

Université de Lille

Ecole Doctorale Biologie-Santé

CANTHER - Hétérogénéité, Plasticité et Résistance aux Thérapies des Cancers

Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU de Lille, Institut Pasteur de Lille – UMR9020 -U1277

Equipe Senfib : Sénescence, fibrose et cancer

Avec le financement de la région Hauts-de-France et de l'institut Pasteur de Lille

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée par

Erwan GOY

Le : 7 octobre 2021

Rôle de la sénescence dans l'initiation des sarcomes secondaires survenant en territoire irradié

Jury

Pr. Nicolas Penel	Président
Dr. David Bernard	Rapporteur
Dr. Fabien Milliat	Rapporteur
Dr. Florence Chainiaux-Debacq	Examineur
Pr Corinne Abbadie	Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier le **Pr. Nicolas Penel**, le **Dr Fabien Milliat**, le **Dr David Bernard** et le **Dr. Florence Chainiaux-Debacq** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et de faire partie de mon jury. Je souhaiterais de même remercier encore une fois le **Dr Fabien Milliat**, le **Pr. Eric Adriaenssens** et le **Dr. Bernard Lopez** d'avoir suivi l'évolution de mes travaux lors de mes comités de suivi individuel.

Je tiens à remercier les **Pr. Yvan de Launoit** et **Dr. Isabelle Van Seuningen** pour leur accueil dans l'UMR8161 puis dans l'Unité CANTHER.

Mille merci aussi au **Pr. Corinne Abbadie** qui a encadré ma formation à la recherche depuis mon Master 1 jusqu'au bout de ces presque quatre années de thèse avec une grande patience. Merci pour ta pédagogie, ton suivi infailible, tes précieux conseils et toutes tes corrections.

Merci également aux autres membres ou anciens membres de l'ancienne équipe ICE ou de l'équipe SENFIB actuelle. Tout d'abord, merci à **Joe Nassour** pour m'avoir encadré avec patience et pédagogie lors de mes stages de Master 1 et Master 2. Un immense merci également à **Nathalie Martin** de m'avoir épaulé pendant la plupart de mes expériences d'irradiation et de m'avoir permis de conserver une vie sociale. Merci également aux Dr. **Albin Pourtier**, **Olivier Pluquet** et **Vanessa Dehennaut** pour leurs conseils éclairés pour ma présentation devant le grand jury et pour la gestion de mon projet de recherche. Merci également à **Maxime Tomezack** qui a initié ce projet et m'a formé avec **Benoît Vatrinet** à l'utilisation du Clinac. Merci également à **Caterina Facchin**, **Mathilde Brulé**, **Faty Merzouki**, **Emmrich Wakeford**, **Olivier Samyn**, **Ingrid Loison**, **Clémentine de Schutter**, **Anaïs Engrand**, **Laure Saas**, **Claire Drullion**, **Gautier Goormachtig** et **Elodie Rodzinski** pour leur participation au projet. Merci également aux autres membres de l'équipe et de l'unité pour leur bonne humeur et leurs conseils.

Je tiens à remercier également nos collaborateurs, **Fabrizio Cleri** et **Nicolas Penel**, pour le montage de ce projet. Merci également à **Eric Lartigau** pour l'accueil au sein du Centre Oscar Lambret. Je souhaite aussi à remercier **Thomas Lacornerie** pour ses conseils et ses travaux en dosimétrie pour le projet. Merci aussi à **Dominique Tierny**, **Jérôme Benoit** et **Emmanuel Bouchaert** pour l'aide à la conception et la réalisation des protocoles d'irradiation in vivo. Merci également aux membres du PLETHA, **Thierry Chassat**, **David Hannebique**, **Anthony Mouray**, **Fabrice Infanti** et **Jean Pierre De Cavel** pour l'aide à la réussite du projet in vivo et à la rédaction du dossier à destination du comité éthique. Merci également à **Philippe Froguel**, **Amélie Bonnefond**, **Emmanuel Vaillant**, **Mehdi Derhourhi**, **Hélène Touzet**, **Isabelle Guigon** et **Franck Bonardi** pour le séquençage des cellules PSNE et l'analyse des données de séquençage. Merci de même à **Olivier Molendi-Coste** et **Laurent Pineau** pour le tri des cellules sénescents. Merci également à **Sophie Salomé-Desnoullez**, **Antonino Bongiovanni** et **Hélène Bauderlique** de la plateforme Bicel pour leurs formations et aides à l'utilisation des microscopes, cytomètres ainsi que pour l'analyse des données.

Merci également aux financeurs de ce projet, principalement la Ligue contre le Cancer (comité du Pas-de-Calais et comité du Nord), le SIRIC OncoLille et le Canceropôle Nord-Ouest. De même qu'au financeur de ma thèse, la région Hauts-de-France et l'institut Pasteur de Lille.

Résumé : Rôle de la sénescence dans l'initiation des sarcomes secondaires survenant en territoire irradié

La radiothérapie est une technique majeure dans le traitement contre le cancer. Elle a pour but d'induire la mort des cellules tumorales, principalement en générant des cassures double-brin (DSB) et simple-brin de l'ADN (SSB). Paradoxalement, la radiothérapie est associée dans de rares cas à la survenue de cancers secondaires. Les données de la littérature montrent que ces seconds cancers sont majoritairement des sarcomes et surviennent préférentiellement en marge du volume-cible planifié (PTV). Cette marge, composée de cellules non-tumorales, est caractérisée par une faible dose d'irradiation et un décalage du spectre d'énergie des particules ionisantes en faveur des énergies les plus faibles. Le premier objectif de ma thèse a été de caractériser les cassures de l'ADN induites dans des fibroblastes normaux de derme humain (NHDF) irradiés dans cette marge. Pour cela, l'équipe a mis en place un système expérimental permettant d'irradier des cellules positionnées en marge du PTV. En utilisant ce système expérimental, nous avons observé qu'un protocole de radiothérapie fractionnée induit une accumulation de SSB en marge du PTV, sans induire de DSB. Cette accumulation de SSB est associée à un défaut de réparation des SSB, corrélé à une baisse d'activité de la PARP, une enzyme essentielle de la voie de réparation des SSB.

Le second objectif a été d'étudier les conséquences de cette accumulation de SSB sur les NHDF. Pour cela, nous avons suivi la croissance des cellules irradiées en marge. Nos résultats montrent que l'irradiation en marge induit un arrêt de croissance. Nous avons évalué la mort cellulaire et montré que les cellules irradiées en marge du PTV ne meurent pas. Nous avons alors testé l'hypothèse d'une induction de sénescence en marge du PTV. La sénescence cellulaire est un état d'arrêt du cycle cellulaire associé à une survie à long terme. Par l'utilisation de différents marqueurs, nous avons montré qu'une partie de la population des NHDF irradiés en marge entrait en sénescence.

La population des cellules irradiées étant hétérogène du point de vue de la survenue de sénescence, nous avons trié les cellules présentant des marqueurs de sénescence très marqués et les avons suivis sur le long terme. Nous avons observé que certaines d'entre-elles étaient capables d'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence pour donner naissance à des cellules filles proliférantes, invasives et mutées. Néanmoins, la xénogreffe de ces cellules dans des souris SCID n'a pas permis de développement tumoral, ce qui suggère que ces cellules sont seulement pré-cancéreuses.

En combinant un traitement au peroxyde d'hydrogène combiné à un inhibiteur de PARP (le Véliparib), nous avons démontré que l'induction de SSB est suffisante pour induire la sénescence de NHDF et l'échappement de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence.

In vivo, nous avons confirmé une partie de ces résultats en mettant en évidence l'induction de foyers XRCC1 (marqueurs de SSB) dans le derme de souris irradiées en marge du PTV. De même, nos premières expériences, qui restent à reproduire, utilisant des souris p16-LUC mettent en évidence une induction de sénescence in vivo en marge du PTV.

Ainsi, ces différents résultats montrent que des fibroblastes normaux placés en marge d'un PTV irradié par un protocole mimant une thérapie standard accumulent des SSB et entrent en sénescence prématurée. Certaines cellules sénescents sont capables d'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire pour donner naissance à des cellules filles pré-transformées.

Abstract: Role of senescence in the initiation of second sarcoma occurring in irradiated field

Radiotherapy is a major technique used in cancer treatment. It aims to cause the death of cancer cells, mainly through the induction of DNA Double-Strand Breaks (DSBs) and Single-Strand Breaks (SSBs). Paradoxically, radiotherapy is associated in rare cases with the occurrence of second cancers. Data from the literature show that these second cancers are mostly sarcoma which develop preferentially in the margin of the Planning Target Volume (PTV). This margin is composed of non-tumoral cells and is characterized by a low dose irradiation with a photon energy spectrum shifted towards lower energies. The first objective of my thesis project was to characterize the DNA damages encountered by Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDFs) irradiated in the margin of the PTV. For that purpose, the team developed an experimental setting allowing the irradiation of NHDFs positioned in the margin of the PTV. By using this system, we observed that a fractionated irradiation protocol mimicking those commonly applied to patients induces an accumulation of SSBs in the margin, without inducing DSBs. This accumulation of SSBs was associated with a repair defect correlated with a decrease of PARP activity, an essential enzyme for SSB repair.

The second objective was to study the effect of this SSB accumulation on NHDF outcome. For this purpose, we followed the growth of NHDFs irradiated in the margin. Our results show that cells positioned in the margin of an irradiated PTV underwent growth arrest. We measured their cell death level and showed that NHDF irradiated in the margin of the PTV did not die. Then, we made the hypothesis of a senescence induction. Cell senescence is a cell cycle arrest state associated with a long-term survival. By using different markers, we have shown that the NHDFs irradiated in the margin enter in premature senescence.

The population of cells irradiated in the margin being heterogenous regarding the occurrence of senescence, we sorted fully senescent cells harbouring marked senescent markers and monitored them up for long time. We observed that a few of them were able to escape from the cell cycle arrest to give rise to proliferating daughter cells, harbouring mutations and invasive capacities. However, the xenografting of these cells in SCID mice did not induce tumoral development, suggesting that these emerging cells are only pre-cancerous.

By combining a hydrogen peroxide treatment with a PARP inhibitor (Veliparib), we have demonstrated that an SSB induction is sufficient to induce NHDF senescence and escape from cell cycle arrest associated to senescence.

In vivo, we have confirmed part of these results. We have evidenced that SSBs are generated in the dermal cells of mice positioned in close contact with an irradiated phantom. Moreover, by performing preliminary experiments with the p16-LUC mice model, we have some data, that have to be confirmed, that senescence would be induced in mice positioned in close contact with a phantom irradiated with a protocol mimicking those commonly applied to patients.

To conclude, these different results show that SSBs are induced in normal fibroblasts positioned at the margin of a PTV and, consequently, that the cells enter in premature senescence. We have also showed that a few of senescent cells can escape from the cell cycle arrest to give a rise to pre-cancerous daughter cells. We thus suggest that SSBs and senescence could play a role in the development of second sarcoma occurring in irradiated field.

Liste des abréviations

µm	Micromètre
3D-CRT	Radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle
4EBP1	4E-binding protein 1
53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1
8-oxoG	8-Oxoguanine
ACD	Adrenocortical dysplasia homolog
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adenosine diphosphate
AKT	Ak strain transforming/Protein kinase B
ALT	<i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	5' AMP-activated protein kinase
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
APE1	Apurinic/aprimidinic endonuclease
ARHs	ADP-ribose hydrolases
ARIH1	Protein ariadne-1 homolog
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ASMase	Acid sphingomyelinase
ATF6a	Activating Transcription Factor 6
ATG5	Autophagy Related 5
ATG7	Autophagy Related 7
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATRIP	ATR-interacting protein
BAD	BCL-2 associated agonist of cell death
BAK	BCL-2 homologous antagonist/killer
BAX	BCL-2 Associated X
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BIR	<i>Break-induced replication</i>
BOK	BCL-2 related ovarian killer
C12FDG	5-Dodecanoylaminofluorescein Di-β-D-Galactopyranoside
CAF	<i>Cancer Associated Fibroblast</i>
CCL2	Chemokine ligand 2
CCl4	Chemokine (C-C motif) ligands 4
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A
CDC25C	Cell division cycle 25 homolog C
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
CDKN1	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1

CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CHK1	Checkpoint kinase 1
CHK2	Checkpoint kinase 2
CIITA	Class II, major histocompatibility complex
CK2	Casein Kinase
CKI	CDK inhibitor
cm	Centimètre
CMA	<i>Chaperone-mediated autophagy</i>
CNV	<i>Copy Number Variant</i>
CoDE-seq	<i>Copy number variation Detection and Exome sequencing</i>
CREB	cAMP response element-binding protein
CSAD	Cysteine sulfinic acid decarboxylase
CTV	<i>Clinical Target Volume</i>
CXCR2	C-X-C chemokine receptor type 2
DAMP	<i>Danger-Associated Molecular Patterns</i>
DcR1	Decoy receptor1
DcR2	Decoy receptor2
DDR	<i>DNA Damage response</i>
DKC1	Dyskerin 1
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
DNP	<i>Double nucleotide polymorphism</i>
dNTP	<i>Nucleoside triphosphate</i>
Dr	Docteur
DR4	Decoy receptor 4
DR5	Decoy receptor 5
E2F	Eukaryotic transcription factor
E2F1	Eukaryotic transcription factor 1
EGF	Epidermal growth factor
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor
ERAD	<i>ER-associated protein degradation</i>
Exp. G	<i>Exponential growth</i>
F1MC1	Fibroblaste issu d'un donneur de 1 an mâle caucasien
F26FC	Fibroblaste issu d'une donneuse de 26 ans femelle caucasienne
F6MC1	Fibroblaste issu d'un donneur de 6 ans mâle caucasien
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	FAS-associated death domain
FAS-L	FAS-Ligand
FASST	<i>Fibroblasts Accelerate Stromal-Supported Tumorigenesis</i>
FGF	Fibroblast growth factors
FIS1	Mitochondrial fission 1 protein
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GLB1	Beta-galactosidase
GNG12	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12
GSTM5	Glutathion S-transférase cytosolique

Gy	Gray
h	Heure
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
H3K9me3	Lysine 9 de l'histone 3 triméthylée
HDAC	Histone désacétylase
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF1α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
hOGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase humaine 1
HP1	Heterochromatin protein 1
HPRT	Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransférase
HRK	Harakiri, BCL-2 Interacting Protein
hrs	<i>Hours</i>
HSC70	Heat shock cognate 71 kDa protein
HSP	<i>Heat Shock Proteins</i>
HUVEC	<i>Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IFNγ	Interferon gamma
IGFBP5	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5
IL-1α	Interleukine 1 alpha
IL-6	Interleukine 6
IL-6Rα	Interleukine 6 receptor alpha
IL-8	Interleukine 8 receptor alpha
IMRT	Radiothérapie à intensité modulée
Indel	Insertion et délétion
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
ITV	<i>Internal Target Volume</i>
KO	<i>Knock Out</i>
LAMP-2A	Lysosome-associated membrane protein 2
LR	<i>Lipid raft</i>
Max	Maximum
MCL-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1
MDC-1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MHC-1	Major histocompatibility complex class 1
Min	Minimum
MLKL	Mixed Lineage Kinase Like
mm	Millimètre
MMP	Matrix metalloproteinases
MnSOD	Manganese superoxide dismutase
MPTP	Pores de transition de perméabilité mitochondriale
MRE11	Meiotic recombination 11 protein
MRN	MRE11, RAD50, NBS1/NBN
MRS2	Magnesium transporter MRS2 homolog
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
mTORC1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mechanistic target of rapamycin complex 2

mTORC3	Mechanistic target of rapamycin complex 3
MV	MégaVolt
NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH-oxidase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome 1
NDUFAF2	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Complex Assembly Factor 2
NDUFS8	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit S8
NF1	Neurofibromin 1
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NGS	Séquençage nouvelle génération
NHDF	<i>Normal Human Dermal Fibroblast</i>
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
nM	Nanomolaire
NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein
NOX1	NADPH Oxidase 1
NOX4	NADPH Oxidase 4
NS	Non significatif
OIS	<i>Oncogene-Induced Senescence</i>
OLA1	Obg-like ATPase
p38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinases
PanIN	<i>Pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARG	(Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymérase 1
PARP2	Poly(ADP-Ribose) Polymérase 2
PD	<i>Population Doubling</i>
PDGFRB	Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta
PG	Population générale
PGE2	Prostaglandin E ₂
pH	Potentiel hydrogène
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PNKP	Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase
POLD3	DNA polymerase delta subunit 3
POT1	Protection of telomere protein 1
PP1	Protein phosphatase 1
PP2A	Protein phosphatase 2A
Pr	Professeur
PSNE	<i>Post-senescence Neoplastic Escape</i>
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTV	<i>Planning Target Volume</i>
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RAD50	DNA repair protein RAD50
RAD51	DNA repair protein RAD51
Rb	Retinoblastoma protein
RE	Réticulum endoplasmique
RIP1	Receptor Interacting Protein kinase

ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPA	Replication protein A
RR	Risque relatif
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RUNX1	RUNX Family Transcription Factor 1
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatin foci</i>
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficient mice</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDH	Succinate deshydrogenase
SMS	<i>Senescence-messaging secretome</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SNV	<i>Single nucleotide Variant</i>
SREBP1	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1
SSB	<i>Single-strand break</i>
SSBR	<i>Single-strand break repair</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TGF-β	Transforming growth factor beta
TIN2	Interacting nuclear factor 2
TIS	<i>Therapy-Induced Senescence</i>
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNF-α	Tumor necrosis factor
TP53	Tumor protein P53
TPP1	Telomere protection protein 1
TRADD	TRAIL associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
transporteur ABC	Transporteur ATP binding cassette
TRF1	Telomere repeat factor 1
TRIP11	Thyroid Hormone Receptor Interactor 11
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WBI	<i>Whole Body Irradiation</i>
WES	<i>Whole-Exome Sequencing</i>
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
YB-1	Y-box binding protein 1
γH2AX	H2A histone family member X, phosphorylée sur la sérine 139

Table des matières

Résumé : Rôle de la sénescence dans l'initiation des sarcomes secondaires survenant en territoire irradié.....	5
Abstract: Role of senescence in the initiation of second sarcoma occurring in irradiated field.....	6
Liste des abréviations.....	7
Table des matières.....	13
Chapitre 1 : Sénescence cellulaire : définition et rôle dans les cancers.....	18
I. Changements phénotypiques caractéristiques de l'état sénescence.....	18
A. Arrêt dans le cycle cellulaire.....	18
B. Changements morphologiques.....	18
C. Activité SA- β -galactosidase.....	19
D. Altérations mitochondriales, stress oxydant et changements métaboliques associés à la sénescence.....	19
E. Augmentation de l'activité autophagique.....	21
F. Stress réticulaire et activation de la voie UPR.....	22
G. Changements épigénétiques.....	23
H. Sécrétome associé au phénotype sénescence (SASP).....	24
I. Résistance à l'apoptose.....	25
II. Principaux mécanismes inducteurs de sénescence.....	26
A. Dommages à l'ADN associés à la sénescence et voies de signalisation.....	28
1. Dommages à l'ADN induisant la voie DDR.....	28
2. Cassures simple brin et activation de la voie SSB.....	32
3. SSB, DSB et fourches de réplication bloquées non réparées : de puissants inducteurs de sénescence.....	33
B. Sénescence rélicative.....	33
C. Sénescence prématurée induite par le stress oxydant.....	35
D. Sénescence induite par activation oncogénique.....	36
E. <i>Sénescence induite par les thérapies anti-cancéreuses</i>	37
F. Cas particulier du <i>Senescence-Messaging Secretome</i> : induction de la sénescence par le SASP.....	38
III. Principaux marqueurs de la sénescence.....	39
IV. Sénescence et cancer.....	41
A. Le rôle antitumoral intrinsèque de la sénescence.....	41
B. Le rôle ambigu du SASP dans la pathologie cancéreuse.....	42
C. La sénescence et la résistance aux thérapies antitumorales.....	43
D. Rôle de la sénescence dans l'initiation tumorale.....	44
V. Élimination des cellules sénescences et conséquences.....	45
Chapitre 2 : Sénescence cellulaire : Rôles en radiothérapie externe anticancéreuse.....	47
I. Principe de la radiothérapie externe conformationnelle 3D par faisceaux de rayons X.....	47
A. Rappel de quelques principes physiques.....	47
B. Caractéristiques des accélérateurs utilisés en radiothérapie conformationnelle 3D.....	49
1. Source.....	49
2. Ciblage.....	50
C. Dosimétrie.....	52
D. Effets de bord.....	54
II. Effets biologiques induits par la radiothérapie externe conformationnelle 3D par faisceaux de rayons X.....	54

A.	Origine des dommages cellulaires	55
B.	Effets induits dans les cellules présentes dans le PTV	56
1.	Endommagement de l'ADN	56
2.	Endommagement des mitochondries.....	57
3.	Endommagement de la membrane plasmique.....	57
C.	Mort cellulaire radio-induite	58
1.	Apoptose	59
2.	Mort par autophagie	60
3.	Nécrose et nécroptose.....	60
4.	Catastrophe mitotique.....	61
D.	Sénescence radio-induite	61
III.	Effet bystander.....	64
IV.	Effets biologiques induits par la dose déposée hors champ.....	65
	Chapitre 3 : Cancers secondaires postradiothérapie.....	66
I.	Définition	66
II.	Risque relatif et facteurs de risque de développer un cancer secondaire postradiothérapie.....	67
III.	Types de cancers secondaires post-radiothérapie : focus sur les sarcomes.....	68
IV.	Localisation des cancers secondaires par rapport au territoire traité.....	70
V.	Génétique et transcriptomique des sarcomes postradiothérapie versus sarcomes sporadiques.....	71
	Chapitre 4 : Projet de thèse.....	73
I.	Hypothèse du projet	73
II.	Les objectifs du projet de thèse.....	73
	Chapitre 5 : Résultats	76
I.	Dispositif expérimental d'irradiation de cellules	76
II.	L'irradiation induit des cassures simple brin dans les cellules positionnées en marge du PTV.....	77
A.	L'irradiation induit des foyers XRCC1 en marge du PTV	77
B.	L'irradiation induit des SSB dans des NHDF positionnés en marge du PTV	80
C.	Une continuité de la matière depuis le PTV est requise pour la formation de SSB dans les cellules positionnées en marge	86
III.	Les SSB formées dans les cellules positionnées en marge du PTV s'accumulent au cours d'irradiations fractionnées.....	88
A.	Un protocole de radiothérapie fractionnée induit des SSB dans les NHDF positionnés en marge du PTV.....	88
B.	L'irradiation fractionnée altère les capacités de réparation des SSB des NHDF positionnés en marge du PTV.....	90
C.	Le défaut de réparation des SSB est corrélé à une diminution de l'activité de PARylation.....	94
IV.	L'accumulation de SSB est corrélée avec une induction de sénescence	95
V.	Certaines cellules sénescents peuvent s'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire pour donner des cellules filles transformées	108
A.	Principe du Tri.....	108
B.	Certaines cellules sénescents issues de la marge sont capables d'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence et acquièrent des capacités néoplasiques.	110
1.	Les cellules PSNE sont invasives	110
2.	Les cellules PSNE sont mutées.....	110

3.	Le séquençage du génome des cellules PSNE démontre un profil de mutation particulier.....	114
a.	Principe du séquençage CODE-seq	114
b.	Analyse de l'ontologie des gènes mutés	114
c.	Comparaison de la liste de gènes mutés avec la base donnée COSMIC	120
d.	Analyse du profil de mutations	120
4.	les cellules PSNE ne sont pas suffisamment transformées pour former une tumeur in vivo.....	124
VI.	L'accumulation de SSB est suffisante pour induire un état de sénescence duquel certaines cellules peuvent s'échapper	125
A.	Mise au point d'un protocole permettant d'induire spécifiquement des SSB	125
B.	L'accumulation de foyers XRCC1 anormaux est corrélée avec la survenue d'un plateau de sénescence.....	132
C.	Certaines cellules ont la capacité de sortir de cet état de sénescence et génèrent des cellules filles mutées..	136
VII.	In vivo, l'irradiation induit des SSB dans les cellules de la peau localisées en marge du PTV	137
A.	Dispositif expérimental d'irradiation de souris en marge du PTV.....	137
B.	In vivo, l'irradiation induit des SSB dans les cellules de la peau localisées en marge du PTV	140
VIII.	Une irradiation fractionnée induit-elle de la sénescence dans des souris positionnées en marge du PTV ?	142
IX.	Expériences préliminaires d'utilisation des sénolytiques	144
A.	Le Navitoclax (ABT-263) permet l'élimination spécifique des fibroblastes sénescents radio-induits.....	144
B.	La combinaison Dasatinib et Quercetin ne permet pas l'élimination spécifique des fibroblastes sénescents radio-induits.....	145
Chapitre 6 : Discussion		146
I.	Mécanismes d'entrée en sénescence des cellules irradiées en marge	147
II.	Mécanismes de l'échappement de l'arrêt du cycle associé à la sénescence	148
A.	Rôle de la multinucléation des cellules sénescents dans l'émergence post-sénescence ?.....	148
B.	Altération des voies d'arrêt dans le cycle cellulaire ?	148
C.	Les SSB : un déterminant important de l'émergence ?.....	149
1.	Les SSB à l'origine des mutations des cellules PSNE ?.....	149
2.	DSB versus SSB non réparées : le déterminant de la stabilité de l'arrêt du cycle ?	150
III.	Activité de PARylation et risque de second cancer	152
A.	Causes de la baisse d'activité de PARylation	152
B.	L'utilisation d'inhibiteurs de PARP pour induire la létalité synthétique : un risque d'induire des cancers secondaires ?.....	153
IV.	Les nouvelles techniques de radiothérapie et le risque de cancer secondaire	153
A.	Radiothérapie par modulation d'intensité.....	153
B.	Hadronthérapie	156
Bibliographie		158
ANNEXES		186



Figure 1 : Schéma résumant les principales modifications associées à l'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence

Chapitre 1 : Sénescence cellulaire : définition et rôle dans les cancers

La sénescence cellulaire est définie comme un arrêt du cycle cellulaire associé à un état de réponse au stress. Il est important de ne pas considérer cet état comme un état de mort cellulaire. En effet, la cellule sénescence est une cellule vivante, métaboliquement active.

I. Changements phénotypiques caractéristiques de l'état sénescence

Les cellules sénescence présentent différentes caractéristiques (**Figure 1**) qui permettent de définir cet état. Cependant, ces caractéristiques peuvent partiellement différer en fonction du type cellulaire et/ou de l'inducteur de sénescence. Le temps est aussi un facteur à prendre en compte dans la caractérisation du phénotype sénescence¹. En effet, la sénescence est un état dynamique dont les différentes caractéristiques peuvent s'établir avec une cinétique propre qui peut varier, là aussi, en fonction du type cellulaire ou de l'inducteur de sénescence. Dans cette première partie, nous allons décrire les principaux changements phénotypiques qui définissent la sénescence, dont certains sont couramment utilisés comme marqueurs de sénescence (voir aussi chapitre III).

A. Arrêt dans le cycle cellulaire

Les cellules sénescence sont arrêtées dans le cycle cellulaire majoritairement en phase G1 et dans une moindre mesure en phase G2². La cellule sénescence acquiert de ce fait des marqueurs d'arrêt du cycle. Parmi ces marqueurs, on trouve les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKI) p16^{INK4A} (*CDKN2A*) et p21^{WAF1/CIP1} (*CDKN1*) dont les expressions sont augmentées transcriptionnellement à la sénescence. P16^{INK4A} inhibe les complexes cycline D/CDK6 et cycline D/CDK4 qui sont responsables de la transition G1/S. P21^{WAF1/CIP1} inhibe également ces deux complexes, mais aussi les complexes cycline A/CDK1 et cycline A/CDK2, ainsi que le complexe cycline B/CDK1 associé à la transition G2/M^{3,4}. Ces inhibitions conduisent à une hypophosphorylation de Rb, ce qui va autoriser sa fonction inhibitrice d'E2F, un facteur de transcription dont l'activité est essentielle à la transition G1/S. L'une des conséquences de cet arrêt en phase G1 est l'accumulation de la cycline D1^{5,6}.

B. Changements morphologiques

Il est bien connu que les cellules sénescence subissent des changements morphologiques. Elles s'étalent plus sur leur support de culture, ont une taille plus importante associée à une augmentation

du volume du noyau et du cytoplasme, et présentent éventuellement un changement de forme (les fibroblastes par exemple passent d'une forme en fuseau à une forme étoilée).

Il a été montré que, dans les cellules épithéliales, l'augmentation du volume cellulaire était due à l'activation de la voie mTOR (*Mechanistic Target Of Rapamycin*). mTOR est une sérine/thréonine kinase ayant de très nombreuses cibles lui permettant de réguler divers phénomènes tels que les synthèses protéique, nucléotidique et lipidique, l'autophagie, la survie et la prolifération. mTOR agit en complexes appelés mTORC1 et mTORC2. mTORC1, en inhibant 4EBP1 (*eIF4E Binding Protein 1*), permet la libération de eIF4E (*eukaryotic translation Initiation Factor 4E*) qui, associé à eIF4G, permet l'initiation de la traduction et donc l'augmentation de la production totale de protéines⁷⁻⁹.

L'étalement et les changements de forme des cellules sénescents sont associés à un réarrangement du cytosquelette, avec notamment une augmentation de l'expression de la vimentine et une réorganisation des protéines d'adhérence telles que la vinculine et la paxilline^{1,10}.

C. Activité SA-β-galactosidase

L'une des caractéristiques les plus connues de la sénescence est l'augmentation de l'expression et de l'activité de la β-galactosidase, appelée *Senescence Associated-beta-Galactosidase* (SA-β-Gal). L'activité de cette enzyme lysosomale codée par le gène GLB1 est un marqueur fréquemment utilisé pour détecter la sénescence¹¹. L'activité SA-β-Gal est mesurée à pH 6 in vitro et in vivo. Ce pH n'est pas le pH optimal pour l'activité de cette enzyme, mais la charge importante de cette enzyme dans les cellules sénescents permet la détection de leur activité à ce pH suboptimal de façon différentielle par rapport à des cellules proliférantes¹¹. Néanmoins, cette activité est également détectable en quiescence induite par la privation de sérum ou la confluence cellulaire¹².

D. Altérations mitochondriales, stress oxydant et changements métaboliques associés à la sénescence

La cellule sénescente est métaboliquement active, mais son métabolisme est modifié par rapport à une cellule en croissance exponentielle. De plus, elle présente un niveau de stress oxydant élevé.

Au niveau mitochondrial, il a été démontré un défaut dans la chaîne respiratoire. Ainsi, une diminution de l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire, qui entraîne une baisse du potentiel membranaire et une augmentation de la formation d'espèces réactives de l'oxygène, a été observée dans de la sénescence induite par irradiation¹³. De plus, la dynamique mitochondriale est également

affectée. Il a été démontré une baisse de l'expression de FIS1³ conduisant à une diminution de la fission des mitochondries dans les cellules sénescents et ainsi à la formation de mitochondries géantes et allongées. Ceci pourrait impacter le contrôle qualité des mitochondries en empêchant leur autophagie³. Cette altération morphologique des mitochondries est accompagnée d'une augmentation de leur masse au sein de la cellule sénescents¹⁴.

Notre équipe a montré que la sénescence des kératinocytes épidermiques humains était associée à une augmentation d'expression et d'activité du facteur de transcription NF-κB. Ceci conduit à une augmentation de l'expression de la MnSOD (*Manganese Superoxide Dismutase*). Cette enzyme mitochondriale convertit l'anion superoxyde O₂⁻ en peroxyde d'hydrogène. En l'absence d'une augmentation coordonnée de l'expression de la catalase ou de la glutathion peroxydase pouvant éliminer le peroxyde d'hydrogène, la concentration de celui-ci augmente dans les cellules^{15,16}. Ce stress oxydant est responsable de dommages oxydants tels que des cassures simple brin de l'ADN, des bases oxydées, la formation de lipofuscine ainsi qu'une augmentation de la mitophagie^{16,17}. De plus, ce stress oxydant, via les cassures simple brin de l'ADN induites, a été montré comme responsable de la survenue de la sénescence des kératinocytes^{17,18}.

La sénescence est également accompagnée d'une augmentation des rapports AMP : ATP et ADP : ATP. L'augmentation du rapport AMP : ATP induit l'activation de l'AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*). L'AMPK est impliquée dans la phosphorylation de p53. Elle est aussi responsable de l'augmentation de l'expression de p21 et p27 consécutive à la phosphorylation de p53 et de la répression de gènes favorisant la prolifération comme la cycline A. Ceci a été montré dans les cellules endothéliales^{1,19}. Néanmoins, il est à noter que de nombreuses études montrent au contraire une diminution de l'activité de l'AMPK lors de la sénescence, notamment dans les fibroblastes²⁰.

La sénescence est aussi associée à une diminution de la concentration en NAD⁺ qui sert de substrat pour l'activité de nombreuses enzymes. C'est le cas de la Sirtuine 1, une enzyme qui, en présence de NAD⁺, désacétyle p53 afin de prévenir son activation²¹⁻²³.

Le métabolisme des glucides est aussi modifié dans les cellules sénescents, avec une augmentation de la glycogénèse.^{1,24,25}

On observe également une modification du métabolisme des lipides avec une augmentation de surface des membranes associée à l'augmentation de la taille de la cellule et du nombre de ses organites. Cette lipogénèse est dirigée par le facteur de transcription SREBP1²⁶.

E. Augmentation de l'activité autophagique

L'autophagie, qui signifie « se manger soi-même », décrit le phénomène par lequel la cellule dégrade ses propres composants par un mécanisme impliquant les lysosomes. Il existe trois types d'autophagie : la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes. La microautophagie consiste en la captation directe de composants à dégrader par invagination des membranes lysosomales. La macroautophagie met en jeu une étape d'englobement des composants à dégrader par une double membrane créant ainsi un autophagosome. Cet autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome, afin de dégrader les composants séquestrés. L'autophagie médiée par les chaperonnes (ou CMA, *Chaperone Mediated Autophagy*) nécessite une séquence KFERQ dans les protéines à dégrader. Cette séquence est reconnue par la chaperonne HSC70 qui amène la protéine cible jusqu'au lysosome au niveau du récepteur LAMP2A. L'oligomérisation de ce récepteur permet alors de faire rentrer la protéine à l'intérieur de la lumière du lysosome dans laquelle elle sera dégradée²⁷.

La sénescence est accompagnée d'une augmentation de la macroautophagie²⁸⁻³⁰ (désignée simplement « autophagie » dans la plupart des études), ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la charge lysosomale et l'augmentation de l'activité SA- β -Gal. Il est à noter que cette augmentation de l'autophagie n'est pas intuitive, car la sénescence est parfois associée à l'activation de la voie mTOR qui inhibe l'autophagie^{25,31,32}. L'activité autophagique pourrait être non ciblée (*in bulk*) ou ciblée. Par exemple, la lamine B1 est dégradée lors de la sénescence par autophagie. Cette dégradation peut s'accompagner d'une dégradation d'une partie de la chromatine par autophagie^{28,33}. On observe à l'inverse une baisse de la mitophagie (autophagie des mitochondries) lors de la sénescence. Cette dernière serait due à l'augmentation du volume des mitochondries lors de la sénescence²¹.

Une étude de l'équipe de Narita suggère que l'autophagie serait un phénomène prosénescence. En effet, dans des fibroblastes IMR90, l'inhibition de l'autophagie retarde la venue du plateau de sénescence induit par la surexpression d'oncogène sans toutefois l'abolir³⁴. Cette étude suggère aussi que l'autophagie aurait un rôle dans la synthèse des composants du sécrétome associé à la sénescence (voir paragraphe H), notamment de l'IL-6 et l'IL-8. En effet, l'autophagie permettrait d'augmenter la quantité d'acides aminés libres qui, à leur tour, permettraient d'activer mTOR et serviraient dans la synthèse massive des protéines sécrétées^{25,34}.

Un autre lien de causalité entre autophagie et sénescence serait la dégradation par autophagie de $\Delta 133p53\alpha$, une isoforme de p53 qui a la propriété d'inhiber les fonctions de p53 en partie par dominant négatif³⁵. Ainsi, l'autophagie participerait à la stabilisation de p53, un acteur majeur de la sénescence³⁶.

À l'inverse, certaines études suggèrent que l'autophagie serait un phénomène antisénescence. En effet, en assurant l'homéostasie cellulaire par la dégradation des molécules et organites défectueux comme les mitochondries ayant subi une chute de potentiel membranaire, l'autophagie diminuerait le stress oxydant qui participe à l'induction du phénotype sénescent. Ceci a été démontré par l'inhibition d'*ATG7* et *ATG5* (gènes impliqués dans l'autophagie) dans des fibroblastes primaires. Cette inhibition a permis d'induire la sénescence³⁷.

D'un point de vue général, des études suggèrent donc que l'autophagie pourrait être un frein à l'établissement de la sénescence par le maintien de l'homéostasie et la réduction des stress responsables de la sénescence comme le stress oxydant. À l'inverse, une fois la sénescence établie, l'autophagie maintiendrait la cellule dans cet état en assurant le recyclage des acides aminés résultant de la dégradation des protéines altérées pour la néosynthèse des protéines du sécrétome et agirait dans certaines voies prosénescentes comme p53. Ceci suggère que, selon sa sélectivité, l'autophagie jouerait un rôle pro ou antisénescence. Par ailleurs, notre équipe a montré que, dans les kératinocytes épidermiques humains, le niveau de macroautophagie dicte le devenir de la cellule sénescente vers la mort ou la survie²⁹. De plus, il a aussi été montré que l'inhibition de l'autophagie diminuait la proportion de cellules entrant en sénescence suite à une radiothérapie, mais augmentait la proportion de cellules entrant en apoptose³⁸. Ces deux études suggèrent que le niveau d'autophagie peut augmenter à la sénescence, mais que cette augmentation doit être hautement régulée pour ne pas entraîner la mort de la cellule.

Les études citées précédemment se sont intéressées principalement à la macroautophagie. Les études s'intéressant au rôle de la CMA dans la sénescence montrent que ce type d'autophagie diminue avec l'âge in vivo chez le rat et in vitro avec la sénescence (pour les fibroblastes humains IMR-90). Cette diminution de CMA serait due à une baisse de la localisation lysosomale de LAMP2A nécessaire à l'internalisation des protéines à dégrader^{39,40}. À ma connaissance, l'impact de cette diminution de la CMA dans la sénescence n'est, à ce jour, pas connu.

F. Stress réticulaire et activation de la voie UPR

La sénescence est également associée à un stress du réticulum endoplasmique (RE). Ce stress résulte probablement d'une demande importante de synthèse protéique, notamment pour la production des protéines sécrétées, dépassant les capacités du RE⁴¹. Ceci conduirait à l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE. La cellule répond à ce stress par deux voies : la voie ERAD (*ER-Associated protein Degradation*), qui assure le transfert des protéines mal conformées vers le protéasome, et la voie UPR (*Unfolded Protein Response*) qui entraîne de nombreuses

conséquences dont celle d'inhiber la synthèse protéique afin de restaurer la protéostasie. Les travaux de notre équipe montrent que l'inhibition de la voie UPR, en particulier de la voie ATF6 α , agit sur les modifications morphologiques associées à la sénescence, sur l'activité SA- β -Gal et sur la synthèse des protéines du sécrétome^{41,42}.

G. Changements épigénétiques

Les cellules sénescents présentent de nombreux changements épigénétiques. Parmi ceux-ci, on compte un remodelage de la chromatine avec, par exemple, la formation de foyers d'hétérochromatine (SAHF, *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*) qui sont d'anciennes zones d'euchromatine qui se sont condensées à la sénescence. Ces zones regroupent des séquences de gènes nécessaires à la prolifération, comme celui de la cycline A. Dans les SAHF, on retrouve des marques épigénétiques telles que l'augmentation de la présence de variants d'histones, des changements dans les modifications post-traductionnelles des histones, ou des modifications dans la présence de protéines non-histones comme HP1⁴³. On note par exemple l'augmentation du variant H3.3 et de sa forme clivée en N-terminal dont l'incorporation dans la chromatine est indépendante de la réplication, contrairement au variant H3.1. On note aussi la présence de macroH2A (un variant de l'histone H2A)⁴³. La fonction de ce variant n'est pas claire. Au début de la sénescence, il est retrouvé dans les promoteurs des gènes codant les protéines spécifiques du sécrétome sénescents et promeut leur activité. Lors de la sénescence, ce variant migre vers les SAHF et participe au maintien de l'hétérochromatine^{31,44,45}. On observe aussi un changement dans la méthylation des histones avec la tri-méthylation de H3 sur les lysines 4, 9, 27 et 36 ainsi que des modifications dans leur acétylation (on note une augmentation de l'acétylation H4K16Ac et une diminution de H3K56Ac)⁴⁴.

On observe également des changements dans la méthylation de l'ADN avec une hypométhylation des sites CpG. Cette hypométhylation est due en partie à la baisse d'expression de la DNA méthyltransférase DNMT1^{43,46}.

H. Sécrétome associé au phénotype sénescence (SASP)

La sénescence est associée à un secrétome particulier appelé *Senescence Associated Secretory Phenotype* (SASP). Parmi les facteurs sur-sécrétés, on trouve des cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-6, IL-8 et l'IFN γ , des facteurs de croissance dont le FGF, l'HGF et l'EGF, des facteurs proangiogéniques tels que le VEGF et l'angiogénine, et des facteurs de remodelage de la matrice extracellulaire tels que les MMP-1, -3, -10, -12, -13 et -14. Les fibroblastes sénescents sécrètent également des composants structuraux de la matrice dans des proportions différentes de celles sécrétées par des fibroblastes jeunes. Par exemple, les fibroblastes sénescents sécrètent plus de fibronectine que les fibroblastes non sénescents⁴⁷.

Le SASP résulte principalement de l'activation des facteurs de transcription de la famille NF- κ B, notamment par la voie DDR ou par la voie p38MAPK, qui elle-même est activée suite au stress oxydant chronique^{48,49}. De manière intéressante, la production du SASP entraîne un stress du RE qui provoque lui-même un stress oxydant pouvant endommager l'ADN et/ou activer la voie p38MAPK et entraîner ainsi une boucle de rétroaction positive³¹. ATM, qui est un activateur de NF- κ B et donc du SASP, inhibe la production du SASP via le recrutement de macroH2A. En effet, macroH2A est une marque épigénétique répressive de la transcription. ATM recrute macroH2A au niveau des promoteurs des gènes du SASP, inhibant ainsi leur transcription⁴⁵. De plus, la voie NOTCH, dont l'activation est dynamique lors de la sénescence, est un inhibiteur du SASP, ce qui conduit à des fluctuations dans la production du SASP au cours de la sénescence^{50,51}.

I. Résistance à l'apoptose

De manière contre-intuitive, la cellule sénescence est résistante à l'apoptose. Cette résistance concerne notamment la voie intrinsèque de l'apoptose mettant en jeu les mitochondries. Suite à un signal proapoptotique, BAX et BAK forment un canal qui perméabilise la membrane externe des mitochondries permettant le relargage du cytochrome C. Celui-ci s'associe alors à APAF-1 pour former l'apoptosome qui active la procaspase 9 en caspase 9, laquelle active à son tour les caspases effectrices de l'apoptose, à savoir les caspases 3 et 7. Dans les cellules sénescences, on observe une surexpression des protéines antiapoptotiques de la famille BCL-2 qui, par hétérodimérisation, inhibent BAX et BAK. Dans les cellules sénescences, on compte parmi les protéines antiapoptotiques surexprimées BCL-2, BCL-XL, BCL-w et MCL-1^{3,4,52,52,53}. L'augmentation d'expression de BCL-2 est due à l'activation du facteur de transcription CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*)⁵⁴. BCL-XL a quant à elle une traduction augmentée grâce à un motif IRES⁵⁵. BCL-w, pour sa part, est up-régulée de manière transcriptionnelle⁵. De plus, la transcription de BAX est inhibée de manière épigénétique⁵⁶.

Concernant la voie extrinsèque de l'apoptose mettant en jeu des récepteurs à domaine de mort, une résistance peut être observée en raison de l'augmentation d'expression des *Decoy receptors* DcR1 et DcR2. Ces récepteurs possèdent une partie extracellulaire semblable aux récepteurs de mort, qui leur permet de lier les ligands inducteurs comme TRAIL, mais sont dépourvus de la partie intracellulaire permettant la multimérisation et l'activation de la caspase 8. Une étude a montré que l'inhibition de DcR2 dans des fibroblastes sénescents augmente leur sensibilité à la mort induite par TRAIL⁵⁷. Une autre étude montre que des hépatocytes induits en sénescence par la chimiokine CCL4 ont une expression de DcR2 augmentée. Cette augmentation est en partie responsable de la résistance à la mort induite par les cellules *Natural Killer*⁵⁸. Ceci pourrait suggérer que les cellules sénescences seraient capables d'échapper en partie à la clairance par le système immunitaire. Néanmoins, cette résistance à l'apoptose induite par DcR2 serait spécifique du type cellulaire. Par exemple, les cellules endothéliales sénescences sont plus sensibles à la mort induite par FAS-L et TNF- α que les cellules endothéliales en croissance exponentielle⁵⁹. Concernant DcR1, malgré son augmentation d'expression dans les cellules sénescences, à ma connaissance aucune étude n'a encore montré son rôle dans la résistance à l'apoptose des cellules sénescences.

II. Principaux mécanismes inducteurs de sénescence

La sénescence peut être définie comme un état d'arrêt dans le cycle cellulaire associé à de nombreux changements qui, globalement, reflètent un état d'adaptation au stress. La sénescence peut être induite par différents types de stress, qu'ils soient physiologiques, associés au vieillissement, ou survenant dans différents contextes agressifs. Ces différents stress définissent quatre sous-types principaux de sénescence qui partagent la plupart des caractéristiques décrites dans le paragraphe précédent : la sénescence répllicative, la sénescence prématurée induite par le stress (le plus souvent oxydant), la sénescence induite par les thérapies (anticancéreuses) et la sénescence induite par l'activation oncogénique. Ces stress induisent la sénescence principalement par leur effet génotoxique, générateur de dommages à l'ADN : altération des télomères, cassures de l'ADN et blocage des fourches de réplication. L'induction du phénotype sénescence implique que ces dommages subis par l'ADN demeurent non réparés et signalisés en permanence. Dans ce chapitre, nous allons donc d'abord décrire les voies de signalisation des dommages à l'ADN associés à la sénescence, puis nous présenterons les différents stress pouvant être à l'origine de l'état de sénescence.

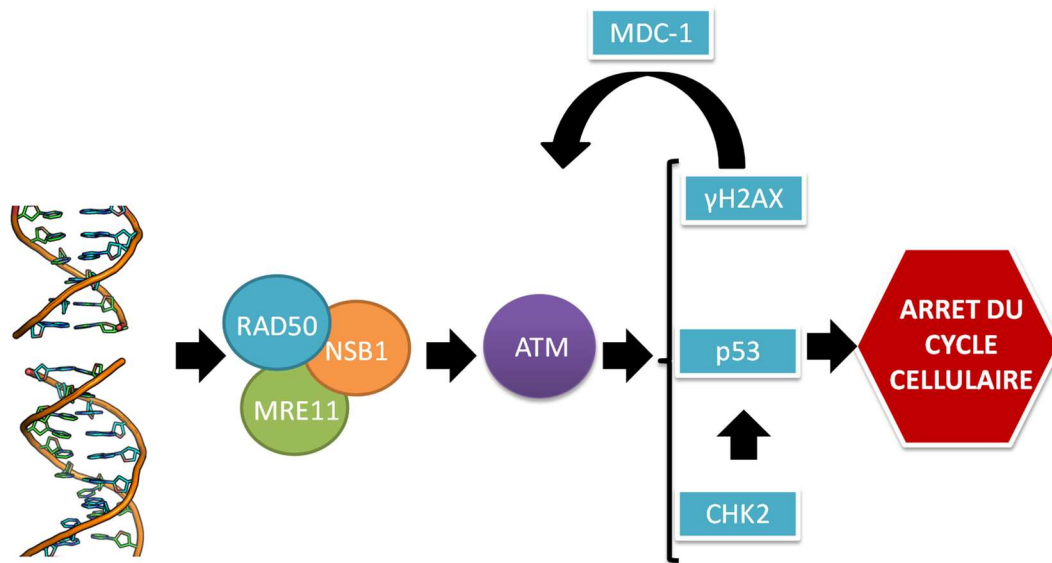


Figure 2 : Schéma simplifié de la voie DDR en réponse à une cassure double brin de l'ADN. La cassure est détectée par le complexe MRN responsable, entre autres, du recrutement de la kinase ATM. Cette dernière va phosphoryler de nombreuses cibles dont γ H2AX. γ H2AX sert au signalement de la cassure et au recrutement de MDC-1 qui permet d'amplifier l'activation d'ATM. ATM va activer CHK2 et p53. CHK2 est une kinase qui a de nombreuses cibles dont p53. p53, gardien du génome, va provoquer l'arrêt du cycle, notamment par l'activation transcriptionnelle de p21, une CKI⁶⁰.

A. Dommages à l'ADN associés à la sénescence et voies de signalisation

Il existe deux types de dommages à l'ADN inducteurs de sénescence : ceux dont la signalisation est réalisée par la voie de réponse au dommage de l'ADN (voie DDR) (**Figure 2**) et ceux dont la signalisation ne dépend pas de la voie DDR et est réalisée par la voie de réparation des cassures simple brin de l'ADN (voie SSBR) (**Figure 3**).

1. Dommages à l'ADN induisant la voie DDR

La voie DDR est activée par des cassures double brin de l'ADN (DSB pour *double-strand break*), définies comme la rupture du squelette sucre-phosphate sur les deux brins de l'ADN à une distance inférieure à 10 pb, des télomères déprotégés assimilables à une cassure double brin dite *one-ended* et des fourches de réplication bloquées.

