brotons MC. (2010). Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol* 97:149-161.

8. Dai LJ, Moniri MR, Zeng ZR, Zhou JX, Rayat J, Warnock GL. (2011). Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer Lett* 305:8-20.
9. Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC. (2004). Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol* 127:326-334.
10. Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll HJ. (2006). Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells* 24:2753-2765.
11. Dickhut A, Schwerdtfeger R, Kuklick L, Ritter M, Thiede C, Neubauer A, Brendel C. (2005). Mesenchymal stem cells obtained after bone marrow transplantation or peripheral blood stem cell transplantation originate from host tissue. *Ann Hematol* 84:722-727.
12. Rieger K, Marinets O, Fietz T, Körper S, Sommer D, Mücke C, Reufi B, Blau WI, Thiel E, Knauf WU. (2005). Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 33: 605-611.
13. Lange C, Brunswig-Spickenheier B, Cappallo-Obermann H, Eggert K, Gehling UM, Rudolph C, Schlegelberger B, Cornils K, Zustin J, Spiess AN, Zander AR. (2011). Radiation rescue: mesenchymal stromal cells protect from lethal irradiation. *PLoS One* 6:e14486.
14. Beauséjour C. (2007). Bone marrow-derived cells: the influence of aging and cellular senescence. *Hand Exp Pharmacol* 180:67-88.
15. Valerie K, & Povirk LF. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22: 5792-5812.
16. Oliver L, Hue E, Rossignol J, Bougras G, Hulin P, Naveilhan P, Heymann D, Lescaudron L, Vallette FM. (2011). Distinct Roles of Bcl-2 and Bcl-X1 in the Apoptosis of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells during Differentiation. *PLoS One* 6:e19820.
17. Oliver L, & Vallette FM (2005) The role of caspases in differentiation and cell death. *Drug Resist. Updat.* 8: 163-170.
18. Kim SM, Oh JH, Park SA, Ryu CH, Lim JY, Kim DS, Chang JW, Oh W, Jeun SS. (2010). Irradiation enhances the tumor tropism and therapeutic potential of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in glioma therapy. *Stem Cells* 28:2217-2228.
19. Frank S, Oliver L, Lebreton-deCoster C, Moreau C, Lecabelle MT, Michel L, Vallette FM, Dubertret L, Coulomb B. (2004). Infrared radiation affects the mitochondrial pathway of apoptosis in human fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 123: 823-831.
20. Bertho JM, Mathieu E, Lauby A, Frick J, Demarquay C, Gourmelon P, Gorin NC, Thierry D. (2004). Feasibility and limits of bone marrow mononuclear cell expansion following irradiation. *Int J Radiat Biol* 80:73-81.
21. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868.
22. Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA. (2010). γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 9:662-669.
23. Kil WJ, Cerna D, Burgan WE, Beam K, Carter D, Steeg PS, Tofilon PJ, Camphausen K. (2008). In vitro and in vivo radiosensitization induced by the DNA methylating agent temozolomide. *Clin Cancer Res* 14:931-938.
24. Sherman MH, Bassing CH, Teitell MA. (2011). Regulation of cell differentiation by the DNA damage response. *Trends Cell Biol* 21:312-331.
25. Greenberger JS, & Epperly M. (2009). Bone marrow-derived stem cells and radiation response. *Semin Radiat Oncol* 19:133-139.
26. Frosina G. (2009). DNA repair and resistance of gliomas to chemotherapy and radiotherapy. *Mol Cancer Res* 7:989-999.
27. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. 3rd. (2011). Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 29:11-19.
28. Hoeijmakers JH. (2009). DNA damage, aging and cancer. *N Engl J Med* 351:1475-1485.
29. Mandal PK, Blanpain C, Rossi DJ. (2011). DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:198-202.
30. Preston BD, Albertson TM, Herr A. (2010). DNA replication fidelity and cancer. *Semin Cancer Biol* 20:281-293.
31. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, Tchirkov A, Rouard H, Henry C, Spingard M, Dulong J, Monnier D, Gourmelon P, Gorin NC, Sensebé L. (2010). "Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire". Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115:1549-1553.
32. Jackson SP, & Bartek J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071-1078.
33. Ciccia A, & Elledge SJ. (2010). The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40:179-204.
34. Adams BR, Hawkins AJ, Povirk LF, Valerie K. (2010). ATM-independent, high-fidelity nonhomologous end joining predominates in human embryonic stem cells. *Aging* 2:582-596.