Il existe deux sous-voies DDR, l'une impliquant la kinase ATM, l'autre la kinase ATR. La branche ATM est activée par les DSB franches, y compris les *one-ended*. La cassure est initialement reconnue par le complexe MRN composé de MRE11, RAD50 et NBS1. Ce complexe a une activité d'exonucléase qui conduit à une résection des extrémités d'ADN et il a également comme fonction de recruter ATM. Celle-ci est une kinase capable de phosphoryler environ 700 cibles. Parmi celles-ci, on trouve le variant de l'histone H2A : H2AX dont la forme phosphorylée se note γ H2AX. γ H2AX sert de plateforme pour le recrutement des facteurs de signalisation et de réparation. Elle permet notamment de recruter MDC-1 qui possède un site de liaison avec γ H2AX et ATM. Leur interaction va favoriser l'autophosphorylation d'ATM, ce qui va entraîner une boucle d'intensification du signal. ATM, quant à elle, recrute et phosphoryle CHK2. Cette dernière phosphoryle CDC25A pour la rendre inactive. CDC25A, en complexe avec CDC25C, a une activité phosphatase qui maintient CDK2 et CDK1 sous forme déphosphorylée. CDK2 est nécessaire à la progression de la phase S et au début de la phase G2, alors que CDK1 permet la transition de G2 vers M. Ainsi CHK2, via la phosphorylation de CDC25A, empêche les transitions G1/S et G2/M. ATM et CHK2 peuvent aussi activer p53 en la phosphorylant sur la Ser15 pour ATM et la Ser20 pour CHK2. Ainsi activé, p53 induit l'expression de p21 qui est un inhibiteur des CDK2 et CDK4, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. ATM recrute également des adaptateurs tels que 53BP1 qui permet d'orienter la réparation vers la NHEJ (*Non Homologous End-Junction*) en inhibant l'initiation de la recombinaison homologue⁶⁰ (**Figure 2**).

La branche ATR de la voie DDR est mise en jeu par des DSB comportant une extrémité simple brin sortant longue, ainsi que par les fourches de réplication bloquées. Dans les deux cas, la portion d'ADN simple brin est reconnue, recouverte et ainsi protégée par la fixation de la protéine RPA. RPA, en interaction avec ATRIP, recrute ATR, une kinase apparentée à ATM. ATR active alors CHK1, une kinase apparentée à CHK2, dont les cibles sont en partie similaires à celles de CHK2. La suite de la voie est donc commune avec celle décrite précédemment et conduit *in fine* à un arrêt du cycle cellulaire⁶⁰.

En ce qui concerne la réparation des DSB, celle-ci peut se faire par deux voies : la recombinaison homologue ou la NHEJ. Brièvement, lors de la recombinaison homologue, les extrémités de la cassure subissent une résection par le complexe MRN qui intervient au début de la voie DDR. Les portions d'ADN simple brin ainsi créées vont être recouvertes par RPA. Puis RPA va être remplacée par RAD51 qui a pour rôle de « trouver » le brin homologue. Celui-ci va servir de matrice pour la synthèse des séquences manquantes. Cette réparation peut induire un *crossover* entre les deux chromosomes homologues⁶¹. En ce qui concerne la NHEJ, le processus est initié par la fixation de Ku70 et Ku80 sur les extrémités de la cassure, afin de permettre le recrutement de DNA-PK. DNA-PK est une kinase qui permet d'activer de nombreux substrats dont ATM. Cette dernière va recruter et phosphoryler l'endonucléase ARTEMIS qui va permettre de rendre les extrémités acceptables pour une ligation. Dans certains cas, l'endonucléase ARTEMIS peut être remplacée par PNKP pour rétablir les bonnes extrémités. La polymérase λ va synthétiser la séquence manquante et la ligase 4 assure la ligation finale. La voie décrite ici est la NHEJ dite canonique. Il existe des voies de réparation par NHEJ alternative que nous ne détaillerons pas ici⁶¹.

La résolution des fourches de réplication bloquées peut se faire via différentes voies. La première est la résolution du problème à l'origine du blocage de la fourche. Pour les fourches bloquées à cause d'un manque de dNTP, l'ajout de dNTP permet de redémarrer la réplication, à condition que la déprivation soit de courte durée (2 h d'après l'étude de Petermann et al.)⁶². Pour des blocages dus à des dommages à l'ADN, il existe des mécanismes qui permettent de passer le dommage afin de poursuivre la réplication que nous ne détaillerons pas ici^{63,64,65}. Néanmoins, si ces différents mécanismes échouent à restaurer une fourche de réplication fonctionnelle, celle-ci peut conduire à la formation de cassures double brin qui seront réparées par recombinaison homologue ou NHEJ^{62,66-68}.

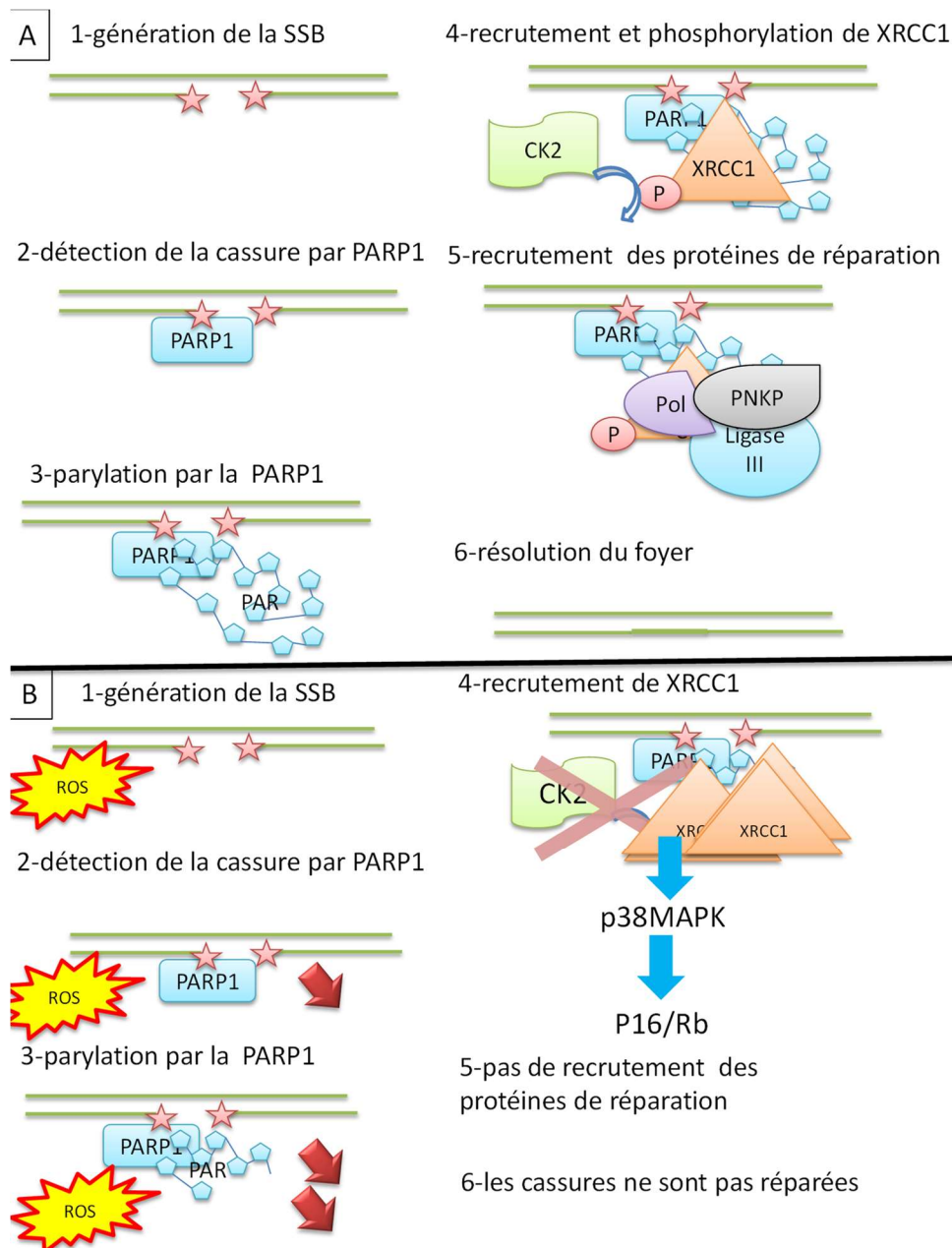


Figure 3 : A. Schéma simplifié de la voie SSB. Lors d'un stress oxydant par exemple, une cassure simple brin peut être générée (1). La PARP1 la détecte (2), puis s'active et synthétise des PAR (3). Cette activité permet le recrutement puis la phosphorylation de XRCC1 (4). XRCC1 sert ensuite de plateforme pour le recrutement et l'activation des protéines de réparation (5). Cela va permettre la réparation de la cassure qui s'ensuit du départ de XRCC1, de la PARP1 et de la dégradation des PAR. **B. Cas de la signalisation SSB dans les cellules épithéliales sénescences.** Cette sénescence est associée à une augmentation du stress oxydant générateur de cassures simple brin (1). La PARP1, dont l'expression est diminuée en situation de stress oxydant, la détecte (2), puis s'active et synthétise de courtes chaînes de PAR (3). Cette activité va tout de même permettre le recrutement de XRCC1, mais pas sa phosphorylation. Ce défaut conduit à l'accumulation de XRCC1, ce qui permet d'activer la p38MAPK et d'aboutir ainsi à l'activation de la voie p16/Rb (4). L'accumulation de XRCC1 non phosphorylé ne permet pas de recruter les autres protéines nécessaires à la réparation de la cassure (5). Ainsi, la cassure va rester non réparée. Schéma établi d'après Nassour, J. et al. Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. Nature Communications 7, 10399 (2016)¹⁸.

2. Cassures simple brin et activation de la voie SSBR

La voie SSBR est, comme son nom l'indique, activée à la suite d'une cassure simple brin de l'ADN (SSB pour *single-strand break*) que l'on peut définir comme une discontinuité du squelette sucre-phosphate sur un seul brin d'ADN, souvent associée à la perte d'un nucléotide. Cette cassure est détectée préférentiellement par la poly(ADP-Ribose) Polymérase 1 (PARP1) ou, dans une moindre mesure, par la PARP2. Ces deux enzymes ont des fonctions redondantes. Elles font partie d'une famille de 17 membres possédant un domaine NAD⁺ permettant la PARylation. La PARP1 assure 80 % de l'activité de PARylation au niveau cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN⁶⁹. Lorsqu'elle se fixe à l'ADN, son activité de PARylation augmente de 10 à 500 fois. Elle synthétise alors des chaînes de poly(ADP-ribose) (PAR). Ces chaînes comprennent des répétitions de 200 ADP-riboses. Elles sont synthétisées soit sous forme libre, soit fixées covalentement à un accepteur qui peut être la PARP1 ou 2, les histones (H2A, H2B, H3 et H4), XRCC1 ou la ligase 3. La PARylation des histones a pour fonction de détendre la chromatine afin de permettre l'accès des protéines de signalisation et de réparation. L'agrégation de PAR au niveau du site de cassure permet le recrutement de XRCC1. XRCC1 ainsi recruté à la cassure sert de plateforme pour le recrutement des autres protéines de réparation et permet d'augmenter leur activité. Les foyers de PAR permettent également de recruter la kinase CK2 dont le rôle est de phosphoryler XRCC1. Cette phosphorylation est nécessaire au recrutement des autres protéines de réparation ainsi qu'à la dissociation finale du complexe de réparation. De plus, l'autoPARylation de PARP1 permet son expulsion de l'ADN par répulsion des charges négatives, ce qui contribue aussi à la résolution du foyer de réparation⁷⁰ (**Figure 3**). La première étape de réparation proprement dite est le rétablissement des extrémités 3'hydroxyle et 5'phosphate. La réalisation de cette étape dépend bien sûr du type d'extrémité anormale générée lors de la cassure. Parmi les enzymes engagées dans cette étape, on note l'implication de PNKP, d'APE1 et de l'ADN polymérase β . Ensuite, l'ADN polymérase β intervient dans la synthèse des nucléotides manquants, c'est ce que l'on appelle la voie *short patch*. Il existe également une voie dite *long patch* lors de laquelle les ADN polymérases δ et ϵ servent à remplacer une dizaine de nucléotides. La réparation est finalisée par l'action de la ligase 3 pour le *short patch* et de la ligase 1 pour le *long patch*⁷⁰.

3. SSB, DSB et fourches de réplication bloquées non réparées : de puissants inducteurs de sénescence

Hormis quelques exceptions, la sénescence est associée à des dommages à l'ADN qui demeurent non réparés, ce qui active en permanence les voies d'arrêt dans le cycle cellulaire⁷¹. Les raisons de ces non-réparations des dommages dans les cellules sénescents ne sont pas très claires et dépendent certainement de plusieurs facteurs qui varient selon les inducteurs de sénescence présentés ci-après.

B. Sénescence répllicative

On doit la découverte de la sénescence à Leonard Hayflick. Il a déterminé *in vitro* que des fibroblastes primaires diploïdes ne pouvaient subir qu'un nombre limité de passages en culture⁷². Ce nombre limité de passages est dû au raccourcissement des télomères⁷³. Les télomères sont les extrémités des chromosomes. Ils sont composés d'une séquence répétée « TTAGGG ». Ils présentent une extrémité 3' sortante simple brin qui, si elle est suffisamment longue, forme une structure en boucle, appelée *T-loop*, en s'insérant dans l'ADN double brin. Lors de la réplication, l'ADN polymérase n'a pas la possibilité de répliquer cette terminaison 3' simple brin, ce qui va conduire au raccourcissement des télomères de 100 à 200 paires de bases à chaque réplication. Lorsque le raccourcissement est devenu trop important, l'extrémité 3' sortante ne peut plus former la *T-loop*. L'extrémité télomérique ainsi dévoilée est reconnue comme une cassure double brin de l'ADN, ce qui entraîne l'activation de la voie DDR. Cette voie DDR va aboutir à l'activation de p53/p21 responsable de l'arrêt du cycle^{74,75}.

Il faut noter que la conformation en *T-loop* est stabilisée par les protéines shelterines : TPP1 (*telomere protection protein 1*), ACD (*adrenocortical dysplasia homolog*), TRF1 (*telomere repeat factor*), TRF2, TIN2 (*Interacting nuclear factor*), POT1 (*protection of telomere protein*). Une étude s'intéressant à la sénescence induite par le tabagisme dans les cellules épithéliales et fibroblastes pulmonaires montre que la dégradation de TPP1 est responsable d'une augmentation de l'attrition des télomères activant la voie DDR et, par conséquent, de l'induction d'un phénotype sénescents⁷⁶.

Kim et al. se sont intéressés à la dynamique de la sénescence répllicative⁷⁷. Pour cela, ils ont étudié des fibroblastes primaires de derme humain qu'ils ont cultivés jusqu'à atteindre la sénescence répllicative. Ils ont tout d'abord constaté que les cellules présentaient une augmentation du stress oxydant sans que celui-ci ne semble affecter la prolifération. Puis, après de nombreux passages, ils ont observé une augmentation de la taille des cellules et de leur granularité, associée à un ralentissement de croissance. Enfin, après un certain délai, ils ont noté une augmentation de l'activité

SA- β -Gal. De manière étonnante, ils ont observé deux phases dans l'activité SA- β -Gal : une première phase où les cellules présentaient une légère augmentation de cette activité et une deuxième phase où les cellules avaient une plus forte activité. En complément de ces mesures, ils ont effectué un RNAseq qui a permis de discerner quatre phases :

- Une phase précoce durant laquelle les cellules continuent à proliférer.
- Une phase intermédiaire associée à des changements métaboliques ainsi qu'à des changements dans la synthèse des ARNt.
- Une phase avancée durant laquelle les cellules expriment les régulateurs du cycle cellulaire et arrêtent de proliférer. Cette phase est associée à l'expression des cytokines pro-inflammatoires du SASP.
- Une phase très avancée durant laquelle les cellules expriment des gènes associés à la mort cellulaire et à la régulation de la croissance cellulaire.

De manière intéressante, l'expression des facteurs du SASP change au cours de ces différentes phases⁷⁷.

La sénescence réplivative est une limite de prolifération à laquelle chaque type cellulaire est théoriquement confronté. Néanmoins, il existe l'exception des cellules souches et tumorales exprimant la télomérase permettant l'élongation de l'extrémité 3' du chromosome. La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique composé d'un ARN de séquence complémentaire à la séquence télomérique, d'une protéine TERT (*telomerase reverse transcriptase*) et de DKC1 (Dyskerin 1) assurant la formation et la stabilité du complexe télomérase. La télomérase allonge l'extrémité 3' chromosomique en utilisant son ARN interne comme matrice, puis l'ADN polymérase alpha synthétise le brin complémentaire manquant^{78,79}. D'autres mécanismes de conservation des télomères indépendants de la télomérase existent. C'est le cas du mécanisme *Alternative Lengthening of Telomeres* (ALT). Le mécanisme exact est sujet à controverse, ce serait une recombinaison homologue qui utiliserait un autre télomère comme matrice^{80,81}.

Les télomères raccourcis pourraient être réparés de façon aberrante par fusion interchromatidienne ou interchromosomique. Ceci peut s'observer dans le contexte des cellules cancéreuses, mais n'est pas observé dans le contexte des cellules en sénescence réplivative. Cela pourrait être dû à la présence des shelterines qui inhibent la réparation⁸²⁻⁸⁴.

Ainsi, la sénescence réplivative est un arrêt du cycle cellulaire dû au raccourcissement des télomères avec un phénotype dynamique au cours du temps. Chaque cellule somatique adulte

normale y est théoriquement confrontée. D'ailleurs, toute sénescence n'étant pas due à l'attrition des télomères peut être considérée comme prématurée et dénommée ainsi.

C. Sénescence prématurée induite par le stress oxydant

Avant d'atteindre la limite de Hayflick, une cellule soumise à un stress oxydant peut entrer en sénescence dite prématurée (ou SIPS pour *Stress-Induced Premature Senescence*). Le stress oxydant peut être endogène et associé au vieillissement. Dans ce cas, il est modéré et chronique. Il peut aussi être exogène, intense et aigu, induit par différents agents comme les radiations ionisantes ou les radiations UV, qui en plus d'induire du stress oxydant induisent des dommages directs à l'ADN tels que des DSB ou des *cross-linking points* bloquant les fourches de réplication. Dans ce paragraphe, nous ne traiterons que de la sénescence induite par un stress oxydant chronique modéré.

Il est admis que l'augmentation de ROS associée au vieillissement est principalement due à divers dysfonctionnements mitochondriaux^{17,21,31,85}. Il est à noter qu'il existe d'autres voies de production de ROS indépendantes des mitochondries comme l'activation de la NADPH-oxydase membranaire⁸⁶. Normalement, la production et l'élimination des ROS dits primaires (comme le peroxyde d'hydrogène H₂O₂) sont bien régulées par la cellule. Néanmoins, du fait de l'augmentation de leur production et/ou de la diminution des défenses antioxydantes de la cellule, la concentration de ces ROS primaires peut augmenter et ils peuvent évoluer en ROS secondaires, notamment en radicaux hydroxyles (•OH). Contrairement aux ROS primaires, ces ROS secondaires sont considérés comme très réactifs d'un point de vue catalytique et incontrôlés par la cellule. Ils sont la source majeure de dommages oxydants observés à la sénescence²¹. Ils vont par exemple induire des dommages à l'ADN tels que des bases oxydées, des liaisons intra- et inter-brins et des cassures simple brin de l'ADN²¹. Les ROS peuvent aussi induire une accélération du raccourcissement télomérique et l'induction de dommages activant la voie DDR. En effet, les télomères semblent spécialement sensibles aux dommages oxydants, avec une accumulation de SSB plus importante dans les séquences télomériques que dans le reste du génome^{1,76,85,87,88}.

Notre équipe a démontré que les cellules épithéliales sénescents (kératinocytes de peau et cellules épithéliales mammaires) présentaient une augmentation du stress oxydant et une accumulation de SSB. L'accumulation de SSB résulte d'une augmentation de la concentration en ROS et d'un défaut de réparation dû à la diminution d'expression et d'activité de la PARP1. L'activité de PARylation résiduelle autorise tout de même le recrutement de XRCC1 aux foyers des cassures, mais elle est insuffisante pour permettre sa phosphorylation par CK2. Ce défaut conduit à l'accumulation

de XRCC1 non phosphorylé aux foyers des cassures, ce qui bloque la réparation et conduit à la phosphorylation de la p38MAPK qui, à terme, active p16¹⁸ (**Figure 3**).

D. Sénescence induite par activation oncogénique

Un stress endogène pouvant induire de la sénescence est celui induit par la surexpression et/ou la mutation de certains oncogènes. C'est le cas des oncogènes RAS^{V12}⁸⁹, BRAF^{E600}⁹⁰, AKT⁹¹, E2F1⁹² et de la cycline E⁹³. On parle dans ce cas d'OIS (*Oncogene-Induced Senescence*). À l'inverse, la sénescence peut être induite suite à l'inactivation des suppresseurs de tumeur PTEN⁹⁴ et NF1⁹⁵. Le point commun entre ces différentes voies est que l'activation des oncogènes ou l'inhibition des suppresseurs de tumeur va induire une phase d'hyper-réplication. Celle-ci va entraîner une augmentation du nombre des réplicons et un blocage des fourches de réplication dû à un épuisement des nucléotides conduisant à l'activation de la voie DDR^{96,97}.

Il a été montré que si l'OIS ne dépend pas directement de l'attrition des télomères, elle est quand même associée à un dysfonctionnement des télomères. À l'appui de ce fait, une forte activité de la télomérase diminue la stabilité de l'arrêt du cycle cellulaire associé à l'OIS⁹⁸. De plus, l'OIS est associée à une présence importante de dommages à l'ADN au niveau des télomères⁹⁸.

L'OIS est également associée à une augmentation du stress oxydant due à une perte du potentiel mitochondrial et à l'augmentation de l'activité des NADPH oxydases membranaires NOX1 et NOX4. Le KO de NOX4 permet de diminuer le stress oxydant et d'empêcher la sénescence induite par RAS^{86,99}.

La p38MAPK est une kinase induite par différents stimuli tels que le dommage à l'ADN et le stress oxydant. La p38MAPK peut phosphoryler de très nombreux substrats qui jouent un rôle dans la prolifération, le cycle cellulaire et l'inflammation. Des expériences de KO dans des cellules induites en OIS par RAS ou RAF indiquent que l'absence de cette kinase abolit l'OIS, ce qui démontre le rôle important de cette kinase. Cette MAPK existe sous quatre isoformes : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . Ces différentes isoformes ne jouent pas le même rôle dans l'OIS. Les KO individuels des isoformes p38 α , p38 γ et p38 δ suffisent à abolir la sénescence induite par RAS. En parallèle, il a été montré que leur surexpression est suffisante pour induire la sénescence. Ces isoformes vont directement ou indirectement induire l'activation de p53 et/ou la transcription de p16¹⁰⁰⁻¹⁰².

De manière étonnante, l'activation de tous les oncogènes n'est pas capable d'induire de la sénescence. En effet, l'inactivation de certains oncogènes comme MYC peut, à l'inverse, dans des cellules tumorales, induire une sénescence prématurée¹⁰³. On parle alors d'*Oncogene Inactivation*

Induced Senescence (OIS). Le mécanisme exact est inconnu. Néanmoins, il a été montré dans une lignée cellulaire de cancer du poumon non à petite cellule déficiente pour TP53 et RB1 que l'inhibition de MYC induit un état de sénescence via l'activation de p21 et p73¹⁰⁴. Dans une autre étude sur des souris transgéniques surexprimant MYC présentant un phénotype d'induction spontanée de leucémies à cellules T, la diminution d'expression de MYC induit la sénescence via p19^{ARF} (correspondant au p14^{ARF} humain). p19^{ARF} stabilise indirectement p53 en inhibant MDM2 qui est une E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de p53. De manière étonnante, dans cette étude, la sénescence est dépendante de p19^{ARF}, mais elle est indépendante de p53. Les auteurs supposent que dans ce cas, p19^{ARF} agirait indépendamment de p53 en régulant d'autres gènes associés à la sénescence comme *E2F1* et *NF-κB*¹⁰⁵.

Ainsi, l'activation d'oncogènes ou, dans certains cas, leur inactivation ou l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur va induire de la sénescence, via un stress réplicatif induisant l'arrêt du cycle, du stress oxydant, un dysfonctionnement des télomères et/ou une activation de la voie p38MAPK.

E. *Sénescence induite par les thérapies anti-cancéreuses*

Les thérapies anticancéreuses -radiothérapie et certaines chimiothérapies- peuvent induire de la sénescence prématurée. On parle de *Therapy-Induced Senescence* (TIS).

La radiothérapie a comme effet, entre autres, d'induire des dommages à l'ADN. Ces dommages vont induire soit de la mort cellulaire, soit de la sénescence. Les mécanismes exacts conduisant à l'endommagement de l'ADN et à la sénescence seront discutés ultérieurement (Chapitre 2/III. Sénescence radio-induite).

En ce qui concerne les chimiothérapies, ce sont principalement les agents chimiothérapeutiques conventionnels qui endommagent l'ADN qui peuvent induire de la sénescence. C'est le cas par exemple de la doxorubicine, de l'aphidicoline ou du cisplatine¹⁰⁶. Ces molécules induisent des dommages à l'ADN par des mécanismes complexes. Par exemple, le cisplatine induit des adduits à l'ADN bloquant la réplication induisant à terme des dommages à l'ADN, une induction d'apoptose ou de sénescence^{106,107}. Récemment, il a été montré que le cisplatine pouvait induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène associée à une dépolarisation mitochondriale. Le co-traitement cisplatine avec un antioxydant permet de diminuer la proportion de cellules sénescents *in vitro* et *in vivo*¹⁰⁷. Ainsi, l'induction de sénescence par le cisplatine passerait par une induction directe et indirecte via des ROS de dommages à l'ADN.

Les inhibiteurs de topoisomérases peuvent aussi, via l'induction de cassures de l'ADN, induire une sénescence prématurée¹⁰⁸.

Certaines thérapies ciblées peuvent également être inductrices de sénescence. Par exemple, un inhibiteur de récepteur tyrosine-kinase comme le Lapatinib, un inhibiteur de HER2, peut induire de la sénescence dans les cellules cancéreuses mammaires surexprimant HER2 et déficientes pour p53. Cette sénescence est dépendante de p15 et p27, mais indépendante de p16 et p21. De plus, la réexpression de p53 sauvage induit l'apoptose des cellules traitées par Lapatinib¹⁰⁹. Un autre exemple concerne le traitement des cancers du col de l'utérus induits par le papilloma virus. Dans ces cancers, les protéines virales inhibent p53 et Rb. Le traitement avec un inhibiteur des protéines virales conduit à une réexpression de p53 et à une entrée en sénescence¹¹⁰.

Les études sur la TIS se concentrent principalement sur l'induction de sénescence dans les cellules cancéreuses, mais il est probable que les cellules normales puissent aussi entrer en TIS sous l'effet du traitement. Il a notamment été montré que les agents chimiothérapeutiques endommageant l'ADN ainsi que les radiations entraînent la sénescence des cellules stromales comme les fibroblastes associés au cancer (CAF)^{5,111,112}.

F. Cas particulier du *Senescence-Messaging Secretome* : induction de la sénescence par le SASP

Le SASP est l'un des phénotypes de la sénescence, mais il peut aussi en être un inducteur. Cet effet est appelé effet SMS (*Senescence-messaging secretome*).

Parmi les facteurs composant le SASP, les interleukines 6, 8 et 1 α , ainsi que l'IFN γ ont la capacité de renforcer le phénotype sénescé par effet autocrine ou d'induire la sénescence par effet paracrine¹¹³. Concernant l'IL-8, il a été montré que celle-ci agissait via le récepteur CXCR2 qui permet d'induire la sénescence de manière dépendante de p53¹¹⁴. IL-6, quant à elle, activerait, via son récepteur IL-6R α , la voie JAK/STAT3 conduisant à l'activation d'IGFBP5 (*Insuline-like Growth Factor Binding Protein 5*)¹¹⁵. Cette dernière peut, indépendamment de son action sur l'IGF, induire du stress oxydant. Ce stress oxydant va à son tour induire la sénescence¹¹⁶. De manière plus générale, les protéines de la famille IGFBP, notamment IGFBP -3, -4, -5 et -7, semblent jouer un rôle majeur dans la sénescence induite par le SASP¹¹⁶⁻¹¹⁸. Le TGF- β semble aussi pouvoir activer les CKI p15 et p21 pour induire la sénescence. Cette activation est corrélée à une augmentation du stress oxydant. Le traitement avec des antioxydants permet d'empêcher l'activation de p21 et p15 et par conséquent la

sénescence¹¹⁹. Ces différents exemples de sénescence induite par le SASP pointent un rôle majeur des ROS dans cette induction de sénescence.

En plus des cytokines, les cellules sénescents sécrètent des vésicules extracellulaires contenant des fragments de chromatine issus de la perte de l'intégrité nucléaire. Ces fragments d'ADN, une fois captés par les cellules avoisinantes, vont entraîner l'activation de la voie DDR dans ces cellules et leur sénescence^{120,121}.

III. Principaux marqueurs de la sénescence

La sénescence est un état dynamique et complexe en termes d'acteurs moléculaires. Malheureusement, aucun de ces acteurs moléculaires n'est entièrement spécifique de la sénescence. Il n'existe donc pas, à ma connaissance, de marqueurs spécifiques de la sénescence. Il est donc nécessaire, pour définir un état cellulaire comme étant de la sénescence, de recourir à la caractérisation de plusieurs marqueurs moléculaires et phénotypiques.

In vitro, les cellules sénescents sont facilement identifiables grâce à leurs changements morphologiques, notamment l'augmentation de taille observable en microscopie ou par cytométrie en flux (paramètre FSC). L'augmentation de l'activité SA- β -Gal est mesurable grâce à divers tests utilisant des substrats de la β -galactosidase, principalement le X-gal dont la métabolisation par l'enzyme produit un précipité bleu⁹² ou le C12FDG, un substrat fluorigène utilisable en cytométrie¹²².

Les cellules sénescents ont aussi un noyau et un nucléole plus grands^{123,124}. Elles peuvent pour certaines d'entre elles être polynucléées^{3,125}. L'enveloppe nucléaire change également, avec une diminution de l'expression de la lamine B1 pouvant perturber l'intégrité de l'enveloppe nucléaire¹²⁶. En effet, on peut trouver des fragments de chromatine dans le cytoplasme des cellules sénescents¹²⁷.

L'activation de la voie DDR est souvent utilisée comme marqueur de sénescence, notamment la présence de foyers γ H2AX ou 53BP1¹²⁸. Il est important de noter que la phosphorylation de H2AX peut être observée dans les cellules sénescents indépendamment de dommages à l'ADN. Ainsi, dans une étude utilisant le butyrate de sodium, un inhibiteur de HDAC, il a été montré que celui-ci induisait un phénotype sénescents associé à une augmentation de γ H2AX et à une activation de p21, en absence de dommages à l'ADN. À l'inverse, dans cette même étude, lorsque la sénescence est induite par irradiation, les cellules présentent des dommages à l'ADN générant des foyers 53BP1 et des foyers γ H2AX. Ainsi, γ H2AX est un marqueur de sénescence dépendant ou indépendant de la présence de dommages à l'ADN, alors que 53BP1 est un marqueur de sénescence lié à l'activation de la voie DDR

et à la présence de dommages à l'ADN. La phosphorylation de p53 sur la sérine 15, qui résulte de l'activation de la voie DDR, sert également fréquemment de marqueur de sénescence¹²⁹.

L'induction de p16 et l'hypophosphorylation de Rb servent également de marqueurs de sénescence^{5,89,130-133}.

Des changements épigénétiques comme la marque H3K9me3¹³⁴ sont souvent utilisés pour caractériser les populations de cellules sénescents.

À cause de l'augmentation du stress oxydant à la sénescence, on peut observer dans les cellules sénescents des agrégats de macromolécules oxydées. C'est le cas de la lipofuscine, composée de protéines oxydées et dégradées, de lipides, de carbohydrates, de vitamines et d'ions (fer et cuivre) qui s'agrègent. Les agrégats de lipofuscine peuvent être autophagocytés. Néanmoins, les enzymes lysosomales n'ont pas la capacité de dégrader la lipofuscine ; celle-ci s'accumule alors dans les lysosomes. Ainsi, l'accumulation de lipofuscine dans les lysosomes ou le cytoplasme est considérée comme un marqueur de sénescence^{3,31,135}.

Les cellules sénescents présentent également un plus grand nombre de vésicules cytoplasmiques visibles en microscopie ou par cytométrie en flux (paramètre SSC). Cette vésiculation reflète l'augmentation de la charge lysosomale, de l'autophagie et/ou du trafic de sécrétion lié à la production du SASP.

In vivo, il existe assez peu de marqueurs disponibles. Il est possible de mesurer l'activité SA-β-Gal sur coupe cryogénisée. Les agrégats de lipofuscine peuvent être mis en évidence sur tout type de coupes par une coloration au noir soudan B (*Sudan black B*)¹³⁶. L'expression transcriptionnelle et protéique de p16 est souvent utilisée comme marqueur de sénescence in vivo. En effet, il a été démontré que, lors du vieillissement, la CKI la plus exprimée dans les tissus vieillissants est p16. Ainsi, chez la souris âgée par rapport à une souris jeune, la quantité d'ARNm de p16 est augmentée d'un facteur 10, contre un facteur 1,4 pour p21¹³⁷. Cette constatation a conduit au développement d'un système rapporteur de l'expression de p16, les souris p16-LUC utilisées dans cette thèse, comme système permettant de visualiser les cellules sénescents sur animal vivant par mesure de bioluminescence¹³². Dans ces souris, l'ADN complémentaire de la luciférase, suivi du signal de polyadénylation de SV40, a été inséré dans le site d'initiation de la traduction (l'exon 1α) d'un des allèles du locus p16 endogène. Ceci a pour conséquence une expression de luciférase sous contrôle du promoteur de p16¹³².

La quiescence est un arrêt de prolifération qui, à l'inverse de la sénescence, est réversible. La quiescence s'installe en réponse à une déprivation en facteurs de croissance ou nutriments, ou

alternativement par inhibition de contact. Dès que les conditions de croissance sont de nouveau réunies, la cellule quiescente ré-entre dans le cycle, à l'inverse de la cellule sénescence. D'un point de vue moléculaire, la cellule quiescente est arrêtée en phase dite G0 correspondant à une quantité d'ADN de 2N semblable à des cellules en phase G1. Les cellules quiescentes partagent des marqueurs avec les cellules sénescence, tels que l'activation des CKI p21 et p27¹³⁸. Dans certains cas, on observe une diminution d'expression de la lamine B1 dans les cellules quiescentes comme dans les cellules sénescence⁵. De même, l'augmentation de l'activité de la β -galactosidase est retrouvée dans des cellules quiescentes. Néanmoins, cette activité est plus faible que dans les cellules sénescence¹³⁹.

Ainsi, les cellules sénescence peuvent partager des marqueurs communs avec les cellules quiescentes. Il est donc important d'utiliser plusieurs marqueurs pour caractériser les cellules sénescence^{31,138}.

IV. Sénescence et cancer

Plusieurs des thématiques de ce paragraphe ont été développées dans une revue (Article n°1 en annexe p179) que j'ai coécrit : Goy, E. & Abbadie, C. Sénescence et cancer : Double jeu. médecine/sciences 34, 223–230 (2018).

La mise en place de l'état sénescence et le développement cancéreux sont deux événements qui semblent intriquement liés. L'élément le plus marquant appuyant cette idée provient des données épidémiologiques qui montrent que le nombre de cancers augmente avec l'âge^{140,141}, alors que dans le même temps, d'après plusieurs études réalisées chez l'homme et la souris, les cellules sénescence s'accumulent^{142,143}. De plus, des cellules sénescence sont retrouvées au niveau des tumeurs bénignes comme les naevi, mais pas quand ces tumeurs progressent en tumeurs malignes^{90,144,145}. Par ailleurs, quatre-vingt-dix pour cent des tumeurs expriment la télomérase, ce qui leur permet d'éviter la sénescence répliquative¹⁴⁶. Néanmoins, le lien entre sénescence et initiation ou progression tumorale est loin d'être simple. Dans ce chapitre, nous discuterons de la nature de ce lien, pro ou antitumoral.

A. Le rôle antitumoral intrinsèque de la sénescence

La sénescence, définie comme un arrêt de prolifération très stable, voire irréversible, dû à l'activation persistante de la voie DDR et la non-réparation des dommages à l'ADN qui l'induisent, a d'abord été considérée comme un processus antitumoral. À l'appui de cette idée, la présence de cellules sénescence induites en OIS dans les naevi, mais pas dans les mélanomes, a conduit à considérer la sénescence comme une barrière à l'évolution maligne des lésions pré-néoplasiques¹⁴⁴. La présence de cellules sénescence dans des lésions pré-néoplasiques n'est pas limitée aux naevi. On

en trouve aussi par exemple dans les lésions pré-néoplasiques intra-épithéliales du Pancréas (PanIN)¹⁴⁷, les adénomes pulmonaires¹⁴⁸ ou les hyperplasies bénignes de la glande pituitaire¹⁴⁹.

De plus, la sénescence est une réponse possible et considérée comme souhaitable des cellules cancéreuses aux chimiothérapies conventionnelles et à la radiothérapie car, de par son état d'arrêt du cycle cellulaire stable, elle contribuerait à arrêter la croissance tumorale. Il a été montré que certaines tumeurs comme les glioblastomes ou certains cancers du poumon entrent plus favorablement en sénescence qu'en apoptose après ces thérapies anticancéreuses¹⁴⁹. Néanmoins, les cellules cancéreuses sénescents étant toujours vivantes et résistantes à l'apoptose, elles pourraient représenter une forme de dormance et de résistance de la tumeur aux thérapies. Cependant, du fait du développement récent des sénolytiques visant à éliminer spécifiquement les cellules sénescents (voir chapitre V), l'induction de sénescence devient un objectif souhaitable des thérapies anticancéreuses^{150,151}.

B. Le rôle ambigu du SASP dans la pathologie cancéreuse

Au sein d'une tumeur, deux grandes catégories de cellules peuvent être en sénescence et sécréter un SASP : les cellules stromales et les cellules cancéreuses elles-mêmes qui peuvent être entrées en OIS ou en TIS suite à un traitement.

Le sécrétome des cellules sénescents stromales peut, en fonction du contexte, avoir un effet protumoral ou antitumoral. L'effet protumoral du SASP est relayé par plusieurs mécanismes. Le SASP comprend des cytokines et des facteurs de croissance (IL-6, IL-8, CXCL-1, HGF, EGF) pouvant augmenter la prolifération des cellules tumorales¹⁵². Le SASP permet également de modifier le microenvironnement, afin de le rendre favorable à la progression tumorale. Il comporte des métalloprotéases (notamment les MMP-2 et MMP-3) permettant de remodeler la matrice et il est appauvri en collagène par rapport à celui des fibroblastes non sénescents. Ce remodelage de la matrice, associé à la sécrétion de chimioattractants comme l'HGF et le bFGF, va favoriser l'invasion. Le SASP favorise également l'angiogenèse et la néoangiogenèse via des facteurs proangiogéniques comme le VEGF, IL-1, IL-8, PGE2 et la laminine. De plus, les cellules recrutées par l'inflammation induite par le SASP vont à leur tour produire des facteurs angiogéniques comme le VEGF¹⁵³. Le SASP favorise également la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM est définie comme l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par des cellules épithéliales. Le SASP des fibroblastes sénescents, via l'IL-6, l'IL-8, l'HGF et les métalloprotéases dont les MMP-1 et MMP-2, peut induire une dédifférenciation des cellules épithéliales, une rupture des liaisons cellule-cellule et l'acquisition d'une morphologie fibroblastoïde au lieu de la morphologie cuboïdale d'origine. Ceci a été montré par notre

équipe sur des kératinocytes précancéreux, ainsi que par d'autres équipes sur des cellules cancéreuses¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

Le SASP des cellules stromales et/ou cancéreuses a également des conséquences sur l'immunité antitumorale. De manière générale, le SASP contient des cytokines pro-inflammatoires, chimioattractantes pour différents types de cellules immunitaires. Néanmoins, ses effets sur la réponse immunitaire antitumorale ne sont pas clairs car il peut aussi favoriser l'immunotolérance de la tumeur^{153,157}. Par exemple, dans un modèle de TIS induite par des faibles doses de chimiothérapie appliquées à des cellules de myélome multiple, le SASP des cellules tumorales sénescents, en particulier la chimiokine CCL2, induit la clairance des cellules tumorales sénescents¹⁵⁸. Dans une autre étude utilisant le modèle de souris FASST où l'expression de p27^{Kip1} est inducible par le tamoxifène dans les cellules mésenchymateuses, ce qui les induit en sénescence, le SASP de ces fibroblastes stromaux sénescents permet d'établir un microenvironnement immunosuppresseur par le recrutement de granulocytes immatures inhibant l'activité des lymphocytes T CD8+. Des essais de tumorigenèse ont révélé que le traitement au tamoxifène, donc l'induction de la sénescence des fibroblastes, augmente l'agressivité des tumeurs par rapport aux souris non traitées au tamoxifène¹⁵⁹. Ces études suggèrent donc un rôle dual du SASP, soit stimulant soit inhibant de système immunitaire en fonction du contexte.

Ainsi, d'une part, le SASP peut contenir des facteurs favorisant la prolifération des cellules tumorales et permettant de modifier le microenvironnement pour favoriser l'angiogenèse tumorale et la transition épithélio-mésenchymateuse. D'autre part, le rôle du SASP concernant la réponse immunitaire antitumorale est duale : il peut favoriser l'immunosurveillance aussi bien que l'immunotolérance.

C. [La sénescence et la résistance aux thérapies antitumorales](#)

La sénescence des cellules stromales et des cellules tumorales peut être la source de résistance aux thérapies antitumorales par plusieurs mécanismes.

Tout d'abord, comme vu précédemment, le SASP des cellules sénescents stromales peut favoriser la résistance des cellules tumorales aux thérapies par le détournement du système immunitaire^{159,160}. De même, la TEM induite par le SASP pourrait être source de résistance aux thérapies antitumorales¹⁶¹. De plus, Le SASP a la capacité d'induire un phénotype de cellules souches cancéreuses¹⁶². L'acquisition de ce phénotype souche est associée à une augmentation de l'hétérogénéité tumorale susceptible de donner lieu à l'apparition de clones résistants. En outre, ces

cellules souches cancéreuses induites par le SASP présentent une diminution de leur vitesse de prolifération, ce qui les rend plus résistantes aux thérapie antitumorales génotoxiques¹⁶².

De plus, les cellules cancéreuses une fois induites en TIS acquièrent une résistance aux thérapies classiques de par leur résistance à l'apoptose et leur absence de prolifération. Elles pourraient persister dans cet état sénescence et pourraient ainsi être à l'origine de récurrence¹⁶³. Par exemple, une étude sur une lignée de cellules cancéreuses H1299 induites en sénescence par plusieurs chimiothérapies montre qu'environ 1 cellule sénescence sur 1 million est capable de s'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire pour donner des cellules filles pouvant entraîner une récurrence de la maladie cancéreuse. Les mécanismes d'échappement de l'arrêt sont assez mal compris¹⁶⁴.

Ainsi, les cellules normales et tumorales sénescence peuvent, par le SASP, favoriser la résistance aux thérapies antitumorales. De plus, les cellules tumorales sénescence, par leur résistance intrinsèque à l'apoptose et leur absence de prolifération, pourraient représenter une forme de résistance aux thérapies anticancéreuses et participer aux mécanismes de récurrence.

D. Rôle de la sénescence dans l'initiation tumorale

La sénescence pourrait être, intrinsèquement, une étape vers l'initiation tumorale.

Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont démontré que, dans les cellules épithéliales, l'accumulation de cassures simple brin de l'ADN entraîne une sénescence prématurée. Il a été montré qu'environ une de ces cellules sénescence sur 10 000 acquiert la possibilité d'échapper à l'arrêt du cycle cellulaire pour donner, suite à une mitose atypique par bourgeonnement, des cellules filles proliférantes, mutées et pouvant former des carcinomes après xénogreffe en souris immunodéprimées. Ces cellules présentent un profil transcriptomique proche de celui de cellules cancéreuses provenant de cancers épithéliaux de peau, de sein ou colorectaux^{18,165,166}.

De même, les cellules entrées en OIS pourraient être précurseurs de cellules cancéreuses. C'est ce qui pourrait se produire lors de l'évolution maligne de lésions préneoplasiques. Les nævi par exemple sont formés de mélanocytes surexprimant ou suractivant B-RAF ou N-RAS. Cette activation oncogénique entraîne une première phase d'hyperprolifération, puis les mélanocytes entrent en OIS, ce qui stabilise le naevus. Malheureusement, les nævi peuvent parfois évoluer en mélanome. Cette évolution suppose un échappement de la sénescence. Des études indiquent que cet échappement serait dû à l'activation de la voie PI3K/AKT, résultant elle-même de la diminution d'expression de PTEN, un inhibiteur de cette voie¹⁶⁷. Un autre mécanisme d'échappement, dans le cas de la sénescence induite par B-RAF, est la délétion du gène *CDKN2A* qui code pour p16. En effet, dans ce

cas, la sénescence est dépendante de p16 et la délétion de ce gène est retrouvée dans les mélanomes¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Ainsi, la survenue de l'OIS peut-être vue à la fois comme une barrière anti-tumorale qui stabilise les lésions prénéoplasiques, mais aussi comme une étape qui prépare à l'émergence de cellules malignes.

V. Élimination des cellules sénescents et conséquences

Au vu de l'effet négatif qu'a l'accumulation de cellules sénescents dans la survenue de nombreuses pathologies, il a été proposé de développer des méthodes pour en diminuer les effets. Deux approches ont été identifiées : inhiber tout ou partie du SASP ou éliminer les cellules sénescents.

L'élimination spécifique des cellules sénescents se fait avec des molécules dites sénolytiques. L'une des pistes en développement est le ciblage de leur résistance à l'apoptose. En effet, nous avons vu que les cellules sénescents étaient résistantes à l'apoptose grâce à la surexpression de protéines antiapoptotiques de la famille BCL-2. La stratégie est donc d'inhiber ces protéines grâce à des BH3 mimétiques. De telles molécules existent déjà. Elles sont utilisées en clinique pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique, du lymphome non Hodgkinien et des myélomes multiples¹⁷¹. Par exemple, il a été développé le Navitoclax (ABT-737), un inhibiteur de BCL-2, BCL-XL, BCL-w. Celui-ci a montré une bonne activité sénolytique, ce qui semble indiquer que l'élimination des cellules sénescents requiert une inhibition de plusieurs protéines antiapoptotiques de la famille BCL-2^{52,53}. Malheureusement, le Navitoclax induit des thrombopénies, ce qui limite son utilisation en clinique¹⁷². Cette thrombopénie est due à l'inhibition de BCL-XL, essentielle pour la survie des plaquettes. Actuellement, de nouveaux BH3 mimétiques sont développés pour ne pas cibler BCL-XL. C'est le cas du Vénétoclax. Celui-ci n'induit pas de thrombopénie et est efficace contre les cancers à lymphocytes B comme la leucémie lymphoïde chronique¹⁷¹. Une étude montre qu'il est efficace pour l'élimination des cellules Bêta sénescents des îlots de Langerhans issues de souris atteintes de diabète de type 1¹⁷³.

En comparant la transcriptomique d'adipocytes induits ou pas en sénescence par irradiation, une étude a mis en évidence une augmentation d'expression de gènes anti-apoptotiques et pro-survie dans les cellules sénescents. Les auteurs de l'étude ont testé une banque de 46 agents pouvant cibler ces gènes. Parmi les agents testés, ils ont retenu la Quercétine (polyphénol d'origine naturelle ayant de nombreuses actions dont celle d'inhiber la voie PI3K qui est activée à la sénescence) et le Dasatinib (inhibiteur de kinases à spectre large). En utilisation combinée, ces deux molécules montrent une bonne sensibilité et spécificité envers les cellules sénescents, notamment des HUVEC et des

préadipocytes induits en sénescence par une irradiation à 10 Gy. Les auteurs ont aussi démontré l'efficacité de ce traitement combiné in vivo sur des souris âgées chez lesquelles ce traitement induisait une baisse du marquage SA- β -Gal, ainsi qu'une baisse de l'expression de p16, associées à une amélioration des fonctions cardiaques. Sur des souris irradiées sur les pattes arrière à 10 Gy, les auteurs ont observé une accélération du rétablissement des capacités d'endurance postirradiation. Enfin, sur un modèle de souris *Ercc1- Δ* mimant la progéria, qui se manifeste par l'apparition de signes de vieillissement précoce associés à une faible durée de vie, le traitement combiné a induit une augmentation de la durée de vie associée à une diminution des pathologies liées à l'âge⁵³. Néanmoins, d'autres études réalisées sur des cellules d'hépatocarcinome induites en sénescence par un traitement à la doxorubicine sont arrivées à des conclusions inverses. En effet, le traitement Dasatinib+Quercetin a augmenté l'expression de p16 et le nombre de foyers γ H2AX dans les cellules cancéreuses, suggérant que le traitement a induit la sénescence. De plus, dans des expériences de xénogreffes, le traitement Dasatinib+Quercetin associé au traitement par la doxorubicine n'a pas montré d'efficacité augmentée par rapport au traitement à la doxorubicine seule pour ce qui est de la diminution du volume tumoral, alors que la doxorubicine avait bien induit une augmentation du marquage SA- β -Gal dans la tumeur par rapport au contrôle. De manière surprenante, le traitement Dasatinib+Quercetin avait au contraire augmenté ce marquage¹⁷⁴. Prises ensemble, ces études suggèrent que l'effet sénolytique du traitement Dasatinib+Quercetin serait restreint à certains contextes de sénescence. Les raisons de ce champ d'action réduit ne sont pas encore connues.

L'inhibition du SASP est réalisée avec des molécules appelées sénomorphiques. Il est à noter que la frontière entre composés sénolytiques et sénomorphiques est fine. En effet, certains composés sénolytiques, comme la Quercetin, affectent le SASP. Dans ce cas l'inhibition du SASP se fait par l'inhibition de la voie NF- κ B impliquée dans la synthèse des facteurs du SASP¹⁷⁵. La rapamycine, un inhibiteur de mTOR, a aussi des effets sénomorphiques¹⁷⁶. Le mécanisme par lequel la rapamycine inhibe le SASP est à ma connaissance inconnu.

Chapitre 2 : Sénescence cellulaire : Rôles en radiothérapie externe anticancéreuse

Le principe de la radiothérapie anticancéreuse est d'utiliser un rayonnement ionisant afin d'induire des effets biologiques, notamment la mort des cellules tumorales ou, a minima, un arrêt de leur prolifération. Ces effets seront détaillés dans le paragraphe sur la radiobiologie (Chapitre 2 : Partie II).

De nos jours, il existe de nombreuses techniques de radiothérapie. La radiothérapie conformationnelle 3D (3D-CRT), qui utilise des faisceaux de photons ou d'électrons, permet d'adapter le volume irradié à la forme tridimensionnelle de la tumeur grâce à un bras pouvant tourner à 360°. La radiothérapie à intensité modulée (IMRT) est une technique permettant, comme son nom l'indique, de moduler l'intensité des faisceaux au cours du protocole de radiothérapie. La radiothérapie stéréotaxique est une technique de radiothérapie utilisant des faisceaux fins permettant de mieux s'adapter aux petites tumeurs. Récemment, l'hadronthérapie s'est développée. Cette méthode utilise des particules chargées au lieu des photons. Elle est plus précise que la 3D-CRT et a également une efficacité biologique relative supérieure. Il existe aussi la brachythérapie qui, contrairement aux techniques précédentes dans lesquelles les rayons sont dirigés sur la tumeur depuis une source externe, utilise une source radioactive scellée placée directement au contact de la tumeur. Mon projet de thèse concernait la 3D-CRT, la technique la plus fréquemment utilisée en radiothérapie.

I. Principe de la radiothérapie externe conformationnelle 3D par faisceaux de rayons X

Cette partie a été rédigée à partir du livre *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*¹⁷⁷.

A. Rappel de quelques principes physiques

Un rayonnement est défini comme une transmission d'énergie. Celle-ci peut se faire avec ou sans transfert de matière. Lorsque la transmission d'énergie se fait sans transfert de matière, on parle de rayonnement électromagnétique. La radiothérapie à rayons X entre dans ce cadre car les photons sont considérés comme ayant une masse nulle et ne sont donc pas considérés comme de la matière. Par ailleurs, les photons sont des particules non chargées, ce qui les rend hautement pénétrants, car

ils ne subissent pas de perte d'énergie par effet électrostatique. Plus l'énergie du photon sera importante, plus celui-ci sera pénétrant. C'est pour cela que l'on utilise les rayons X pour traiter les tumeurs internes.

En ce qui concerne l'interaction des rayonnements avec la matière, on distingue les rayonnements ionisants et les rayonnements non ionisants. Un rayonnement est ionisant si l'énergie transmise est suffisante pour arracher un ou plusieurs électrons à un atome ou à une molécule de la matière. Pour le tissu vivant composé d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'azote et d'oxygène, l'énergie d'un rayonnement doit être supérieure ou égale à 12,4 eV (électronVolt) pour que le rayonnement soit ionisant. Dans le spectre de la lumière, les photons ayant cette énergie sont ceux de longueur d'onde inférieure à 100 nm.

On distingue deux types d'ionisation :

- L'ionisation directe de la matière par la particule émise. C'est le mode d'action des particules chargées, donc par exemple de la protonthérapie.
- L'ionisation indirecte qui a lieu lorsque l'ionisation est réalisée par un électron secondaire. C'est le mode d'action de la radiothérapie à rayons X.

Dans le cas de l'ionisation indirecte, il est important de définir la cascade électronique, c'est-à-dire l'ensemble des événements conduisant à l'ionisation :

- La première étape consiste en l'interaction entre le photon et la matière conduisant à la production d'électrons secondaires.
- Les étapes suivantes consistent en l'ionisation ou l'excitation de la matière par les différents électrons secondaires.

Des rayonnements d'énergie inférieure à 12,4 eV peuvent non pas ioniser une molécule, mais l'exciter. L'excitation consiste à déplacer un électron du cortège électronique vers un niveau d'énergie supérieur.

Des rayonnements d'énergie supérieure ou égale à l'énergie de liaison intramoléculaire peuvent induire une lyse moléculaire en rompant les liaisons interatomiques. Cette énergie est inférieure à celle nécessaire à l'ionisation d'un atome. Par exemple, une énergie de 10 eV est suffisante pour induire des cassures de l'ADN.

Au cours de leurs interactions avec la matière, les photons vont céder leur énergie par :

- Effet photoélectrique : le photon donne toute son énergie pour arracher un électron de son orbite atomique. L'électron devient alors un photon-électron. Il s'ensuit une

réorganisation du cortège électronique provoquant un dégagement d'énergie, soit sous forme de photon, soit transmise aux électrons adjacents.

- Diffusion de Compton : le photon transfère partiellement son énergie à un électron. Cela conduit à la diffusion de l'électron et du photon.
- Production de paires : le photon transfère son énergie au noyau atomique, ce qui conduit à la production d'un électron et de son antiparticule le positon. Celui-ci, lorsqu'il va rencontrer un électron, va s'annihiler pour créer une paire de photons.

Dans tous les cas, ces interactions vont être responsables de la production d'électrons secondaires ; ce sont eux qui causent le dépôt d'énergie dans la matière. Le type d'interaction est défini, d'une part, par l'énergie des photons et, d'autre part, par le numéro atomique (Z) des atomes de l'élément traversé. De manière générale, pour les tissus humains, des photons de faible énergie interagissent par effet photoélectrique, des photons de forte énergie par production de paires et enfin, pour des énergies intermédiaires, les photons interagissent par effet Compton. En radiothérapie, où l'énergie est généralement autour de 10 MeV, l'effet observé au niveau tissulaire ($Z = 7,5$) est majoritairement dû à l'effet Compton.

B. Caractéristiques des accélérateurs utilisés en radiothérapie conformationnelle 3D

1. Source

Les faisceaux de rayons X utilisés en 3D-CRT sont générés par un accélérateur linéaire (LINAC). Dans ce dispositif, des électrons sont générés grâce à un canon à électrons puis sont accélérés grâce à un générateur à haute tension. Ces électrons ainsi accélérés vont atteindre une cible de quelques micromètres d'épaisseur dont la nature peut varier, mais le plus généralement il s'agit d'une cible en tungstène. Les électrons aux abords des atomes de la cible vont être accélérés par effet de répulsion électrostatique. Cette accélération va générer de l'énergie sous forme de rayons X. L'énergie émise dépend de l'énergie cinétique de l'électron avant de rencontrer la cible et de la distance entre l'électron et l'atome qui a permis son accélération. Cette distance est variable, ce qui a pour conséquence que les rayons X sont émis sous forme d'un spectre d'énergie. L'énergie maximum des rayons X correspondra à la collision de l'électron avec le noyau de l'atome. Cette énergie est proportionnelle à l'énergie cinétique maximale de l'électron qui elle-même est dépendante de la tension de l'accélérateur. Ainsi, la tension choisie pour accélérer les électrons détermine le spectre d'énergie des rayons X émis.

2. Ciblage

Le ciblage précis d'un volume en 3D est rendu possible par deux éléments de l'accélérateur : le bras et le collimateur. En effet, l'accélérateur dispose d'un bras pouvant tourner à 360° autour du patient, ce qui permet de délivrer des faisceaux dans différentes directions. Un collimateur est également présent sur le parcours des faisceaux de photons. Il est composé d'un ensemble de lamelles épaisses de tungstène opaques aux rayons X. Ces lamelles sont motorisées de manière autonome et contrôlable par ordinateur, ce qui permet de donner la forme souhaitée au faisceau de photons. De plus, les lamelles butent entre elles de manière à limiter la fuite de rayons X. Ainsi, en utilisant des faisceaux de différentes formes grâce au collimateur et provenant de différentes directions grâce à la rotation du bras, il est possible de cibler le dépôt d'énergie précisément dans un volume choisi.

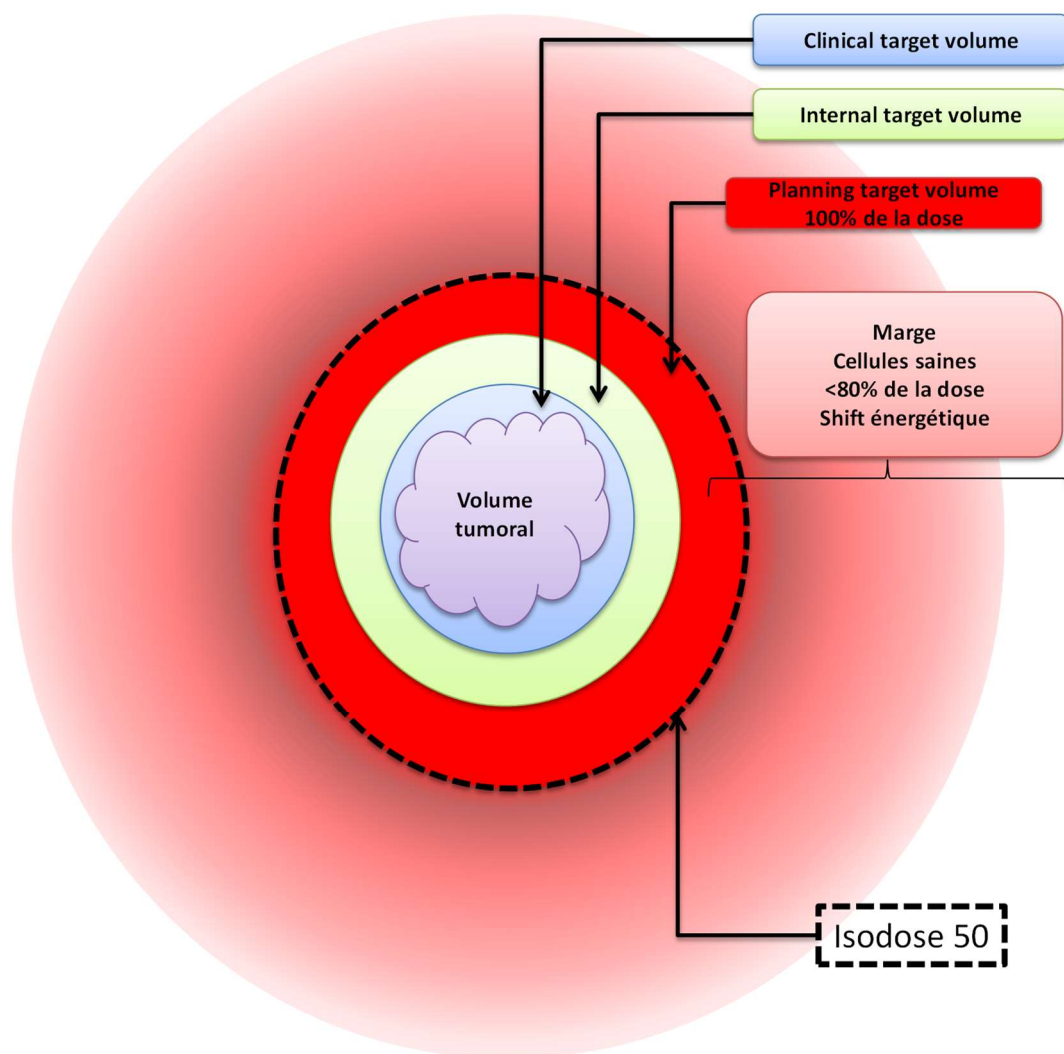


Figure 4 : Schéma des différents volumes pris en compte en radiothérapie.

C. Dosimétrie

La dosimétrie consiste à quantifier la dose déposée dans la tumeur et dans le patient et à établir la manière dont celle-ci sera délivrée. La détermination de cette dose et de sa distribution en 3D va se faire en fonction des effets biologiques souhaités (élimination des cellules tumorales) et non souhaités (atteinte du tissu sain et des organes radiosensibles).

L'effet biologique des radiations dépend de l'énergie absorbée par le milieu, autrement appelée dose déposée. La dose déposée se mesure en Gray (Gy), sachant que 1 Gy correspond à l'énergie de 1 joule déposée dans 1 kilogramme. L'effet biologique dépend principalement de la dose déposée, mais il peut aussi dépendre du débit de dose, qui correspond à la vitesse d'absorption de la dose par le milieu et qui a comme unité le Gy/s.

La distribution de la dose en 3D doit prendre en compte le rendement en profondeur et le profil latéral de dose. Le rendement en profondeur correspond à la variation de la dose déposée en fonction de l'épaisseur du milieu traversé par l'axe du faisceau. Le profil latéral de dose correspond à la variation de la dose sur un plan parallèle à l'axe du faisceau, à une profondeur et une taille de champ données. En pratique, le champ est délimité par un champ lumineux. Le point central de ce champ reçoit 100 % de la dose. La limite du champ reçoit 50 % de la dose.

En radiothérapie, différents volumes sont considérés (**Figure 4**) :

- Le volume tumoral : il correspond au volume tumoral macroscopique observable par imagerie.
- Le *Clinical Target Volume* (CTV) : il s'agit du volume tumoral élargi. Il permet de prendre en compte les risques d'invasion microscopique.
- L'*Internal Target Volume* (ITV) : il comprend le CTV plus une marge pour prendre en compte les mouvements des patients comme ceux des organes, dus à la respiration par exemple.
- Le *Planning Target Volume* (PTV) : il comprend l'ITV plus une marge qui prend en compte l'imprécision de l'accélérateur et la variabilité entre les différentes séances du traitement. En effet, en clinique, la dose est délivrée en différentes fractions espacées dans le temps. En règle générale, le PTV correspond au CTV plus une marge de 1 cm. Le PTV est aussi délimité en tenant compte de la présence d'organes à risques radiosensibles à proximité de la tumeur. Si les organes à risques se situent à distance du PTV, alors ceux-ci n'affecteront pas la délimitation du PTV, mais ils seront pris en considération pour le choix de l'axe et de la taille des faisceaux.

En clinique, les thérapeutes vont donc utiliser des faisceaux de différentes directions, formes et énergies, afin de s'adapter au mieux à la profondeur et à la forme de la tumeur et de limiter la dose reçue par les organes à risque.

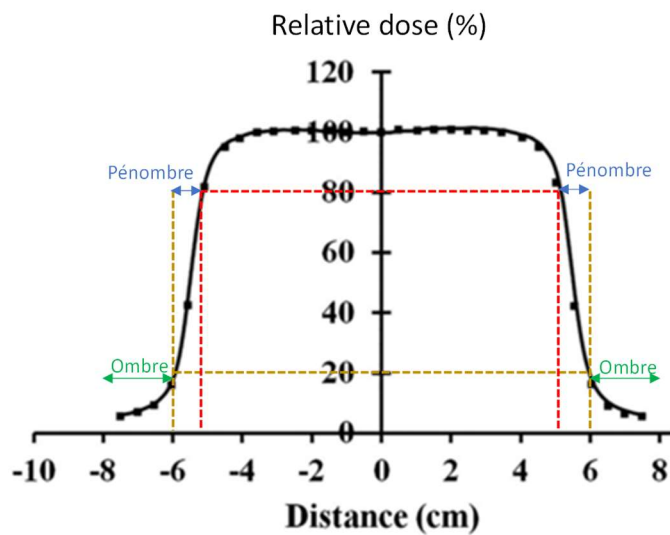


Figure 5 : Exemple d'un profil latéral de dose. D'après Isra Israngkul-Na-Ayuthaya et al. (J Radiat Res. 2015 Nov;56(6):919-26)

D. Effets de bord

Il est important de prendre en considération les volumes en dehors du PTV, dans lesquels de la dose peut être déposée. Il est important de distinguer la dose hors champ et la dose hors volume, La dose hors champ est déposée dans un volume localisé en dehors du PTV et du parcours des photons. La dose hors volume est déposée dans les tissus situés sur l'axe des faisceaux mais en dehors du PTV, typiquement les tissus qui se trouvent au-dessus ou en dessous du PTV.

Dans mon projet de thèse, je me suis intéressé à la dose hors champ, déposée dans un volume que j'appellerai tout au long de ce mémoire « la marge ». La dose déposée en marge peut provenir de fuite de rayonnements ou de la déviance des faisceaux à différents niveaux de l'accélérateur. Elle peut aussi provenir de la diffusion de photons secondaires provenant du volume ciblé. Chofor et al. ont démontré que ce sont principalement ces photons secondaires qui sont responsables de la dose déposée en marge¹⁷⁸.

La dose déposée en marge présente plusieurs caractéristiques :

- Telle que décrite par le profil latéral de dose, elle décroît entre 80 % et 20 % de la dose du PTV dans une zone appelée pénombre physique, puis de 20 % à moins de 5 % dans une zone appelée ombre (**Figure 5**). La taille de la pénombre et de l'ombre dépendent de la taille du champ¹⁷⁹. Étant donnée la taille des champs généralement utilisés en radiothérapie, la pénombre mesure le plus souvent quelques millimètres. En revanche, la limite la plus externe de l'ombre est mal définie.
- Le spectre d'énergie des photons secondaires responsables de la dose déposée en marge est décalé du côté des énergies faibles par rapport au spectre d'énergie des photons dans le PTV. La diminution d'énergie de ces photons secondaires en marge résulte de leur diffusion dans la matière par effet Compton¹⁷⁹.

II. Effets biologiques induits par la radiothérapie externe conformationnelle 3D par faisceaux de rayons X

Le traitement par 3D-CRT est fréquemment utilisé en radiothérapie anti-cancéreuse. Typiquement, le traitement varie entre une dose totale de 45 Gy à 70 Gy, délivrée par des doses fractionnées de 2 Gy par jour à l'exception des weekends¹⁸⁰. Dans cette partie, nous allons décrire les effets d'un tel traitement sur le volume irradié, le PTV mais également en dehors du PTV.

A. Origine des dommages cellulaires

Les rayonnements ionisants génèrent des effets biologiques en altérant la structure des molécules de la cellule et donc l'intégrité des composants cellulaires. Les modifications résultent d'ionisations directes des molécules biologiques ou de leur oxydation par des espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour *Reactive Oxygen Species*), elles-mêmes produites par radiolyse de l'eau. Cette dernière consiste en l'excitation ou l'ionisation de la molécule d'eau, conduisant à la formation de molécules d'eau ionisée H_2O^+ ou excitée H_2O^* et d'électrons. Par diverses réactions physiques et chimiques, ces espèces vont former les espèces H_3O^+ (ion hydronium), $HO\bullet$ (radical hydroxyle) et $H\bullet$ (radical hydrogène). Ces espèces, en réagissant entre elles ou avec les molécules en solution à proximité, vont former d'autres radicaux $HO\bullet$, $H\bullet$, $HO_2\bullet$ (radical hydroperoxyde), des ions HO^- (ions hydroxyle) et H_3O^+ ainsi que du H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène). Ces réactions produisent aussi des molécules d'eau (H_2O) et de dihydrogène (H_2)^{181,182}. La production de ROS est favorisée par la présence de dioxygène. En effet, l' O_2 va favoriser la production de peroxyde d'hydrogène parmi toutes les espèces réactives de l'oxygène¹⁸². Le peroxyde d'hydrogène est le ROS le plus stable, donc le moins réactif, mais qui diffuse le plus.

Ainsi, la présence d'oxygène est un facteur déterminant dans l'efficacité de la radiothérapie. En effet, il a été montré que les tumeurs hypoxiques sont plus radiorésistantes¹⁸³. L'effet de l'hypoxie est reflété par l'OER (*Oxygen Enhancement Ratio*) qui correspond au rapport dose appliquée sous hypoxie pour obtenir une fraction de survie X / dose appliquée sous normoxie pour obtenir une fraction de survie Y. Par exemple, pour la radiothérapie utilisant des rayons X, l'OER est estimé à 3. Cela signifie que pour obtenir le même effet en termes de survie en hypoxie qu'en normoxie, il faut multiplier la dose par 3¹⁸⁴. De manière paradoxale, l'irradiation induit une hypoxie aiguë, due en partie à la formation des ROS qui consomme de l'oxygène, à l'adaptation métabolique des cellules (augmentation de la respiration cellulaire) et à l'endommagement des petits capillaires¹⁸⁴. À la suite d'une irradiation, un délai est nécessaire pour retrouver une réoxygénation normale. La durée de ce délai dépend de l'angiogenèse, de la distance entre les cellules tumorales et les vaisseaux sanguins, du niveau de diminution de la respiration cellulaire et du remaniement tissulaire en réponse à la radiothérapie, notamment en réponse à la mort des cellules^{184,185}. Ce temps nécessaire de réoxygénation est une des raisons pour lesquelles la radiothérapie est fractionnée. Des fractions avec un délai interfractions trop court pour permettre une réoxygénation pourraient conduire à une baisse de l'efficacité du traitement et pourraient conduire à une sélection de cellules radiorésistantes^{184,186}.

B. Effets induits dans les cellules présentes dans le PTV

1. Endommagement de l'ADN

Pour les cellules présentes dans le PTV, principalement les cellules cancéreuses ciblées, les effets sont considérés être principalement dus à l'endommagement de l'ADN induit par les particules ionisantes. Cette considération est basée sur deux propriétés des molécules d'ADN dans la cellule : leur lent *turnover* et leur faible nombre de copies, contrairement aux autres biomolécules présentes dans la cellule comme les protéines et les lipides qui ont un *turnover* plus rapide et sont présentes en un nombre de copies souvent très important. La démonstration de l'ADN comme cible préférentielle de la radiothérapie a été réalisée en 1977. Les chercheurs ont utilisé une microaiguille en polonium, qui émet des particules alpha dont la distance d'arrêt est très courte. Ils ont appliqué cette microaiguille directement en contact avec la membrane plasmique et dans le cytoplasme, sans entraîner d'effet sur la cellule. En revanche, la mise en contact de l'aiguille directement avec le noyau a induit la mort des cellules¹⁸⁷.

L'endommagement de l'ADN peut se faire soit par ionisation directe, soit indirectement par oxydation par les ROS produites par radiolyse de l'eau¹⁸⁸. Les dommages principalement engendrés sont des DSB, des SSB et des oxydations de guanine en 8-oxo-guanine¹⁸⁹. De manière générale, on considère que 1 Gy induit dans une cellule 100 000 ionisations causant à terme plus de 1000 dommages de bases, 1000 SSB et entre 20 et 40 DSB. Il est à noter qu'une base endommagée peut, au cours de sa réparation par la voie BER (*Base Excision Repair*), conduire à la formation temporaire d'une SSB. Si une autre SSB se trouve sur le brin opposé à celui portant la base endommagée, une DSB peut être générée¹⁸⁴.

Les faisceaux de rayons X peuvent aussi induire des dommages dits complexes. Les dommages complexes sont définis comme un ensemble de dommages regroupés dans un cluster d'une dizaine de paires de bases. Par exemple, on peut observer plusieurs SSB ou une DSB associée à une SSB. Il est à noter que les dommages complexes mettent plus de temps à être réparés que des dommages simples. Ceci peut être dû à l'encombrement stérique engendré par le recrutement sur un même site de plusieurs complexes de signalisation et de réparation^{188,190}.

Différents modèles rendent compte du lien entre dommages à l'ADN et effets cellulaires. Les effets cellulaires dépendent du type de dommages, de la localisation dans le génome, des capacités de réparation de la cellule en fonction du nombre de dommages (saturation), de la phase du cycle cellulaire (qui peut fluctuer au cours des irradiations successives d'un traitement fractionné) et de la vitesse de prolifération de la cellule¹⁸⁴.

2. Endommagement des mitochondries

Les mitochondries et leur ADN sont sensibles aux radiations. De manière intéressante, l'ADN mitochondrial est plus sensible en termes de dommages que l'ADN nucléaire. Une délétion dite commune, ou Δ mtDNA⁴⁹⁷, est fréquemment observée en réponse à une irradiation par rayons X allant de 0,1 à 10 Gy¹⁹¹. Il s'agit d'une grande délétion entre les nucléotides à la position 8470 et 13446¹⁹². Pour pallier à ces dommages mitochondriaux, des mécanismes conduisant à une augmentation du nombre de copies d'ADN mitochondrial par mitochondrie ainsi que de la masse mitochondriale (elle peut augmenter d'un facteur 3,8) peuvent se mettre en place¹⁸³. L'augmentation du nombre de copies d'ADN mitochondrial par mitochondrie pourrait être responsable de l'augmentation observée de la quantité de certaines des protéines des complexes I, II, III et V composant la chaîne respiratoire après une irradiation par rayons X aiguë de 10 Gy. Cette augmentation est dépendante de la dégradation de HIF1 α . Ce qui suggère qu'en cas d'hypoxie où HIF1 α est stabilisé, cette augmentation pourrait ne pas avoir lieu^{192,193}. De manière contradictoire, des déficiences dans l'activité des complexes I, II ou III (cela varie selon les études) ont été rapportées¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Le complexe II, qui est une succinate déshydrogénase (SDH), est composé de 4 sous unités, SDH-A, SDH-B, SDH-C et SDH-D. Une étude a montré que l'irradiation induisait un défaut d'assemblage du complexe. En effet, en immunoprécipitant SDH-A, les auteurs n'ont retrouvé que SDH-B mais pas SDH-C et SDH-D. La raison de ce défaut d'assemblage est inconnue¹⁹⁴. L'activité du complexe I serait sensible aux peroxy-nitrites (ONO₂⁻) formés par l'oxydation de l'oxyde nitrique (NO) dont la concentration augmente après irradiation, suite à l'activité accrue de la NOSynthase^{195,197}. Par une étude protéomique, Barjaktarovic et al. ont montré une diminution de l'expression de certaines protéines des complexes III et I, pouvant expliquer une déficience d'activité¹⁹⁶. Cette déficience va induire une fuite d'électrons conduisant à la production d'anions superoxydes¹⁹⁸, à la dépolarisation de la membrane mitochondriale et à la libération de calcium. Cette libération de calcium induit alors la dépolarisation des autres mitochondries, par l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) et une augmentation des ROS¹⁹⁹.

3. Endommagement de la membrane plasmique

Récemment, la membrane plasmique a été reconnue comme un acteur important de la réponse aux radiations. En effet, celle-ci est directement affectée par les dommages lipidiques induits par les radiations tels que la peroxydation ou la fragmentation. La peroxydation lipidique est la réaction d'oxydation d'un acide gras par une espèce oxydante comme une ROS aboutissant à la formation de peroxyde lipidique. La fragmentation touche principalement les phospholipides et consiste en leur décomposition en acide phosphatidique et hydroxy-acétone. La peroxydation et la fragmentation

lipidiques peuvent affecter dans les minutes suivant l'irradiation la perméabilité de la membrane et sa fluidité²⁰⁰.

Associée à ces effets directs, les radiations induisent aussi en quelques minutes l'activation d'enzymes comme l'ASMase qui hydrolyse la sphingomyéline en céramide et conduit ainsi à une augmentation de la concentration membranaire en céramides et à une diminution de la concentration en sphingomyéline, affectant là encore la structure de la membrane. Suite à cet effet rapide des radiations, une deuxième vague de synthèse de céramides de novo survient dans les heures qui suivent par la voie de la céramide synthase activée par ATM suite aux dommages à l'ADN^{201,202}. L'introduction des céramides dans la membrane a pour effet de modifier les radeaux lipidiques (LR pour *Lipid Raft*). Ces LR sont des microdomaines de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipides. Ils regroupent de nombreux récepteurs, canaux ioniques et protéines de voies de signalisation, afin de faciliter l'interaction entre les différents acteurs. La production de céramides suite à une irradiation induit la coalescence de ces LR pour en former de plus larges, ce qui facilite l'oligomérisation activatrice des récepteurs de mort et donc conduit à la mort cellulaire par la voie extrinsèque de l'apoptose²⁰³. En outre, la coalescence des LR participe au regroupement des différentes sous-unités de la NADPH oxydase. L'activité de cette enzyme ainsi augmentée produit du stress oxydant, notamment par la formation de radicaux superoxyde. De manière intéressante, le stress oxydant augmente l'activité de l'ASMase, ce qui conduit à une boucle d'amplification de la production de céramides et d'induction de stress oxydant²⁰³. De plus, les céramides permettent d'activer des voies de signalisation, notamment via les *ceramide-activated serine/threonine phosphatases* PP2A et PP1. Ces voies influent sur Rb, BCL-2, AKT, c-JUN et PKC α , jouant ainsi un rôle dans la survie, l'apoptose, la différenciation et l'arrêt dans le cycle cellulaire²⁰⁴⁻²⁰⁶. De plus, par l'activation de BID via la cathepsin D, les céramides peuvent induire la voie intrinsèque de l'apoptose^{207,208}. La production de céramides peut aboutir à la sénescence via l'activation de Rb et la production de stress oxydant, mais, dans le cadre des irradiations, les céramides sont principalement impliquées dans la mort cellulaire. Ceci a été montré avec des souris KO pour l'ASMase spécifiquement dans les cellules endothéliales chez lesquelles l'apoptose de l'endothélium induite par irradiation dans différents organes est abolie²⁰³.

C. Mort cellulaire radio-induite

Les dommages induits par la radiothérapie peuvent conduire directement à la mort cellulaire ou à la sénescence. Il existe dans la littérature une erreur fréquente concernant la sénescence radio-induite. Certains articles la considèrent comme un mécanisme de mort cellulaire, car, par leur incapacité

à proliférer, les cellules sénescents ne forment pas de clones en tests de clonogénicité, fréquemment utilisés en radiobiologie pour évaluer la survie cellulaire¹⁸⁴. Néanmoins, comme développé dans le chapitre 1 de ce mémoire, la sénescence n'est pas un mécanisme de mort cellulaire. Elle correspond au contraire à un état d'adaptation qui confère à la cellule une longue durée de vie associée à un arrêt dans le cycle cellulaire.

La mort cellulaire radio-induite proprement dite peut survenir rapidement suite à l'irradiation ou après plusieurs mitoses. La mort cellulaire induite rapidement est nommée mort cellulaire précoce ou prémitotique. Elle est relativement rare, car elle ne touche que les cellules ayant un cycle cellulaire court. Dans ce mécanisme, l'activation de la voie DDR et l'activation de p53 se font en quelques minutes. C'est, par exemple, le devenir fréquent des lymphocytes irradiés²⁰⁹. Néanmoins, dans la majorité des situations, la mort cellulaire n'intervient qu'à la suite d'une ou plusieurs mitoses^{210,211}. Les cellules irradiées peuvent mourir par différents mécanismes que nous détaillerons ici.

1. Apoptose

Les cellules irradiées peuvent mourir par apoptose, autrement appelée mort programmée de type I. Les cellules en apoptose subissent un arrondissement, une perte de contact avec les cellules à proximité, une condensation de la chromatine, une fragmentation de l'ADN et enfin la formation de corps apoptotiques qui seront phagocytés par les cellules avoisinantes ou par des cellules immunitaires spécialisées. Dans le cadre de la radiothérapie, le déterminant majeur conduisant à l'apoptose est supposé être la présence de DSB non ou mal réparées. Dans la plupart des cas, les cellules ne vont pas mourir immédiatement après l'irradiation, mais après plusieurs divisions conduisant à une grande instabilité génétique¹⁸⁴.

Il existe deux grandes voies d'induction de l'apoptose : la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.

La voie extrinsèque dépend des récepteurs de mort et de leur ligand. Parmi ces récepteurs, on compte le TNFR1, FAS, DR4 et 5 fixant respectivement le TNF, le FAS-L et le TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Lorsque le ligand fixe le récepteur, celui-ci se trimérise et recrute des protéines adaptatrices telles que FADD pour le récepteur FAS et TRADD pour le TNFR1. Ces protéines adaptatrices vont activer des caspases régulatrices telles que la caspase 8. Les caspases sont des protéases à cystéine qui clivent leurs substrats après des résidus acide aspartique. L'activation des caspases requiert leur clivage en deux sous-unités qui s'assemblent en un tétramère actif. Les caspases régulatrices peuvent cliver d'autres caspases dites effectrices (-3, -6, -7) qui, par leur grande variété de cibles, vont induire la mort cellulaire²¹²⁻²¹⁴.

La voie intrinsèque, appelée aussi voie mitochondriale, est régulée par les protéines de la famille BCL-2. Tous les membres de cette famille possèdent des domaines d'homologie avec BCL-2

(domaines BH). Cette famille comprend des protéines à effet antiapoptotique possédant les domaines BH1 à BH4 (BCL-2, BCL-XL, BCL-w, MCL-1) ainsi que des protéines à effet proapoptotique possédant soit les domaines BH1 à BH3 (BAX, BAK, BOK) ou ne possédant que le domaine BH3, protéines appelées alors BH3-only (BAD, BID, BIM, HRK, PUMA, NOXA). En temps normal, les protéines antiapoptotiques inhibent les protéines proapoptotiques par hétérodimérisation. Après un stimulus proapoptotique, les protéines antiapoptotiques sont déplacées par les protéines BH3-only. Ainsi libérées, les protéines proapoptotiques telles que BAX et BAK vont créer par homodimérisation des pores dans la membrane externe des mitochondries. Ces pores vont permettre le relargage du cytochrome C qui, associé à APAF1, va lier la procaspase 9 pour former l'apoptosome. Au sein de l'apoptosome, la caspase 9 va s'activer, ce qui va entraîner une cascade d'activation de caspases effectrices²¹²⁻²¹⁴.

Après irradiation, les DSB activent la voie DDR et p53, lequel induit alors l'activation transcriptionnelle de BAX et inhibe l'expression de BCL-2, ce qui favorise la voie intrinsèque de l'apoptose. p53 peut aussi induire l'expression de TRAIL et FAS-L et conduire ainsi à une mort par la voie extrinsèque, de manière autocrine ou paracrine. Sous irradiation, l'apoptose peut néanmoins être induite indépendamment de l'activation de p53. En effet, il a été montré que des cellules hématopoïétiques humaines déficientes pour p53 conservent leur capacité à entrer en apoptose suite à une irradiation^{212,213}.

La mort par apoptose représente environ 20 % de la mort induite par les irradiations et intervient de manière relativement précoce. En effet, des cellules irradiées à 10 Gy entrent en apoptose 3 jours après irradiation²¹⁵.

2. Mort par autophagie

De manière plus tardive, la mort par autophagie peut intervenir et sera prédominante au 7^e jour postirradiation²¹⁵. La mort par autophagie est aussi nommée mort programmée de type II, par analogie avec l'apoptose qui est la mort programmée de type I. Comme décrit dans le chapitre 1.1.E, la mort par autophagie met en jeu de nombreuses vésicules autophagiques (autophagosomes et autophagolysosomes), sans activation des caspases, sans dégradation de l'ADN et sans perte d'intégrité de la membrane plasmique^{216,217}.

3. Nécrose et nécroptose

Les mécanismes de mort prédominants induits par les radiations ionisantes semblent être la mort par nécrose, qui est une forme de mort non programmée, et par nécroptose, qui est une forme de nécrose régulée, mais indépendante des caspases^{218,219}. Le point commun entre nécrose et nécroptose est qu'elles sont caractérisées par une perte d'intégrité de la membrane plasmique. Cette

perte d'intégrité membranaire conduit au relargage dans le milieu extracellulaire de *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMP), qui sont des molécules comme des acides nucléiques, des cytokines, ou des *Heat Shock Proteins* (HSP). Ces DAMP sont de puissants inducteurs d'inflammation susceptibles d'activer une réponse immunitaire innée ou adaptative^{220 218}. La nécrose est induite le plus souvent suite à un fort endommagement membranaire. La nécroptose quant à elle est engagée par les mêmes stimuli que ceux induisant l'apoptose. Elle nécessite l'activation de RIP1 (*Receptor Interacting Protein kinase*) et RIP3 qui va conduire à l'oligomérisation de MLKL et sa translocation à la membrane plasmique. Les pores ainsi formés entraînent une perméabilisation de la membrane qui conduit à la mort cellulaire²²⁰.

4. Catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique est un mécanisme de contrôle des cellules ne parvenant pas à finir leur mitose. On suppose que ce processus est mis en place suite à des dommages à l'ADN mal ou pas réparés, entraînant des aberrations chromosomiques comme des chromosomes dicentriques qui peuvent bloquer le déroulement de la mitose. Dans le cas de la catastrophe mitotique induite par les irradiations, même si ce mécanisme est probable, il n'a pas été démontré²²¹. Il n'est pas clair non plus dans les données actuelles si la catastrophe mitotique est un processus de mort en soi, ou s'il précède et permet l'induction d'apoptose, de nécrose ou de nécroptose.

Un point à considérer est que théoriquement les cellules doivent avoir passé le *checkpoint* G2/M pour pouvoir subir une catastrophe mitotique. Les cellules cancéreuses ont souvent un contrôle du cycle cellulaire défaillant, ce qui permet ce passage en phase M, malgré la présence de dommages à l'ADN²²¹.

La catastrophe mitotique n'a pas forcément lieu lors de la première mitose faisant suite à l'irradiation, mais souvent après plusieurs divisions. Ce délai est peut-être dû au temps nécessaire pour accumuler suffisamment de dommages pour induire la catastrophe mitotique²²¹. Il expliquerait également que le plus souvent les cellules irradiées ne meurent qu'après un délai assez long.

D. Sénescence radio-induite

Il ne fait aucun doute que l'induction de sénescence est l'une des conséquences de l'irradiation^{5,222-226}. He et al. suggèrent que de manière aigüe après la radiothérapie, la présence de cellules sénescents est bénéfique car favorise la réparation du tissu sain endommagé. En revanche, si la sénescence persiste, celle-ci peut être associée à la pathogénèse de la fibrose pulmonaire radio-induite²²².

Les personnes ayant eu un cancer et/ou traitées par radiothérapie ou chimiothérapie présentent un risque plus élevé de développer des pathologies liées à l'âge comme des maladies cardiovasculaires, des maladies neurodégénératives ou des sarcopénies. Ces données pourraient suggérer que la sénescence radio-induite pourrait être à l'origine de certains des effets secondaires de la radiothérapie^{227,228}. Cette hypothèse a été étayée par Soysouvanh et al. en utilisant le modèle murin p16-LUC. Les auteurs ont montré qu'une radiothérapie stéréotaxique thoracique appliquée en une dose de 90 Gy ou en 5 fractions de 20 Gy induisait un phénotype sénescence dès 4 mois et ce jusqu'à au moins 16 mois post-irradiation. Une analyse histologique poussée a permis de montrer que les pneumocytes de type II, les macrophages et les cellules endothéliales présentaient une augmentation de l'activité SA-β-Gal ainsi qu'une augmentation de l'expression de p16 et p21. De manière intéressante, le co-marquage de l'activité SA-β-Gal et de l'ARNm de p21 a montré que certaines cellules étaient doublement marquées, et d'autres ne présentaient qu'un seul des deux marqueurs, ce qui suggère une hétérogénéité de phénotype dans la population des cellules sénescence radio-induites. De plus, l'analyse a montré que l'induction du phénotype sénescence était corrélée à l'endommagement du tissu pulmonaire, avec notamment une induction de fibrose²²⁹. Une autre étude de l'équipe de Beauséjour a montré que des souris irradiées une fois en corps entier à 8 Gy présentaient des foyers 53BP1 à partir de 12 semaines post-irradiation et une activation de p16 à partir de 17 semaines post-irradiation dans le foie et le cerveau. La reproduction de cette expérience dans des souris déficientes pour p53 a montré que l'activation de p16 était indépendante de p53, malgré la présence de foyers 53BP1 marqueurs de la voie DDR aboutissant normalement à l'activation de p53²²⁵. Une autre étude utilisant le système 3MR permettant lui aussi de suivre l'activation du promoteur de p16 par bioluminescence démontre l'induction de sénescence suite à des irradiations, mais dans des temps beaucoup plus longs. En effet, les auteurs rapportent une augmentation de bioluminescence ex vivo dans le tissu adipeux viscéral, les reins et les poumons, 90 jours après une irradiation corporelle totale à 7 Gy²³⁰. Une autre étude montre une activation de p16 suite à une irradiation stéréotaxique des poumons à 90 Gy après 8 mois, mais de manière non significative, puis après 16 mois de manière significative²²⁹.

Le débit de dose peut influencer sur l'induction du phénotype sénescence. En effet, il a été montré que la radiothérapie FLASH, où le débit de dose est beaucoup plus élevé que dans la radiothérapie conventionnelle, induisait moins de foyers 53BP1 marqueurs de DSB, diminuait la proportion de cellules sénescence et diminuait le phénotype de fibrose²²³.

Hernandez-Segura et al.⁵ ont comparé des données de RNAseq provenant de différents types cellulaires (fibroblastes, mélanocytes, kératinocytes et astrocytes) induits en sénescence par activation d'un oncogène, par limite répliquative ou par irradiation (10 jours après une irradiation à 10

Gy, γ -radiation par $\alpha^{137}\text{Cs}$). Ils ont ainsi mis en lumière des profils d'expression différant partiellement en fonction de l'inducteur. Ils ont ainsi listé 647 gènes exprimés différemment dans les fibroblastes induits en sénescence par les radiations. Parmi ces 647 gènes, ils en ont trouvé 386 up-régulés, dont l'ontologie indique qu'ils sont impliqués dans le métabolisme du phosphore, dans la communication cellulaire et la transduction du signal. Ils ont également trouvé 261 gènes down-régulés suite aux radiations. L'ontologie de ces gènes montre une implication dans la synthèse d'ARN, l'ajout des queues polyA et le métabolisme des ARNm, ce qui semble indiquer une baisse globale de la synthèse d'ARN⁵.

Ils ont, par ailleurs, mis en évidence des disparités de transcriptome en fonction des types cellulaires induits en sénescence par irradiation. Mais ils ont suggéré, sur la base d'une analyse ontologique, que ces différences relevaient de la différenciation cellulaire plutôt que de l'état sénéscent. Ils ont aussi trouvé un tronc commun de 55 gènes modulés par l'irradiation quel que soit le type cellulaire. De manière étonnante, ce tronc commun ne contient pas les marqueurs de sénescence communément utilisés tels que les CKI p16 et p21, la lamine B1 ou des composants du SASP, mais une augmentation de l'expression de BCL-w ainsi que de la cycline D1⁵.

Dans cette même étude, les auteurs ont suivi la dynamique d'apparition des marqueurs de sénescence à 4 jours, 10 jours et 20 jours après une irradiation à 10 Gy. Comparé à la condition non-irradiée, ils ont retrouvé des changements d'expression de 61 gènes communs à tous les temps (dont 31 gènes n'intervenant pas dans la quiescence) partagés par tous les types cellulaires irradiés (kératinocytes, mélanocytes, fibroblastes). L'ontologie de ces gènes indique une implication dans le cancer et la progression dans le cycle cellulaire. D'autres gènes étaient exprimés différemment selon le temps post-irradiation. Au jour 4, ils ont observé une activation de gènes impliqués dans la voie DDR et la signalisation de p53. Au jour 10, ils ont trouvé des gènes impliqués dans le métabolisme et notamment dans le cycle de l'acide citrique et dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Ils ont aussi retrouvé l'activation de p38MAPK et de ses isoformes, de p53, de p21 ainsi que l'expression de gènes du SASP. Il est à noter que les marqueurs du SASP étaient différents selon le type cellulaire et le temps post-irradiation. Au 20^e jour, ils ont remarqué des changements dans l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans le remodelage de la chromatine, avec notamment la diminution de l'expression de la lamine B1⁵.

La sénescence induite par la radiothérapie peut contribuer à l'effet curatif de la radiothérapie, car elle stoppe la croissance des cellules tumorales. Cependant, elle peut également être dommageable pour le patient. En effet, les radiations peuvent induire la sénescence des cellules saines dans ou à proximité de la tumeur. Ceci pourrait être responsable de la baisse de la qualité de

vie et de la survie des patients. Par exemple, il a été suggéré que la sénescence radio-induite des cellules saines pourrait être responsable sur le long terme de fibrose, de troubles cardiovasculaires et d'athérosclérose^{231–233}.

III. Effet bystander

L'effet bystander peut être défini comme l'ensemble des modifications induites dans des cellules non irradiées présentes à proximité du volume irradié, en réponse à un signal émis par les cellules du volume irradié.

Ces modifications induites dans les cellules du volume non irradié sont en partie de nature épigénétique. En effet, des études rapportent une hypométhylation de l'ADN et la modification de plusieurs microARN en marge du volume irradié. Ces changements épigénétiques sont variables selon les tissus et le sexe²³⁴. On observe également une production accrue de ROS, prostaglandines et cytokines pro-inflammatoires par les cellules irradiées dans le PTV qui peuvent affecter les cellules environnantes²³⁵. In vitro, on peut observer une baisse de viabilité et une induction de sénescence de cellules soumises à l'effet bystander par une mise en contact avec des cellules irradiées²³⁶. À ma connaissance, aucune étude n'a encore démontré la capacité de l'effet bystander à induire des cancers secondaires. Néanmoins, des expériences in vitro ont montré que du sérum provenant de personnes irradiées pouvait induire des mutations dans des cellules saines. La survenue de ces mutations était corrélée à une dérégulation du système oxydant/antioxydant dans ces cellules saines²³⁷.

Le signal induisant l'effet bystander est varié en composition. On compte des exosomes dont la production et la sécrétion augmentent dans les cellules irradiées. Ces exosomes ont la capacité d'induire une réponse inflammatoire dans le tissu sain environnant²³⁸. En plus des exosomes, les cytokines ont aussi la possibilité d'induire une réponse inflammatoire. Ces cytokines peuvent provenir des cellules mortes ou mourantes dans le PTV. De manière intéressante, le type de mort cellulaire dans le PTV conditionne la réponse inflammatoire environnante. En effet, les cellules mourant par nécrose vont produire entre autres du TNF- α conduisant à une réponse cytotoxique, alors que les cellules mourant par apoptose vont relarguer des cytokines comme le TGF- β conduisant à une immunité tolérogène. Comme vu précédemment, l'irradiation induit dans le volume irradié une augmentation du stress oxydant conduisant à l'oxydation de l'ADN. L'ADN oxydé, s'il est libéré suite à la lyse de la cellule irradiée, va induire un effet bystander avec notamment une production de radicaux libres dans les cellules non irradiées. Le mécanisme exact menant à cette production de radicaux libres

suite à l'exposition à de l'ADN oxydé n'est pas connu. Toutefois, il a été observé que l'exposition de cellules à de l'ADN oxydé induisait une augmentation de l'expression de NOX4 (NADPH oxydase) qui est un producteur de ROS^{239,240}.

On peut supposer que la sénescence induite dans le PTV pourrait intervenir dans l'effet bystander, du fait du sécrétome des cellules sénescents. Une première démonstration de ce rôle a été réalisée en 2015 dans une étude portant sur la lignée de carcinome colorectal HCT116. Les auteurs ont utilisé des cellules HCT116 p53+/+ et p53-/- qui, respectivement, entrent en sénescence ou en apoptose après irradiation. Ils ont réalisé des expériences dans lesquelles des cellules non irradiées étaient exposées aux composés sécrétés par des cellules irradiées desquelles elles étaient séparées par un filtre laissant passer les cytokines. Ils ont observé une augmentation de l'effet bystander produit par les cellules sauvages irradiées par rapport aux cellules p53-/. L'effet bystander était caractérisé par une augmentation de la proportion de cellules sénescents dans les deux compartiments, associée à une diminution des capacités clonogéniques²⁴¹.

IV. Effets biologiques induits par la dose déposée hors champ

Comme précisé précédemment (Chapitre 2 ; partie I ; D : effets de bord), la marge du PTV reçoit également des radiations provenant principalement de la diffusion de particules ionisantes dans la matière. La dose reçue est bien évidemment plus faible que dans le PTV et est déposée par des photons dont le spectre d'énergie est décalé vers les énergies faibles. Une partie des effets biologiques et cliniques qui se développent à proximité du volume traité pourraient donc être attribués à cette dose hors champ. Néanmoins, à ma connaissance, aucune étude n'a jusqu'à présent investigué les effets attribuables à la dose hors champ en excluant l'effet bystander. Le système expérimental que j'ai utilisé au cours de ma thèse permet d'aborder cette question, car les cellules sont placées en bordure de champ d'irradiation, dans des puits permettant une séparation physique d'avec les cellules irradiées dans le PTV, ce qui permet d'exclure l'effet bystander.

Chapitre 3 : Cancers secondaires postradiothérapie

Les effets secondaires de la radiothérapie sont divisés en deux catégories : les effets secondaires précoces ou aigus et les effets secondaires tardifs ou chroniques.

La gravité des effets secondaires dépend de la dose, de la localisation de la tumeur et de l'historique du patient. Par exemple, le tabagisme et la consommation d'alcool augmentent le risque d'effets secondaires¹⁸⁴.

Les effets secondaires précoces sont principalement dus à une mort massive des cellules. C'est le cas par exemple de la leucopénie ou de l'épithéliolyse de l'épiderme et des muqueuses, notamment buccales. On observe aussi une augmentation des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 α et TNF- α . La combinaison radiothérapie et chimiothérapie augmente les effets secondaires précoces¹⁸⁴.

Les effets secondaires tardifs sont, quant à eux, dus à plusieurs facteurs. Tout d'abord, intervient l'augmentation de l'inflammation. Le contexte inflammatoire favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, augmentant la synthèse de collagène responsable de fibrose. Cette différenciation est due à la sécrétion de TGF- β par de nombreux types cellulaires en réponse à l'irradiation. On peut aussi observer une destruction des capillaires et une détérioration des vaisseaux avec par exemple une télangiectasie et une perte des muscles lisses. Ces différents facteurs vont induire une déficience des organes, voire des pertes de fonctions¹⁸⁴.

Un autre effet secondaire tardif de la radiothérapie est le développement de cancers secondaires.

I. Définition

Les cancers secondaires postradiothérapie sont définis selon plusieurs critères. Ils doivent avoir lieu dans ou à proximité du PTV, avec une latence minimale de trois ans entre l'exposition initiale aux rayonnements et le diagnostic du cancer secondaire. Ils doivent avoir une histologie clairement différente de celle de la tumeur primaire pour laquelle la radiothérapie a été appliquée, afin de ne pas être confondus avec une récurrence de la tumeur primaire²⁴².

II. Risque relatif et facteurs de risque de développer un cancer secondaire postradiothérapie

Le risque relatif (RR) de développer un cancer postradiothérapie est défini comme l'incidence des cancers postirradiation divisée par l'incidence des cancers dans la population de référence, avec une accordance en termes d'âge et de genre. Dans le cadre des cancers postradiothérapie, il est intéressant de prendre en compte deux populations de référence, la population générale (PG) n'ayant pas eu de cancer primaire et une population qui a eu une tumeur primaire, mais qui n'a pas été traitée par radiothérapie (noRT), dans l'idéal uniquement par une résection chirurgicale. En effet, le RR de développer un cancer de noRT sur PG est égal à 1,12, ce qui signifie que les personnes ayant eu une tumeur primaire sont plus susceptibles de développer un nouveau cancer que la population générale. Le RR des patients traités par radiothérapie de développer un cancer secondaire est de 1,31 par rapport à PG et de 1,08 seulement lorsque l'on compare à noRT²⁴³.