Mesenchymal stem cells: DNA repair and differentiation.

See www.StemCells.com for supporting information available online.

Figure 1. Influence of osteogenic differentiation medium on hMSCs morphology and apoptosis.

(A) Morphological aspects of hMSCs cultured for one-week in complete media or in osteogenic differentiation medium (pre-diff.). (B) Osteogenic differentiation was determined by alizarin red (binds to mineralized bone) in hMSC cultures after three weeks of incubation in either complete media or in osteogenic differentiation medium (diff.). (C) Human MSCs cultured in complete hMSC media or in osteogenic differentiation medium for one week (pre-diff.) were subjected or not to 5 Gy γ -irradiation and then cell viability was determined by Trypan blue exclusion at the indicated times. The results are the mean \pm SD of three independent experiments.

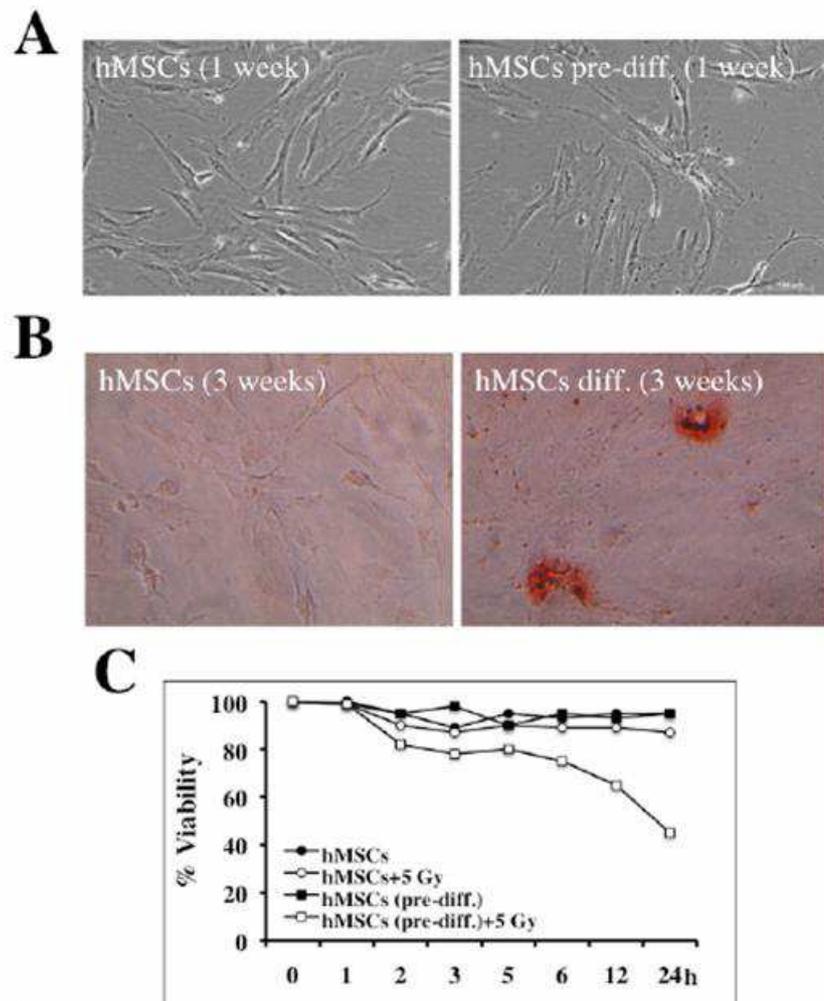


Figure 1: Oliver et al.

Figure 2. Influence of adipogenic differentiating medium on hMSCs morphology and apoptosis.

(A) Morphological aspects of hMSCs cultured for three weeks in complete hMSC media or in adipogenic differentiation medium. Adipogenic differentiation was determined after three weeks of incubation in either complete hMSC media or in adipogenic differentiation medium using Red Oil O. (B) Human MSCs cultured in complete media or in adipogenic differentiation medium for one week (pre-diff.) were subjected or not to 5 Gy γ -irradiation and then cell viability was determined by Trypan blue exclusion at the indicated times. The results are the mean \pm SD of three independent experiments. (C) Human MSCs were cultured in osteogenic or adipogenic differentiation media for one week and then cultured for another week in complete hMSC medium before being subjected to 5 Gy γ -irradiation. One week later cellular senescence was determined by x-gal staining. (D) Human fibroblasts cultured in complete hMSC media were subjected or not to 5 Gy γ -irradiation and then cell viability was determined by Trypan blue exclusion at the indicated times. The results are the mean \pm SD of three independent experiments.

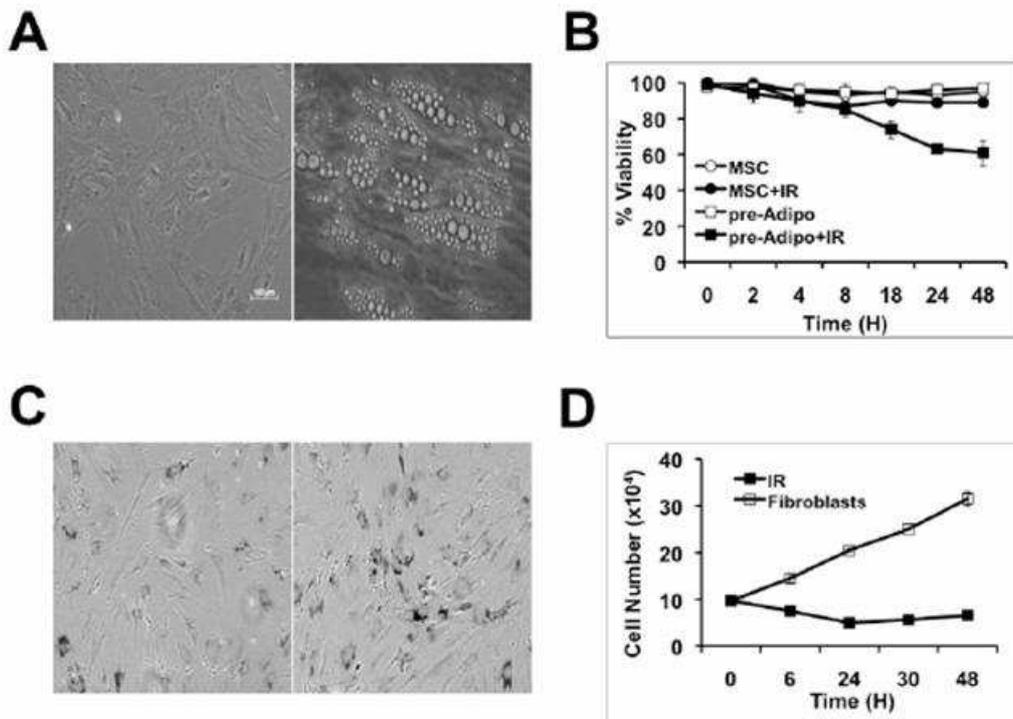


Figure 2: Oliver et al.

Figure 3. Difference in DNA repair activity between hMSCs and U251.

Human MSCs (A) and human glioma cell line U251 (B) were subjected to γ -irradiation (5 Gy) and then at different time points the cells were fixed and labeled with a monoclonal mouse anti-H2AX^{ser139} and the nuclei were stained with Dapi. (C) The number of γ -H2AX foci in the nuclei was quantified using ImageJ and the 3D object counter plugin. An average of 100 nuclei was analyzed at each time point.