Le RR de développer un cancer secondaire augmente en corrélation avec l'augmentation de la dose du traitement initial. Néanmoins, aucune modélisation mathématique n'est parvenue à prédire l'incidence des seconds cancers en fonction de la dose. La dose minimale à laquelle il existe un risque de développement de cancer est encore débattue. Tucker et al. ont calculé le RR de survenue d'un sarcome secondaire par rapport à la population générale : il est égal à 6 pour une dose comprise entre 10 et 30 Gy, à 17 entre 30 et 40 Gy, à 21 entre 40 et 60 Gy et à 38 au-dessus de 60 Gy^{244,245}. Il est admis que dès 2 Gy, le risque de développer un second cancer n'est pas négligeable. Des expériences d'irradiation du corps entier (WBI, pour *Whole Body Irradiation*) de souris ont permis de montrer que l'incidence des leucémies myéloïdes augmentait dès 0,5 Gy (irradiation ⁶⁰Co, faisceau γ)²⁴⁶. Une autre étude sur des chiens irradiés dans des conditions similaires a montré une légère augmentation des cancers secondaires dès 0,16 Gy²⁴³. Par ailleurs, différentes études ont comparé le développement d'un second cancer chez la souris après une seule dose ou après un fractionnement de cette dose. Les résultats ne montrent pas d'effet positif ou négatif du fractionnement sur le RR de développer un second cancer²⁴⁷.

Le risque de développer un second cancer après irradiation augmente avec l'âge. Il faut savoir que le temps de latence médian entre la survenue du cancer secondaire et le traitement initial est de 15 ans. Une étude portant sur le développement de sarcomes induits postradiothérapie chez des femmes traitées pour un cancer du col de l'utérus a montré que le RR était de 1,4 entre 10 et 19 ans post-traitement, de 2,6 entre 20 et 29 ans post-traitement et de 3,3 après 30 ans post-traitement²⁴⁵.

Les lymphomes et les cancers du sein, à cause de leur fréquence et de la longévité des patients à la suite du traitement, sont les tumeurs primaires présentant le plus haut taux de cancers secondaires postirradiation²⁴².

Certaines études semblent montrer un effet du genre sur le risque de développer un second cancer. C'est le cas des cancers secondaires localisés au niveau pulmonaire chez des patients traités par radiothérapie pour une maladie de Hodgkin. En effet, le RR calculé est de 1,18 pour les hommes contre 1,04 pour les femmes^{242,243}.

En plus de l'âge, d'autres facteurs de risque peuvent augmenter le RR de développer un cancer secondaire postradiothérapie. Par exemple, la présence d'un terrain génétique favorable comme le rétinoblastome bilatéral, le syndrome de Li-Fraumeni, la maladie de Recklinghausen et l'ataxie-télangiectasie²⁴².

Un traitement initial associant radiothérapie et chimiothérapie augmente le RR de développer un second cancer par rapport à la PG à 4,4, alors que ce RR est de 1,1 après chimiothérapie seule et de 2,8 après radiothérapie seule²⁴³.

Ainsi, la radiothérapie induit un risque de développer un cancer secondaire. L'âge, le terrain génétique et la combinaison radiothérapie et chimiothérapie sont des facteurs aggravant ce risque.

III. Types de cancers secondaires post-radiothérapie : focus sur les sarcomes

À la suite d'une radiothérapie, des cancers secondaires de toute nature peuvent se développer. En effet, ont été décrits des cancers du rein, du tractus digestif, du système nerveux central, du sein, de la thyroïde, des mélanomes, des lymphomes, des leucémies et des sarcomes^{248,249}.

Un fait notable est que chez l'homme, les primates non humains, les chiens, les souris et les rats, le cancer majoritaire postirradiation est le sarcome. Chez l'homme, le RR de développer un sarcome après une radiothérapie comparé à la PG est de 10,5. De nombreux sous-types histologiques de sarcomes ont été décrits comme les ostéosarcomes, histiocytomes fibreux malins, fibrosarcomes, angiosarcomes et liposarcomes^{242,243,248,250}.

Le pronostic des seconds sarcomes est le plus souvent mauvais avec un taux de survie à cinq ans variant de 10 à 30 %. Les sarcomes sont souvent de haut grade, avec un risque de récurrence locale et un fort potentiel métastatique vers les poumons et le foie²⁴².

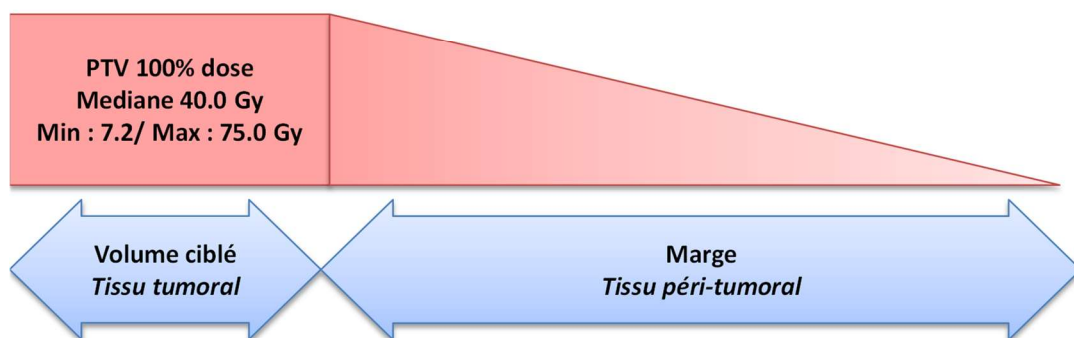
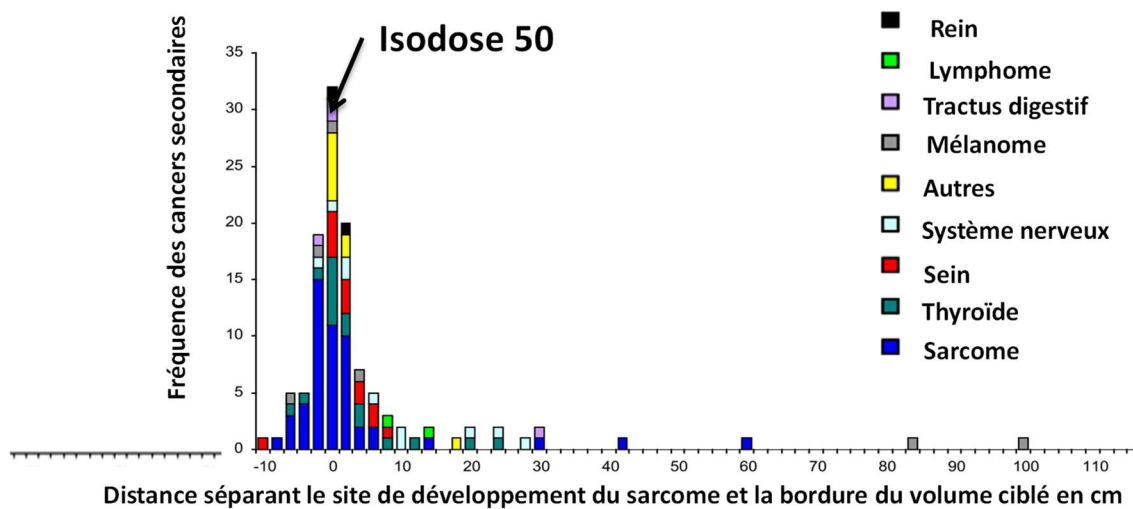


Figure 6 : Localisation des cancers secondaires en fonction de la distance avec l'isodose 50 (distance 0 cm). D'après Diallo et al. 2009. Les données sont issues d'une étude rétrospective sur 115 patients âgés de 0 à 16 ans lors de la radiothérapie initiale. Parmi ces 115 patients, 108 ont été traités par photons et 7 l'ont été par électrons.

IV. Localisation des cancers secondaires par rapport au territoire traité

Une considération importante est, qu'au cours d'une radiothérapie, le PTV reçoit la plus forte dose, mais d'autres parties du volume corporel reçoivent aussi de la dose. Il s'agit d'une part des volumes situés dans la trajectoire des faisceaux et, d'autre part des volumes ne se trouvant pas sur la trajectoire des faisceaux mais recevant des particules ionisantes dispersées depuis la tête de l'accélérateur ou diffusant dans la matière depuis le PTV¹⁷⁸.

Diallo et al. ont analysé la distribution spatiale des seconds cancers par rapport au PTV initial (**Figure 6**). Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée sur une cohorte de 115 personnes âgées de 0 à 16 ans lors de la radiothérapie initiale effectuée dans différents centres français et britanniques pour un cancer solide. La majorité des 115 patients ont été traités par rayons X ; seulement 7 patients ont été traités par électrons. Pour chaque patient, les auteurs ont recalculé la dose délivrée dans le PTV et en marge, en prenant en compte les données calculées par les centres de radiothérapie, la dose issue de la diffusion dans le patient, les fuites de l'accélérateur et des équipements utilisés pour limiter ces fuites. Cette dose estimée a été modélisée dans un fantôme imitant le patient. Dans ce patient, ils ont mesuré la distance qui sépare le centre de la tumeur secondaire avec la limite du champ d'irradiation (correspondant à l'isodose 50) pris comme 0. Par convention, la distance à l'intérieur du PTV où la dose est supérieure à 50 % a été notée négativement et celle à l'extérieur positivement. Les résultats montrent que 76 tumeurs secondaires sur 115 se sont développées à proximité de la limite du champ d'irradiation, à des distances allant de -2,5 cm à +5 cm. La dose dans cette zone varie de presque 0 à plus de 70 Gy en fonction des patients. De manière intéressante, la dose moyenne qui a permis le développement de sarcomes secondaires dans cette zone est de 25,7 Gy contre une dose moyenne de 15 Gy pour les autres types de tumeurs hors sarcome ce qui pourrait suggérer que le développement des sarcomes nécessite une plus forte dose²⁴⁸.

V. Génétique et transcriptomique des sarcomes postradiothérapie versus sarcomes sporadiques

Une étude déjà ancienne a montré que 88 % des sarcomes en territoire irradié présentent une mutation inactivatrice sur l'un des allèles de p53, contre 16 % pour les sarcomes spontanés. De manière intéressante, le type de mutation entre les deux types de sarcomes est différent : en territoire irradié, les sarcomes présentent environ deux fois plus de petites délétions d'approximativement 20 paires de bases par rapport aux sarcomes sporadiques^{251,252}. Une autre étude de génomique comparative portant sur 53 sarcomes sporadiques versus 31 sarcomes postirradiation a montré une perte des régions portant les gènes *CDKN2A* (codant pour les CKI p16 et p14) et *CDKN2B* (codant pour la CKI p15) dans 39 % des sarcomes sporadiques et dans 71 % des sarcomes postradiothérapie. Néanmoins, *RB1*, qui intervient dans la transition G1/S et qui est contrôlé par ces CKI, est délété de manière équivalente entre les sarcomes sporadiques et les sarcomes postradiothérapie (dans environ 75 % des sarcomes sporadiques et postradiothérapie). Au total, on retrouve une perte de *RB1* ou de *CDKN2A* dans 91 % des sarcomes sporadiques contre 97 % des sarcomes postradiothérapie²⁵³.

Hadj-Hamou et al. ont réalisé une analyse transcriptomique comparant les différences d'expression génique entre des sarcomes sporadiques et des sarcomes postradiothérapie. Ils ont trouvé 136 gènes exprimés différemment entre les deux conditions. La signature transcriptomique des sarcomes postradiothérapie ainsi dégagée est robuste, car elle a permis de classer correctement à l'aveugle 30 sarcomes sur 36 comme étant postradiothérapie ou sporadiques. Les fonctions des protéines encodées par les gènes de cette signature suggèrent que les sarcomes postradiothérapie seraient soumis à un stress oxydant chronique. Plus précisément, on compte parmi ces gènes une augmentation de *NADH dehydrogenase complex 1*, *NDUFAF2*, *NDUFS8* et *MRS2* qui sont impliqués dans la chaîne respiratoire mitochondriale dont l'activité induit la synthèse de ROS. On trouve aussi une augmentation d'expression de gènes codant des enzymes cytoplasmiques responsables de la production de ROS comme *OLA1* qui est une *Obg-like ATPase* qui réprime la réponse antioxydante. Le gène *GNG12* est aussi surexprimé. Celui-ci a un rôle dans la production de radicaux libres d'oxyde nitrique. On observe une diminution d'expression de gènes impliqués dans la réponse antioxydante tels que la glutathion S-transférase cytosolique (*GSTM5*). On note aussi une up-régulation des gènes de réponse au stress mitochondrial comme *CSDA* et une baisse des gènes inducteurs d'apoptose tels qu'*AVEN*. On observe également une augmentation d'expression des gènes *EIF4E* et *ARIH1* impliqués dans la traduction. Cela peut être une réponse au stress oxydant qui induit du dommage aux biomolécules comme les protéines et donc nécessite un *turn-over* important. En ligne avec cette idée, on constate aussi une dérégulation de nombreux gènes impliqués dans l'ubiquitination et la déubiquitination et dans la dégradation des protéines par les lysosomes ou par

autophagie. On observe de plus une augmentation des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN oxydé, comme *NONO* impliqué notamment dans la réparation des DSB par NHEJ en facilitant la formation du complexe KU70/KU80²⁵⁴.

Ainsi, les analyses transcriptomiques montrent que les sarcomes radio-induits sont caractérisés par un niveau de stress oxydant élevé. Les analyses génomiques quant à elles révèlent des altérations dans des gènes comme *CDKN2A* et *CDKN2B*, plus fréquente dans les sarcomes postradiothérapie par rapport aux sarcomes sporadiques. Néanmoins, de manière générale, la voie p16/Rb est altérée de manière équivalente dans les deux types de sarcomes.

Chapitre 4 : Projet de thèse

I. Hypothèse du projet

Mon travail de thèse s'est inscrit dans un projet qui visait à comprendre les mécanismes d'émergence des sarcomes postradiothérapie. Diallo et al. ont montré que ces sarcomes se développent préférentiellement en marge du PTV²⁴⁸. Cette marge est caractérisée par une dose allant de 80 à moins de 5% de celle du PTV, déposée principalement par des photons ayant diffusé dans la matière avec perte d'énergie¹⁷⁸. Notre hypothèse était que les cellules saines présentes dans cette marge et soumises à des irradiations de faible dose et de faible énergie (principalement autour de 500 keV) subiraient principalement des SSB et peu de DSB. Or, il avait été montré dans l'équipe dans des études antérieures qu'une accumulation de SSB (induites par un stress oxydant modéré) résulte en l'induction d'un état sénescence propice à l'émergence de cellules aux propriétés néoplasiques¹⁷. Ainsi, notre hypothèse était que l'irradiation des cellules saines en marge du champ d'irradiation pourrait, en induisant préférentiellement des SSB, induire une sénescence prématurée, qui permettrait aux cellules de survivre à long terme. Puis, certaines cellules pourraient s'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence pour donner naissance à des cellules filles ayant acquis des propriétés néoplasiques et ainsi générer un sarcome secondaire.

II. Les objectifs du projet de thèse

Le premier objectif de mon projet de thèse a donc été d'analyser les cassures de l'ADN (SSB et DSB) induites dans des fibroblastes humains de derme positionnés en marge d'un PTV.

Le second objectif a été de caractériser le devenir de ces fibroblastes irradiés en marge du PTV en termes de croissance, mort cellulaire et surtout sénescence.

Le troisième objectif était de suivre le devenir des cellules sénescences obtenues, notamment de déterminer leur potentiel à s'échapper de l'arrêt dans le cycle cellulaire et générer des cellules filles ayant un certain potentiel tumorigène.

Enfin, le dernier objectif était de valider ces résultats in vivo, chez la souris.

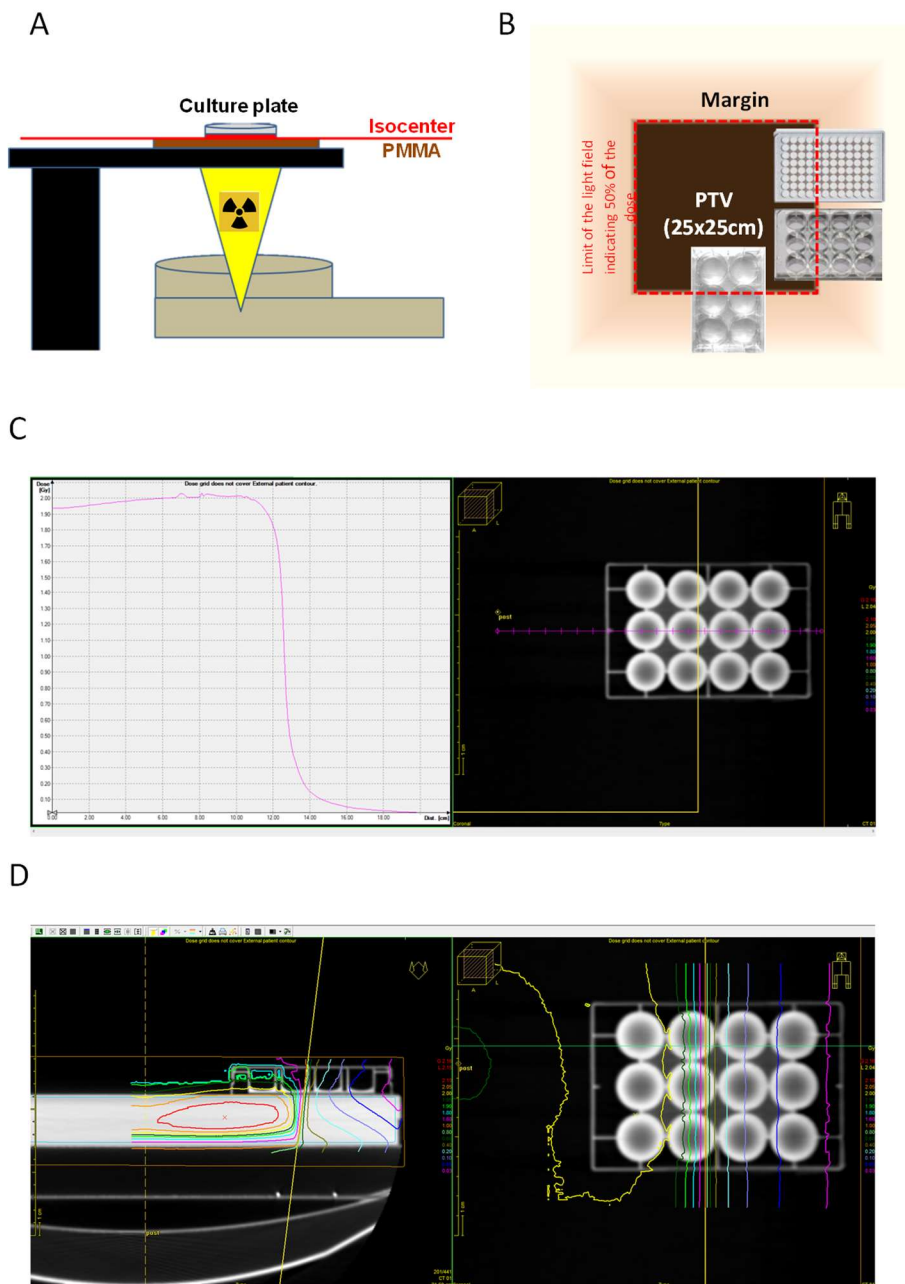


Figure 7 (figure supplémentaire 2 de l'article) : Cell irradiation set-up. (A) Schematic representation of how 96-, 12- or 6-well plates were irradiated. Plates were putted down a 2- or 4cm-thick poly(methyl methacrylate) (PMMA) plate laid on the carbon fiber table for an irradiation at 6 or 20MV respectively and irradiated from below. (B) Schematic representation of how well plates were positioned in order to have at the same time wells inside the PTV and outside, in the margin. The red line represents the limit of the light field at which the deposited dose is 50% of that in the PTV. (C) Scanning of a 12-well plate and calculation of the dose deposited by a 20MV beam using the treatment planning system of the Centre Oscar Lambret (Lille). The limit of the beam (isodose 50) is indicated by the yellow line). (D) Isodose curves for a 12-well plate. Note that the bottom of the wells inside the PTV did receive 100% of the dose. Similar results were obtained with 96- and 6-well plates.

Chapitre 5 : Résultats

La plupart des résultats présentés dans ce chapitre font l'objet d'une publication actuellement soumise pour publication disponible en annexe : « **The out-of-field dose in radiation therapy induces delayed tumorigenesis by senescence evasion** » par Erwan GOY, Maxime TOMEZAK, Caterina FACCHIN, Nathalie MARTIN, Emmanuel BOUCHAERT, Jérôme BENOIT, Joe NASSOUR, Laure SAAS, Claire DRULLION, Priscille BRODIN, Alexandre VANDEPUTTE, Olivier MOLENDI-COSTE, Olivier PLUQUET, Albin POURTIER, Fabrizio CLERI, Eric LARTIGAU, Nicolas PENEL, et Corinne ABBADIE. Les figures de l'article utilisées dans cette partie sont incluses dans le texte avec un rappel vers l'article dans la légende. Y sont ajoutées des figures ne figurant pas dans l'article.

I. Dispositif expérimental d'irradiation de cellules

Le dispositif d'irradiation des cellules en culture a été mis au point par Maxime Tomezak au cours de sa thèse en collaboration avec les équipes du Pr Éric Lartigau du Centre Oscar Lambret et du Pr Fabrizio Cleri de l'Institut d'Électronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie.

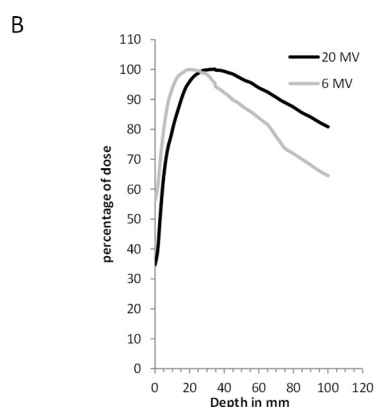


Figure 7 (figure supplémentaire 1 de l'article): Physical parameters of the linear accelerator (Varian Primus CLINAC®). (B) Varian Primus CLINAC®'s depth profile recorded in photon mode at 6 or 20MV.

Les irradiations ont été exclusivement réalisées en utilisant le Varian Clinac® du Centre Oscar Lambret en mode photons, car il s'agit là du mode le plus utilisé, à 6 ou 20 MV. Les données recueillies par Maxime Tomezak concernant le rendement profondeur du Varian Clinac® ont permis de définir comment utiliser la machine de façon à ce que 100 % de la dose soit déposée au niveau des cellules qui résident au fond des plaques ou boîtes de culture (**Figure 7**). Ainsi, les plaques de culture posées

sur la table ont été irradiées par en dessous, en plaçant le bras à 180°. De plus, les plaques de culture ont été surélevées de 4 cm pour les faisceaux de 20 MV et de 2 cm pour les faisceaux de 6 MV grâce à l'ajout de plaques de PMMA (**Figure 7A**).

Les cellules ont été cultivées en plaques 96-, 12- ou 6- puits, selon les besoins en quantité de cellules pour chaque type d'expériences. Les plaques étaient positionnées à cheval sur la limite du PTV, matérialisé par un champ lumineux, de telle sorte à avoir des puits dans le PTV et des puits en marge à différentes distances de la limite du champ. La taille du PTV a toujours été fixée à 25 cm x 25 cm (**Figure 7B**).

L'équipe a réalisé des expériences de dosimétrie, afin d'évaluer la dose que les cellules reçoivent effectivement. Les résultats indiquent que, comme attendu, 100 % de la dose est déposée au fond des puits placés dans le PTV. Cette dose décroît rapidement en marge (**Figure 7C et D**).

Avec ce dispositif, grâce à la séparation des cellules dans des puits, nous nous affranchissons de l'effet bystander. Néanmoins, tous les puits sont reliés par le plastique (polystyrène) des plaques, ce qui permet une diffusion des particules ionisantes dans la matière.

Le modèle cellulaire choisi pour le projet a été le fibroblaste normal de derme humain (NHDF). Ce choix a été fait pour deux raisons. Premièrement, les fibroblastes sont un modèle classique d'étude de la sénescence depuis l'étude princeps de Hayflick et al dans les années 1960. Deuxièmement, les fibroblastes sont des cellules mésenchymateuses suspectées à l'origine des fibrosarcomes, un sous-type de sarcome secondaire.

II. L'irradiation induit des cassures simple brin dans les cellules positionnées en marge du PTV

La première étape du travail a été d'analyser les cassures de l'ADN (SSB et DSB) induites dans des NHDF positionnés en marge d'un PTV.

A. L'irradiation induit des foyers XRCC1 en marge du PTV

Cette étape a été réalisée par Maxime Tomezak, en collaboration avec l'équipe de Priscille Brodin.

En utilisant le système expérimental décrit précédemment, Maxime Tomezak a irradié des NHDF cultivés dans des plaques 96 puits. Il a tout d'abord irradié ces cellules une seule fois à 2 Gy, en mode photons à 20 MV. Trente minutes à 2h après irradiation, il a analysé les dommages à l'ADN par

immunofluorescence anti-XRCC1 pour les SSB et anti-53BP1 pour les DSB. L'analyse a été faite en utilisant un microscope haut débit (*Operetta High-Content Imaging System*).

Les résultats montrent que l'irradiation induit des foyers XRCC1 et 53BP1 dans les cellules positionnées dans le PTV. En revanche, de manière intéressante, les cellules positionnées en marge n'ont présenté que peu ou pas de foyers 53BP1 par comparaison aux cellules non irradiées, mais elles ont présenté des foyers XRCC1, sur une distance allant jusqu'à 5 cm de la limite du champ (**Figure 8**). Ces résultats suggèrent que l'irradiation induit des SSB et DSB dans le PTV, comme attendu, mais uniquement des SSB en marge.

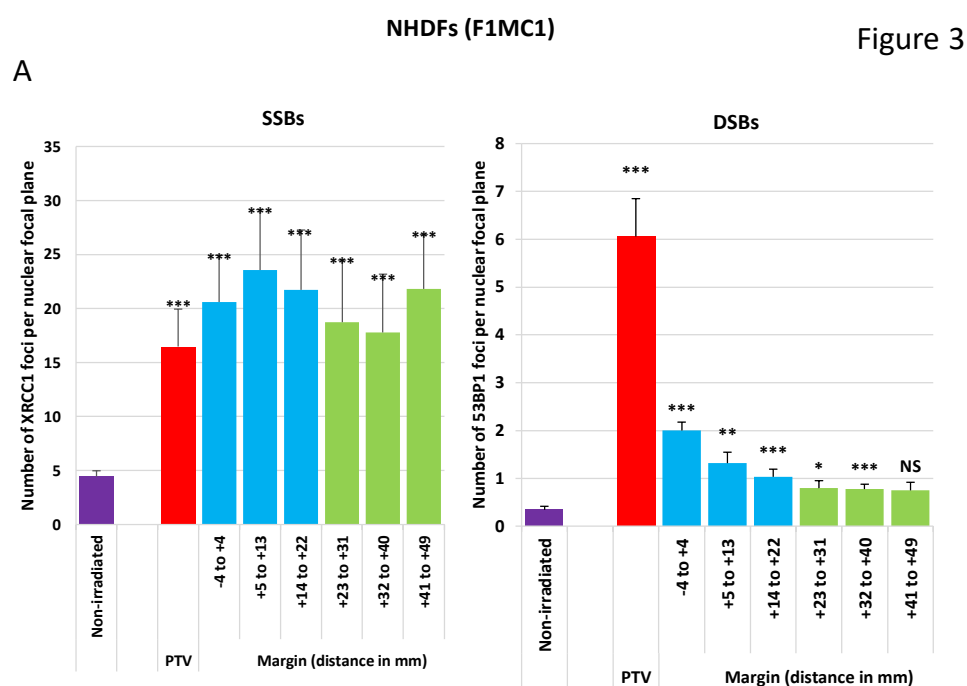


Figure 8 (Figure 3 de l'article): SSBs and DSBs generated in NHDFs positioned at the margin or inside a PTV having received 2Gy. (A) Proliferating NHDFs (donor F1MC1, PD=32) positioned straddling the PTV and the margin were irradiated once at 2Gy. Cells were fixed 20min or 2hrs later for the immunodetection of XRCC1 and 53BP1 respectively. XRCC1 and 53BP1 foci were quantified by high content microscopy. The bar chart represents the mean number +/- SD of foci per cell in 100 cells of all wells of a column. An ANOVA test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs

L'irradiation étant réalisée chez les patients avec des énergies de 6 et/ou 20 MV, Maxime Tomezak a ensuite comparé les dommages générés par une irradiation à 2 Gy réalisée à 6 ou 20 MV. Il n'a pas observé de différences significatives dans l'induction de dommages entre ces deux énergies de faisceau (**Figure 9**). Dans la suite de l'étude, l'équipe a utilisé l'énergie de 20 MV, car la courbe de

rendement en profondeur montre que la plage de profondeur à laquelle 100 % de la dose est déposée est plus large (**Figure 7**), ce qui améliore la reproductibilité des expériences.

Sup Figure 9

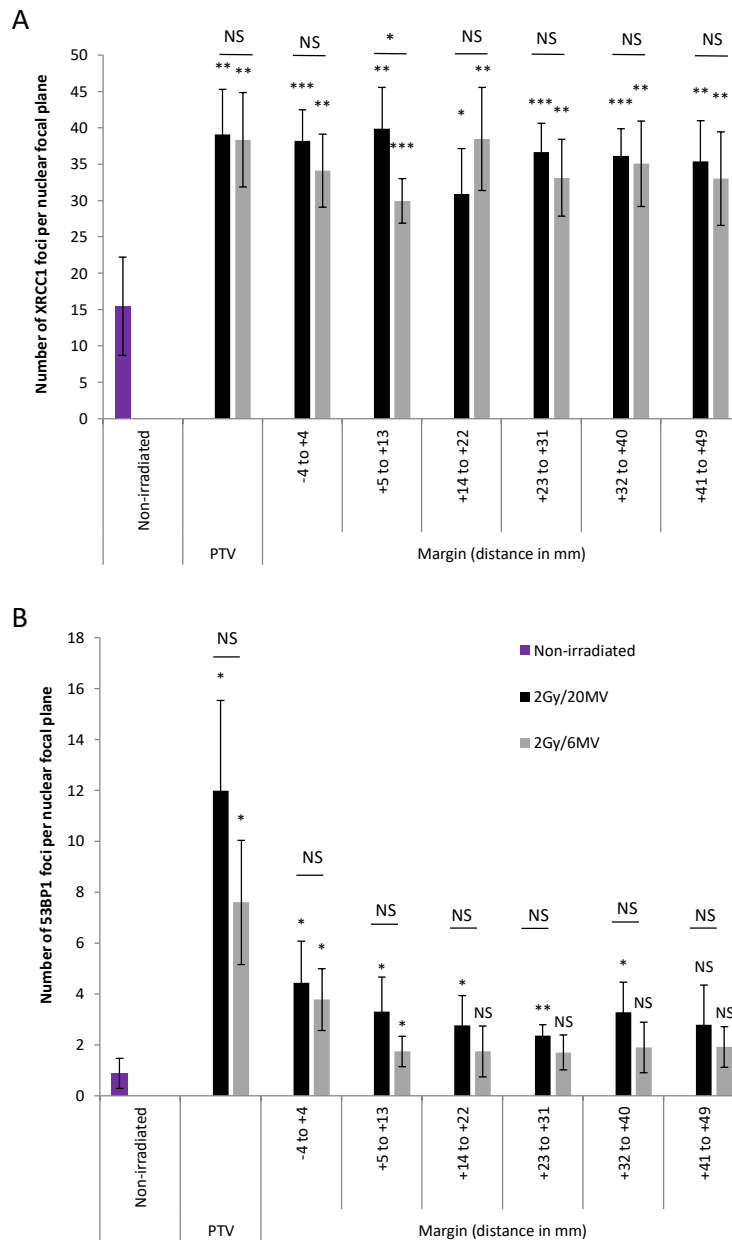


Figure 9 (figure supplémentaire 9 de l'article): 53BP1 and XRCC1 foci after an irradiation with 6 and 20 MV photon beams. Proliferating NHDFs (donor F1MC1, PD=39) cultured in 96-well plates were irradiated as in Figure 4 at 2Gy by a photon beam of 6 or 20MV. XRCC1 and 53BP1 foci were detected and analyzed as in Figure 4A. An ANOVA with a Bonferroni correction was performed for each condition in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs. A T-test was performed for each distance the number of XRCC1 or 53BP1 foci between 20MV and 6MV.

B. L'irradiation induit des SSB dans des NHDF positionnés en marge du PTV

Le résultat des analyses par immunofluorescence réalisées par Maxime Tomezak étant assez étonnant, à savoir que les NHDF placés en marge ne subissent que des SSB avec peu décroissance de leur quantité sur 5 cm, la première étape de mon travail a été de vérifier ces résultats en utilisant une technique totalement différente, l'essai comète.

L'essai comète est une technique d'électrophorèse sur cellules uniques permettant de quantifier les DSB, les SSB et les dommages dits alcali-labiles. La première étape consiste à mettre les cellules en suspension dans un gel d'agarose. Les cellules sont ensuite lysées grâce à un tampon à pH 10 contenant une forte concentration en chlorure de sodium et du détergent. Cette lyse ne laisse que le nucléoïde, c'est-à-dire une structure comprenant l'ADN génomique et la matrice nucléaire composée de protéines d'échafaudage et d'ARN.

Ces nucléoïdes figés grâce à l'agarose sont placés dans un champ électrophorétique forçant la migration des fragments d'ADN issus de cassures vers l'anode de la cuve d'électrophorèse. Après migration, le marquage de l'ADN grâce à un intercalant de l'ADN comme l'iodure de propidium ou le SYBRGreen permet de discerner des comètes composées de deux parties : une tête correspondant au nucléoïde et une queue formée par les fragments d'ADN ayant migré. Lorsque le tampon d'électrophorèse utilisé est à pH 8, l'ADN reste sous sa structure native de double hélice. Dans cette situation, seuls les fragments issus de DSB vont migrer hors du nucléoïde. En revanche, l'utilisation d'un tampon alcalin à pH 12,3 permettra, grâce à la dénaturation de la double hélice d'ADN, la migration de fragments issus à la fois de DSB et de SSB. Ainsi, en réalisant des électrophorèses à pH 8 et à pH 12,3 en parallèle, on peut évaluer les quantités de SSB et de DSB.

De plus, il est à noter l'existence de dommages à l'ADN dits sites alcali-labiles. Comme leur nom l'indique, ce sont des dommages qui, soumis à un pH alcalin, vont former une cassure. La nature de ces sites est assez méconnue. Ils correspondraient à la fois à des sites abasiques²⁵⁵, des alkylations de bases ou de phosphates avec la formation d'alkylphosphotriesters²⁵⁶. Ils sont détectés au pH très alcalin de 13. L'utilisation d'un pH plus faible comme le pH 12,3 permet de détecter spécifiquement les SSB et les DSB sans détecter les sites alkali-labiles²⁵⁷.

Les essais comète permettent de quantifier directement les cassures de l'ADN. En effet, la proportion d'ADN dans la queue, reflétée par le ratio de fluorescence entre la queue et la tête, ainsi que la taille de la queue sont proportionnelles à la quantité de cassures dont sont issus les fragments. Une étude montre que le *tail moment*, qui est le produit entre le pourcentage d'ADN dans la queue et la longueur de la queue, est la quantification qui offre la meilleure linéarité entre la quantité de dommages estimés et la valeur du *tail moment*^{258,259}.

En utilisant le même système expérimental que précédemment, j'ai irradié des NHDF positionnés dans le PTV ou en marge une fois, à 2 Gy. La réparation des cassures a été bloquée en plaçant les cellules après irradiation à 10°C, pendant le trajet entre le Centre Oscar Lambret et le laboratoire (une dizaine de minutes). J'ai vérifié l'efficacité de ce blocage en comparant, par essai comète à pH 8, les dommages induits dans des NHDF irradiés une fois à 2 Gy dans le PTV, transportés à 10°C ou à température ambiante. Les résultats montrent que seul un retour à 10 °C permet d'obtenir des comètes (**Figure 10**).

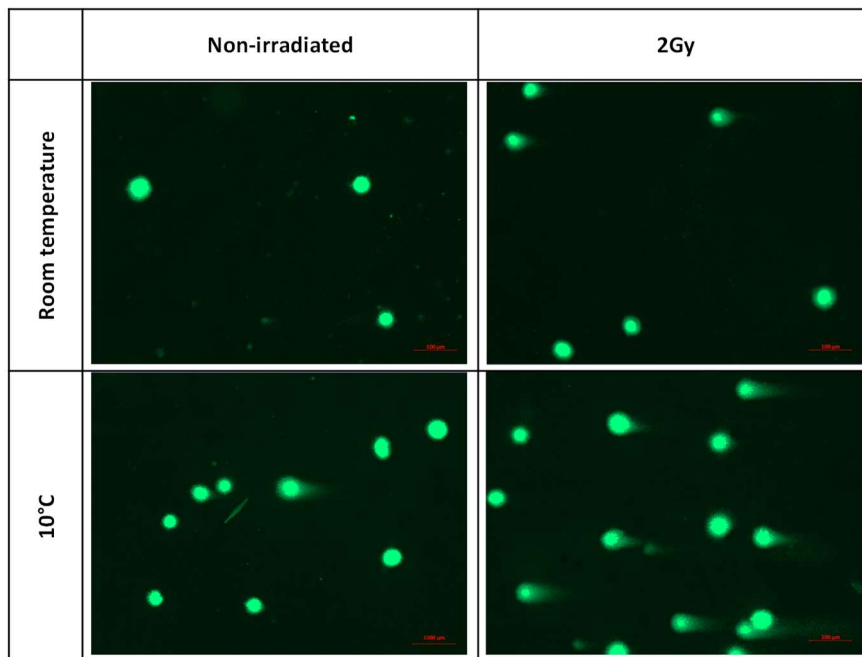


Figure 10 : Comparaison de l'analyse des DSB radio-induites par essai comète à pH 8 suite à un transport entre le Centre Oscar Lambret et le laboratoire, à température ambiante ou à 10 °C. La barre d'échelle correspond à 100 µm.

Ce protocole étant établi, j'ai quantifié les SSB et DSB dans les NHDF placés dans le PTV ou en marge après une irradiation à 2 Gy. Les résultats des essais comète à pH8 montrent que les cellules irradiées dans le PTV ont un plus grand *tail moment* que les cellules non irradiées, ce qui indique une augmentation du nombre de DSB. En revanche, nous n'observons pas d'augmentation du *tail moment* en marge, ce qui indique qu'il ne se forme pas de DSB en marge (**Figure 11**).

Les essais comète à pH 12,3 mettent en évidence une augmentation du *tail moment* dans les cellules placées dans le PTV par rapport aux cellules non irradiées, ainsi que dans les cellules placées en marge (**Figure 12**). Etant donné que les cellules placées en marge ne présentent pas de DSB, cette augmentation du *tail moment* à pH12.3 reflète uniquement la présence de SSB. Ainsi, comme dans les résultats d'immunofluorescence anti-XRCC1, nous observons de manière étonnante une augmentation des SSB jusqu'à 5 cm de distance de la limite des faisceaux, zone où la dose théoriquement reçue est très faible.

Cette analyse a été répétée sur trois donneurs de fibroblastes différents, à savoir des F1MC (donneur mâle de type caucasien âgé de 1 an au moment du don), F6MC (donneur mâle de type caucasien âgé de 6 ans au moment du don) et F26FC (donneuse femelle de type caucasien âgée de 26 ans au moment du don). Les trois donneurs donnent des résultats similaires (**Figure 12**).

L'ensemble des résultats indiquent donc qu'une irradiation à 2 Gy n'induit que peu ou pas de DSB dans les cellules positionnées en marge du PTV, mais induit des SSB.

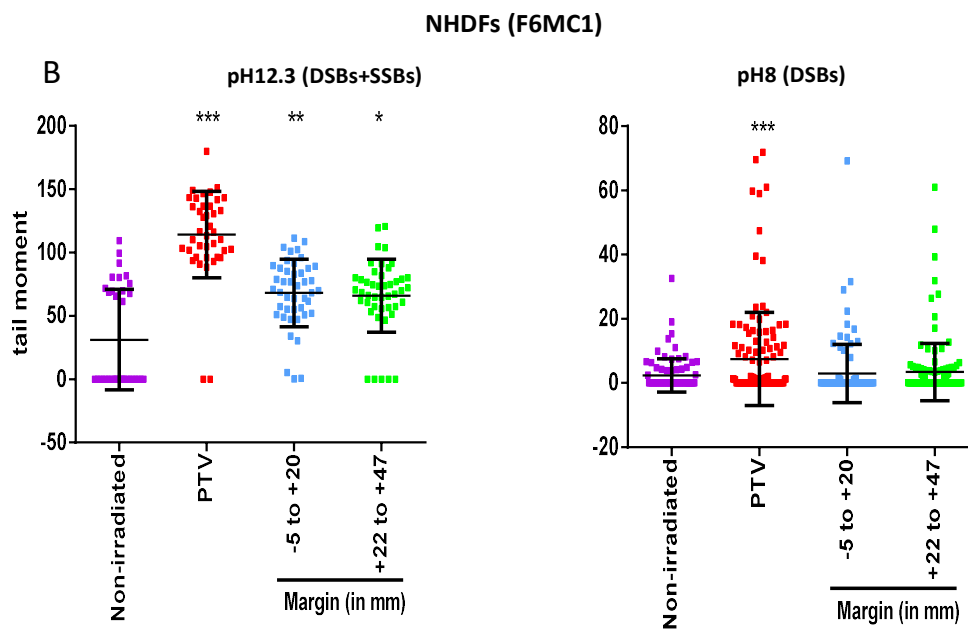


Figure 11 (figure 3 de l'article): SSBs and DSBs generated in NHDFs positioned at the margin or inside a PTV having received 2Gy. (B) Proliferating NHDFs (F6MC1, PD=20.53) were irradiated as in A, immediately put at 10°C for 30min and then processed for comet assays. Each dot in the scatter plots represents the value of the tail moment of one cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of tail moment values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

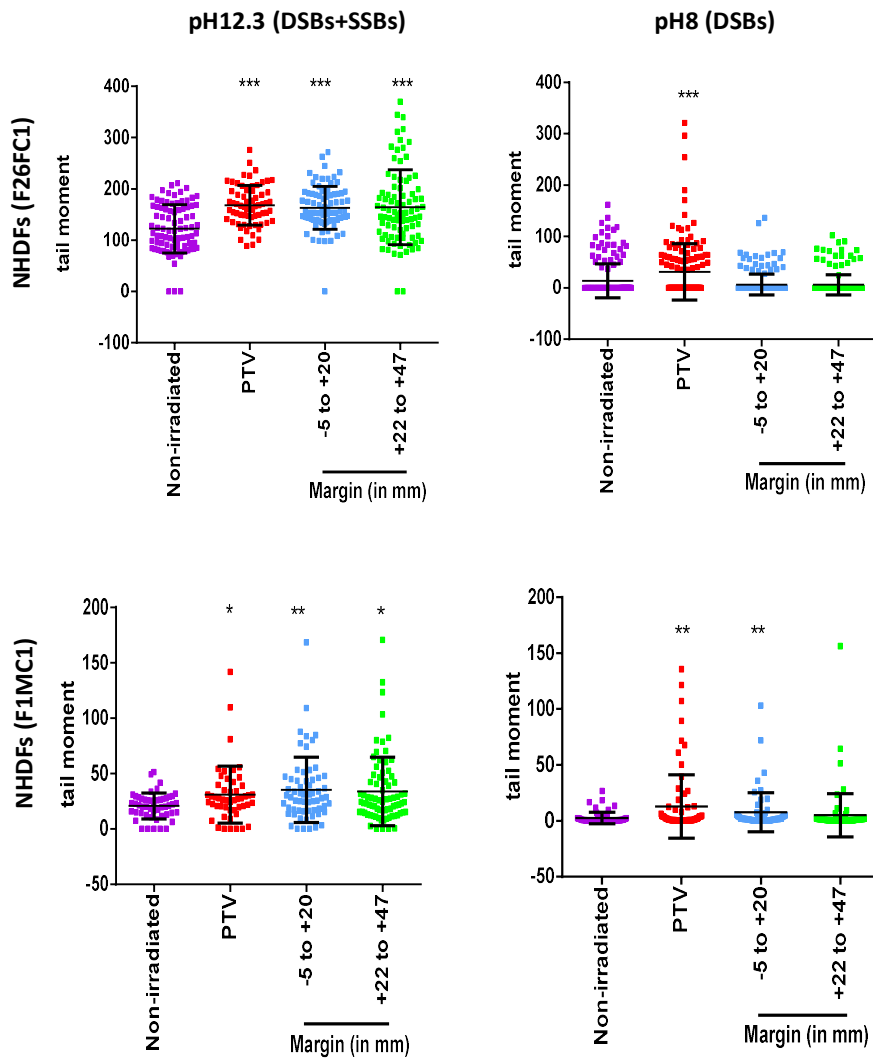


Figure 12 (figure supplémentaire 8 de l'article): SSBs and DSBs generated in NHDFs derived from different donors positioned at the margin or inside a PTV receiving 2Gy. Proliferating NHDFs (F26MC1, PD=6.2; F1MC1, PD=24.3) cultured in 12-well plates were irradiated at 2Gy and then processed for comet assays as in Figure 4B. Each dot in the scatter plots represents the value of the tail moment of one cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of tail moment values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

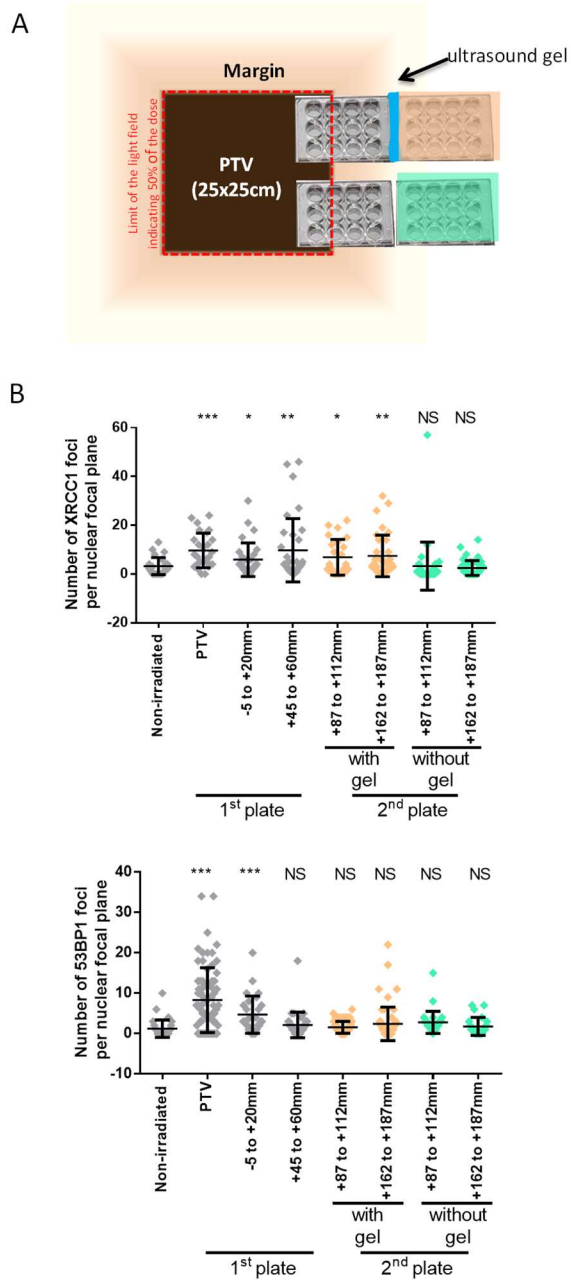


Figure 13 (figure supplémentaire 10 de l'article): A propagation of ionizing particles in the material is necessary for SSB induction at distance from the PTV. (A) Schematic representation of how the 12-well plates were aligned, sealed or not together with an ultrasound gel (250820, Asept Inmed), in order to have wells inside the PTV and wells in the margin, in continuity or not with the PTV. The red line represents the limit of the light field at which the deposited dose is 50% of that in the PTV. (B) Immunodetection of XRCC1 and 53BP1 foci in NHDFs (F6MC1, PD: 27.93) irradiated at 2Gy as represented in A. Cells were fixed 20min or 2hrs after the irradiation for the immunodetection of XRCC1 or 53BP1 respectively. Each dot in the scatter plots represents the number of foci in a focal plane of one nucleus. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of foci number of 50 cells. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

C. Une continuité de la matière depuis le PTV est requise pour la formation de SSB dans les cellules positionnées en marge

Comme décrit dans le chapitre 2. I. D (effet de bord), la dose déposée en marge est majoritairement issue de photons qui ont diffusé dans la matière et non à des photons déviés par des éléments de l'accélérateur¹⁷⁸. Nous avons donc supposé que de telles particules diffusant dans la matière seraient responsables des SSB générées en marge. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réitéré l'expérience précédente, mais en ajoutant une plaque de culture dans la continuité de la précédente. Une continuité de la matière entre les plaques a été assurée ou non par ajout d'un gel d'échographie. Les plaques ont été irradiées, puis nous avons analysé les DSB et SSB respectivement par immunofluorescence anti-53BP1 et anti-XRCC1.

Comme précédemment, nous n'avons observé des foyers 53BP1 que dans les NHDF positionnés dans le PTV et dans la marge la plus proximale. En ce qui concerne les foyers XRCC1, nous en avons observé dans les NHDF des puits de la première plaque, jusqu'à 60 mm de distance de la limite du PTV. Dans la deuxième plaque juste accolée à la première mais sans ajout de gel d'échographie, nous n'avons observé aucune augmentation du nombre de foyers XRCC1 par rapport à la condition non irradiée. En revanche, dans la deuxième plaque mise en étroit contact avec la première par le gel d'échographie, nous avons observé une augmentation significative du nombre de foyers XRCC1 par rapport aux cellules non irradiées, et ce jusqu'à 187 mm de distance du PTV (**Figure 13**). Ces résultats indiquent que les tissus en marge du PTV pourraient subir des SSB jusqu'à 18,7 cm de la bordure du champ d'irradiation. La nécessité d'une continuité dans la matière, assurée par un gel d'échographie dans notre expérience, montre que ces effets en marge sont dus à la diffusion dans la matière de particules ionisantes.