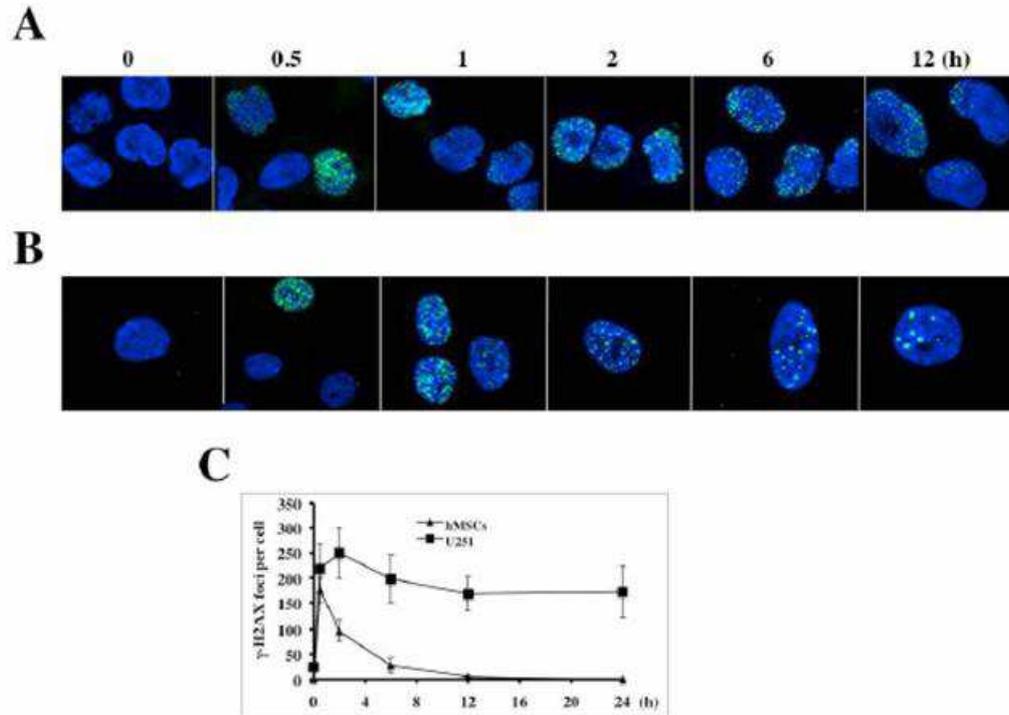


Figure 3: Oliver et al.

Figure 4. DNA repair activity in undifferentiated hMSCs.

Human MSCs were irradiated (5 Gy) and then at the different times indicated cell lysates were prepared and separated in SDS-PAGE to determine the expression of pDNA-PKCs^{Ser2056}, Ku80, Ku70 and pATM^{Ser1981}.

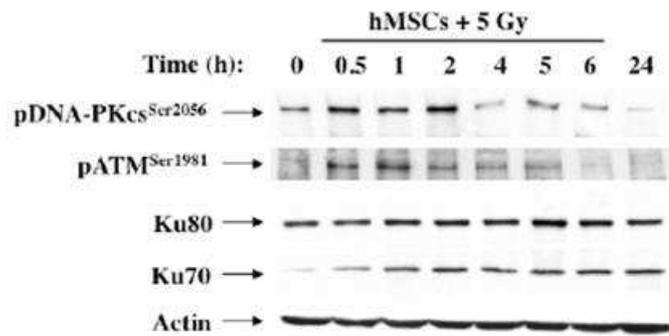


Figure 4: Oliver et al.

Figure 5. DNA repair activity in undifferentiated and differentiated hMSCs.

(A) Human MSCs were cultured in either complete media or in osteogenic differentiation media for 3 week and then subjected to 5 Gy γ -irradiation. At different time points the cells were fixed and labeled with a monoclonal mouse anti-H2AX^{Ser139} and the nuclei were stained with Dapi. (B) The number of γ -H2AX foci in the nuclei was quantified using ImageJ and 3D Object Counter plugin. An average of 100 nuclei was analyzed at each time point. The data presented are the mean \pm SD. (C) To determine the effect of γ -irradiation on osteogenic differentiation, hMSCs cultured in complete medium were subjected to γ -irradiation (5 Gy) and then cultured in osteogenic differentiation medium (hMSCs + 5 Gy + diff.). As a control, hMSCs were either cultured in complete media (hMSCs); in osteogenic differentiation media (hMSCs + diff.) or hMSCs cultured in complete media were irradiated (hMSCs + 5 Gy). The number of cells in the different cultures were determined at the indicated times. The data presented are duplicate values of 3 independent experiments. (D) To determine the effect of irradiation on the cell cycle, hMSCs were subjected or not to γ -irradiation (5 Gy) and 24h later the cells were stained with BrdU and propidium iodide. Cells were analyzed by flow cytometry and the number of cells in G1, S and G2/M were quantified (E).

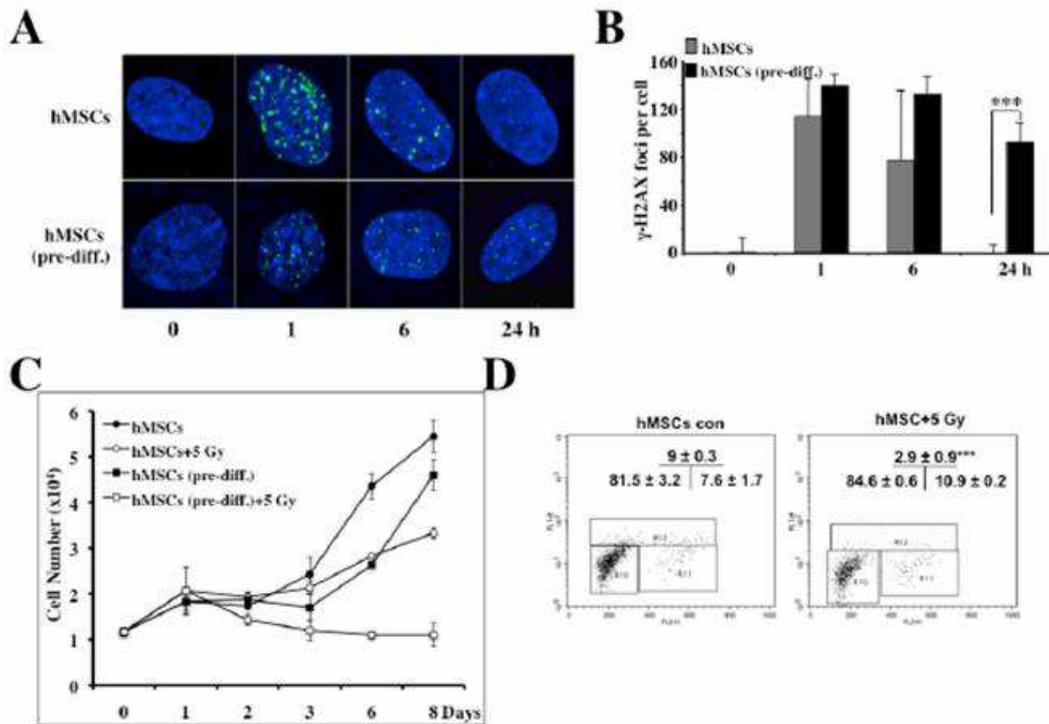


Figure 5; Oliver et al.

Figure 6. Comparison of DNA repair and sensitivity towards cell death in U251 cells.

(A) The human glioma U251 cells were treated with 25 μ M TMZ and then cells were fixed and labeled with the anti- γ -H2AX at the indicated times and (B) quantification of the γ -H2AX foci were done as described in **Figure 3**. An average of 80 cells were counted per time point. (C) U251 cells were both cultured in the absence or presence of 25 μ M TMZ or γ -irradiated (5 Gy) and then cultured in the presence of 25 μ M TMZ. Cell viability was assessed by Trypan blue exclusion. Data are presented as mean \pm SD of duplicate values of 3 independent experiments. ** Statistical analyses of the percentage of cell death between irradiated cells and a treatment TMZ + irradiation of $p = 0.0019$.