Sup Figure 12

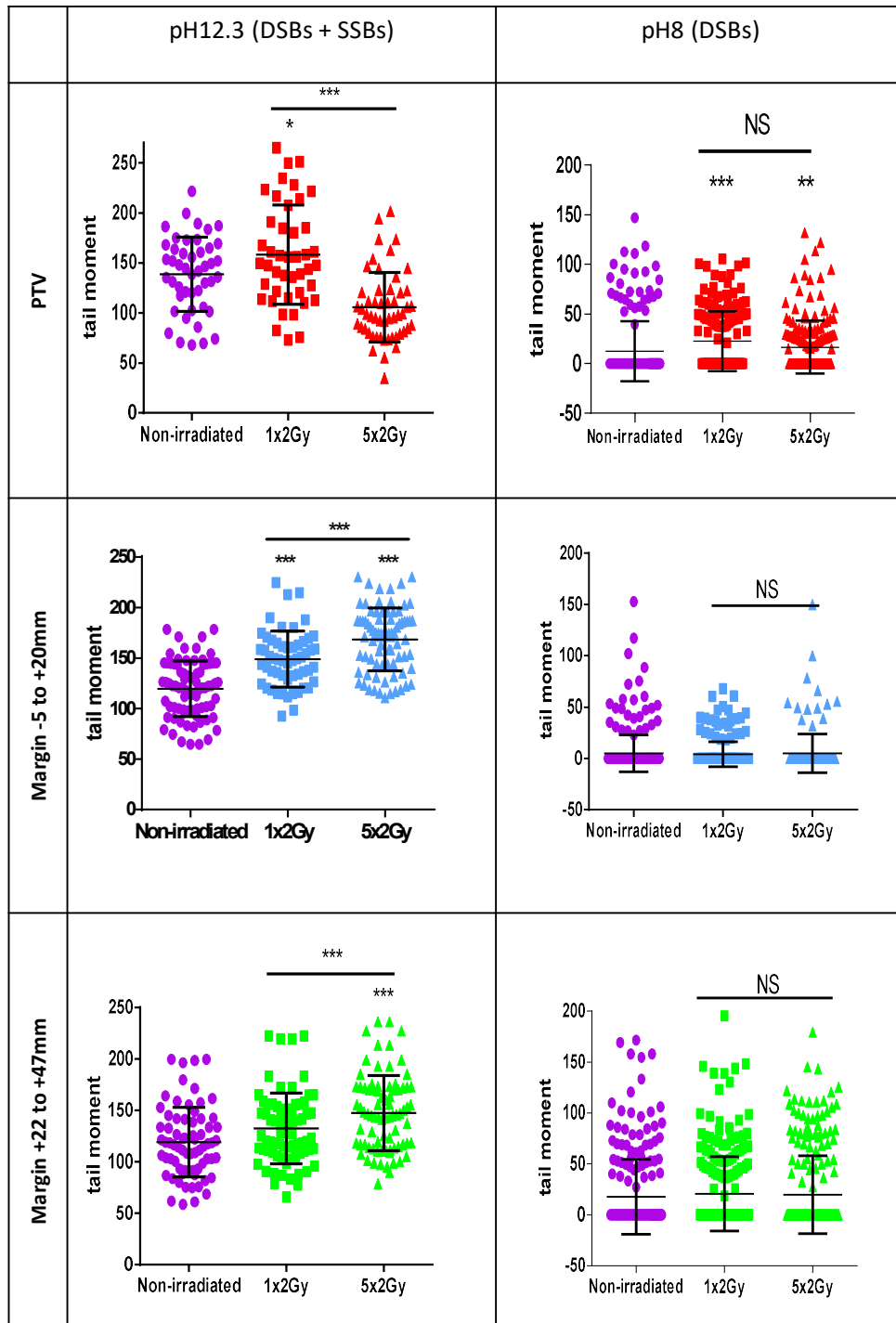


Figure 14 (figure supplémentaire 12 de l'article): SSBs accumulate with successive irradiations in NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day. Proliferating NHDFs (donor F6MC1, PD=22.67) cultured in 12-well plates were irradiated or not only one time at 2Gy or during 5 days at 2Gy daily. Just after the last irradiation, cells were put at 10°C for 30min and then processed for comet assays. Each dot in the scatter plots represents the value of the tail moments of one cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of tail moment values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs or between cells irradiated one or five times.

III. Les SSB formées dans les cellules positionnées en marge du PTV s'accumulent au cours d'irradiations fractionnées

A. Un protocole de radiothérapie fractionnée induit des SSB dans les NHDF positionnés en marge du PTV

En clinique, la radiothérapie se réalise, la majorité du temps, de manière fractionnée à 2 Gy par jour à l'exception des weekends. Nous avons donc analysé par essai comète les dommages à l'ADN induits par un protocole de radiothérapie fractionnée. Nous avons comparé la quantité de DSB et SSB générés dans des NHDF positionnés dans le PTV et en marge après une unique irradiation (notée 1 x 2 Gy) ou après 5 jours d'irradiation (notés 5 x 2 Gy). L'objectif était de déterminer si l'un des types de cassures s'accumulait avec des irradiations successives.

En ce qui concerne les DSB, mesurés à pH 8, nous en avons observé uniquement dans les NHDF positionnés dans le PTV comme précédemment. Les *tail-moments* étaient similaires après 1 x 2 Gy ou 5 x 2 Gy (**Figure 14**), suggérant que ces cassures ne s'accumulent pas.

Dans les essais comète à pH 12,3, nous avons observé à nouveau une formation de SSB dans les NHDF positionnés en marge du PTV irradié à 1 x 2 Gy. Les *tail-moments* obtenus après 5 irradiations quotidiennes étaient plus grands que ceux obtenus après 1 x 2 Gy (**Figure 14**), ce qui suggère que les SSB s'accumulent dans les cellules positionnées à la marge du PTV au fur et à mesure des irradiations successives.

De manière surprenante, dans les NHDF positionnés dans le PTV, non seulement les SSB et les DSB ne s'accumulent pas, mais leur nombre est moins important après une semaine d'irradiation qu'après une irradiation unique (**Figure 15**). Étant donné que des cellules meurent dans le PTV, nous pensons qu'il pourrait y avoir, au fur et à mesure des irradiations, une sélection des cellules les plus radiorésistantes, c'est-à-dire celles ayant la meilleure capacité de réparation.

Globalement, ces résultats montrent que, en marge, l'irradiation induit uniquement des SSB qui s'accumulent au cours des irradiations successives.

Sup Figure 13

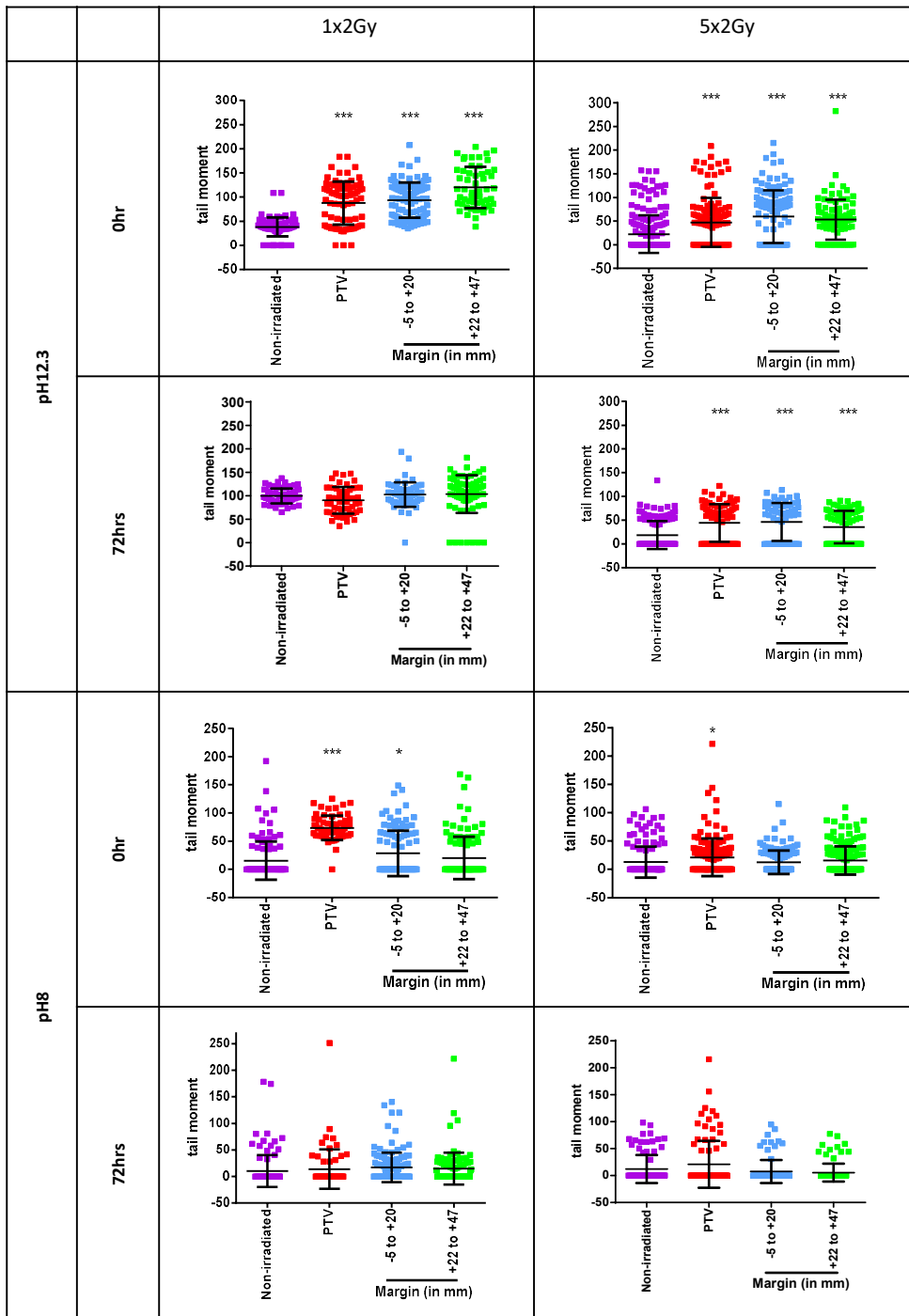


Figure 15 (figure supplémentaire 13 de l'article): SSBs generated in NHDFs positioned at the margin of the PTV are no more repaired after 5 successive irradiations at 2Gy. Proliferating NHDFs (F6MC1, PD=20.3 at the beginning of the experiment) cultured in 12-well plates were irradiated at 2Gy per day for one (1x2Gy) or five days (5x2Gy). After the last irradiation, cells were either put at 10°C for 30min and processed for comet assays, or put in culture at 37°C and processed for comet assays 72hrs later. Each dot in the scatter plots represents the value of the tail moment of one cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of tail moment values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

B. L'irradiation fractionnée altère les capacités de réparation des SSB des NHDF positionnés en marge du PTV

Afin d'expliquer l'accumulation des SSB dans les cellules positionnées en marge du PTV, nous avons fait l'hypothèse que les capacités de réparation des cellules pourraient diminuer au fur et à mesure des irradiations. Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé les capacités de réparation des NHDF après une seule irradiation ou après cinq irradiations. Pour cela, nous avons quantifié les dommages immédiatement après la dernière irradiation ou 72 h après, afin d'évaluer leur réparation.

Dans les essais comète à pH 8, nous avons observé que seules les NHDF positionnés dans le PTV subissaient des DSB. Celles-ci étaient réparées après 72 h, que ce soit après une seule irradiation ou après cinq irradiations (**Figure 15**). Les cellules positionnées en marge n'avaient pas subi de DSB (**Figure 15**), conformément aux résultats précédents.

Dans les essais comète à pH 12,3, les SSB et DSB induites après une seule irradiation étaient entièrement réparées après 72 h, que les NHDF aient été placés dans le PTV ou en marge. En revanche, après cinq irradiations, les SSB et DSB induites dans les NHDF placés en marge et dans le PTV n'étaient toujours pas réparées 72 h après la dernière irradiation (**Figure 15**), ce qui indique qu'un défaut de réparation s'était installé au cours des irradiations successives.

Nous avons confirmé ces résultats par des expériences d'immunofluorescence anti-53BP1 (DSB) et anti-XRCC1 (SSB) réalisées 30 min ou 72 h après quatre irradiations quotidiennes à 2 Gy (expérience réalisée par Maxime Tomezak). Pour les DSB générées dans le PTV, nous observons, contrairement aux résultats de l'essai comète, un défaut de réparation après 4 irradiations. En ce qui concerne les SSB, nous confirmons un défaut de réparation survenant après quatre irradiations dans les cellules placées dans le PTV et en marge (**Figure 16**).

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que les NHDF positionnés en marge du champ d'irradiation accumulent des SSB au cours des irradiations fractionnées, à cause d'un défaut de réparation qui s'installe au fur et à mesure des irradiations successives.

Sup Figure 14

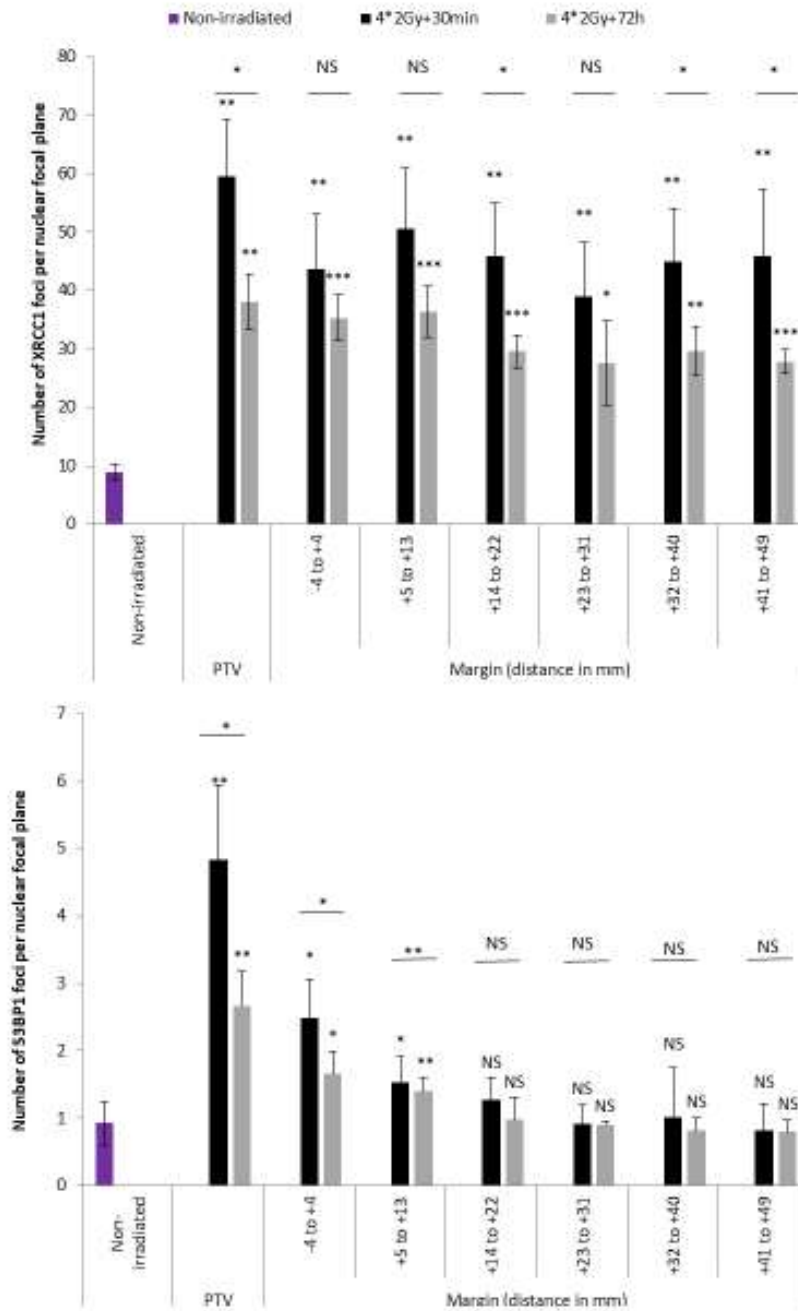
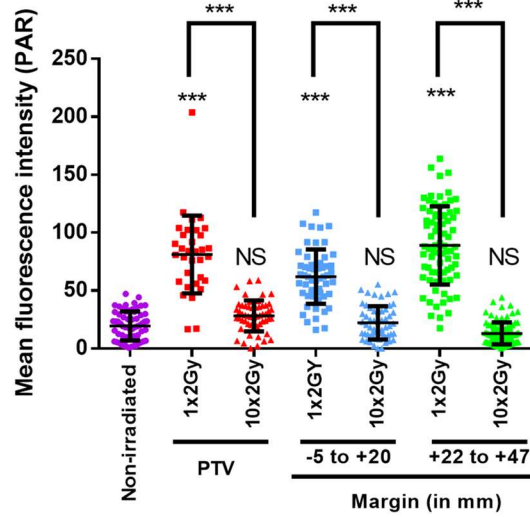


Figure 16 (figure supplémentaire 14 de l'article): The repair of SSBs generated in NHDFs positioned at the margin of the PTV becomes poorly efficient after 4 successive irradiations at 2Gy. Proliferating NHDFs (F6MC1, PD=19) cultured in 96-well plates were irradiated at 2Gy per day for 4 days (4x2Gy). Then, they were fixed at indicated time and an immunodetection of XRCC1 (upper panels) or 53BP1 (bottom panels) foci was performed as in figure 4A. The results were analyzed by high content microscopy. The bar chart represents the mean number +/- SD of foci per cell in 100 cells of all wells of a column. An ANOVA with a Bonferroni was performed for each condition in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs. T-tests were performed to compare the number of foci 72hrs versus 30min post-irradiation.

A



B

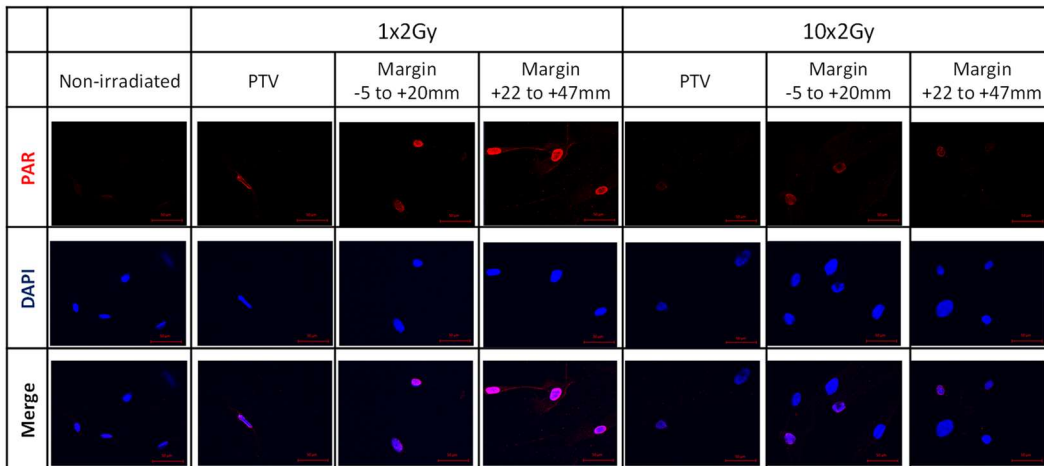


Figure 17 (figure supplémentaire 15 de l'article): The PARylation capacity decreases with successive irradiations. (A) Analysis of the PARylation activity in NHDFs (F6MC1, PD=32.4 at the beginning of the experiment) positioned at the margin or inside a PTV irradiated or not for 1 or 10 days at 2Gy per day. PAR chain detection was made by immunofluorescence after challenging cells of all conditions by 100µM hydrogen peroxide for 10min at room temperature followed by a recovery at 37°C for 3min in fresh medium. The bar chart represents the mean +/- SD of fluorescence intensity per cell in 100 cells. An ANOVA with a Bonferroni correction was performed for each condition in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs. T-tests were performed to compare the fluorescence intensity after 10x2Gy versus 1x2Gy. (B) Representative fluorescent microscopic images of the PAR chain immunostaining. Scale bar = 50µm

C. Le défaut de réparation des SSB est corrélé à une diminution de l'activité de PARylation

Dans un travail précédent, l'équipe avait montré que dans les cellules épithéliales sénescents (kératinocytes et cellules épithéliales mammaires), les SSB s'accumulent à cause d'une diminution d'expression transcriptionnelle de la PARP1, causée par le stress oxydant associé à la sénescence¹⁸. La PARP1 est l'enzyme clé de la voie SSBR car c'est elle qui détecte les SSB et synthétise des chaînes de polyADPribose (PAR) nécessaires au recrutement des protéines de réparation. Nous avons donc mesuré l'évolution de l'activité de PARylation au cours d'un protocole d'irradiation fractionnée en détectant les PAR par immunofluorescence. Nous avons ajouté en fin d'irradiation un court traitement au peroxyde d'hydrogène qui permet d'évaluer en plus la réserve d'activité de PARylation après irradiation. Nous observons qu'après une irradiation, les NHDF présentent une forte accumulation de PAR par rapport aux NHDF non irradiés. En revanche, après 10 irradiations à 2 Gy, nous observons une nette diminution de cette accumulation par rapport aux cellules irradiées une seule fois (**Figure 17**).

Ces résultats indiquent donc que l'activité PARP diminue au fur et à mesure des irradiations. Cette baisse d'activité pourrait être à l'origine d'un défaut de réparation des SSB qui entrainerait leur accumulation. La cause de la baisse d'activité PARP reste à investiguer.

IV. L'accumulation de SSB est corrélée avec une induction de sénescence

Pour observer les conséquences de l'irradiation sur le devenir cellulaire, nous avons suivi la croissance de NHDF positionnés dans le PTV et en marge, irradiés à 2 Gy par jour pendant 2 semaines (weekend non compris). En premier lieu, afin de valider notre protocole d'irradiation comme un protocole mimant un protocole à effet curatif, nous avons irradié des MDA-MB231, une lignée cancéreuse mammaire, placées dans le PTV. Comme attendu, nous avons observé une décroissance progressive et rapide de la population cellulaire (**Figure 18A**), suggérant que ces cellules cancéreuses subissaient une mort cellulaire. En ce qui concerne les NHDF positionnés dans le PTV, nous avons observé de même une diminution régulière du nombre de cellules. Les NHDF positionnés dans la marge la plus proximale ont quant à eux subi une diminution de croissance, mais sans mort cellulaire apparente. Ceux positionnés dans la marge la plus distale ont, selon le donneur, subi un léger ralentissement de croissance ou une croissance comparable à celle des cellules non irradiées (**Figure 18B, Figure 19A**).

Caterina Facchin a, au cours de son stage de Master2 réalisé dans l'équipe, étudié la mort cellulaire induite par ce protocole d'irradiation. Elle a notamment utilisé le kit *Vibrant FAM polycaspases assay* qui permet l'analyse de l'activité des caspases et l'analyse de la perméabilité membranaire, afin de distinguer les cellules en apoptose précoce (détection de caspases actives associées à une intégrité membranaire conservée), en apoptose tardive (détection de caspases actives associées à une perte de l'intégrité membranaire), ou subissant d'autres types de mort non apoptotique (perte de l'intégrité membranaire sans activité de caspases associées). Ses résultats montrent que les NHDF irradiés dans le PTV meurent principalement par apoptose à partir de 4 x 2 Gy. En revanche, les cellules positionnées en marge ne meurent pas. Elle a également analysé la mort des MDA-MB231 et montré que, comme attendu, ces cellules cancéreuses mourraient lorsqu'elles étaient irradiées dans le PTV à la fois par apoptose et par un processus indépendant des caspases (**Figure 18C, Figure 19B, 19C**).

Figure 1

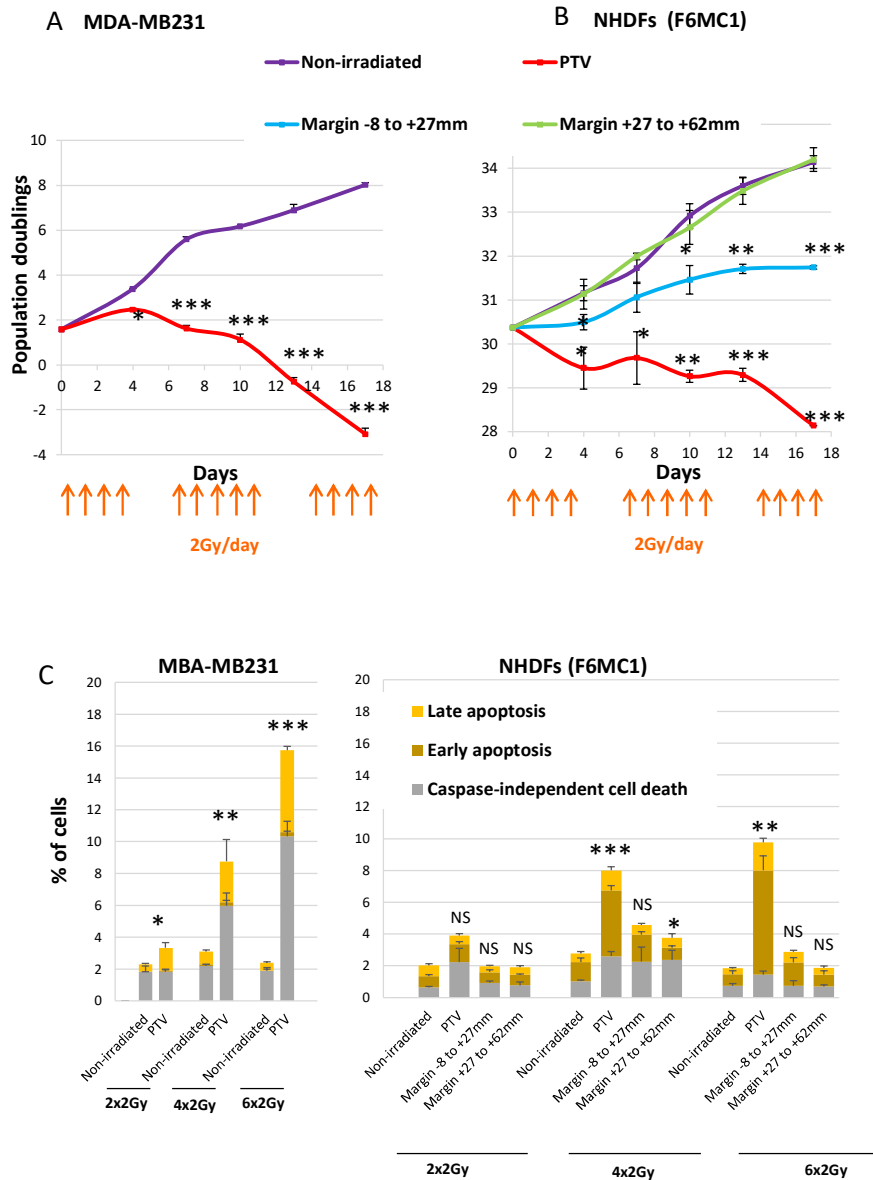


Figure 18 (figure 1 de l'article): Growth curves and cell death level of MDA-MB231 and NHDFs positioned at the margin or inside a PTV receiving 2Gy/day. (A) Growth curves of MDA-MB231 positioned inside the PTV and irradiated or not during 3 weeks. (B) Growth curves of NHDFs (donor F6MC1, PD=30.36 at the beginning of the experiment) positioned straddling the PTV and the margin irradiated or not during 3 weeks. Cells were counted at each passage using a Malassez chamber. Each point represents the mean +/- SD of 3 counts from 3 independent culture plates. T-tests were performed for each counting in comparison to non-irradiated cells. (C) MDA-MB231 positioned inside the PTV and NHDFs (donor F6MC1, PD= 33.05 at the beginning of the experiment) positioned straddling the PTV and the margin were irradiated or not up to 6 times. The level of cell death was measured 8hrs after the last irradiation. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 measures. Caspase-independent cell death refers to cells negative for caspase activity and positive for propidium iodide. Early apoptosis refers to cells positive only for caspase activity. Late apoptosis refers to cells positive for both caspase activity and propidium iodide. T-tests were performed between the total percentages of cell death of each condition in comparison to non-irradiated condition.

Sup Figure 3

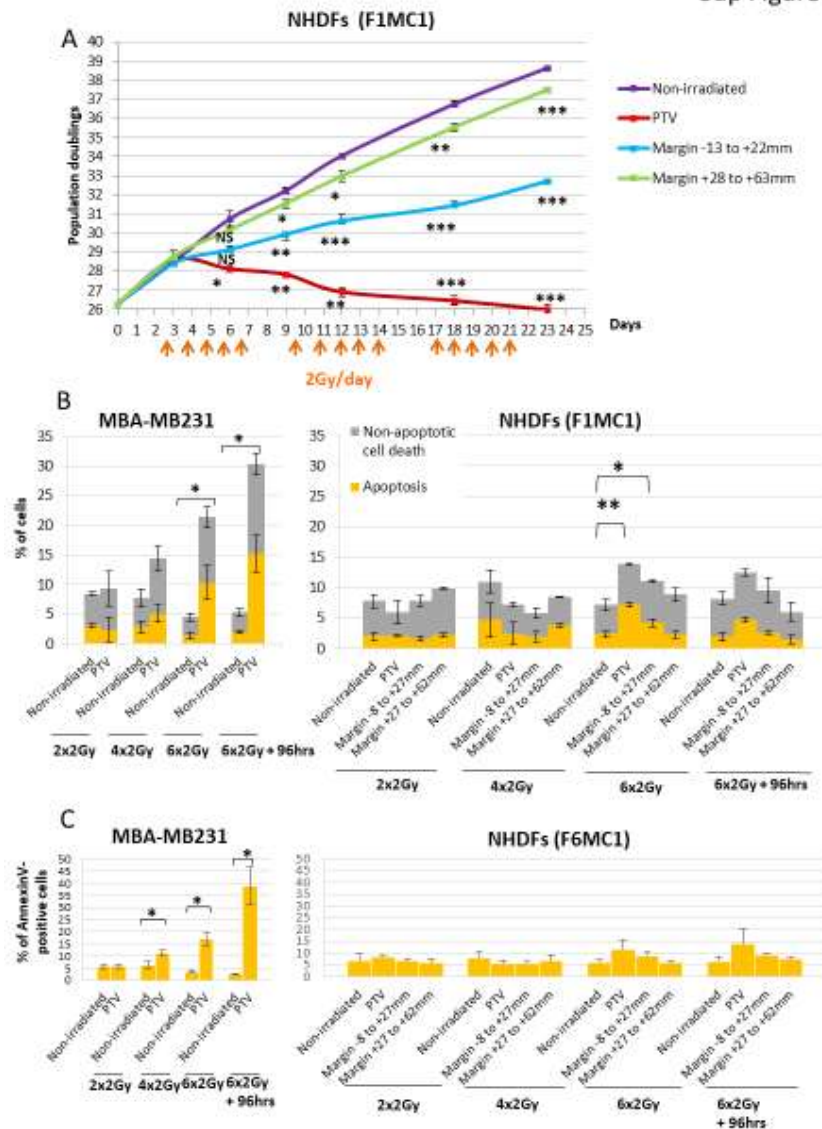


Figure 19 (figure supplémentaire 3 de l'article): Growth curves and cell death level of NHDFs positioned at the margin or inside a PTV receiving 2Gy/day. (A) Growth curves of NHDFs (donor F1MC1, PD=26.3 at the beginning of the experiment) cultured in 6-well plates irradiated at 2Gy per day except week-ends during three weeks. The days of irradiation are indicated with an arrow. Cells were counted at each passage using a Malassez cell counting chamber. Each point represents the mean +/- SD of three measures from three independent culture plates. T-tests were performed for each counting in comparison to non-irradiated cells. (B) MDA-MB231 cultured in 100mm dishes were irradiated or not at 2Gy per day except week-ends up to 6 irradiations. The dishes were entirely located inside the PTV. NHDFs (in A: donor F1MC1, PD=28 at the beginning of the experiment; in B: donor F6MC1, PD=20.29 at the beginning of the experiment) cultured in 6-well plates were irradiated, positioned as indicated in sup figure 2A. The level of cell death was measured 8hrs or 96hrs after the last irradiation by flow cytometry using the Alexa Fluor 488 AnnexinV/Dead Cell Apoptosis kit (Life Technologies). Apoptosis was recorded as AnnexinV-positive and PI-negative cells. Non-apoptotic cell death was recorded as AnnexinV-positive and PI-positive cells. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 measures. (C) Total cell death was recorded as AnnexinV-positive cells. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 measures. T-tests were performed between the total percentages of cell death of each condition in comparison to non-irradiated condition.

Par conséquent, ce n'est pas une induction de mort cellulaire qui permet d'expliquer la diminution de croissance des NHDF positionnés en marge. Comme les travaux précédents de l'équipe avaient démontré que, dans les kératinocytes, l'accumulation de SSB non réparées était responsable d'une sénescence prématurée¹⁸, nous avons émis l'hypothèse que les SSB accumulées dans les NHDF positionnés en marge pourraient être responsables d'une induction de sénescence qui pourrait expliquer la diminution de leur croissance. Cette hypothèse a été testée en recherchant des marqueurs de sénescence par cytométrie en flux. Nous avons utilisé la sonde fluorescente C12FDG qui permet de quantifier l'activité de la SA- β -Gal, couplée à la mesure de la taille des cellules, grâce au paramètre FSC, et de leur granularité, grâce au paramètre SSC. Ces expériences ont été réalisées sur les deux donneurs F6MC et F1MC. Des NHDF F6MC en sénescence répliquative ou en croissance exponentielle ont été utilisés pour paramétrer les marqueurs de sénescence. Nos résultats montrent que la radiothérapie induit, quel que soit le donneur, une augmentation de la taille, de la granularité et de l'activité SA- β -Gal dans les NHDF positionnés dans la marge la plus proximale et dans le PTV, par rapport aux cellules en croissance exponentielle. En revanche, dans la marge la plus distale, nos résultats ne montrent pas de différence avec les cellules non irradiées (**Figure 20, Figure 21**).

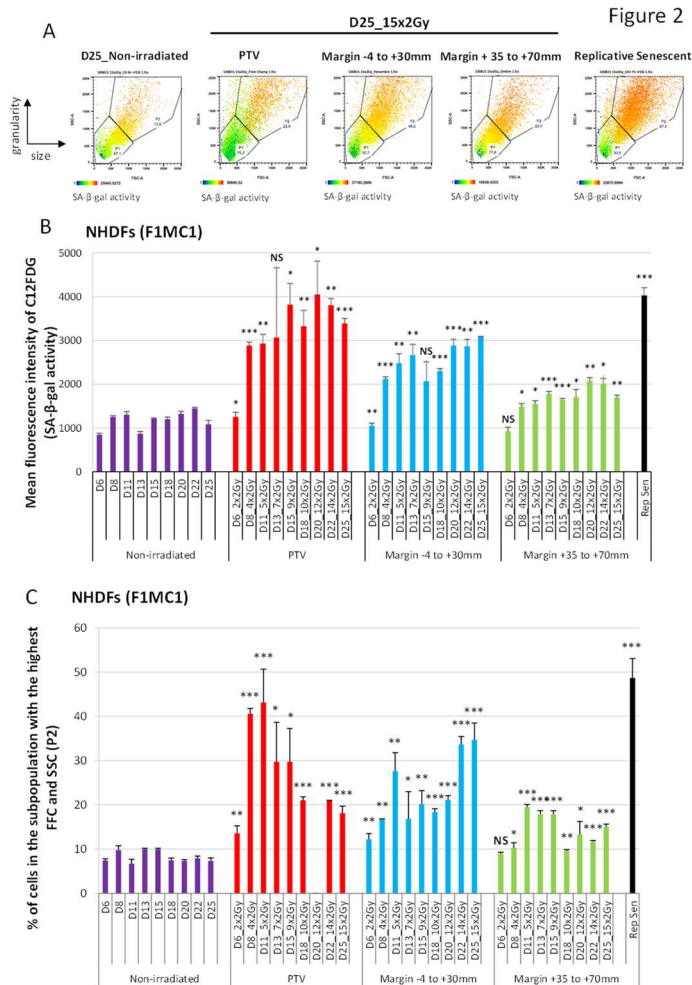


Figure 20 (figure 2 de l'article): NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day undergo senescence. Six-well plates of NHDFs (donor F1MC1, PD=25.8 at the beginning of the experiment) positioned straddling the PTV and the margin were irradiated during 3 weeks at 2Gy per day except week-ends. Cells were analyzed 24hrs or 72hrs after the last irradiation by flow cytometry for their SSC and FSC values, representing the granularity and the size of the cells respectively, and for their SA-β-Gal activity using the fluorogenic C12FDG substrate. (A) Examples of dot plots used to characterize senescent cells. The dot plots represent the size (FSC) and granularity (SSC) measures of NHDFs. The gate P2 correspond to cells with the highest size and granularity established by comparing non-irradiated exponentially growing NHDFs to replicative senescent NHDFs. The color scale of the dots represents their SA-β-Gal activity, with the blue color representing a low activity and an orange color a high activity. The middle panels are examples of C12FDG measures after 15 irradiations (Day 25). The right panel illustrate the gate of the biggest and most granular cells that was set by comparing non-irradiated exponentially growing NHDFs (left panel) to NHDFs at replicative senescence plateau (PD=61.03). (B) SA-β-Gal activity measured 24 or 72hrs after the last irradiation by flow cytometry using the fluorogenic C12FDG substrate. The results are given as the mean C12FDG fluorescence intensity. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 measures. T-tests were performed for each condition in comparison to non-irradiated cells. (C) SSC and FSC values, representing the granularity and the size of the cells respectively, were measured by flow cytometry on the same cells and at the same time as the C12FDG fluorescence. Each bar shows the percentage of cells with the highest FSC and SSC values. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 measures. T-tests were performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

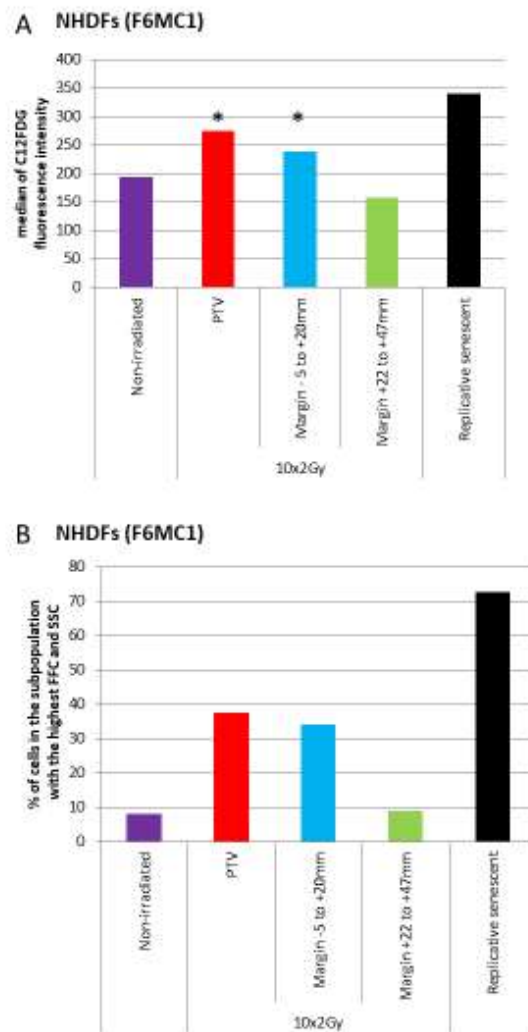


Figure 21 (figure supplémentaire 4 de l'article): NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day undergo senescence. NHDFs (donor F6MC1, PD=32.4 at the beginning of the experiment) cultured in 12-well plates were irradiated or not at 2Gy each day except week-ends for a total of 10 irradiations. Plates were positioned with one row of wells inside the PTV and three rows in the margin. (A) The SA- β -Gal activity was measured 72hrs after the 10th irradiation by flow cytometry using the fluorogenic C12FDG substrate. NHDFs at replicative senescence plateau (PD= 55.8) were used for comparison. The results are given as the median C12FDG fluorescence intensity. A Chi-square test was done to compare the fluorescence intensity of each of the 10,000 irradiated or senescent NHDFs to non-irradiated NHDFs. (B) The SSC and FSC values were measured by flow cytometry on the same cells and at the same time as the C12FDG fluorescence. Each bar gives the percentage of cells with the highest FSC and SSC values. The gate was established by comparing non-irradiated exponentially growing NHDFs to NHDFs at the replicative senescence plateau (PD= 55.8).

NHDFs (F1MC1)

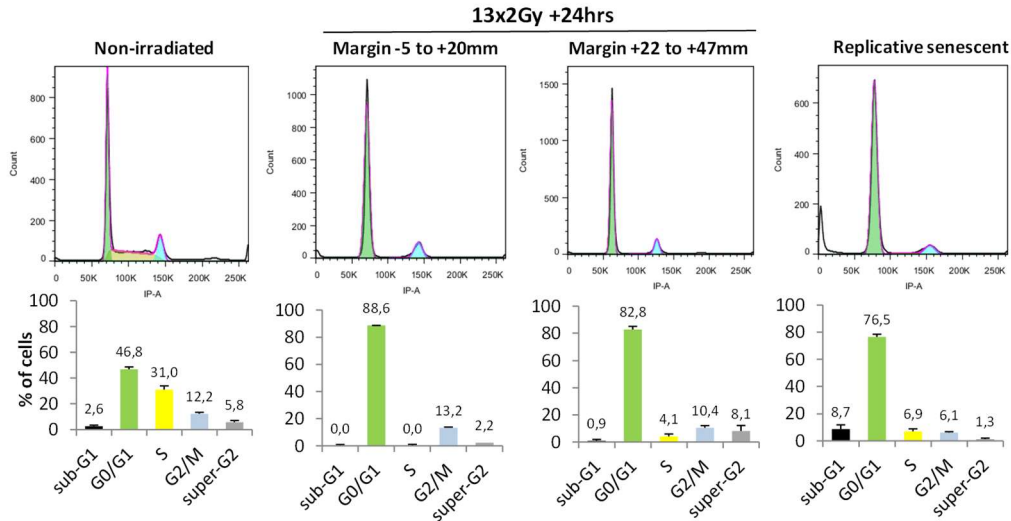


Figure 22 (figure supplémentaire 5 de l'article): NHDFs positioned at the margin of the PTV receiving 2Gy/day become cell cycle arrested in G1. NHDFs (donor F1MC1, PD=25.8 at the beginning of the experiment) cultured in 6-well plates were irradiated or not at 2Gy per day except week-ends up to 13 times. NHDFs at replicative senescence plateau (PD=61.03) were used for comparison. Cells were analyzed 24hrs after the 13rd irradiation by flow cytometry with propidium iodide staining. Each condition was performed in duplicate and analyzed with Flowjo V10. The upper panels show representative cell cycle histograms. The lower bar charts represent the mean of the 2 measures. Each bar represents a cell cycle phase. Sub-G1 represents dying cells. Super-G2 represents polyploid cells or doublets.

La sénescence est définie avant tout comme un état d'arrêt du cycle cellulaire. Nous avons donc analysé le cycle cellulaire de NHDF (F1MC) irradiés dans le PTV ou en marge, 24 h après une série d'irradiations de 13 x 2 Gy, Nous observons dans la population des NHDF positionnés en marge une diminution du pourcentage de cellules en phase S, voire une absence complète de celles-ci parmi les cellules positionnées dans la marge la plus proximale. Les cellules se retrouvent majoritairement en phase G1 (**Figure 22**). Ces résultats montrent donc que l'irradiation des cellules en marge du PTV induit majoritairement un arrêt du cycle cellulaire en phase G1.

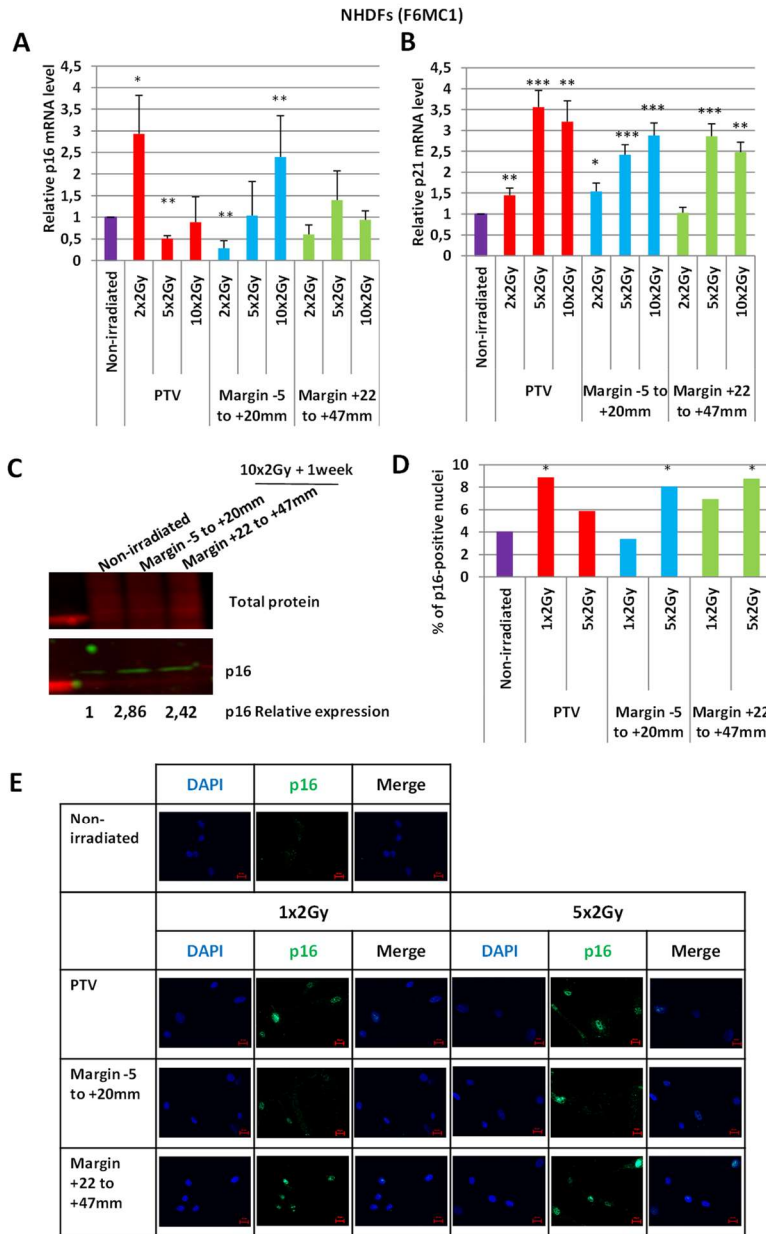


Figure 23 (figure supplémentaire 6 de l'article): Induction of p16 and p21 expression in NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day. NHDFs (donor F6MC1, PD=18 at the beginning of the experiment) cultured in 12-well plates were irradiated or not at 2Gy per day except week-ends for different durations (2x2Gy, 5x2Gy, 10x2Gy). The expressions of p16 (A) and p21 (B) were analyzed by RT-qPCR. Each condition was done in triplicate. The bar charts represent the mean fold change +/-SD of p16 or p21 mRNA abundance compared to non-irradiated cells from the three measures of each condition. A student-test was performed for each condition in comparison to non-irradiated cells. (C) Western Blot analysis of p16 protein levels after 10x2Gy with a resting time of one week. Total protein stain is used as loading control. P16 expression was compared to the non-irradiated cells for each condition. (D) The percent of p16-positive nuclei was calculated from immunofluorescence anti-p16 of almost 100 cells. A Chi-square test was done to compare the percent of p16-positive cells between irradiated and non-irradiated cells. (E) Representative images of immunofluorescence used to calculate the percent of p16-positive nuclei. The scale bar represents 20µm.

p16 (*CDKN2A*) et p21 (*CDKN1A*) sont des inhibiteurs de CDK impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence (voir chapitre 1 ; I ; A Arrêt dans le cycle cellulaire). Nous avons donc suivi leur expression transcriptionnelle par RT-qPCR au cours d'une cinétique de 10 irradiations à 2 Gy. Les résultats montrent que les NHDF irradiés dans le PTV surexpriment p16 après 2 irradiations à 2 Gy. Cependant, après 5 et 10 irradiations à 2 Gy, l'expression de p16 diminue à nouveau. Dans les NHDF positionnés dans la marge la plus proximale, l'expression de p16 est également augmentée, mais plus tardivement, après 10 irradiations à 2 Gy. En ce qui concerne les cellules positionnées dans la marge la plus distale, l'expression de p16 n'est pas modifiée de manière significative. Ces résultats indiquent que, de manière précoce et transitoire, p16 est surexprimé dans les NHDF irradiés dans le PTV. En revanche dans les cellules positionnées dans la marge la plus proximale, p16 n'est surexprimé qu'après 10 irradiations à 2 Gy, ce qui coïncide avec l'arrivée du plateau de sénescence. Concernant p21, celui-ci est exprimé à partir de 5 x 2 Gy et jusqu'à 10 x 2 Gy, aussi bien dans les NHDF positionnés dans le PTV que dans les marges proximale et distale (**Figure 23A, B**). Par western blot, nous avons observé une augmentation de l'expression protéique de p16 après 10 x 2 Gy et une semaine de repos (**Figure 23C**). L'immunofluorescence démontre une hétérogénéité de l'expression de p16 dans la population des NHDF irradiés en marge, avec 8% de cellules positives pour p16 pour la marge proximale (**Figure 23D, E**). Ces résultats permettent d'envisager un rôle de p16 et p21 dans la sénescence radio-induite en marge du PTV.

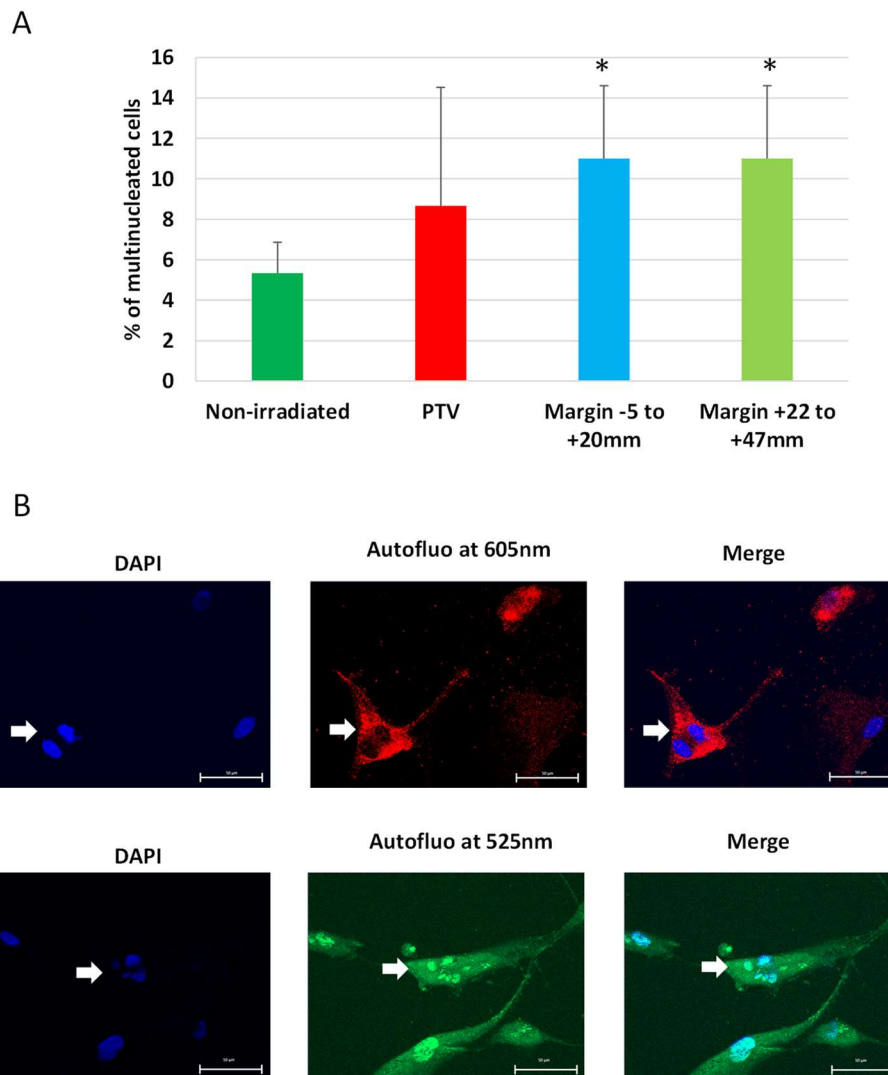


Figure 24 (figure supplémentaire 6 de l'article): A significant proportion of NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day become multinucleated. Three independent series of fluorescent microscopy photos from 3 immunofluorescence experiments were analyzed for the presence of multinucleated cells. In these experiments, NHDFs were irradiated in 12-well plates at 2Gy/day for two weeks. Nuclei were detected by the DAPI staining and the cell limits were determined by using the cell autofluorescence at 605 +/- 70nm or 525 +/- 50nm. (A) About 100 cells were manually counted for each condition. Each bar represents the mean +/- SD of the percent of multinucleated cells in the three series. T-tests were performed for each condition in comparison to the non-irradiated condition. (B) Representative images of multinucleated cells visualized at 605 +/- 70nm or 525 +/- 50nm. The white arrows point multinucleated cells. Scale bar = 50 μ m.

Il est établi que la sénescence cellulaire peut être associée à une multinucléation^{1,125}. Nous avons donc calculé le pourcentage de NHDF multinucléés à partir d'expériences d'immunofluorescence où le noyau a été marqué au DAPI. Nous avons utilisé l'autofluorescence des cellules pour discerner leur contour. Les résultats montrent que l'on passe de 5,3 % de cellules multinucléées parmi les cellules non irradiées à 11 % parmi les cellules positionnées en marge. Aucune augmentation significative du pourcentage de cellules multinucléées n'a été détectée parmi les NHDF positionnés dans le PTV (**Figure 24**). Ces résultats montrent une augmentation spécifique du pourcentage de cellules multinucléées parmi les cellules irradiées en marge.

L'ensemble de ces résultats indiquent donc que les NHDF positionnés en marge d'un PTV irradié à 2 Gy par jour entrent dans un état de sénescence prématurée, caractérisée par un arrêt du cycle cellulaire principalement en phase G1, une surexpression des CKI p21 et p16, une augmentation de la taille, de la granularité, de l'activité SA- β -Gal et une augmentation du pourcentage de cellules multinucléées, en corrélation avec une accumulation de SSB.

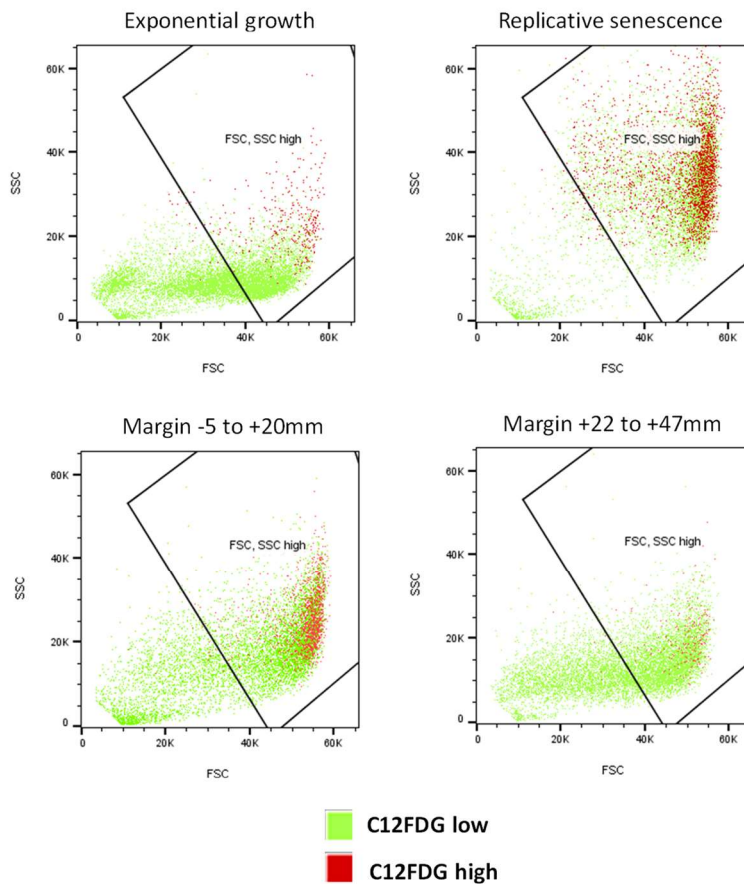


Figure 25 (figure supplémentaire 16 de l'article): Principle of senescent cell sorting. Dot plots showing of how senescent cells were sorted in Figure 6. The time of cell sorting is indicated in Figure 6A. First, by comparing the intensity of the C12FDG staining in exponentially growing NHDFs versus NHDFs at replicative senescence, we set the threshold to separate the C12FDG high (red dots) and C12FDG low (green dots) cells. Then, in the C12FDG high subpopulation, we delimited the subpopulation of 50% of cells with the highest FSC and SSC values. The gate thus defined was applied to all conditions to sort the cells.

V. Certaines cellules sénescents peuvent s'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire pour donner des cellules filles transformées

Nous avons montré que les cellules positionnées en marge du PTV devenaient sénescents. L'étape suivante a été de suivre le devenir de ces cellules et de déterminer notamment si certaines d'entre elles étaient capables d'échapper à l'arrêt dans le cycle cellulaire pour donner naissance à des cellules présentant des caractères de transformation néoplasique.

A. Principe du Tri

Ce n'est jamais 100% de la population cellulaire qui devient sénescents après irradiation. Par exemple, les expériences d'immunofluorescence anti-p16 montrent que seulement 8% des cellules irradiées en marge sont positives pour p16. Pour pallier à l'hétérogénéité de la population irradiée en marge, nous avons trié les cellules sénescents par FACS, comme décrit dans la **Figure 25**. Brièvement, nous avons trié les cellules présentant à la fois une forte activité SA- β -Gal et une taille et une granularité importantes, en comparaison avec des cellules en croissance exponentielle (contrôle négatif) et des cellules en sénescence réplivative (contrôle positif).

Figure 5

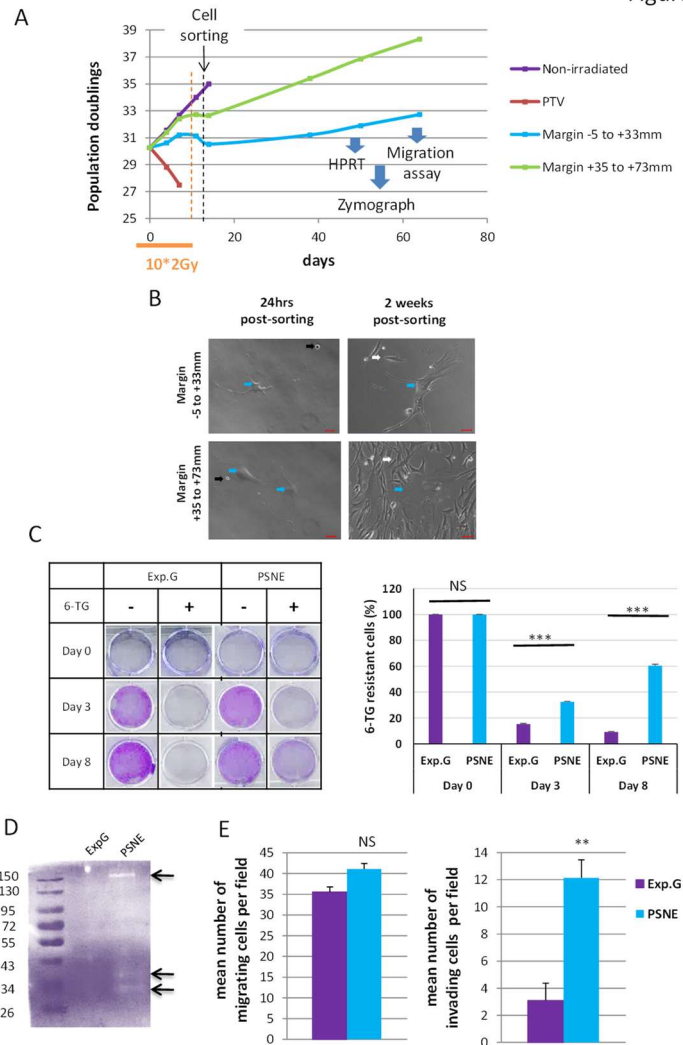


Figure 26 (figure 5 de l'article): Some radio-induced senescent cells generated in the margin escape from senescence to generate a progeny of cells which re-proliferate, have an increased invasion capacity and display mutations. (A) NHDFs (donor F6MC1, PD=29.6 at the beginning of the experiment) positioned straddling the PTV and the margin were irradiated or not during 2 weeks (10*2Gy). Cells were counted at each passage using a Malassez chamber. After two weeks of irradiation, the senescent cells generated in the margin were sorted according to their size, granularity, and SA- β -Gal activity (see parameters of sorting in Sup Fig16). After sorting, cells were put again in culture and followed at long term. (B) Phase contrast microscopic images of cells of the margin 24hrs and 2 weeks post-sorting. The blue arrows indicate cells with a senescent morphology. The black arrows indicate cells that have not replated. The white arrows indicate small replating cells. (C) HPRT assays performed on cells having regrown from sorted senescent cells generated in the margin referred as PSNE (Post Senescence Neoplastic Emerging cells) and on non-irradiated exponentially growing NHDFs at 17PDs (used as control for normal cells). The bars indicate the mean \pm SD of three measures of the percentage of 6-TG resistant cells. (D) MMP activity analysis of culture supernatant from PSNE or exponentially growing cells by 0.1% gelatin Zymograph. Arrows show bands of digested gelatin. (E) Migrating and invasive capacities were assayed in Boyden chambers without or with Matrigel respectively. Cells that have passed across the filters were counted in 5 fields per chamber in 3 different chambers for each condition. Each bar represents the mean \pm SD of the number of cells per field. T-tests were performed for comparing exponentially growing and PSNE cells.

B. Certaines cellules sénescents issues de la marge sont capables d'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence et acquièrent des capacités néoplasiques.

Après tri, les NHDF ont été ré-ensemencés et suivis pendant environ deux mois. La courbe de croissance obtenue indique que certaines cellules sénescents radio-induites originaires de la marge du PTV ont été capables d'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire pour reprojiférer (**Figure 26A**). Nous remarquons que les cellules reprojiférantes originaires de la marge la plus distale semblent avoir une plus grande capacité reprojiférative que celles issues de la marge proximale. Cette donnée est confirmée par les photos prises au microscope à contraste de phase. En effet, 24 h après tri, nous observons comme attendu des cellules présentant une morphologie sénescents (flèches bleues) accompagnées de cellules qui n'ont pas ré-adhéré (flèches noires). Deux semaines après tri, parmi les cellules originaires de la marge, on observe toujours des cellules sénescents, mais aussi des petites cellules à l'allure reprojiférative (flèches blanches) (**Figure 26B**). Nous avons baptisé ces cellules « cellules PSNE » pour « *post-senescence neoplastic escape* » et les avons caractérisées.

1. Les cellules PSNE sont invasives

Tout d'abord, nous avons évalué la capacité des cellules PSNE à dégrader la matrice extracellulaire. Pour cela, nous avons réalisé une zymographie qui permet d'évaluer la capacité des cellules à digérer la gélatine. Le zymogramme présente plusieurs bandes de digestion, dues à l'activité de MMP libres ou en complexes, que nous ne retrouvons pas dans la piste des cellules en croissance exponentielle (**Figure 26D**). Ensuite, nous avons testé les capacités migratoire et invasive des cellules grâce à des tests en chambres de Boyden, tapissées ou non de Matrigel (**Figure 26E**). En absence de Matrigel (mesure de la capacité migratoire), nous observons qu'il n'existe pas de différence de capacité migratoire entre les cellules en croissance exponentielle et les cellules PSNE. En revanche, en présence de Matrigel (mesure de la capacité invasive), nous observons une augmentation du nombre de cellules invasives dans la population de cellules PSNE par rapport aux cellules en phase exponentielle de croissance.

2. Les cellules PSNE sont mutées

Pour tester si les cellules PSNE étaient mutées, nous avons tout d'abord effectué un test HPRT (**Figure 26C**). Ce test utilise le gène *HPRT* comme gène rapporteur. Ce gène code l'enzyme HPRT (Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransférase) impliquée dans le métabolisme des purines. En utilisant un analogue de la guanine, la 6-thio-guanine, dont le métabolisme par HPRT génère un produit toxique pour la cellule, on peut savoir si le gène *HPRT* est muté perte de fonction. En effet, s'il est muté, la 6-thioguanine ne sera pas métabolisée et la cellule survivra. À l'inverse, s'il n'est pas muté, la 6-thioguanine sera métabolisée et la cellule mourra. Les résultats montrent que, comme attendu, les cellules en croissance exponentielle n'ont pas survécu aux traitements à la 6-thioguanine, ce qui

signifie qu'elles ne sont pas mutées sur le gène *HPRT* et, par extrapolation, n'ont pas subi de mutations en général. En revanche, les cellules PSNE provenant de la marge la plus distale ont survécu au traitement par la 6-thioguanine, ce qui indique qu'elles ont probablement subi des mutations.

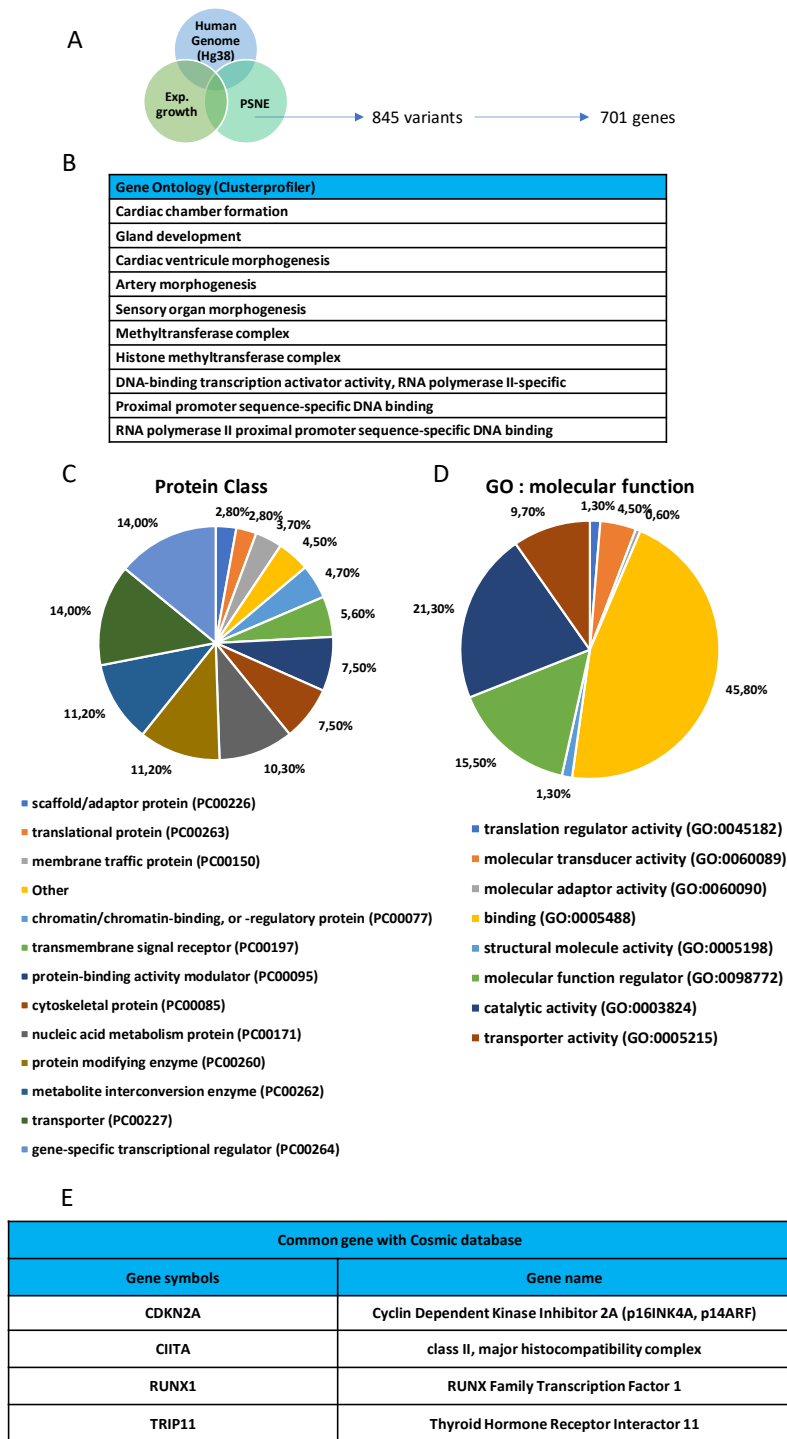


Figure 27: Séquençage des cellules PSNE : Ontology. L'ADN des cellules PSNE a été séquençé par la technique du CoDE-seq²⁶⁰. (A) Représentation schématique de l'analyse du séquençage. Les séquences des cellules en croissance exponentielle ou PSNE (donneur F1MC1) ont été comparées à la séquence du génome humain de référence (Hg38), puis comparées entre elles. (B) Ontologie des gènes impactés par les variants en utilisant ClusterProfiler. (C) Catégories des protéines impactées par les mutations selon l'outil Panther (<http://www.pantherdb.org/>). (D) Fonctions moléculaires des gènes impactés par les mutations. (E) Liste des gènes variants communs avec la base de données COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/census>).

3. Le séquençage du génome des cellules PSNE démontre un profil de mutation particulier

a. Principe du séquençage CODE-seq

Afin de caractériser les mutations des cellules PSNE, nous avons séquençé le génome des cellules PSNE issues de NHDF F1MC1 induits en sénescence par une irradiation à 5 x 2 Gy. Il s'agit d'une expérience préliminaire afin d'évaluer la faisabilité de cette approche. En collaboration avec le docteur Amélie Bonnefond du laboratoire EGID, nous avons réalisé un CoDE-seq (pour *Copy number variation Detection and Exome sequencing*). Cette technique de séquençage nouvelle génération (NGS) est une forme de Whole-Exome Sequencing (WES) améliorée. Plus précisément, elle utilise un mélange de sondes de capture de WES, auxquelles sont rajoutées des sondes hors exons afin d'améliorer la couverture et de mieux détecter les variations du nombre de copies de gènes (CNV). Concrètement, cette technique utilise des sondes de 120 paires de base disséminées toutes les 10 kb dans des régions décrites comme souvent affectées par les CNV d'après la littérature (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources [DECIPHER]*) auxquelles s'ajoute une sonde tous les 25 kb pour le reste du génome. Ces sondes permettent une couverture de 91 Mb contre 47 Mb pour les sondes du WES d'après le fournisseur²⁶⁰.

b. Analyse de l'ontologie des gènes mutés

L'analyse des résultats a été réalisée en collaboration avec l'équipe d'Amélie Bonnefond et la plateforme de bioinformatique de Lille (Bilille). Nous avons d'abord identifié les variants présents dans le génome des cellules PSNE et des cellules en croissance exponentielle par rapport au génome humain de référence (Hg38). Puis les variants ont été comparés entre eux, afin de ne sélectionner que les mutations somatiques différenciant les cellules PSNE des cellules en croissance exponentielle. Cette analyse a permis d'identifier 845 variants touchant 701 gènes (**Figure 27A**). L'ontologie de ces gènes a été réalisée avec plusieurs outils. L'outil *Clusterprofiler* révèle un impact, entre autres, sur les complexes méthyltransférase et histone méthyltransférase, ainsi que sur des facteurs de transcription (*DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific et Proximal promoter sequence-specific DNA binding, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding*) (**Figure 27B**). L'utilisation de Panther confirme en partie ces résultats en montrant un impact sur les protéines de la classe « facteur de transcription gène-spécifique » (14% des gènes impactés) et « enzymes de modification protéique » (11,2% des gènes impactés) (**Figure 27C, D**). Ce résultat est renforcé par l'analyse GO des fonctions moléculaires des gènes impactés où l'on peut voir que 45,8% des gènes ont des fonctions de « binding », ce qui regroupe toutes les interactions possibles dont les interactions protéine-protéine et protéine-chromatine, ce qui peut correspondre aux facteurs de transcription et aux épizymes. Ainsi l'ontologie des gènes variants montre que de nombreux

facteurs de transcription sont impactés, ce qui pourrait avoir un impact sur l'expression d'un nombre beaucoup plus important de gènes. Enfin, la **table 1** obtenue avec une des fonctionnalités de Panther montre un impact dans de nombreuses voies dont certaines impliquées dans le cancer comme la voie p53 ou le cycle cellulaire.

Beta3 adrenergic receptor signaling pathway (P04379)

Beta2 adrenergic receptor signaling pathway (P04378)

Beta1 adrenergic receptor signaling pathway (P04377)

De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis (P02739)

5HT4 type receptor mediated signaling pathway (P04376)

Angiogenesis (P00005)

Interleukin signaling pathway (P00036)

Integrin signalling pathway (P00034)

Ubiquitin proteasome pathway (P00060)

Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction (P00028)

p53 pathway feedback loops 2 (P04398)

Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway (P00027)

VEGF signaling pathway (P00056)

T cell activation (P00053)

Methylcitrate cycle (P02754)

TGF-beta signaling pathway (P00052)

DNA replication (P00017)

PI3 kinase pathway (P00048)

Histamine H2 receptor mediated signaling pathway (P04386)

Cell cycle (P00013)

Enkephalin release (P05913)

Blood coagulation (P00011)

Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway (P00043)

B cell activation (P00010)

Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway (P00042)

Corticotropin releasing factor receptor signaling pathway (P04380)

De novo pyrimidine ribonucleotides biosynthesis (P02740)

Metabotropic glutamate receptor group III pathway (P00039)

De novo purine biosynthesis (P02738)

Ionotropic glutamate receptor pathway (P00037)

Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)

Alzheimer disease-amyloid secretase pathway (P00003)

Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway (P00026)

Endothelin signaling pathway (P00019)

Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway (P00044)

Metabotropic glutamate receptor group I pathway (P00041)

Huntington disease (P00029)

p53 pathway (P00059)

Wnt signaling pathway (P00057)

Notch signaling pathway (P00045)

Table 1 : Liste des voies de signalisation impactés par les variants selon Panther

(<http://www.pantherdb.org/>)

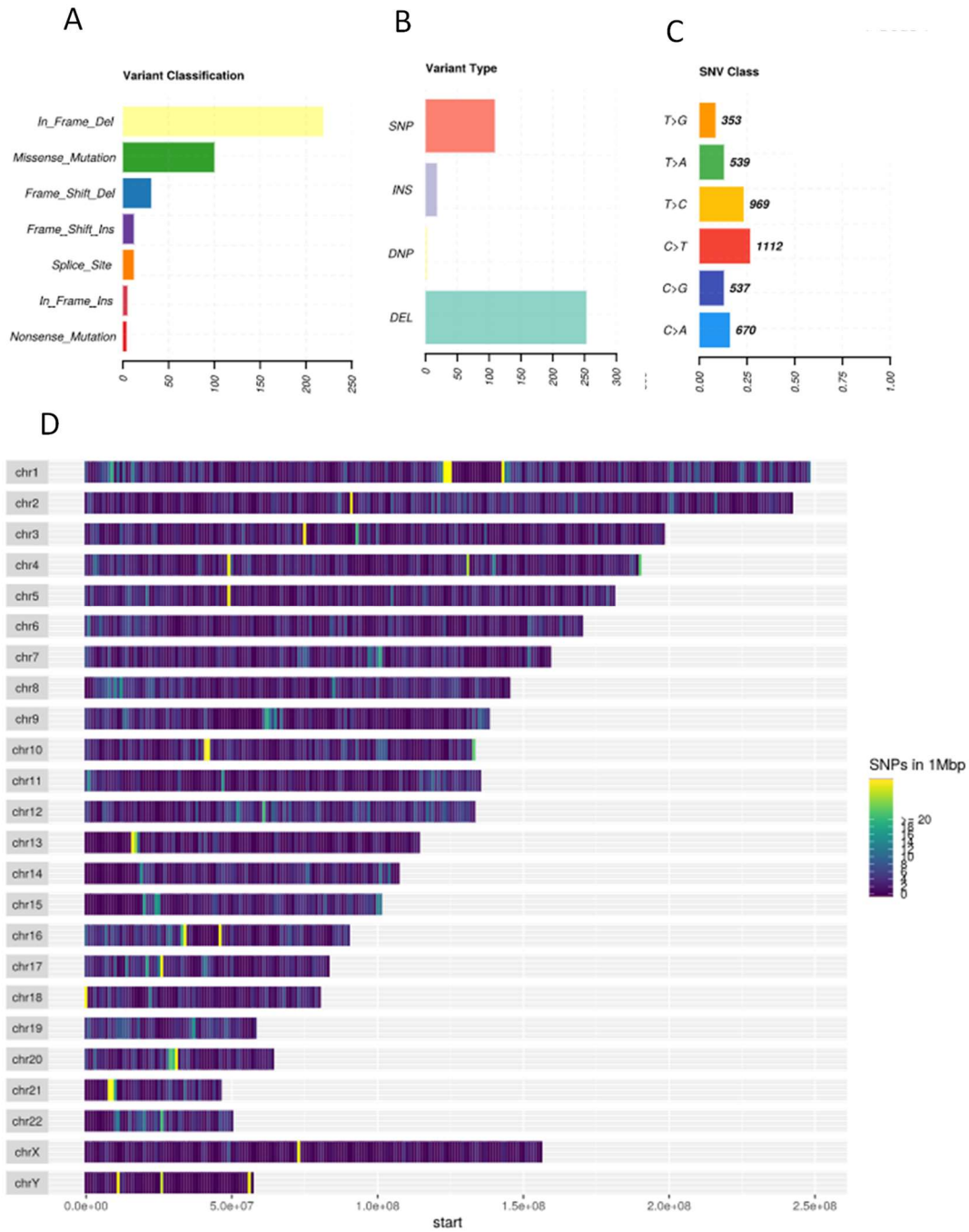


Figure 28 : Profil des mutations des cellules PSNE. (A) Classification des variants selon l'effet sur la traduction. (B) Types de variants. (C) Classification des SNV (*Single Nucleotide Variant*). (D) Distribution des SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) dans le génome.

c. Comparaison de la liste de gènes mutés avec la base donnée COSMIC

Nous avons comparé la liste des gènes variants dans les cellules PSNE avec la base de données Censu de COSMIC qui compile l'ensemble des gènes mutés et ayant un impact démontré dans le cancer. Cette comparaison a permis de dégager 4 gènes variants, *CDKN2A*, *CIITA*, *RUNX1* et *TRIP11*, impliqués dans le cancer (**Figure 27E**).

Les mutations affectant *CDKN2A* et *RUNX1* se situent dans des introns, ce qui réduit la probabilité que ces mutations aient un impact sur la fonction des protéines codées. Néanmoins ces mutations pourraient avoir un impact sur leur expression. *CDKN2A* est le gène codant pour p16 pouvant être responsable de l'arrêt dans le cycle cellulaire associé à la sénescence. Ce gène est associé à de nombreux cancer dont les sarcomes secondaires post-radiothérapie²⁵³. *RUNX1* code un facteur de transcription répresseur de nombreux gènes dont celui de la cycline D2 impliquée dans le cycle cellulaire²⁶¹.

Les mutations affectant *CIITA* et *TRIP11* se situent dans des exons et pourraient donc impacter directement la fonction des protéines. *CIITA* code le *Class II Major Histocompatibility complex Transactivator*, un facteur de transcription dont les mutations sont retrouvées dans de nombreux lymphomes et ont un impact dans l'échappement de ces cancers à l'immuno-surveillance²⁶². *TRIP11* code une protéine golgienne physiologiquement importante pour le développement des os et des cartillages²⁶³. La fusion de ce gène avec *PDGFRB* est associée à la leucémie myéloïde aigüe²⁶⁴. Dans notre échantillon, c'est une mutation faux-sens que l'on observe, pas une fusion de gène.

Pour conclure, ces quatre mutations pourraient avoir un impact sur l'expression et ou la fonction des gènes *CDKN2A*, *CIITA*, *RUNX1* et *TRIP11* et pourraient donc être impliquées dans l'acquisition des propriétés tumorigènes des cellules PSNE.

d. Analyse du profil de mutations

L'analyse du profil des mutations révèle une part importante de délétions (**Figure 28A, B**). Une étude comparant les profils de mutations dans des cancers murins induits par différents carcinogènes a montré que les radiations induisaient spécifiquement des cancers ayant une quantité importante de délétions²⁶⁵. Plus encore, les sarcomes secondaires post-radiothérapie sont caractérisés par un grand nombre de délétion²⁵³. On remarque aussi une part importante de mutations faux-sens qui sont surtout des SNP. De manière intéressante, on observe un grand nombre de substitutions de paires de base CG en TA et inversement (**Figure 28C**). Cela peut résulter de l'oxydation de la guanine en 8-oxoG, mésappariée alors avec une adénine lors de la réplication. Or, l'irradiation est associée à une augmentation du stress oxydant et donc à une augmentation de l'oxydation de la guanine^{266,267}. Les SNP semblent toucher tout le génome (**Figure 28D**).

A

Séquence downstream

Seulement les variants "PASS" et "clustered_events" (49 InDels)

Motif 1: [matrix] GAATGGAATGGAAT
 Motif 2: [matrix] CACACACACAC
 Motif 3: [matrix] mRAAGAAASww
 Motif 4: [matrix] wmAATAAAyM
 Motif 5: [matrix] YmGCCAGCCm
 Motif 6: [matrix] CATTCCATTCCATTC
 Motif 7: [matrix] YACACACACACAC
 Motif 8: [matrix] mymGCCAGCCmr
 Motif 9: [matrix] mrAAAGAAAGAwM
 Motif 10: [matrix] GATCCACCTCTG

Séquence upstream

Seulement les variants "PASS" et "clustered_events" (49 InDels)

Motif 1: [matrix] TTCCATTCCATTCC
 Motif 2: [matrix] CACACACACAS
 Motif 3: [matrix] kAACTGCTCwm
 Motif 4: [matrix] mkGCCTCCks
 Motif 5: [matrix] YvCAATCCmy
 Motif 6: [matrix] wTGGAAATGGAATGGA
 Motif 7: [matrix] ACACACACACAC
 Motif 8: [matrix] mkAACTGCTCwm
 Motif 9: [matrix] CCAGCCAGCCA
 Motif 10: [matrix] TGCTGCCTCCTG

B

SINE name	Ref	Species
Alu	Vassetzky May 2011	Primates
B1-dID	Kramerov 2001	Gliridae, Sciuridae & Aplodontidae/Mammalia
B4	Vassetzky Jun 2011	rat & mouse/Mammalia
MEN	Serdobova 1998	squirrels Menetes & Callosciurus/Mammalia
pB1	Quentin 1994; FLAM	rodents and primates/Mammalia
SINE_type_II	Daniels 1983	galago/Mammalia
Ther-1	Vassetzky Jun 2011	Vertebrata
Ther-2	Vassetzky Jun 2011	Mammalia

Figure 29 : Analyse des régions à proximité des délétions. (A) Liste des microhomologies présentes en amont ou en aval de 20 nucléotides des délétions selon l'outil « peak-motifs tool » de RSAT. (B) Liste des SINE retrouvées en amont en aval de 700 nucléotides des délétions par comparaison avec la base de données « SINE Base website »

Le fait que les variants les plus fréquents soient des délétions pourrait être indicateur d'un processus de réparation préférentiellement engagé pour permettre l'émergence post-sénescence. Pour essayer d'obtenir plus d'information sur ce processus de réparation, nous avons analysé les séquences flanquant les délétions. En analysant les séquences flanquant les délétions sur 20 nucléotides, nous avons mis en évidence des microhomologies dans ces zones. De même, en analysant ces séquences sur 700 nucléotides, nous avons mis en évidence des SINE (*Short interspersed nuclear elements*) (**Figure 29**). La présence de microhomologies et de SINE pourrait être marqueur de réparation par recombinaison homologue.

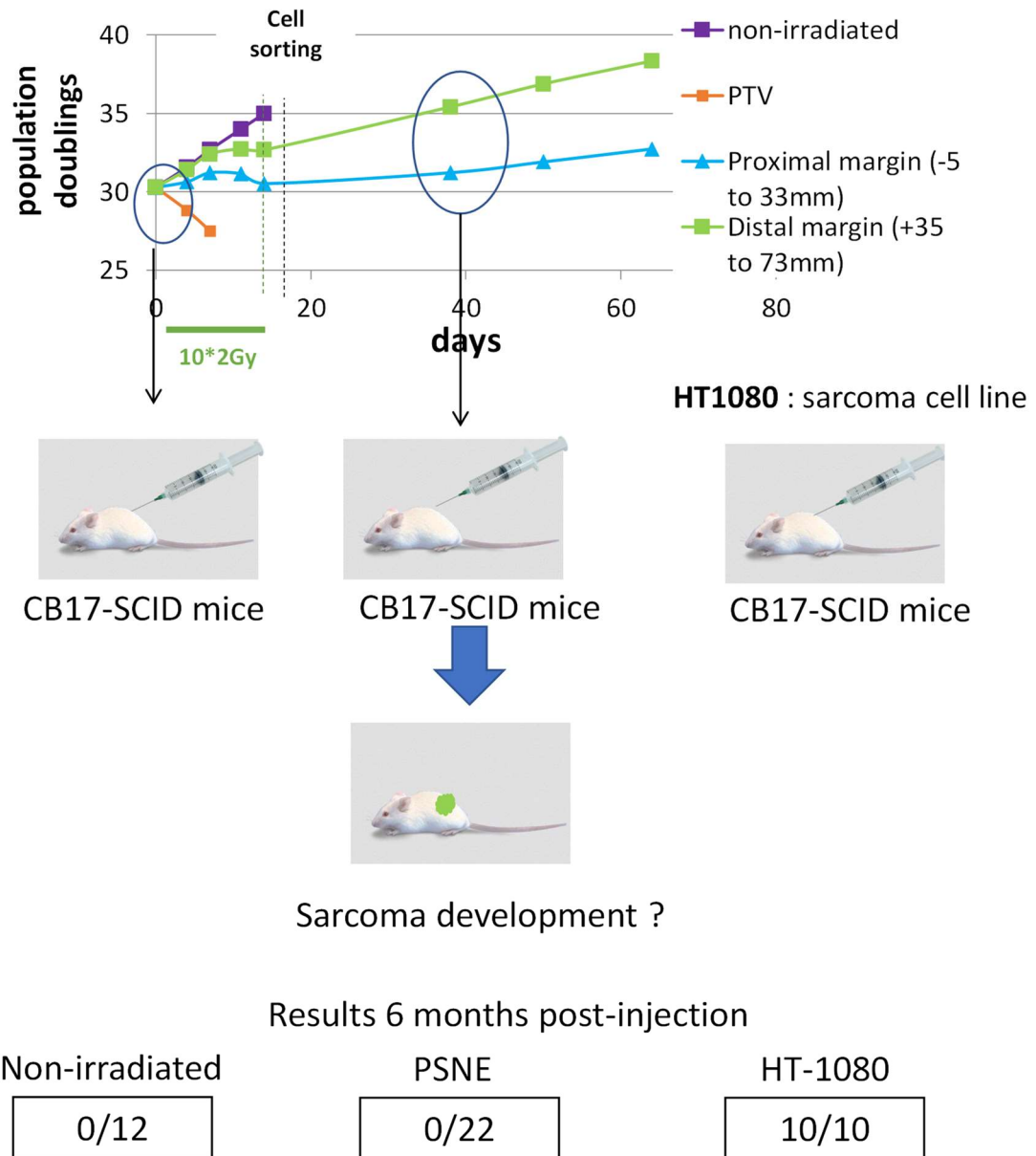


Figure 30 : Résultats préliminaires des essais de tumorigénèse. Des cellules PS NE ayant émergé de cellules sénescents radio-induites F1MC1 et F6MC1 positionnées en marge proximale et distale ont été xéno greffées dans des souris CB17-SCID (1×10^6 cellules par souris). Des cellules en phase de croissance exponentielle ainsi que des HT1080, qui sont des cellules d'une lignée de sarcome, ont été utilisées comme contrôle négatif et positif respectivement. Les résultats 6 mois post-injection sont présentés.

4. les cellules PSNE ne sont pas suffisamment transformées pour former une tumeur in vivo

Afin de savoir si les cellules PSNE présentant les caractères de transformation établis ci-dessus étaient tumorigènes, nous les avons xéno greffées en sous-cutané dans des souris immunodéprimées CB17-SCID le 16 juillet 2020. La greffe des cellules PSNE n'a pas conduit à la formation de tumeurs à ce jour, soit 6 mois post-injection, contrairement à l'injection de cellules de la lignée de sarcome HT1080 utilisées comme contrôle positif (**Figure 30**).

L'ensemble de ces résultats montre que des fibroblastes positionnés en marge d'un PTV subissant un protocole d'irradiation similaire à celui appliqué couramment à des patients rentrent dans une phase de sénescence prématurée suivie d'une émergence de cellules proliférantes, invasives et mutées, c'est-à-dire qui présentent des propriétés de cellules transformées. Néanmoins, le caractère tumorigène de ces cellules n'a pas pour l'instant pu être établi.

VI. L'accumulation de SSB est suffisante pour induire un état de sénescence duquel certaines cellules peuvent s'échapper

Nous avons précédemment montré que l'irradiation de fibroblastes positionnés en marge d'un PTV induisait des SSB dont l'accumulation est corrélée avec la survenue d'une sénescence prématurée suivi d'un échappement néoplasique. La question suivante a donc été de déterminer si une accumulation spécifique de SSB comme celles induites en marge est suffisante pour induire un état de sénescence prématurée duquel pourraient s'échapper des cellules transformées.

A. Mise au point d'un protocole permettant d'induire spécifiquement des SSB

Pour répondre à cette question, nous avons mis au point un protocole permettant d'induire spécifiquement des SSB dans des NHDF et de bloquer leur réparation afin qu'elles s'accumulent, puis nous avons suivi le devenir des cellules.

Dans un premier temps, nous avons évalué si bloquer la réparation des SSB générées de façon endogène en inhibant pharmacologiquement la PARP1 permettrait d'en accumuler. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le Veliparib, pour sa spécificité envers la PARP1 et la PARP2²⁶⁸. Afin de déterminer la concentration de Veliparib à utiliser, nous avons réalisé un test d'activité de PARylation (western-blot anti-PAR) avec une gamme de concentration d'inhibiteur. Conformément aux données de la littérature²⁶⁸, nous observons une nette diminution de PARylation dès une concentration de 1 nM. Cette inhibition est renforcée avec des concentrations plus importantes (**Figure 31**). Nous avons décidé d'utiliser une concentration de 1 mM pour la suite du projet, afin de s'assurer d'une inhibition effective de PARylation.

Sup Figure 18

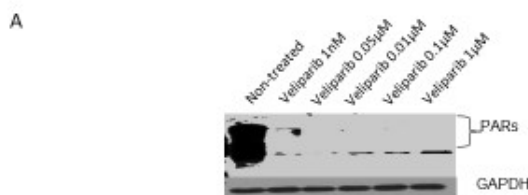


Figure 31 (figure supplémentaire 18A de l'article): The combined PARP inhibitor + H₂O₂ treatment does not induce other oxidative damages than SSBs. (A) PARylation activity assay on NHDFs (F1MC1, PD=46) treated during 24hrs with different concentrations of Veliparib and challenged for 10min with 100µM H₂O₂.

Afin de vérifier que l'inhibition de PARylation induisait bien une accumulation de SSB, nous avons réalisé des immunofluorescences anti-XRCC1. Comme nous n'avons pas observé d'augmentation significative des foyers XRCC1 comparé aux cellules contrôle, nous avons décidé de combiner le traitement au Veliparib à un traitement au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive de l'oxygène connue comme inducteur de SSB²⁶⁹. Nous savions, par des données non publiées de l'équipe, qu'à des concentrations inférieures à 20 µM il induit des SSB, en quasi absence de DSB. Nous avons donc traité des NHDF par 5 µM H₂O₂. Les analyses par immunofluorescence anti-XRCC1 montrent que ce traitement induit une légère augmentation du nombre de foyers XRCC1 par noyau, mais non statistiquement significative. En revanche, la combinaison peroxyde d'hydrogène + Veliparib induit une augmentation significative de foyers XRCC1 par noyau après 14 jours de traitement quotidien (**Figure 32**).

Le traitement au peroxyde d'hydrogène ayant un léger effet cytotoxique, nous avons arrêté le traitement H₂O₂ au jour 21, mais maintenu le traitement au Veliparib et examiné si cela permettait de maintenir non réparées les cassures préalablement accumulées. Les analyses par immunofluorescence anti-XRCC1 montrent qu'après l'arrêt du traitement à l'H₂O₂, maintenir l'inhibition de PARP1/PARP2 permet de maintenir la persistance des SSB (**Figure 32**).

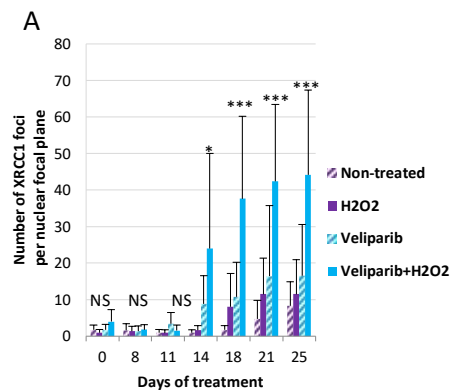


Figure 32 (figure 6A de l'article): An SSB accumulation is enough to induce senescence and post-senescence neoplastic escape. (A) Analysis of XRCC1 foci by immunofluorescence on NHDFs (F1MC1, DP=44.07 at the beginning of the experiment) treated daily or not with Veliparib at 1µM in combination with H₂O₂ at 5µM during 21 days and then with Veliparib alone. Each point represents the mean number of XRCC1 foci per nuclear focal plane at indicated time of treatment from 100 nuclei per condition. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point.

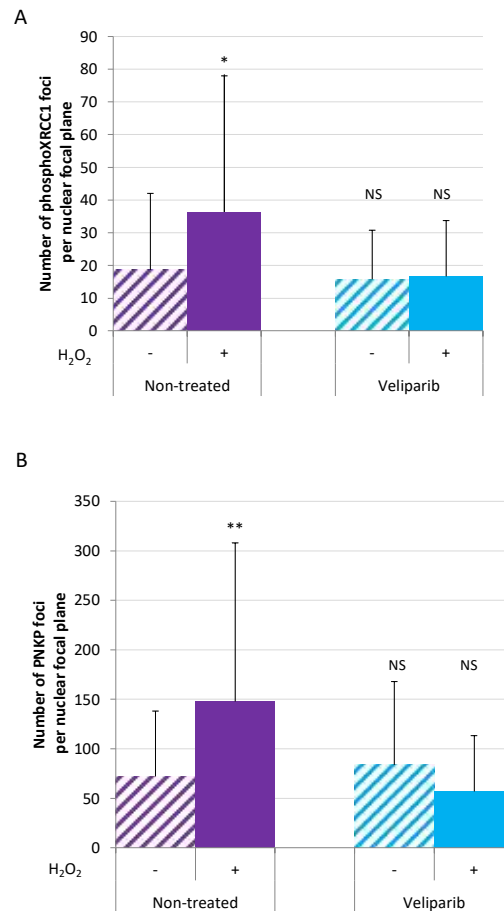


Figure 33 (figure supplémentaire 19 de l'article) : The repair of SSBs is blocked during a Veliparib + H₂O₂ treatment. NHDFs (F1MC1, DP=44.07 at the beginning of the experiment) were treated daily or not with Veliparib + H₂O₂ as in Figure 6. PhosphoXRCC1 (A) and PNKP (B) foci were analyzed by immunofluorescence at day 26. The bar chart represents the mean number +/- SD of foci per nuclear focal plane in 100 nuclei T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point.

Suite à son recrutement aux foyers de cassures, XRCC1 est phosphorylé. Cette phosphorylation est nécessaire au recrutement des protéines de réparation, ainsi qu'à la résolution finale du foyer²⁷⁰. Nous avons donc examiné la phosphorylation de XRCC1 par immunofluorescence avec des anticorps spécifiques de la forme phosphorylée. Alors que la phosphorylation de XRCC1 a lieu dans les cellules traitées au H₂O₂ seul, ce qui indique une réparation normale, nous observons une absence de phosphorylation de XRCC1 dans les cellules traitées Veliparib + H₂O₂ (**Figure 33A**). Ceci montre que la diminution de l'activité de PARylation inhibe la phosphorylation de XRCC1 recruté aux foyers des cassures. Il a été montré que la phosphorylation de XRCC1 était nécessaire au recrutement de la PNKP, une des protéines de réparation^{271,272}. Nous avons donc examiné le recrutement de cette protéine par immunofluorescence. Alors qu'une augmentation du nombre de foyers PNKP a bien été observée lorsque les cellules sont traitées par le H₂O₂ seul, aucune augmentation n'a été observée dans les cellules traitées au Veliparib + H₂O₂ (**Figure 33B**). Ces résultats indiquent donc que le traitement combiné Veliparib + H₂O₂ induit une accumulation de SSB, en figeant la voie SSB en amont de l'étape de phosphorylation de XRCC1.

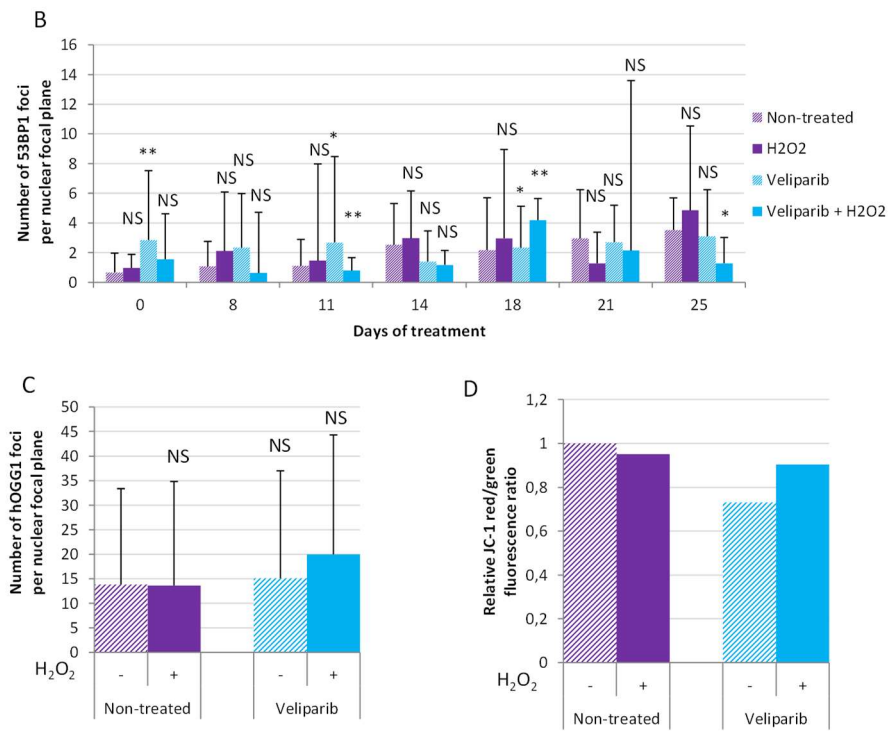


Figure 34 (figure supplémentaire 18 de l'article): The combined PARP inhibitor + H₂O₂ treatment does not induce other oxidative damages than SSBs. (B) NHDFs (F1MC1, DP=44.07 at the beginning of the experiment) were treated daily or not with Veliparib + H₂O₂ as in Figure 6. 53BP1 foci were analyzed by immunofluorescence during the first 25 days of treatment. (C) hOGG1 foci were analyzed by immunofluorescence at day 26. The bar chart represents the mean number +/- SD of foci per nuclear focal plane in 100 nuclei. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point. (D) The mitochondrial membrane potential was evaluated by the JC-1 dye at day 25 by flow cytometry. Each bar gives the mean of the red / green fluorescence ratio in a population of 10,000 cells normalized to the non-treated population.