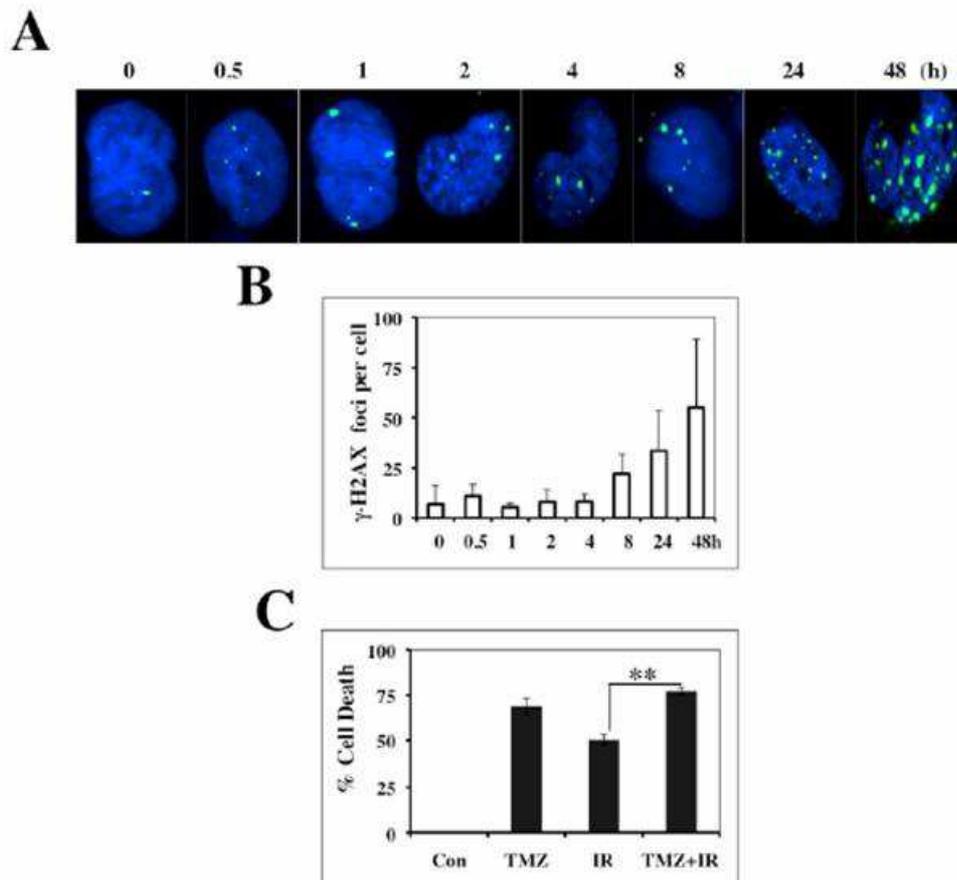


Figure 6: Oliver et al.

Figure 7. Comparison of DNA repair with cell death induction in hMSCs by TMZ and/or irradiation.

(A) Undifferentiated hMSCs were both cultured in the presence of 25 μM TMZ or irradiated (5 Gy) and then cultured in the presence of TMZ (25 μM). The nuclei were labeled with an anti-H2AX^{Ser139} to quantify the number of γ -H2AX foci as described above. (B) Simultaneously the percentage of cell death under the different conditions of (A) was determined by Trypan blue exclusion as described in previous figures.

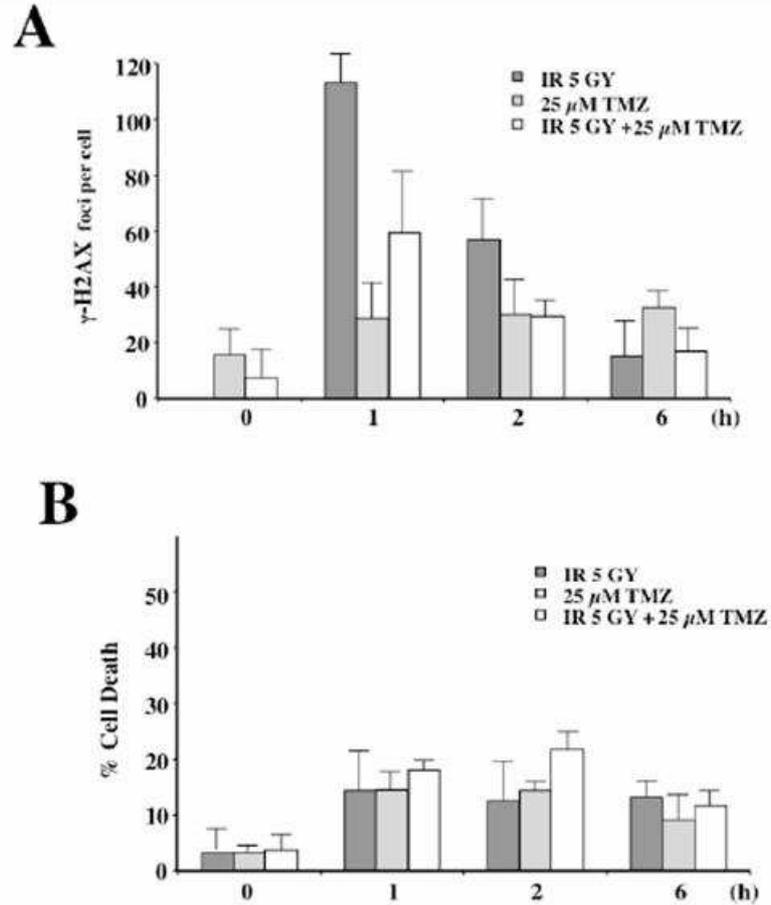


Figure 7: Oliver et al.

ETUDE MECANISTIQUE & FONCTIONNELLE DE LA SENESCENCE RADIO-INDUITE DES CELLULES ENDOTHELIALES MICROVASCULAIRES

Résumé

Les bénéfices de la radiothérapie reposent sur une balance mettant en jeu la réponse anti-tumorale et la toxicité sur les tissus sains périphériques. La Sphingosine-1-Phosphate (S1P) permet de limiter la radio-toxicité aiguë en prévenant la mort cellulaire dépendante du Céramide des cellules endothéliales microvasculaires. Cependant, de nombreuses observations physiopathologiques indiquent que les cellules endothéliales jouent également un rôle essentiel dans le développement de la radio-toxicité tardive, et peut être conditionné par leur entrée en sénescence prématurée. La S1P, en protégeant ces cellules, permet potentiellement la stabilisation de dommages de l'ADN et/ou de leur signalisation, pouvant ainsi favoriser la sénescence. Les objectifs de ce travail de thèse ont été de comprendre *in vitro*, les mécanismes moléculaires impliqués lors de la sénescence radio-induite des cellules endothéliales microvasculaires, et d'évaluer l'impact de la S1P. Nous avons observé que l'induction de la sénescence est associée à un phénotype d'activation, et à l'augmentation de la perméabilité endothéliale. Sur le plan mécanistique, si les résultats obtenus montrent que la sénescence endothéliale est ici originalement indépendante de la signalisation persistante de dommages de l'ADN, ils montrent cependant la dépendance d'un stress oxydant mitochondrial chronique, et la dépendance de p53. Ces travaux proposent en perspectives l'utilisation combinée de la S1P et d'un inhibiteur de la sénescence endothéliale afin de limiter la toxicité aiguë comme la toxicité tardive.

Mots-clés : Radiothérapie, radiotoxicité, endothélium, sénescence prématurée, Sphingosine-1-Phosphate, stress chronique.

STUDY OF RADIATION-INDUCED MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELL SENESCENCE, MECHANISM & FUNCTION

Abstract

The benefits of radiation therapy depend on the balance between the impact on tumoral tissues and on healthy peripheral tissues. Sphingosine-1-Phosphate (S1P) treatment allows to limit acute radiation toxicity through prevention of Ceramide-dependent microvascular endothelial cell death. However, numerous physiopathological observations indicate that endothelial cells also play an essential role in late radiation toxicity, possibly owing to premature senescence. S1P treatment, by protecting endothelial cells, could stabilize DNA damages and/or downstream signalization, and thereby promote senescence. The objectives of this thesis aimed at understanding the molecular mechanisms involved in *in vitro* development of radiation-induced microvascular endothelial cell senescence, and evaluate the impact of S1P treatment. We have observed that induction of senescence is associated with an activated phenotype, and with an increase in endothelial cell monolayer permeability. Regarding the mechanisms, our results indicate that, interestingly, endothelial cell senescence is independent of the persistence of DNA damage signalization. Instead, we show that it depends on chronic mitochondrial oxidative stress and p53 upregulation. These original findings suggest as perspectives the combination between S1P and an endothelial cell senescence inhibitor, so as to limit both acute and late toxicity.

Key words : Radiation therapy, radiation toxicity, endothelium, premature senescence, Sphingosine-1-Phosphate, chronic stress.

LAFARGUE Audrey

Université de Nantes

INSERM UMR892 - CRCNA

IRS1, 8, quai Moncousu, BP 70721

44007 NANTES Cedex 1