Le stress oxydant et les PARP1 et 2 sont décrits dans la littérature pour avoir d'autres effets que l'induction et la réparation de SSB. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent aussi provoquer des DSB, des modifications de bases, notamment l'oxydation de la guanine en 8-oxoguanine, et une dépolarisation des mitochondries²⁷³⁻²⁷⁷. En plus d'être impliquée dans la voie SSB, la PARP1 contribue à la réparation des DSB. Plus précisément, son activité concurrence la formation du complexe Ku80/Ku70 nécessaire à la NHEJ. En cas de déficience de ce complexe, l'activité de la PARP1 devient essentielle pour la réparation des DSB par une voie NHEJ alternative (A-NHEJ)^{278,279}. La PARP1 facilite également le recrutement du complexe MRN au niveau des fourches de réplication bloquées et facilite ainsi leur résolution^{280,281}. Nous avons donc voulu déterminer si le traitement combiné Veliparib 1 mM + H₂O₂ 5 μM induisait d'autres effets que l'accumulation de SSB. Tout d'abord, afin d'évaluer l'induction potentielle de DSB, nous avons réalisé des immunofluorescences dirigées contre 53BP1. Quels que soient la condition et le temps de traitement, nous n'observons pas d'augmentation de foyers 53BP1 par rapport aux cellules contrôle (**Figure 34B**). Ensuite, nous avons évalué l'accumulation potentielle de bases oxydées. Celles-ci sont réparées par le système *Base Excision Repair* (BER) faisant intervenir des glycosylases spécifiques au type de base endommagée²⁸². Afin de détecter l'accumulation de 8-oxo-guanines, nous avons réalisé, après 26 jours de traitement combiné et une semaine après l'arrêt du traitement à l'H₂O₂, des immunofluorescences contre hOGG1 (*8-oxoguanine DNA glycosylase humaine 1*). Là encore, nous n'observons pas de différence de nombre de foyers hOGG1 entre les cellules traitées et les cellules contrôle (**Figure 34C**). Enfin, pour suivre la viabilité mitochondriale, nous avons utilisé la sonde fluorescente JC-1 dont la longueur d'onde d'émission et la localisation dépendent de la polarisation des mitochondries. En effet, lorsque les mitochondries sont polarisées, la sonde s'y accumule et émet dans le rouge ; en cas de dépolarisation, elle en est exclue et émet dans le vert. La dépolarisation mitochondriale est donc quantifiable par une diminution du ratio rouge/vert. Nos analyses n'ont pas montré de diminution importante de ce ratio dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôle (**Figure 34D**).

Avec l'ensemble de ces expériences, nous avons donc montré que l'inhibition de l'activité des PARP1 et 2 combinée à un stress oxydant ménagé permet d'induire et d'accumuler spécifiquement des SSB, sans induire de DSB, ni d'oxydation de guanines, ni de dépolarisation mitochondriale.

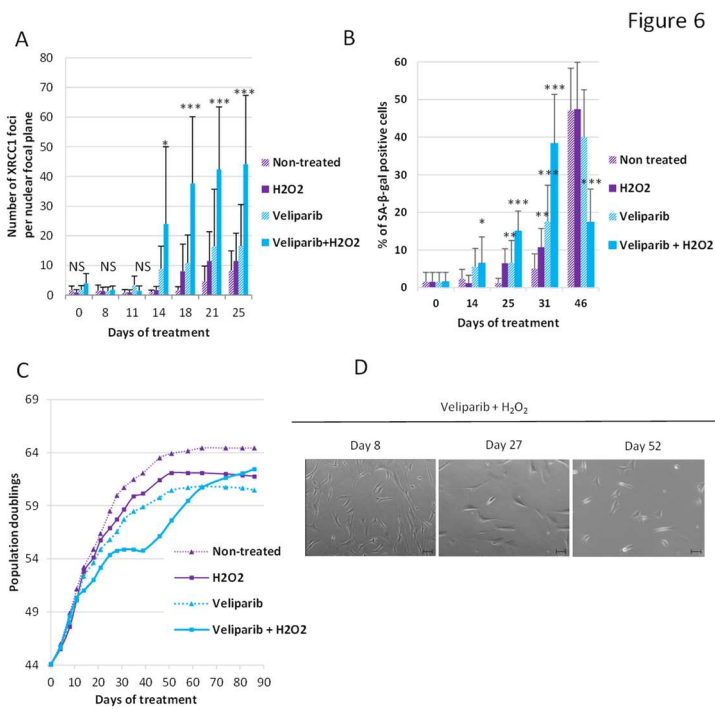


Figure 35 (figure 6 de l'article): An SSB accumulation is enough to induce senescence and post-senesence neoplastic escape. (A) Analysis of XRCC1 foci by immunofluorescence on NHDFs (F1MC1, DP=44.07 at the beginning of the experiment) treated daily or not with Veliparib at 1 μ M in combination with H₂O₂ at 5 μ M during 21 days and then with Veliparib alone. Each point represents the mean number of XRCC1 foci per nuclear focal plane at indicated time of treatment from 100 nuclei per condition. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point. (B) SA- β -Gal assays. Each bar represents the mean +/- SD percent of SA- β -Gal-positive cells in an X-gal assay from 5 independent microscopic fields. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point. (C) Growth curves of the same cells. (D) Representative phase contrast microscopy images of cell morphologies.

B. L'accumulation de foyers XRCC1 anormaux est corrélée avec la survenue d'un plateau de sénescence

Afin de connaître les effets de la persistance des SSB dans les NHDF, nous avons suivi leur croissance. Nous avons observé, dans le cas d'un traitement combiné Veliparib + H₂O₂, la survenue d'un plateau de croissance où le nombre de doublements de population n'évolue plus entre les jours 25 et 39, malgré l'arrêt du traitement à l'H₂O₂ (**Figure 35C, Figure 36A**). Nous avons voulu déterminer les causes de cet arrêt de croissance. Nous avons émis deux hypothèses : (i) le plateau est dû à un équilibre entre effet cytotoxique et prolifération cellulaire ; (ii) ce plateau est dû à un état de sénescence.

Pour évaluer la première hypothèse, nous avons réalisé un marquage annexine V/IP après 20 jours de traitement, période où la croissance des cellules traitées diminuait (**Figure 37D**). Les résultats mettent en évidence un taux de mortalité d'environ 10 % pour le groupe non traité qui augmente de manière non significative (test du Chi-deux) à 14 % pour le groupe traité au Veliparib + H₂O₂. De manière intéressante, le groupe traité à l'H₂O₂ seul subit la même augmentation de mortalité, ce qui indique que le léger effet cytotoxique est dû au stress oxydant et pas au Veliparib.

Pour évaluer la deuxième hypothèse, nous avons tout d'abord analysé l'activité SA-β-Gal. Le test colorimétrique X-gal révèle une augmentation significative de l'activité β-Gal dans 50 % des cellules au jour 31 pour le traitement combiné contre 5 % pour le groupe non traité (**Figure 35B, Figure 36B**). Ce résultat a été vérifié par une analyse en cytométrie en flux avec l'utilisation du substrat fluorigène C12FDG (**Figure 37A, B**). Ensuite, nous avons quantifié par cytométrie en flux la taille des cellules et leur granularité. Nous remarquons une augmentation du pourcentage des cellules grosses et granulaires dans le groupe traité au Veliparib + H₂O₂ qui passe à 22 % de la population totale contre 11 % dans le groupe non traité (**Figure 37A**). Enfin, nous avons réalisé une analyse par western-blot de l'expression des protéines clés de l'arrêt dans le cycle cellulaire associé à la sénescence. Nous observons une augmentation de l'expression de p16 dans les cellules traitées au Veliparib + H₂O₂, associé à une diminution de la phosphorylation de Rb, ce qui met en évidence l'activation de la voie p16/Rb (**Figure 37C**).

Ainsi, nous pouvons en conclure que le plateau de croissance induit par le traitement combiné au Veliparib + H₂O₂ correspond à une induction de sénescence prématurée médiée par la voie p16/Rb.

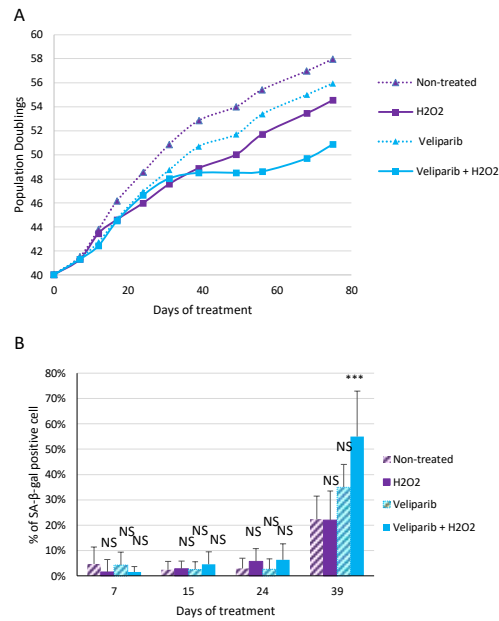


Figure 36 (figure supplémentaire 20 de l'article): Same experiment as in Figure 6 with another NHDF donor. NHDFs (F6MC1, DP=40.04 at the beginning of the experiment) were submitted daily to the combined Veliparib +H₂O₂ treatment as in Figure 7 for 31 days. Then, the H₂O₂ treatment was stopped but the Veliparib treatment maintained up to day 75. (A) Growth curves. (B) SA-β-Gal assays. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point.

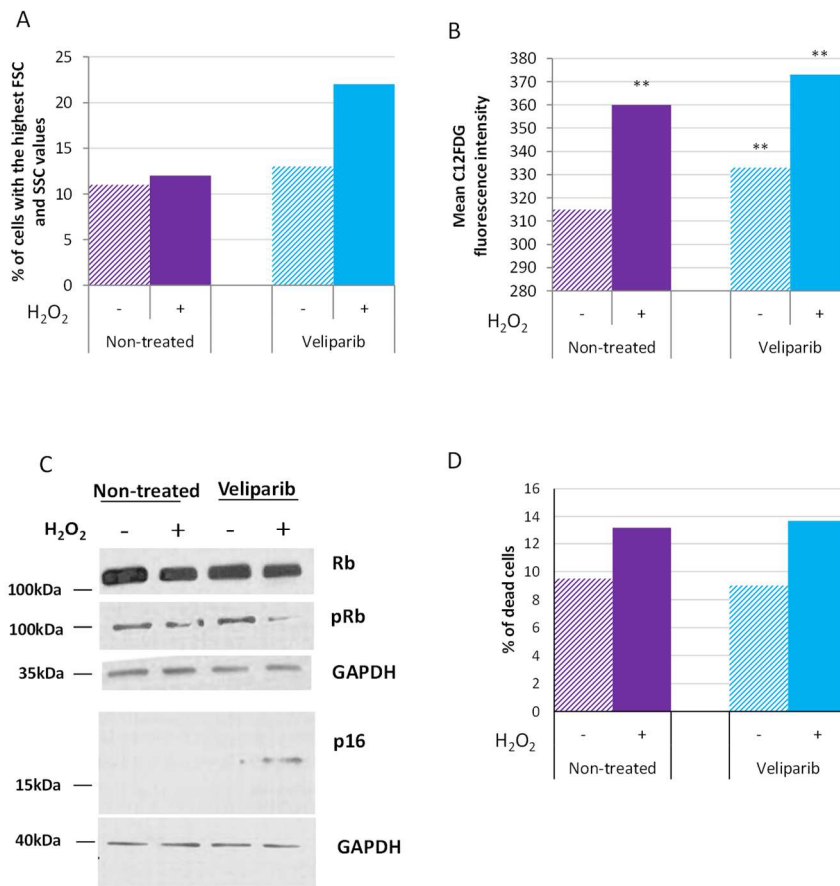


Figure 37 (figure supplémentaire 21 de l'article): The combined PARP inhibitor + H₂O₂ treatment induces a panel of senescence markers. NHDFs (F1MC1, DP=40.01 at the beginning of the experiment) were treated daily or not with Veliparib + H₂O₂ as in Figure 7. (A) At day 25, cell morphologies were analyzed by flow cytometry. The bar chart reports the percentage of cells with high FSC and SSC values among 10,000 cells. (B) SA-β-Gal activity evaluated at day 25 by flow cytometry using the C12FDG fluorescent substrate. The bar chart reports the mean C12FDG fluorescence intensity of 10,000 cells. A Chi-square test was done to compare the fluorescence intensity of each of the 10,000 irradiated or senescent NHDFs to non-irradiated NHDFs. (C) Western Blot analysis of Rb, phospho-Rb (pRb), p16 and GAPDH (loading control) protein levels after 25 days of treatment. (D) Level of cell death measured at day 20 by flow cytometry using the AnnexinV/PI assay. The indicated percentage of dead cells regroups AnnexinV and/or PI-positive cells.

Figure 6

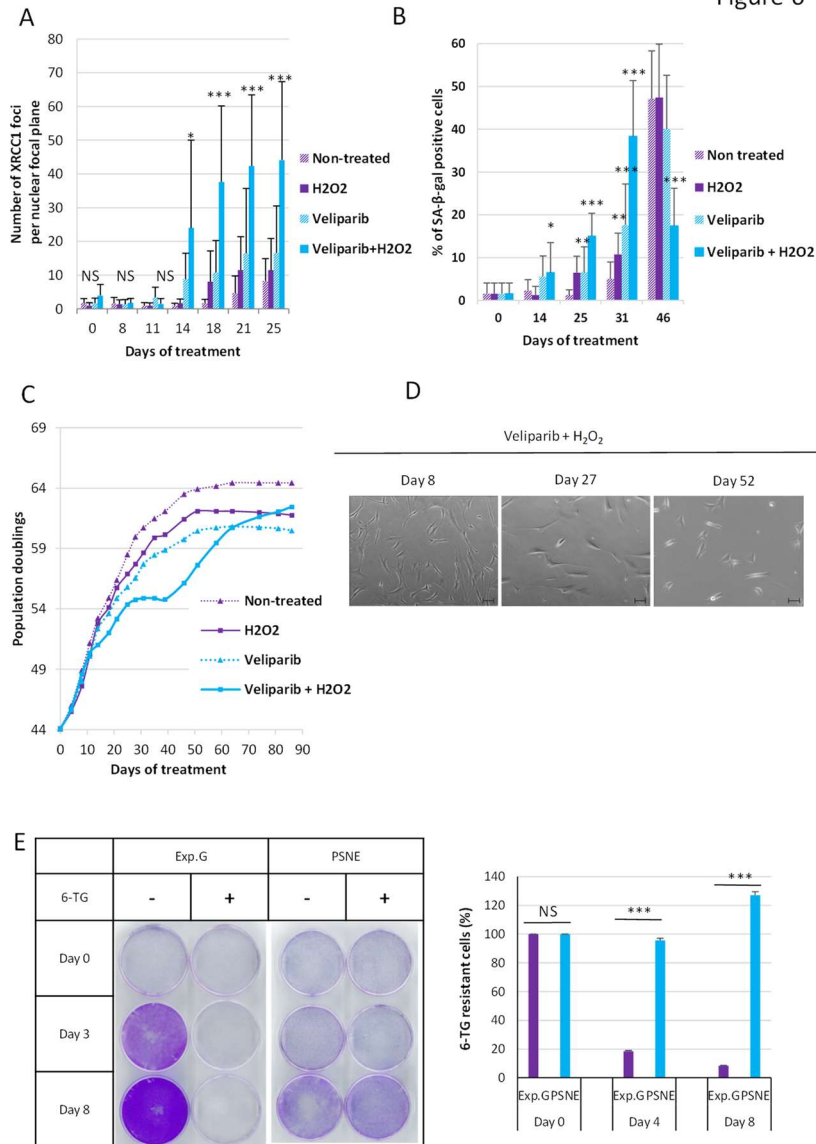


Figure 38 (figure 6 de l'article): An SSB accumulation is enough to induce senescence and post-senescence neoplastic escape. (A) Analysis of XRCC1 foci by immunofluorescence on NHDFs (F1MC1, DP=44.07 at the beginning of the experiment) treated daily or not with Veliparib at 1μM in combination with H₂O₂ at 5μM during 21 days and then with Veliparib alone. Each point represents the mean number of XRCC1 foci per nuclear focal plane at indicated time of treatment from 100 nuclei per condition. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point. (B) SA-β-Gal assays. Each bar represents the mean +/- SD percent of SA-β-Gal-positive cells in an X-gal assay from 5 independent microscopic fields. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point. (C) Growth curves of the same cells. (D) Representative phase contrast microscopy images of cell morphologies. (E) HPRT assays performed on PSNE cells having regrow after the senescent plateau and on non-treated exponentially growing NHDFs (Exp. Growth) at 22PDs as control. The bars indicate the mean +/- SD of three measures of the percentage of 6-TG resistant cells. T-tests were performed for comparing exponentially growing cells and emerging cells.

C. Certaines cellules ont la capacité de sortir de cet état de sénescence et génèrent des cellules filles mutées

La question suivante a été de déterminer si des cellules présentant des caractéristiques cancéreuses étaient capables d'émerger de cette sénescence induite par l'accumulation de SSB non réparées.

Pour cela, nous avons suivi le devenir des NHDF au-delà du plateau de sénescence. Nous avons observé une reprise de croissance après le jour 39 de cellules présentant les caractéristiques morphologiques de cellules PSNE (**Figure 38C**). Nous remarquons que la croissance de ces cellules PSNE est lente, avec un temps de doublement de 3,5 jours versus 1,5 jour pour les cellules en croissance exponentielle, avant le plateau de sénescence. Ces cellules PSNE ne présentent plus de marqueurs de sénescence : leur activité β -Gal a rediminué et leur taille, telle qu'observée au microscope à contraste de phase, correspond à celles de cellules proliférantes. Néanmoins, par rapport aux NHDF en croissance exponentielle avant le plateau de sénescence qui sont fusiformes et bien organisés en faisceaux, les cellules PSNE présentent une morphologie étoilée et sont plus désorganisées (**Figure 38B, D**), ce qui suggère qu'elles ont acquis certains caractères transformés.

Pour mieux caractériser ce caractère transformé des cellules PSNE, nous avons recherché la présence de mutations par un test HPRT. Comme déjà montré, le traitement à la 6-thioguanine a induit la mort des cellules contrôle en croissance exponentielle, alors que les cellules PSNE ont résisté à ce traitement, indiquant qu'elles présentent une mutation perte de fonction du gène *HPRT*, et potentiellement d'autres (**Figure 38E**).

Pour conclure, nous avons montré qu'un traitement au Veliparib + H₂O₂ permet d'induire spécifiquement une accumulation de SSB persistantes, comme observé dans les cellules placées en marge du PTV irradié de façon similaire aux patients. Ces SSB sont suffisantes pour induire un phénotype sénescence pouvant donner lieu à une émergence de cellules mutées et morphologiquement transformées.

VII. In vivo, l'irradiation induit des SSB dans les cellules de la peau localisées en marge du PTV

Les étapes suivantes de mon projet de thèse avaient pour but de confirmer ou infirmer les résultats obtenus in vitro dans un modèle préclinique murin.

A. Dispositif expérimental d'irradiation de souris en marge du PTV.

En collaboration avec de Dr vétérinaire Jérôme Benoit d'Oncovet Clinical Research, nous avons mis en place un système expérimental permettant d'irradier des souris en marge d'un fantôme représentant le PTV.

Nous avons utilisé l'Elekta Precise®, un accélérateur linéaire très similaire au Varian Clinac® du Centre Oscar Lambret que nous avons utilisé pour irradier les cellules. Un fantôme a été réalisé en plaques de PMMA superposées. La souris est placée tout contre ce fantôme, couchée sur le côté, sa colonne vertébrale en contact avec le fantôme. La continuité de la matière entre le fantôme et la souris est assurée par un gel d'échographie. Le fantôme représente le PTV, la limite (isodose 50) étant placée juste au niveau du contact avec la souris. Pour l'irradiation du PTV, l'isocentre a été positionné à la même hauteur que celle de la peau de la souris. L'irradiation a été réalisée en mode photon à 6 MV (Figure 39).

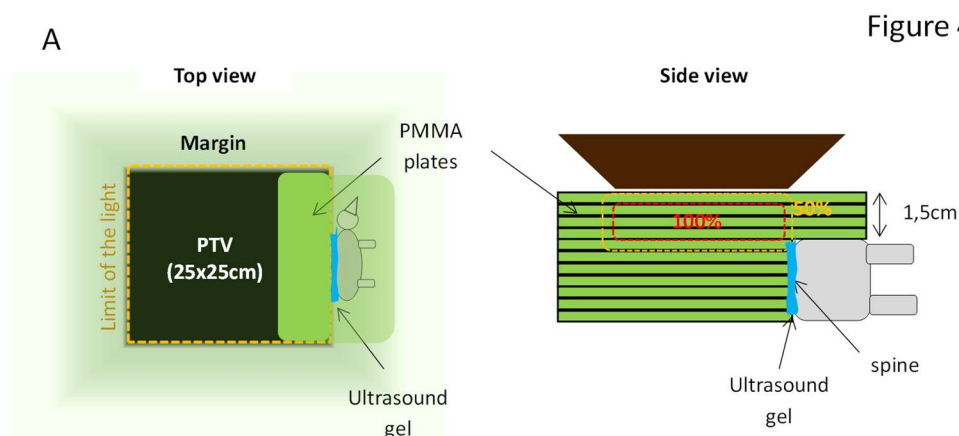


Figure 39 (figure 4 de l'article): Mice positioned at the margin of a phantom mimicking a PTV irradiated once at 2Gy have a significant increase of XRCC1 foci. (A) Schematic representation of how mice were irradiated.

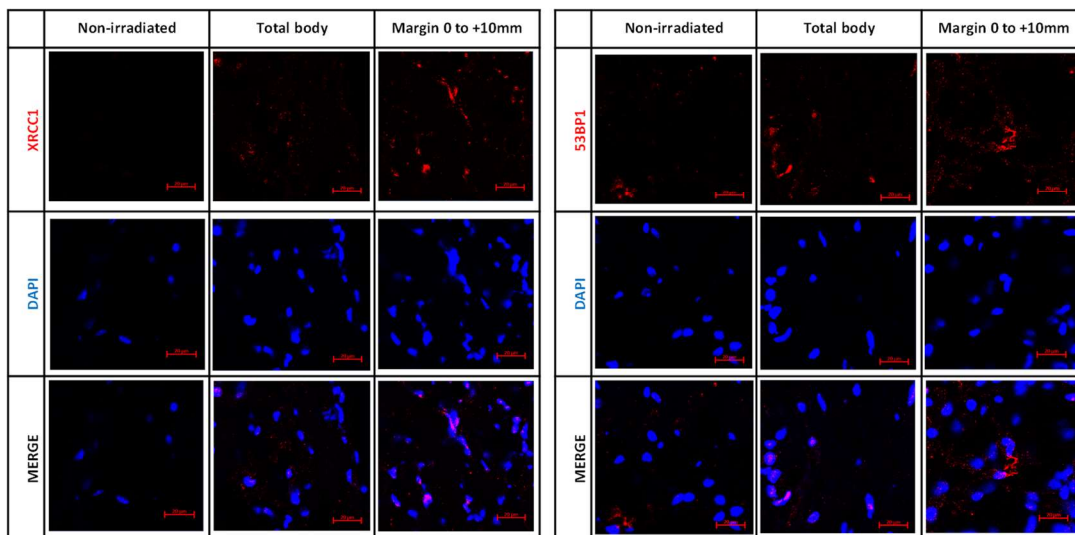
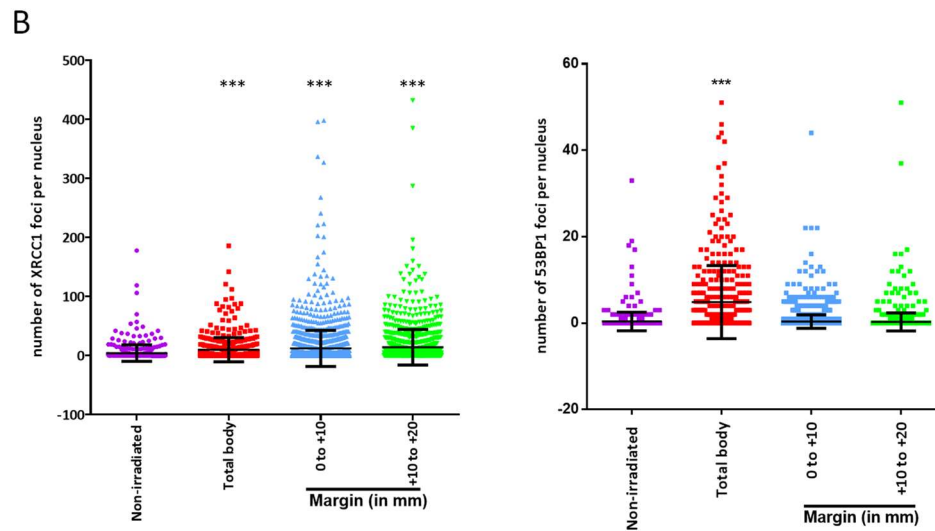


Figure 40 (figure 4 de l'article): Mice positioned at the margin of a phantom mimicking a PTV irradiated once at 2Gy have a significant increase of XRCC1 foci. (B) Mice were sacrificed 1hr after irradiation. Skin samples at different distances from the isodose 50 (the spine), established as the zero, were dissected and fixed for the immunodetection of XRCC1 and 53BP1. XRCC1 and 53BP1 foci of dermal cells were quantified by confocal microscopy. Each dot in the scatter plots represents the number of XRCC1 or 53BP1 foci of one dermal cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of foci number values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated mice. The lower panel shows representative fluorescent microscopic images of XRCC1 or 53BP1 foci in red and nucleus stained by DAPI in blue.

B. In vivo, l'irradiation induit des SSB dans les cellules de la peau localisées en marge du PTV

En utilisant le design expérimental décrit ci-dessus (**Figure 39**), nous avons examiné si une irradiation une fois à 2 Gy du fantôme pouvait induire des SSB dans les cellules de peau d'une souris placée en contact étroit. Deux souris mâles et deux souris femelles ont été utilisées. De plus, une souris femelle a été irradiée en plein champ (*total body*) comme contrôle positif et une autre femelle n'a pas été irradiée pour servir de contrôle négatif. Une heure après l'irradiation, les souris ont été sacrifiées et des échantillons de peau ont été prélevés à différentes distances du contact avec le fantôme.

L'analyse par immunofluorescence des foyers XRCC1, marqueurs de SSB, montre que l'irradiation a généré dans le derme de la souris irradiée en plein champ une augmentation significative du nombre de foyers XRCC1 par noyau par rapport à la souris non irradiée, comme attendu. En ce qui concerne les souris positionnées au contact du fantôme, l'irradiation a induit une augmentation significative du nombre de foyers XRCC1 par noyau par rapport aux souris non irradiées, et ce jusqu'à 2 cm du contact d'avec le fantôme (**Figure 40**).

L'analyse par immunofluorescence des foyers 53BP1, marqueurs de DSB, révèle que seule la souris irradiée dans le plein champ présente une augmentation significative du nombre de foyers 53BP1 par noyau par rapport à la souris non irradiée (**Figure 40**).

Ces résultats montrent que, chez les souris non irradiées directement, mais placées en marge d'un fantôme irradié à 2 Gy, il se forme des SSB mais pas de DSB, comme dans les cellules en culture in vitro.

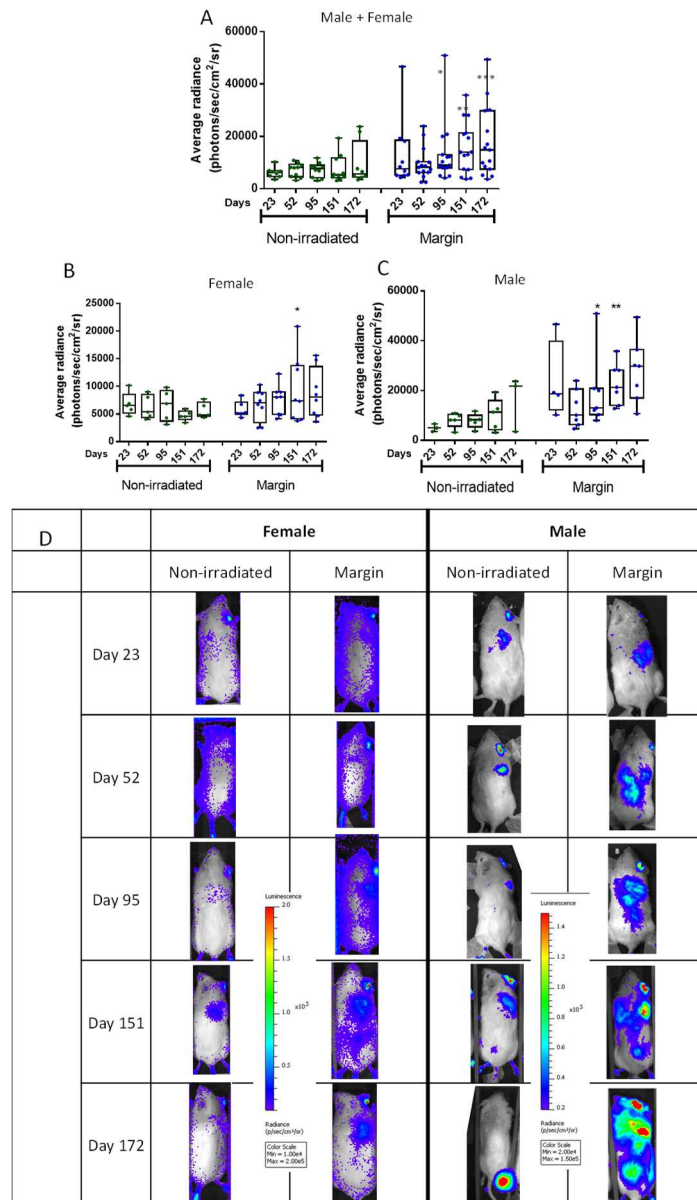


Figure 41 : Suivi par bioluminescence des souris p16-LUC positionnées en marge d'un fantôme irradié. Des souris p16-LUC ont été positionnées en marge d'un fantôme (comme décrit dans la figure 19) irradié quotidiennement ou non pendant 7 semaines (soit jusqu'au jour 47). Une mesure de bioluminescence a été effectuée aux jours indiqués, le jour 1 étant pris comme le premier jour d'irradiation **A**. Radiance moyenne du dos des souris mesurée aux jours indiqués. La mesure ne prend en compte que le tronc. La limite inférieure de la boîte à moustache montre le 10^{ème} percentile et la limite supérieure montre le 90^{ème} percentile. La barre centrale présente la médiane. Les barres d'erreurs représentent les valeurs minimales et maximales. **B**. Radiance moyenne des souris mâles uniquement. **C**. Radiance moyenne des souris femelles uniquement. Des T-tests ont été réalisés pour comparer les souris non-irradiées aux souris irradiées en marge. *, ** et *** représentent respectivement $p < 0.05$, $p < 0.01$ et $p < 0.001$. **D**. Photos représentatives des souris aux différents points de mesure. L'intensité de bioluminescence dans les souris mâles et femelles sont représentées avec des échelles de couleur différentes.

VIII. Une irradiation fractionnée induit-elle de la sénescence dans des souris positionnées en marge du PTV ?

Pour répondre à cette question, nous avons irradié, en utilisant le même système expérimental que précédemment, des souris p16-LUC à 2 Gy par jour ouvré pendant 7 semaines (ce qui correspond à l'irradiation maximale appliquée chez les patients), soit jusqu'au jour 47 après la première irradiation. Dans les souris p16-LUC, l'ADN complémentaire de la luciférase suivi du signal de polyadénylation de SV40 est inséré dans le site d'initiation de la traduction (l'exon 1 α) d'un des allèles du locus p16 endogène. Ceci a pour conséquence une expression de luciférase sous contrôle du promoteur de p16. Cette construction permet donc un suivi en temps réel par bioluminescence de l'expression de p16 qui est up-régulé transcriptionnellement dans les cellules sénescentes²⁸³.

Nous avons mené cette expérience une première fois sur 8 souris (4 mâles et 4 femelles) positionnées en marge et 6 souris non-irradiées (3 mâles et 3 femelles) comme contrôle négatif. Malheureusement, du fait du manque d'approvisionnement en Antisedan (qui permet le réveil des souris après anesthésie) pendant la période du 1^{er} confinement lié à la pandémie de COVID19, une grande partie des souris sont mortes après 3 semaines d'irradiation. A la suite de cet incident, il nous restait 5 souris irradiées en marge (2 femelles et 3 mâles) et 2 mâles non-irradiés. Le faible nombre de souris survivantes ne nous a pas permis de conclure sur une induction de sénescence en marge du champ d'irradiation.

Nous avons donc réitéré l'expérience dans les mêmes conditions à la fin du confinement avec 12 souris irradiées en marge (6 mâles et 6 femelles) et 10 souris non-irradiées (5 mâles et 5 femelles). Lors de l'analyse des résultats, nous avons dû éliminer 4 mâles (2 non-irradiés et 2 irradiés en marge) qui s'étaient battus et présentaient des blessures positives en bioluminescence. Nous avons par ailleurs additionné aux résultats de cette expérience ceux de la première.

Ainsi le résultat compilé de ces deux expériences met en évidence une augmentation de bioluminescence statistiquement significative dans les souris positionnées en marge du fantôme à partir du jour 95, soit 48 jours après la dernière irradiation (**Figure 41A**). Cela suggère que les particules ionisantes diffusant depuis le fantôme vers la souris pourraient induire un phénotype sénescent, après un délai de plusieurs semaines. Par ailleurs, nous avons été surpris de constater qu'il existait une différence importante de réponse entre les mâles et les femelles, avec une plus grande hétérogénéité dans la population mâle et un niveau de bioluminescence plus faible dans les souris femelles que dans les mâles, qu'il s'agisse du niveau de base ou du niveau induit par l'irradiation (**Figure 41**)

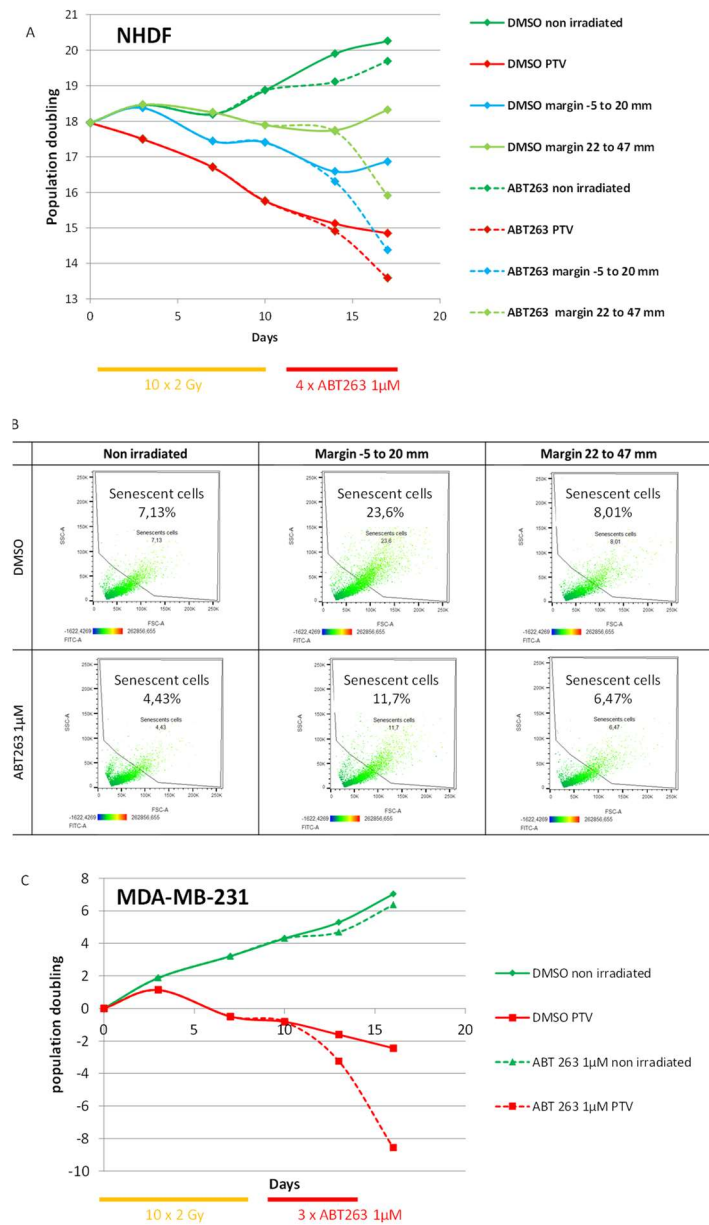


Figure 42 : L'ABT263 élimine spécifiquement les cellules sénescents radio-induites. (A) Courbe de croissance de NHDF (F6MC, DP : 21,03 au début de l'expérience) cultivés en plaque 12 puits, irradiés ou pas à 2 Gy par jour ouvré pendant 2 semaines (mode photon, 20 MV), puis traités chaque jour avec 1 μ M d'ABT263 ou du DMSO pendant 4 jours. La marge est indiquée en termes de distance depuis la limite du champ lumineux qui représente 50 % de la dose du PTV. Les cellules non irradiées ont été laissées hors du bunker. Les cellules ont été comptées à chaque passage en utilisant une lame de Malassez. (B) Analyse par cytométrie en flux du phénotype sénescents 24 h après le dernier traitement à l'ABT263. Les axes représentent le FSC (taille) en fonction du SSC (granularité). L'activité SA- β -Gal mesurée avec la sonde C12FDG (analysée ici grâce au canal FITC) est représentée avec la gamme de vert (le vert foncé représente une faible activité et le vert clair représente une forte activité). Le pourcentage des cellules sénescents indiqué correspond à celui des cellules ayant une forte intensité C12FDG et une valeur de SSC et FSC élevée. (C) Courbe de croissance de MDA-MB231 (passage 43 au début de l'expérience) cultivés en plaque 12 puits, irradiés ou pas à 2 Gy par jour ouvré pendant 2 semaines (mode photon, 20 MV), puis traitées chaque jour avec 1 μ M d'ABT263 ou du DMSO pendant 3 jours. Les cellules non irradiées ont été laissées hors du bunker. Les cellules ont été comptées à chaque passage en utilisant une lame de Malassez.

IX. Expériences préliminaires d'utilisation des sénolytiques

Nos résultats suggèrent que les fibroblastes positionnés en marge du PTV induits en sénescence pourraient être la source des sarcomes secondaires postradiothérapie. Il pourrait donc être intéressant, dans une optique de prévention des cancers secondaires, d'éliminer les cellules sénescents radio-induites à l'aide de sénolytiques. Nous avons commencé à vérifier l'efficacité de quelques sénolytiques déjà établis comme tels pour éliminer ces cellules. Plus particulièrement, nous avons testé le Navitoclax (ABT-263) ainsi que la combinaison du Dasatinib avec la Quercetin.

A. Le Navitoclax (ABT-263) permet l'élimination spécifique des fibroblastes sénescents radio-induits

Sur des NHDF positionnés dans ou en marge du PTV ayant subi 2 semaines d'irradiation à 2 Gy par jour ouvré, nous avons testé un traitement au Navitoclax appliqué à 1 μ M par jour, pendant les 5 jours suivant les deux semaines d'irradiation. L'analyse de la croissance des populations cellulaires montre que les NHDF non irradiés subissent un ralentissement de croissance au début du traitement par le Navitoclax, suivie d'une reprise de la croissance. En revanche, les NHDF irradiés en marge et dans le PTV subissent de la mort cellulaire au cours du traitement par le Navitoclax (**Figure 42A**). Nous avons quantifié le nombre de cellules sénescents par cytométrie en flux, selon les paramètres FSC (taille), SSC (granularité) et intensité de fluorescence du C12FDG (activité SA- β -Gal), à l'issue du traitement. L'analyse révèle une diminution de la proportion de cellules sénescents dans tous les groupes traités au Navitoclax par rapport au même groupe non traité (**Figure 42B**), ce qui indique que ce sont spécifiquement les cellules sénescents qui ont été sensibles à l'effet létal du Navitoclax. Ce traitement semble donc prometteur pour l'élimination spécifique des cellules en sénescence radio-induite, que ce soit dans le PTV ou dans la marge. Afin de déterminer si le traitement au Navitoclax pourrait interférer avec l'effet curatif de la radiothérapie, nous avons examiné son effet sur des cellules cancéreuses après une radiothérapie de deux semaines. Nous avons donc irradié pendant 2 semaines des MDA-MB-231 placés dans le PTV, puis nous les avons traités au Navitoclax, comme les NHDF. L'analyse de la courbe de croissance montre que le traitement au Navitoclax a amplifié la mort des MDA-MB231 irradiées (**Figure 42C**). Donc le traitement au Navitoclax permet également d'éliminer les cellules cancéreuses ayant résisté à l'effet létal des rayonnements.

B. La combinaison Dasatinib et Quercetin ne permet pas l'élimination spécifique des fibroblastes sénescents radio-induits

Pour tester l'efficacité du traitement combiné Dasatinib et Quercetin (D+Q), des NHDF ont été irradiés pendant 2 semaines à 2 Gy par jour ouvré, puis ils ont été traités au Dasatinib à 200 nM et à la Quercetin à 30 μ M deux fois. Les courbes de croissance montrent que le traitement D+Q induit de la mort dans toutes les conditions, y compris dans les NHDF non irradiés (**Figure 43A**). Il en est de même pour les MDA-MB231 avec l'élimination des cellules qu'elles aient été irradiées ou non (**Figure 43B**). Ces résultats montrent que ce traitement combiné D+Q manque de spécificité dans l'élimination des cellules sénescents.

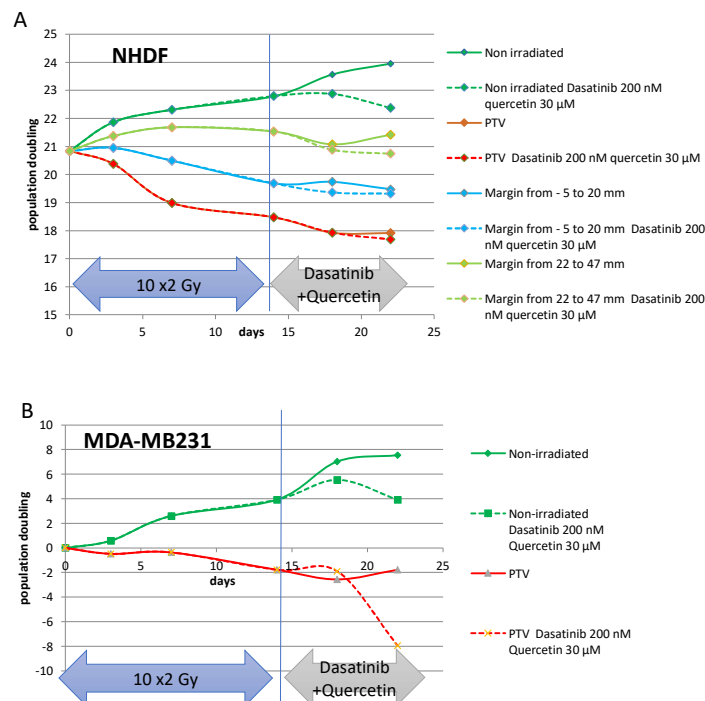


Figure 43 : La combinaison Dasatinib + Quercetin ne permet pas d'éliminer spécifiquement les cellules sénescents radio-induites. (A) Courbes de croissance de NHDF (F6MC, DP : 21,03 au début de l'expérience) cultivés en plaque 12 puits, irradiés ou pas à 2 Gy par jour ouvré pendant 2 semaines (mode photon, 20 MV), puis traités tous les deux jours avec 200 nM de Dasatinib et 30 μ M de Quercetin ou du DMSO pendant 4 jours. La marge est indiquée en termes de distance depuis la limite du champ lumineux qui représente 50 % de la dose du PTV. Les cellules non irradiées ont été laissées hors du bunker. Les cellules ont été comptées à chaque passage en utilisant une lame de Malassez. (B-C) Analyse par cytométrie en flux du phénotype sénescents 24 h après le dernier traitement aux Dasatinib et quercetin (DasaQ). (B) Courbes de croissance de MDA-MB231 (passage 43 au début de l'expérience) cultivés en plaque 12 puits, irradiés ou pas à 2 Gy par jour ouvré pendant 2 semaines (mode photon, 20 MV), puis traités tous les deux jours avec 200 nM de Dasatinib et 30 μ M de Quercetin ou du DMSO pendant 4 jours. Les cellules non irradiées ont été laissées hors du bunker. Les cellules ont été comptées à chaque passage en utilisant une lame de Malassez.

Chapitre 6 : Discussion

Nous avons montré qu'un protocole d'irradiation mimant une radiothérapie fractionnée à 2 Gy par jour ouvré induisait dans des fibroblastes placés en marge du PTV, que ce soit des fibroblastes humains *in vitro* ou des cellules dermiques de souris *in vivo*, une accumulation de SSB, en quasi-absence de DSB. Ces SSB ne se forment que lorsqu'il y a continuité de la matière entre le PTV et les cellules ou tissus périphériques, ce qui suggère que les SSB sont induites par des particules ionisantes qui diffusent dans la matière depuis le PTV. Ces SSB s'accumulent au fur et à mesure des irradiations successives, du fait d'un défaut de réparation résultant d'une baisse d'activité de PARylation. L'accumulation des SSB entraîne la survenue d'un état de sénescence prématurée, caractérisé par des changements morphologiques, une augmentation de l'activité SA- β -Gal, un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 associé à une augmentation de l'expression des CKI p16 et p21, ainsi qu'une augmentation de la proportion de cellules multinucléées. *In vivo*, l'utilisation de souris p16-LUC suggère que ce phénotype sénescence surviendrait après une période de 48 jours post-irradiation. Nous avons aussi montré que certaines de ces cellules sénescence sont capables de donner naissance à des cellules filles proliférantes, mutées, aux capacités invasives augmentées. Nous avons prouvé le lien de cause à effet entre l'accumulation de SSB et la survenue de sénescence et d'émergence post-sénescence en montrant que des NHDF qui accumulent des SSB, suite à un traitement très modéré au peroxyde d'hydrogène associé à un inhibiteur de PARP1 et PARP2, entrent en sénescence, puis, là encore, certaines cellules s'échappent de l'arrêt dans le cycle cellulaire pour donner naissance à une descendance de cellules proliférantes, à morphologie transformée et mutées.

L'ensemble de ces résultats nous amène donc à proposer que les sarcomes secondaires post-radiothérapie pourraient se former à partir de fibroblastes péri-tumoraux, non directement irradiés, mais soumis aux particules ionisantes qui diffusent dans le patient depuis le PTV. Ces particules induisent très préférentiellement des SSB, ce qui conduit à l'établissement d'un phénotype sénescence duquel des cellules néoplasiques peuvent émerger. Néanmoins, malgré l'acquisition d'un certain nombre de caractères transformés, ces cellules émergentes ne semblent pas capables de former de tumeur après xénogreffe en souris immunodéprimée, du moins dans un délai de 7 mois. Afin de démontrer le rôle de la sénescence dans l'émergence des sarcomes, nous devons réitérer les approches d'irradiation de souris p16-LUC en marge d'un fantôme, les suivre à long terme pour le développement de sarcomes et examiner si un traitement sénolytique appliqué à la fin du protocole d'irradiation permettrait de prévenir le développement des sarcomes.

Les résultats de cette étude mettant en lumière l'importance des SSB confortent des résultats antérieurs de l'équipe obtenus dans des modèles de cellules épithéliales humaines normales

(kératinocytes d'épiderme et cellules épithéliales mammaires) dont la sénescence est induite par une augmentation de leur niveau de stress oxydant endogène. En effet, pour ces cellules également, l'induction de sénescence est due à l'accumulation de SSB qui demeurent non réparées. De plus, certaines cellules sénescents peuvent également s'échapper de l'arrêt dans le cycle cellulaire. Les cellules PSNE ainsi générées présentent également des propriétés néoplasiques, allant jusqu'à la capacité d'induire des tumeurs après xénogreffe dans des souris immunodéprimées^{165,272}. Le parallélisme de ces résultats suggère que le passage par un stade de sénescence SSB-dépendante pourrait être un mécanisme de tumorigenèse qui peut se mettre en place dans plusieurs contextes de stress chronique et modéré (stress oxydant endogène ou radiations ionisantes hors champ).

I. Mécanismes d'entrée en sénescence des cellules irradiées en marge.

Comme dit précédemment, nos résultats suggèrent que l'accumulation de SSB dans des fibroblastes positionnés en marge d'un PTV soit responsable de l'entrée en sénescence. Afin de conforter ce résultat, il serait intéressant d'empêcher l'accumulation des SSB. Pour cela, on pourrait augmenter l'expression de la PARP1 par génie génétique. On pourrait aussi tenter d'augmenter son activité en fournissant aux cellules un excès de NAD⁺ qui est le substrat de la PARP1. De même, on pourrait inhiber la PARG, afin d'empêcher la dégradation des PAR et ainsi booster la réparation. Par ces différents moyens, si l'on parvient à suffisamment augmenter la réparation des SSB et de fait empêcher leur accumulation, on pourrait montrer directement leur impact sur l'induction de sénescence.

Un point à élucider est la ou les voies moléculaires de transduction du signal entre l'accumulation des SSB et l'entrée en sénescence. En effet, nous avons montré par RT-qPCR une augmentation de l'expression de p16 et de p21. Or, dans les kératinocytes d'épiderme où la sénescence est induite par une augmentation du stress oxydant et une accumulation de SSB non réparées, la sénescence est n'est associée qu'à une activation de la voie p16/Rb, sans activation de la voie DDR conduisant à l'activation de p53 et à l'induction transcriptionnelle de p21²⁷². Il se pose donc deux questions. La première est qu'est-ce qui conduit à l'activation de p16 dans les fibroblastes soumis aux radiations hors champ ? Dans les kératinocytes, l'équipe avait montré que c'est l'accumulation de XRCC1 non phosphorylé aux foyers de dommages qui entraîne la phosphorylation de la p38MAPK puis en aval l'activation de p16. Nous devons donc déterminer si ce mécanisme a lieu également dans les fibroblastes soumis aux radiations hors champ. La deuxième question est qu'est-ce qui induit l'activation de p21 ? Nous devons mieux analyser les marqueurs de la voie DDR comme la phosphorylation p53 sur la sérine 15 car il a été montré qu'ATM peut être activée en absence de

dommages à l'ADN¹²⁸. Enfin, il serait intéressant de réaliser des co-marquages p16 et p21 afin de savoir si les cellules expriment ces deux CKI de manière mutuelle ou exclusive.

II. Mécanismes de l'échappement de l'arrêt du cycle associé à la sénescence

En triant les fibroblastes sénescents de façon à avoir des populations sénescents débarrassées de cellules encore proliférantes, nous avons observé que certaines cellules sénescents peuvent échapper de l'arrêt du cycle cellulaire pour donner naissance à des cellules PSNE. Plusieurs mécanismes, qui restent à investiguer en profondeur, pourraient contribuer à cet échappement.

A. Rôle de la multinucléation des cellules sénescents dans l'émergence post-sénescence ?

La multinucléation est l'une des caractéristiques de la sénescence³¹. De nombreuses études ont montré que les cellules sénescents polyploïdes pouvaient donner naissance à des cellules filles diploïdes par bourgeonnement grâce à un mécanisme appelé dépolyploïdisation^{284,285}. Par exemple, il a été montré sur des cellules de carcinome colique du rat qu'un traitement au cisplatine induit de la sénescence. Certaines de ces cellules sénescents sont multinucléées. Les auteurs de l'étude citée ont trié les cellules multinucléées (c'est-à-dire ayant une quantité d'ADN supérieure ou égale à 8 N) et montré que ces cellules peuvent échapper de l'arrêt du cycle cellulaire pour former des colonies. De manière intéressante, les cellules filles proliférantes provenant des cellules polynucléées étaient diploïdes²⁸⁶.

Dans notre étude, nous obtenons en marge du PTV des cellules multinucléées. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces cellules multinucléées soient la source des cellules PSNE. Pour tester cette hypothèse, on pourrait trier les cellules sénescents selon leur contenu en ADN et observer si l'on obtient une fréquence d'émergence différente entre la population polyploïde et la population non-triée.

B. Altération des voies d'arrêt dans le cycle cellulaire ?

Il est établi que l'arrêt dans le cycle cellulaire des cellules sénescents peut être dû aux voies p16/Rb et/ou p53/p21. Dans notre étude, nous observons une augmentation de l'expression en ARNm de p16 et de p21. Un mécanisme possible pour échapper de l'arrêt du cycle associé à la sénescence est une altération de ces voies. Ceci a été montré pour la sénescence induite par l'activation de l'oncogène B-RAF^{V600E}. Cette sénescence est dépendante de p16. In vivo, on retrouve des mélanocytes

sénescents positifs pour B-RAF^{V600E} et p16 dans les naevi, des lésions prénéoplasiques qui peuvent évoluer en mélanome. De manière intéressante, le gène *CDKN2A* qui code p16 et p14^{ARF} est fréquemment délété dans les mélanomes. De plus, la perte de ce gène est suffisante pour induire l'échappement des cellules sénescentes de l'arrêt du cycle cellulaire¹⁶⁸.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que dans notre étude une altération de la voie p16/Rb est responsable de l'échappement de l'arrêt du cycle associé à la sénescence. À l'appui de cette hypothèse, l'altération de *CDKN2A* et/ou de *RB1* codant pour Rb est retrouvée dans 97 % des sarcomes induits postradiothérapie²⁵³. De plus, le résultat du séquençage des cellules PSNE montre une mutation dans un intron du gène *CDKN2A*, ce qui pourrait impacter son expression. Ainsi, l'altération de *CDKN2A* pourrait être responsable de l'échappement de l'arrêt du cycle cellulaire des fibroblastes sénescents induits par les radiations hors champ.

Une autre hypothèse est la surexpression d'une ou plusieurs protéines promouvant la progression du cycle cellulaire. C'est ce qui a été observé dans une lignée cancéreuse pulmonaire induite en sénescence par chimiothérapie où l'échappement de la sénescence dépendait de l'expression de CDK1¹⁶⁴.

C. Les SSB : un déterminant important de l'émergence ?

1. Les SSB à l'origine des mutations des cellules PSNE ?

Nous avons vu que les cellules sénescentes radio-induites en marge accumulent des SSB non réparées. Par ailleurs, la sénescence est, dans notre cas, majoritairement associée à un arrêt en phase G1. Le fait que quelques cellules sénescentes échappent de l'arrêt du cycle cellulaire implique obligatoirement qu'elles passent en phase S. Si c'est le cas, ces quelques cellules sénescentes devraient subir un second arrêt en phase S, car les fourches de réplication devraient bloquer devant les SSB non réparées. Puis, ce type de dommage devrait être réparé pour que la phase S reprenne et que la mitose ait lieu. Des fourches bloquées peuvent s'effondrer et donner lieu à des *one-ended DSB*. De tels dommages peuvent être réparés par Recombinaison Homologue (HR) ou par plusieurs formes de *Non-Homologous-End Joining* (NHEJ)²⁸⁷. PARP1 orienterait la réparation des fourches bloquées vers la HR en facilitant le recrutement du complexe MRN grâce aux chaînes de PAR²⁷⁹. Ainsi, à cause de la baisse d'activité de la PARP1 que nous observons à la sénescence, la NHEJ réputée mutagène serait favorisée. En effet, le séquençage des cellules PSNE montre la présence de nombreuses mutations.

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'accumulation de SSB non réparées dans les cellules sénescents radio-induites serait responsable de la formation de mutations dans les cellules PSNE et favoriserait ainsi la tumorigenèse.

2. DSB versus SSB non réparées : le déterminant de la stabilité de l'arrêt du cycle ?

Dans notre étude, lorsque nous quantifions de façon comparative les cassures de l'ADN des fibroblastes irradiés dans le PTV et dans sa marge, nous observons à la fois des DSB et des SSB dans le PTV et quasi-uniquement des SSB dans la marge. Dans le PTV, nous observons l'induction d'un phénotype *senescent-like*, que nous n'avons pas caractérisé en détail, qui est suivi par une mort cellulaire, alors qu'en marge les cellules sénescents persistent et donnent naissance à des cellules filles proliférantes, mutées et aux capacités invasives augmentées. Étant donné ces résultats, on peut se demander si le type de dommages à l'ADN à l'origine du phénotype sénescents, DSB versus SSB, influe sur le devenir des cellules sénescents.

Un premier argument en faveur de cette hypothèse est que l'induction spécifique de SSB, sans induction de DSB, obtenu par un co-traitement par un inhibiteur de PARP et une concentration faible de peroxyde d'hydrogène, permet d'induire un phénotype sénescents propice à l'émergence de cellules filles mutées.

Un second argument provient de l'étude antérieure de Nassour *et al.* dans l'équipe qui a comparé les dommages associés à la sénescence de NHDF et de NHEK (kératinocytes d'épiderme) provenant d'un même donneur, donc isogéniques. Dans le premier cas, la sénescence résulte du raccourcissement des télomères et de la formation de DSB conduisant à une activation de la voie DDR et à l'activation de p53/p21. L'arrêt du cycle cellulaire ainsi induit est extrêmement stable, du moins pendant plusieurs mois. Dans le cas des kératinocytes, le plateau de sénescence est causé par une augmentation du stress oxydant endogène associée à une baisse d'expression de PARP1 et d'activité de PARylation. Cela conduit à une accumulation de SSB, et à l'induction de p16, responsable de l'établissement du plateau de sénescence. Parmi les cellules sénescents, systématiquement une sur 10 000 environ donne spontanément naissance à des cellules filles transformées et tumorigènes. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans le modèle des fibroblastes co-traités Véliparib + H₂O₂. Ainsi, Ces observations amènent à faire l'hypothèse que le type de dommages à l'ADN et les voies d'arrêt du cycle induites en aval pourraient déterminer la stabilité de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence.

Ainsi, nous disposons de trois modèles de sénescence induite par une accumulations de SSB, à savoir l'irradiation en marge d'un PTV irradié selon un protocole d'irradiation fractionnée, une induction spécifique de SSB par cotraitement avec le Veliparib et le peroxyde d'hydrogène et enfin le modèle du kératinocyte. Dans ces trois modèles, certaines cellules sénescents peuvent donner naissance à des cellules filles proliférantes aux propriétés néoplasiques.

III. Activité de PARylation et risque de second cancer

A. Causes de la baisse d'activité de PARylation

Nous avons montré que l'accumulation de SSB en marge du PTV est associée à une diminution d'activité de PARylation. La ou les raisons de cette baisse d'activité de PARylation restent à élucider.

Des résultats préliminaires de RT-qPCR réalisées par Elodie Rodzinski, étudiante en M2 dans l'équipe, montrent que cette diminution d'activité est associée à une diminution de l'expression de PARP1 de 20%, quoique pour l'instant non statistiquement significative.

Récemment a été mis en évidence YB-1, un co-facteur de PARP1. Sa présence stimule l'activité de la PARP1, mais conduit à la production de chaînes de PAR plus courtes²⁸⁸. HPF1 est de même un co-facteur indispensable à l'activité de PARP1 et PARP2²⁸⁹. On peut supposer qu'une variation d'expression de l'un ou l'autre de ces co-facteurs pourrait contribuer à diminuer l'activité de PARylation qui s'installe au cours des irradiations.

Une autre hypothèse est l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité de PARG (Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase) ou d'une autre ADP-ribose hydrolase, ARH3. Ces enzymes permettent l'hydrolyse des chaînes de PAR lors de la résolution du dommage²⁹⁰. Les données de la littérature montrent que PARG est surexprimée dans les cancers du sein HER2 positifs et est associée à un mauvais pronostic. In vitro, la surexpression de PARG dans des cellules épithéliales mammaires normales induit une augmentation de leurs capacités invasives, les rend indépendantes de l'ancrage, et surtout leur confère la capacité de former des tumeurs lorsqu'elles sont xénotransplantées dans des souris immunodéprimées NOD/SCID²⁹¹. Néanmoins, les résultats préliminaires de RT-qPCR d'Elodie Rodzinsky ne semblent pas indiquer de changement dans l'expression de PARG ou de ARH3 dans les NHDF irradiés en marge.

Une dernière hypothèse que nous pouvons émettre est que la demande répétée et forte en NAD⁺, le substrat des PARP, pour réparer les cassures induites par les irradiations successives pourrait induire une déplétion du *pool* de NAD⁺, inhibant de fait l'activité enzymatique. Néanmoins, un contre-argument à cette hypothèse est qu'une déplétion en NAD⁺ due à une suractivation de PARP est connue pour induire la mort de la cellule. Cela a été montré pour plusieurs types cellulaires comme les astrocytes, les neurones et les fibroblastes²⁹². Ainsi, la déplétion en NAD⁺, si elle avait bien lieu, devrait être modérée afin d'induire une inhibition de l'activité de PARylation suffisante pour inhiber la réparation des SSB sans affecter la viabilité cellulaire.

B. L'utilisation d'inhibiteurs de PARP pour induire la létalité synthétique : un risque d'induire des cancers secondaires ?

La létalité synthétique consiste en l'inhibition de deux gènes qui, inhibés séparément n'induisent pas la mort de la cellule, mais qui inhibés ensemble l'induisent. L'application thérapeutique la plus connue de ce principe est l'utilisation d'inhibiteurs de PARP dans le traitement de tumeurs mutées pour le gène BRCA1. Dans ce cas, l'inhibition de PARP va conduire à la persistance de SSB qui deviendront des DSB non réparées du fait du manque de BRCA1, lesquelles induiront la mort des cellules cancéreuses²⁹³. La létalité synthétique peut aussi être obtenue avec une déficience dans d'autres gènes suppresseurs de tumeur. Ainsi, la déficience en ATM ou ATR a été associée avec une augmentation de la sensibilité aux inhibiteurs de PARP et fait maintenant l'objet d'investigations cliniques pour induire la létalité synthétique²⁹³.

Notre étude montre que l'accumulation de SSB non réparées pourrait être la cause de cancers secondaires, via un passage par un état de sénescence prématurée. Cela suggère que l'utilisation d'inhibiteurs de PARP pourrait certes avoir un effet curatif en favorisant la mort par létalité synthétique de cellules cancéreuses déficientes en BRCA1, ATM ou ATR, mais pourrait aussi induire une sénescence prématurée dans des cellules normales, qui pourraient à long terme être sources de transformation néoplasique.

IV. Les nouvelles techniques de radiothérapie et le risque de cancer secondaire

Nous avons étudié la tumorigenèse induite en marge d'un PTV irradié selon un protocole de radiothérapie conformationnelle 3D (3D-CRT) en mode photon à 2 Gy par jour. Ce protocole est celui le plus communément utilisé en radiothérapie. Dans les dernières décennies, de nombreuses autres techniques de radiothérapie sont apparues. Cependant, elles sont apparues trop récemment pour que l'on puisse avoir un réel recul sur l'épidémiologie des cancers secondaires induits par ces techniques. L'idée dans cette dernière partie est, à partir des données préexistantes de la littérature, de voir si le mécanisme putatif de tumorigenèse post-radiothérapie que nous avons mis en évidence serait ou non toujours présent avec ces nouvelles techniques.

A. Radiothérapie par modulation d'intensité

La radiothérapie IMRT (*intensity modulated radiotherapy*) est une technique apparue dans les années 90 permettant de moduler l'intensité des différents faisceaux, afin de conformer au mieux le volume dans lequel 100% de la dose est déposée à la forme de la tumeur et de limiter la dose reçue par les organes à risques. L'IMRT implique l'utilisation d'un nombre de faisceaux plus importants qu'en

3D-CRT (**Figure 45**). Ceci a pour conséquence une augmentation du volume de tissu sain en marge, même si celui-ci reçoit une plus faible dose que lors de la 3D-CRT. La modulation d'intensité requiert aussi un temps d'irradiation plus long, ce qui implique un risque de fuite de particules provenant de la tête de l'accélérateur plus important comparé à la 3D-CRT. Ainsi, le volume de tissu sain recevant une dose significative d'irradiation est augmenté par rapport à la 3D-CRT. Cette constatation suggère une augmentation du risque de second cancer avec l'IMRT²⁹⁴⁻²⁹⁶.

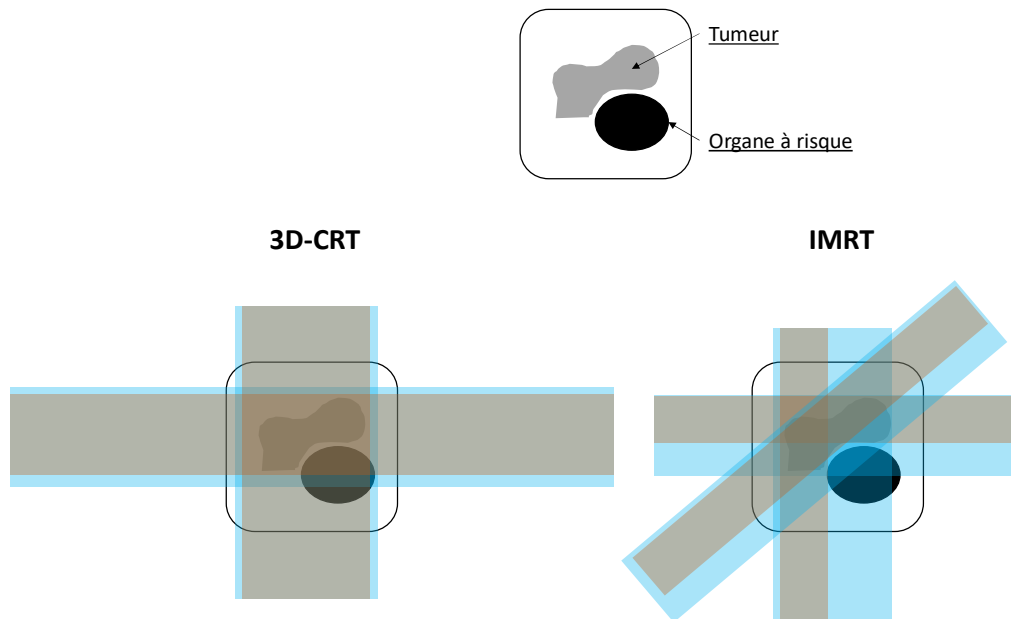


Figure 45 : Représentation schématique de la distribution de dose de la 3D-CRT et de l'IMRT. Les faisceaux gris représentent des faisceaux délivrant de fortes doses et les faisceaux bleus représentent des faisceaux délivrant de faibles doses. L'IMRT, contrairement à la 3D-CRT, permet par la modulation de l'intensité au sein de ses faisceaux de délivrer une forte dose spécifiquement au volume tumoral tout en évitant les organes à risque situés à proximité. Adapté de la présentation : « PROSTATE CANCER: RADIATION THERAPY APPROACHES » ANDREW L. SALNER <https://www.slideserve.com/saxon/prostate-cancer-radiation-therapy-approaches>

Dans les années 2000, plusieurs équipes ont tenté d'évaluer le risque de cancer secondaire consécutif à l'utilisation de cette technique par des modélisations, en se basant sur les données de dosimétrie. Une étude sur des patients irradiés au niveau du pelvis a montré un dépôt de dose plus important au niveau de la peau par rapport à une irradiation 3D-CRT. Concernant les autres organes, les auteurs n'ont pas calculé d'augmentation du risque de cancer secondaire, notamment pour la vessie et l'intestin²⁹⁶. Une autre étude s'intéressant à des données issues de patients traités pour des cancers de la prostate a montré qu'il n'y avait pas de changement dans le risque de développement de cancer secondaire dans le PTV ou à proximité. En revanche, ils ont estimé une augmentation du risque dans des organes distants comme la thyroïde, les glandes salivaires et la cavité orale²⁹⁷.

Plus récemment, les résultats préliminaires d'études épidémiologiques visant à estimer le risque de cancer secondaire suite à des IMRT sont sortis. Ces études ont comme défaut un faible temps de suivi des patients de 13 ans maximum, sachant que la médiane de survenue des cancers secondaires est de 15 ans. Ces études ne démontrent pas d'excès de risque de cancers secondaires suite à l'IMRT par comparaison à la 3D-CRT. Une première étude compare des patients traités par IMRT à des patients traités par 3D-CRT pour des cancers de la prostate avec une médiane de suivi de 5,2 ans (min-max : 2-10 ans). Les résultats ne montrent pas de différence entre l'IMRT et la 3D-CRT à l'exception des cancers secondaires du colon et du rectum où l'IMRT permet d'en diminuer le risque²⁹⁸. Une autre étude regroupant des patients traités par IMRT ou 3D-CRT pour différents types de cancers avec une médiane de suivi de 5,1 ans (min-max : 2-13,8 ans) n'a pas démontré d'excès de risque de développer un cancer secondaire avec l'IMRT comparé à la 3D-CRT. Plus encore, ils ont observé une légère diminution du risque de cancer secondaire de la tête et du cou avec l'IMRT²⁹⁹. À l'inverse, une étude portant sur 1561 patients traités pour des cancers de la prostate par 3D-CRT (854) ou IMRT (707) a montré un risque plus important de développer un second cancer après un traitement IMRT. Les auteurs ont en effet trouvé un taux d'incidence de 25,1 seconds cancers pour 10 000 personnes-années pour l'IMRT, contre 19,2 pour la 3D-CRT³⁰⁰.

Ainsi, les études épidémiologiques ne permettent pas à ce jour de conclure sur une différence dans la survenue des cancers post-radiothérapie après IMRT comparé à 3D-CRT. Néanmoins, notre étude suggère que c'est l'induction de dommages de l'ADN et de sénescence en marge qui serait responsable de l'émergence de cancer secondaire. Ainsi, en augmentant le volume de la marge, l'IMRT devrait augmenter la probabilité d'induire des cancers secondaires.

B. Hadronthérapie

L'hadronthérapie est une technique de radiothérapie qui utilise des particules chargées au lieu de photons pour irradier les tumeurs. Ces particules peuvent être des protons, on parle alors de protonthérapie, ou d'autres ions tels que des ions carbone, hélium, lithium, oxygène, etc. Un avantage de l'utilisation de ces particules est que l'énergie transférée dans la matière est élevée et permet d'induire des dommages complexes par ionisation directe de l'ADN indépendamment de la présence d'oxygène. Cet effet permet donc de traiter des tumeurs hypoxiques considérées comme radiorésistantes aux techniques d'irradiation utilisant des photons. Un autre avantage de l'utilisation de ces particules est que le dépôt d'énergie dans la matière se fait quasiment uniquement en fin de parcours et sur une échelle de distance assez courte appelée pic de Bragg (**Figure 46**). Avant ce pic, la dose déposée est très faible et la dose dite de sortie après ce pic est considérée comme nulle. Le dépôt de dose en profondeur est donc mieux contrôlé qu'avec les rayons X. Cette propriété permet de diminuer la dose déposée dans les tissus sains traversés par les faisceaux et des tissus en marge des faisceaux en amont et en aval de la tumeur sans diminuer la dose déposée dans la tumeur et dans sa marge³⁰¹.

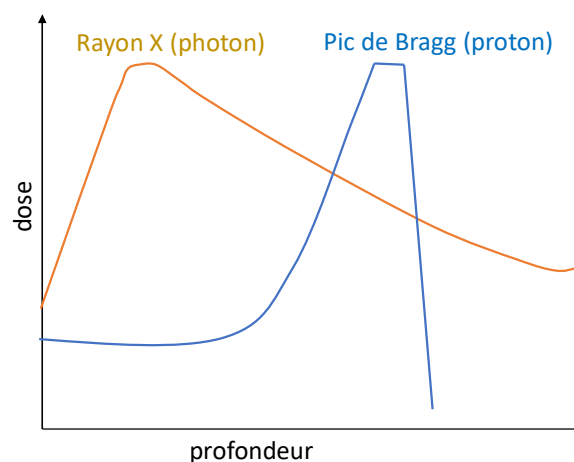


Figure 46 : Courbe représentative du rendement en profondeur d'un faisceau de rayons X ou de protons formant un pic de Bragg. Adapté de : Mallick S. (2020) Proton Therapy. In: Mallick S., Rath G., Benson R. (eds) Practical Radiation Oncology. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0073-2_12

Cela permet de supposer une baisse du risque de cancer secondaire par rapport à la radiothérapie par photons. Ceci a été montré sur des simulations de traitement de cancers de la prostate et du sein³⁰²⁻³⁰⁴. Une autre étude nuance ces résultats. En effet, cette étude simulant le traitement de six cancers pédiatriques par IMRT (mode photon) ou par protonthérapie suggère que

l'IMRT permet de diminuer le risque de cancer secondaire en bordure du champ d'irradiation par rapport à la protonthérapie. En revanche, à distance du champ d'irradiation, l'IMRT augmente ce risque par rapport à la protonthérapie. Ce résultat est dû à la dose reçue plus faible à distance de la tumeur pour la protonthérapie comparé à l'IMRT³⁰⁵.

Il existe assez peu de données cliniques sur le risque de cancers secondaires associés à l'hadronthérapie. Les seules existantes concernent la protonthérapie, du fait de son ancienneté. Comme pour l'IMRT, les études concernant la protonthérapie ont été réalisées sur un faible temps de suivi des patients. De plus, l'hadronthérapie est un mode de traitement assez peu utilisé, ce qui mène à des études cliniques réalisées sur un faible nombre de patients. Cela est problématique pour l'évaluation de l'incidence d'un évènement rare comme le développement de cancer secondaire. Une étude réalisée sur 558 patients traités par protonthérapie comparés à 558 autres patients traités par photonthérapie avec une médiane de suivi de 6,7 ans a montré une plus faible incidence de cancer secondaire pour le traitement par protonthérapie avec une incidence de 5,2 % contre 7,5 %³⁰². Néanmoins, cette différence n'est pas significative. Une autre étude comparant 5867 patients traités par protonthérapie avec 293 486 autres patients traités par IMRT a montré une diminution significative du risque de cancer secondaire suite au traitement de cancers de la tête et du cou ou de la prostate par protonthérapie³⁰³. Ainsi, les quelques études cliniques semblent confirmer les simulations prédisant une diminution du risque de cancer secondaire avec le traitement par hadronthérapie comparé au traitement par photonthérapie.

L'hadronthérapie permet un dépôt d'énergie localisé au niveau du volume tumoral. De plus, le dépôt se réalise grâce à des particules de haute énergie créant préférentiellement des DSB et des dommages complexes, ce qui d'après notre modèle est peu propice à l'induction de sénescence susceptible d'être source de cancer secondaire qui nécessite l'induction spécifique de SSB³⁰¹. Néanmoins, aucune donnée n'est disponible sur les effets de l'hadronthérapie en marge du PTV. On peut toutefois citer le projet ANDANTE en cours visant à caractériser les effets biologiques des neutrons secondaires³⁰⁶.

Bibliographie

1. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology* **28**, 436–453 (2018).
2. Gire, V. & Dulić, V. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle* **14**, 297–304 (2015).
3. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
4. Goy, E. & Abbadie, C. Sénescence et cancer: Double jeu. *médecine/sciences* **34**, 223–230 (2018).
5. Hernandez-Segura, A. *et al.* Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology* **27**, 2652-2660.e4 (2017).
6. Fukami, J., Anno, K., Ueda, K., Takahashi, T. & Ide, T. Enhanced expression of cyclin D1 in senescent human fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development* **81**, 139–157 (1995).
7. Fingar, D. C. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & Development* **16**, 1472–1487 (2002).
8. Fingar, D. C. *et al.* mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. *MCB* **24**, 200–216 (2004).
9. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976 (2017).
10. Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H. & Mimura, A. Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochem Cell Biol* **116**, 321–327 (2001).
11. Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187–195 (2006).
12. Holt, D. J. & Grainger, D. W. Senescence and quiescence induced compromised function in cultured macrophages. *Biomaterials* **33**, 7497–7507 (2012).

13. Lafargue, A. *et al.* Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation. *Free Radical Biology and Medicine* **108**, 750–759 (2017).
14. Yoon, Y.-S. *et al.* 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 (2006).
15. Bernard, D. *et al.* Involvement of Rel/Nuclear Factor- κ B Transcription Factors in Keratinocyte Senescence. *Cancer Research* **64**, 472–481 (2004).
16. Bernard, D., Slomianny, C., Vandebunder, B. & Abbadie, C. cRel induces mitochondrial alterations in correlation with proliferation arrest. *Free Radical Biology and Medicine* **31**, 943–953 (2001).
17. Gosselin, K. *et al.* Senescence-Associated Oxidative DNA Damage Promotes the Generation of Neoplastic Cells. *Cancer Research* **69**, 7917–7925 (2009).
18. Nassour, J. *et al.* Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nature Communications* **7**, 10399 (2016).
19. Peyton, K. J., Liu, X., Yu, Y., Yates, B. & Durante, W. Activation of AMP-Activated Protein Kinase Inhibits the Proliferation of Human Endothelial Cells. *J Pharmacol Exp Ther* **342**, 827–834 (2012).
20. Han, X. *et al.* AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD⁺ elevation. *Aging Cell* **15**, 416–427 (2016).
21. Correia-Melo, C. & Passos, J. F. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1847**, 1373–1379 (2015).
22. Mendelsohn, A. R. & Larrick, J. W. The NAD⁺/PARP1/SIRT1 Axis in Aging. *Rejuvenation Research* **20**, 244–247 (2017).
23. van der Veer, E. *et al.* Extension of Human Cell Lifespan by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **282**, 10841–10845 (2007).

24. Seo, Y.-H. *et al.* Enhanced glycogenesis is involved in cellular senescence via GSK3/GS modulation. *Aging Cell* **7**, 894–907 (2008).
25. Kwon, S. M., Hong, S. M., Lee, Y.-K., Min, S. & Yoon, G. Metabolic features and regulation in cell senescence. *BMB Rep.* **52**, 5–12 (2019).
26. Kim, Y.-M. *et al.* Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP)-1-mediated Lipogenesis Is Involved in Cell Senescence. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 29069–29077 (2010).
27. Ravanan, P., Srikumar, I. F. & Talwar, P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sciences* **188**, 53–67 (2017).
28. Lenain, C., Gussyatiner, O., Douma, S., van den Broek, B. & Peeper, D. S. Autophagy-mediated degradation of nuclear envelope proteins during oncogene-induced senescence. *Carcinogenesis* **36**, 1263–1274 (2015).
29. Deruy, E. *et al.* Level of macroautophagy drives senescent keratinocytes into cell death or neoplastic evasion. *Cell Death and Disease* **5**, e1577 (2014).
30. Jiang, H. *et al.* The RB-E2F1 Pathway Regulates Autophagy. *Cancer Research* **70**, 7882–7893 (2010).
31. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology* **28**, 436–453 (2018).
32. Houssaini, A. *et al.* mTOR pathway activation drives lung cell senescence and emphysema. *JCI Insight* **3**, e93203 (2018).
33. Dou, Z. *et al.* Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* **527**, 105–109 (2015).
34. Young, A. R. J. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & Development* **23**, 798–803 (2009).
35. Aoubala, M. *et al.* p53 directly transactivates $\Delta 133p53\alpha$, regulating cell fate outcome in response to DNA damage. *Cell Death Differ* **18**, 248–258 (2011).
36. Horikawa, I. *et al.* Autophagic degradation of the inhibitory p53 isoform $\Delta 133p53\alpha$ as a regulatory mechanism for p53-mediated senescence. *Nat Commun* **5**, 4706 (2014).

37. Kang, H. T., Lee, K. B., Kim, S. Y., Choi, H. R. & Park, S. C. Autophagy Impairment Induces Premature Senescence in Primary Human Fibroblasts. *PLoS ONE* **6**, e23367 (2011).
38. Huang, Y.-H. *et al.* Autophagy promotes radiation-induced senescence but inhibits bystander effects in human breast cancer cells. *Autophagy* **10**, 1212–1228 (2014).
39. Cuervo, A. M. & Dice, J. F. Age-related Decline in Chaperone-mediated Autophagy. *J. Biol. Chem.* **275**, 31505–31513 (2000).
40. Kiffin, R. *et al.* Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age. *Journal of Cell Science* **120**, 782–791 (2007).
41. Pluquet, O., Pourtier, A. & Abbadie, C. The unfolded protein response and cellular senescence. A Review in the Theme: Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **308**, C415–C425 (2015).
42. Druelle, C. *et al.* ATF6 α regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget* **7**, 67699 (2016).
43. Zhang, R., Chen, W. & Adams, P. D. Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci. *MCB* **27**, 2343–2358 (2007).
44. Pal, S. & Tyler, J. K. Epigenetics and aging. *Sci. Adv.* **2**, e1600584 (2016).
45. Chen, H. *et al.* MacroH2A1 and ATM Play Opposing Roles in Paracrine Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Molecular Cell* **59**, 719–731 (2015).
46. Cruickshanks, H. A. *et al.* Senescent cells harbour features of the cancer epigenome. *Nat Cell Biol* **15**, 1495–1506 (2013).
47. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol* **6**, e301 (2008).
48. Salminen, A., Kauppinen, A. & Kaarniranta, K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling* **24**, 835–845 (2012).

49. Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype: p38 regulates the senescence secretory phenotype. *The EMBO Journal* **30**, 1536–1548 (2011).
50. Hoare, M. *et al.* NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol* **18**, 979–992 (2016).
51. Ito, Y., Hoare, M. & Narita, M. Spatial and Temporal Control of Senescence. *Trends in Cell Biology* **27**, 820–832 (2017).
52. Zhu, Y. *et al.* Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* **15**, 428–435 (2016).
53. Zhu, Y. *et al.* The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* **14**, 644–658 (2015).
54. Ryu, S. J., Oh, Y. S. & Park, S. C. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ* **14**, 1020–1028 (2007).
55. Yosef, R. *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* **7**, 11190 (2016).
56. Sanders, Y. Y. *et al.* Histone Modifications in Senescence-Associated Resistance to Apoptosis by Oxidative Stress. *Redox Biology* **1**, 8–16 (2013).
57. Soto-Gamez, A., Quax, W. J. & Demaria, M. Regulation of Survival Networks in Senescent Cells: From Mechanisms to Interventions. *Journal of Molecular Biology* **431**, 2629–2643 (2019).
58. Sagiv, A. *et al.* Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells. *Oncogene* **32**, 1971–1977 (2013).
59. Jeon, H. & Boo, Y. C. Senescent endothelial cells are prone to TNF- α -induced cell death due to expression of FAS receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **438**, 277–282 (2013).

60. Giglia-Mari, G., Zotter, A. & Vermeulen, W. DNA Damage Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a000745–a000745 (2011).
61. Cannan, W. J. & Pederson, D. S. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin: DOUBLE-STRAND DNA BREAK FORMATION IN CHROMATIN. *J. Cell. Physiol.* **231**, 3–14 (2016).
62. Petermann, E., Orta, M. L., Issaeva, N., Schultz, N. & Helleday, T. Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. *Molecular Cell* **37**, 492–502 (2010).
63. Johnson, R. E., Prakash, S. & Prakash, L. Efficient Bypass of a Thymine-Thymine Dimer by Yeast DNA Polymerase, *Pol. Science* **283**, 1001–1004 (1999).
64. Ray Chaudhuri, A. *et al.* Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 417–423 (2012).
65. Higgins, N. P., Kato, K. & Strauss, B. A Model for Replication Repair in Mammalian Cells. *Journal of Molecular Biology* **101**, 417–425 (1976).
66. Cortés-Ledesma, F. & Aguilera, A. Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesin-dependent sister-chromatid exchange. *EMBO Rep* **7**, 919–926 (2006).
67. Katz, S. S., Gimble, F. S. & Storici, F. To Nick or Not to Nick: Comparison of I-SceI Single- and Double-Strand Break-Induced Recombination in Yeast and Human Cells. *PLoS ONE* **9**, e88840 (2014).
68. Costantino, L. *et al.* Break-Induced Replication Repair of Damaged Forks Induces Genomic Duplications in Human Cells. *Science* **343**, 88–91 (2014).
69. Matta, E., Kiribayeva, A., Khassenov, B., Matkarimov, B. T. & Ishchenko, A. A. Insight into DNA substrate specificity of PARP1-catalysed DNA poly(ADP-ribosyl)ation. *Sci Rep* **10**, 3699 (2020).
70. Caldecott, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* **9**, 619–631 (2008).

71. Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**, 973–979 (2009).
72. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research* **37**, 614–636 (1965).
73. Bodnar, A. G. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* **279**, 349–352 (1998).
74. Saretzki, G., Sitte, N., Merkel, U., Wurm, R. E. & von Zglinicki, T. Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene* **18**, 5148–5158 (1999).
75. Vancevska, A., Douglass, K. M., Pfeiffer, V., Manley, S. & Lingner, J. The telomeric DNA damage response occurs in the absence of chromatin decompaction. *Genes Dev.* **31**, 567–577 (2017).
76. Ahmad, T. *et al.* Shelterin Telomere Protection Protein 1 Reduction Causes Telomere Attrition and Cellular Senescence via Sirtuin 1 Deacetylase in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **56**, 38–49 (2017).
77. Kim, Y.-M. *et al.* Implications of time-series gene expression profiles of replicative senescence. *Aging Cell* **12**, 622–634 (2013).
78. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331–337 (1989).
79. Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**, 521–529 (1989).
80. Barthel, F. P. *et al.* Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet* **49**, 349–357 (2017).
81. Amorim, J., Santos, G., Vinagre, J. & Soares, P. The Role of ATRX in the Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) Phenotype. *Genes* **7**, 66 (2016).

82. Silva, B. A., Stambaugh, J. R. & Berns, M. W. Targeting telomere-containing chromosome ends with a near-infrared femtosecond laser to study the activation of the DNA damage response and DNA damage repair pathways. *J. Biomed. Opt* **18**, 095003 (2013).
83. Duan, J., Duan, J., Zhang, Z. & Tong, T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**, 1407–1420 (2005).
84. Arnoult, N. & Karlseder, J. Complex interactions between the DNA-damage response and mammalian telomeres. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 859–866 (2015).
85. Jones, D. P. Redox theory of aging. *Redox Biology* **5**, 71–79 (2015).
86. Kodama, R. *et al.* ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence. *Genes Cells* **18**, 32–41 (2013).
87. Bernadotte, A., Mikhelson, V. M. & Spivak, I. M. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY)* **8**, 3 (2016).
88. Passos, J. F. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Accounts for the Stochastic Heterogeneity in Telomere-Dependent Senescence. *PLoS Biology* **5**, e110 (2007).
89. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997).
90. Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–724 (2005).
91. Nogueira, V. *et al.* Akt Determines Replicative Senescence and Oxidative or Oncogenic Premature Senescence and Sensitizes Cells to Oxidative Apoptosis. *Cancer Cell* **14**, 458–470 (2008).
92. Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M. & Campisi, J. Regulation of a Senescence Checkpoint Response by the E2F1 Transcription Factor and p14ARF Tumor Suppressor. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 273–285 (2000).

93. Vredeveld, L. C. W., Rowland, B. D., Douma, S., Bernards, R. & Peeper, D. S. Functional identification of LRF as an oncogene that bypasses RAS V12 -induced senescence via upregulation of CYCLIN E. *Carcinogenesis* **31**, 201–207 (2010).
94. Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725–730 (2005).
95. Courtois-Cox, S. *et al.* A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 459–472 (2006).
96. Mannava, S. *et al.* Depletion of Deoxyribonucleotide Pools Is an Endogenous Source of DNA Damage in Cells Undergoing Oncogene-Induced Senescence. *The American Journal of Pathology* **182**, 142–151 (2013).
97. Micco, R. D. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. **444**, 5 (2006).
98. Suram, A. *et al.* Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions: Telomere dysfunction limits cancer progression in humans. *The EMBO Journal* **31**, 2839–2851 (2012).
99. Weyemi, U. *et al.* ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* **31**, 1117–1129 (2012).
100. Xu, Y., Li, N., Xiang, R. & Sun, P. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends in Biochemical Sciences* **39**, 268–276 (2014).
101. Kwong, J. *et al.* p38 α and p38 γ Mediate Oncogenic *ras* -induced Senescence through Differential Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **284**, 11237–11246 (2009).
102. Kwong, J. *et al.* Induction of p38 Expression Plays an Essential Role in Oncogenic *ras*-Induced Senescence. *Molecular and Cellular Biology* **33**, 3780–3794 (2013).
103. Wu, C.-H. *et al.* Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 13028–13033 (2007).

104. Fiorentino, F. P. *et al.* Growth suppression by MYC inhibition in small cell lung cancer cells with TP53 and RB1 inactivation. *Oncotarget* **7**, 31014–31028 (2016).
105. Yetil, A. *et al.* p19ARF is a critical mediator of both cellular senescence and an innate immune response associated with MYC inactivation in mouse model of acute leukemia. *Oncotarget* **6**, 3563–3577 (2015).
106. Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G. & Jarrard, D. F. Therapy-Induced Senescence in Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **102**, 1536–1546 (2010).
107. Li, C. *et al.* N-acetylcysteine ameliorates cisplatin-induced renal senescence and renal interstitial fibrosis through sirtuin1 activation and p53 deacetylation. *Free Radical Biology and Medicine* **16** (2019).
108. Michishita, E. *et al.* DNA Topoisomerase Inhibitors Induce Reversible Senescence in Normal Human Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253**, 667–671 (1998).
109. McDermott, M. S. J. *et al.* HER2-Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors Cause Therapy-Induced-Senescence in Breast Cancer Cells. *Cancers* **11**, 197 (2019).
110. Horner, S. M., DeFilippis, R. A., Manuelidis, L. & DiMaio, D. Repression of the Human Papillomavirus E6 Gene Initiates p53-Dependent, Telomerase-Independent Senescence and Apoptosis in HeLa Cervical Carcinoma Cells. *JVI* **78**, 4063–4073 (2004).
111. Taverna Porro, M. L. & Greenberg, M. M. DNA Double Strand Cleavage via Interstrand Hydrogen Atom Abstraction. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 16368–16371 (2013).
112. Li, M., You, L., Xue, J. & Lu, Y. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front. Pharmacol.* **9**, 522 (2018).
113. Kuilman, T. & Peeper, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer* **9**, 81–94 (2009).

114. Acosta, J. C. *et al.* Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008).
115. Kojima, H., Inoue, T., Kunimoto, H. & Nakajima, K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAK-STAT* **2**, e25763 (2013).
116. Sanada, F. *et al.* IGF Binding Protein-5 Induces Cell Senescence. *Front. Endocrinol.* **9**, 53 (2018).
117. Hong, S. & Kim, M.-M. IGFBP-3 plays an important role in senescence as an aging marker. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **59**, 138–145 (2018).
118. Severino, V. *et al.* Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis* **4**, e911–e911 (2013).
119. Senturk, S. *et al.* Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology* **52**, 966–974 (2010).
120. Di Micco, R. Sensing the Breaks: Cytosolic Chromatin in Senescence and Cancer. *Trends in Molecular Medicine* **23**, 1067–1070 (2017).
121. Takahashi, A. *et al.* Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* **8**, 15287 (2017).
122. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. & Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* **4**, 1798–1806 (2009).
123. Mitsui, Y. & Schneider, E. L. Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. *Experimental Cell Research* **100**, 147–152 (1976).
124. Bemiller, P. M. & Lee, L.-H. Nucleolar changes in senescing WI-38 cells. *Mechanisms of Ageing and Development* **8**, 417–427 (1978).
125. Gosselin, K. *et al.* Senescence-Associated Oxidative DNA Damage Promotes the Generation of Neoplastic Cells. *Cancer Research* **69**, 7917–7925 (2009).

126. Freund, A., Laberge, R.-M., Demaria, M. & Campisi, J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *MBoC* **23**, 2066–2075 (2012).
127. Dou, Z. *et al.* Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* **550**, 402–406 (2017).
128. Pospelova, T. V. *et al.* Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle* **8**, 4112–4118 (2009).
129. Webley, K. *et al.* Posttranslational Modifications of p53 in Replicative Senescence Overlapping but Distinct from Those Induced by DNA Damage. *MOL. CELL. BIOL.* **20**, 6 (2000).
130. Tsygankov, D., Liu, Y., Sanoff, H. K., Sharpless, N. E. & Elston, T. C. A quantitative model for age-dependent expression of the p16INK4a tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 16562–16567 (2009).
131. Liu, Y. *et al.* Expression of p16^{INK4a} in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell* **8**, 439–448 (2009).
132. Burd, C. E. *et al.* Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a p16INK4a-Luciferase Model. *Cell* **152**, 340–351 (2013).
133. Chicas, A. *et al.* Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence. *Cancer Cell* **17**, 376–387 (2010).
134. Sidler, C. *et al.* A role for SUV39H1-mediated H3K9 trimethylation in the control of genome stability and senescence in WI38 human diploid lung fibroblasts. *Aging* **6**, 545–563 (2014).
135. Höhn, A. & Grune, T. Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biology* **1**, 140–144 (2013).
136. Georgakopoulou, E. *et al.* Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *aging* **5**, 37–50 (2012).
137. Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114**, 1299–1307 (2004).

138. Terzi, M. Y., Izmirli, M. & Gogebakan, B. The cell fate: senescence or quiescence. *Molecular Biology Reports* **43**, 1213–1220 (2016).
139. Yang, N. & Hu, M. The limitations and validities of senescence associated- β -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Experimental Gerontology* **40**, 813–819 (2005).
140. Silvestro, K. D., Pautex, S. & Pugliesi, A. Cancer et vieillissement : une évidence épidémiologique. *Revue médicale suisse* **7**, 1149–1153 (2011).
141. Pedersen, J. K., Engholm, G., Skytthe, A., Christensen, K. & on behalf of the Academy of Geriatric Cancer Research (AgeCare). Cancer and aging: Epidemiology and methodological challenges. *Acta Oncologica* **55**, 7–12 (2016).
142. Sharpless, N. E. & Sherr, C. J. Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer* **15**, 397–408 (2015).
143. Idda, M. L. *et al.* Survey of senescent cell markers with age in human tissues. *aging* **12**, 4052–4066 (2020).
144. Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. BRAFE600 in benign and malignant human tumours. *Oncogene* **27**, 877–895 (2008).
145. Kang, T.-W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547–551 (2011).
146. Kim, N. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011–2015 (1994).
147. Caldwell, M. E. *et al.* Cellular features of senescence during the evolution of human and murine ductal pancreatic cancer. *Oncogene* **31**, 1599–1608 (2012).
148. Collado, M. *et al.* Senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**, 642–642 (2005).
149. Denchi, E. L., Attwooll, C., Pasini, D. & Helin, K. Deregulated E2F Activity Induces Hyperplasia and Senescence-Like Features in the Mouse Pituitary Gland. *MCB* **25**, 2660–2672 (2005).

150. Xu, J. *et al.* Differential Radiation Sensitivity in p53 Wild-Type and p53-Deficient Tumor Cells Associated with Senescence but not Apoptosis or (Nonprotective) Autophagy. *Radiation Research* **190**, 538 (2018).
151. Quick, Q. A. & Gewirtz, D. A. An accelerated senescence response to radiation in wild-type p53 glioblastoma multiforme cells. *JNS* **105**, 111–118 (2006).
152. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 12072–12077 (2001).
153. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **5**, 99–118 (2010).
154. Nomura, A. *et al.* Inhibition of NF-kappa B pathway leads to deregulation of epithelial–mesenchymal transition and neural invasion in pancreatic cancer. *Lab Invest* **96**, 1268–1278 (2016).
155. Malaquin, N. *et al.* Senescent Fibroblasts Enhance Early Skin Carcinogenic Events via a Paracrine MMP-PAR-1 Axis. *PLoS ONE* **8**, e63607 (2013).
156. Laberge, R.-M., Awad, P., Campisi, J. & Desprez, P.-Y. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts. *Cancer Microenvironment* **5**, 39–44 (2012).
157. Jiang, M. *et al.* Interleukin-6 Trans-Signaling Pathway Promotes Immunosuppressive Myeloid-Derived Suppressor Cells via Suppression of Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Breast Cancer. *Front. Immunol.* **8**, 1840 (2017).
158. Soriani, A. *et al.* ATM-ATR–dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* **113**, 3503–3511 (2009).
159. Ruhland, M. K. *et al.* Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nat Commun* **7**, 11762 (2016).

160. Eggert, T. *et al.* Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* **30**, 533–547 (2016).
161. Kong, D. *et al.* Epithelial to Mesenchymal Transition Is Mechanistically Linked with Stem Cell Signatures in Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE* **5**, e12445 (2010).
162. Ritschka, B. *et al.* The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* **31**, 172–183 (2017).
163. Shahbandi, A. *et al.* BH3 mimetics selectively eliminate chemotherapy-induced senescent cells and improve response in TP53 wild-type breast cancer. *Cell Death Differ* **27**, 3097–3116 (2020).
164. Roberson, R. S., Kussick, S. J., Vallieres, E., Chen, S.-Y. J. & Wu, D. Y. Escape from Therapy-Induced Accelerated Cellular Senescence in p53-Null Lung Cancer Cells and in Human Lung Cancers. *Cancer Research* **65**, 2795–2803 (2005).
165. Gosselin, K. *et al.* Senescence-Associated Oxidative DNA Damage Promotes the Generation of Neoplastic Cells. *Cancer Research* **69**, 7917–7925 (2009).
166. Martin, N. *et al.* Identification of a gene signature of a pre-transformation process by senescence evasion in normal human epidermal keratinocytes. *Molecular cancer* **13**, 151 (2014).
167. Vredeveld, L. C. W. *et al.* Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes & Development* **26**, 1055–1069 (2012).
168. Liu, W. & Sharpless, N. E. Senescence-escape in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* **25**, 408–409 (2012).
169. Rocco, J. W. & Sidransky, D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. *Experimental Cell Research* **264**, 42–55 (2001).
170. Goel, V. K. *et al.* Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene* **28**, 2289–2298 (2009).
171. Lin, V. S., Xu, Z.-F., Huang, D. C. S. & Thijssen, R. BH3 Mimetics for the Treatment of B-Cell Malignancies—Insights and Lessons from the Clinic. *Cancers* **12**, 1–24 (2020).

172. Kaefer, A. *et al.* Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis of navitoclax (ABT-263) induced thrombocytopenia. *Cancer Chemother Pharmacol* **74**, 593–602 (2014).
173. Thompson, P. J. Targeted Elimination of Senescent Beta Cells Prevents Type 1 Diabetes. *cell metabolism* **29**, 27 (2019).
174. Kovacovicova, K. *et al.* Senolytic Cocktail Dasatinib+Quercetin (D+Q) Does Not Enhance the Efficacy of Senescence-Inducing Chemotherapy in Liver Cancer. *Front. Oncol.* **8**, 459 (2018).
175. Lim, H. Effects of flavonoids on senescence-associated secretory phenotype formation from bleomycin-induced senescence in BJ fibroblasts. *Biochemical Pharmacology* **96**, 337–348 (2015).
176. Wang, R. *et al.* Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism. *Aging Cell* **16**, 564–574 (2017).
177. Podgorsak, E. B. *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*. vol. 1 (IAEA, 2005).
178. Chofor, N., Harder, D., Willborn, K. C. & Poppe, B. Internal scatter, the unavoidable major component of the peripheral dose in photon-beam radiotherapy. *Physics in Medicine and Biology* **57**, 1733–1743 (2012).
179. Chofor, N., Harder, D., Willborn, K., Rühmann, A. & Poppe, B. Low-energy photons in high-energy photon fields – Monte Carlo generated spectra and a new descriptive parameter. *Zeitschrift für Medizinische Physik* **21**, 183–197 (2011).
180. Société Française de Radiothérapie Oncologique. Guide des procédures de radiothérapie externe 2007. (2007).
181. Le Caër, S. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. *Water* **3**, 235–253 (2011).
182. Daniels, M. & Wigg, E. W. Oxygen as a Primary Species in Radiolysis of Water. *Science* **153**, 1534–1535 (1966).

183. Chapman, J. D., Engelhardt, E. L., Stobbe, C. C., Schneider, R. F. & Hanks, G. E. Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays. *Radiotherapy and Oncology* **46**, 229–237 (1998).
184. Joiner, M. & van der kogel, A. *Basic clinical radiobiology*. vol. 4 (2009).
185. Crockart, N. *et al.* Early reoxygenation in tumors after irradiation: Determining factors and consequences for radiotherapy regimens using daily multiple fractions. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* **63**, 901–910 (2005).
186. Guerrero, M. & Carlson, D. J. A radiobiological model of reoxygenation and fractionation effects. *Med. Phys.* **44**, 2002–2010 (2017).
187. Warters, R. L. & Hofer, K. G. Radionuclide toxicity in cultured mammalian cells: Elucidation of the primary site for radiation-induced division delay. *Radiation Research* **69**, 348–358 (1977).
188. Goodhead, D. T. Energy deposition stochastics and track structure: what about the target? *Radiation Protection Dosimetry* **122**, 3–15 (2006).
189. Havaki, S. *et al.* The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect. *Cancer Letters* **356**, 43–51 (2015).
190. Carter, R. J. *et al.* Complex DNA Damage Induced by High Linear Energy Transfer Alpha-Particles and Protons Triggers a Specific Cellular DNA Damage Response. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* **100**, 776–784 (2018).
191. Schilling-Tóth, B. *et al.* Analysis of the common deletions in the mitochondrial DNA is a sensitive biomarker detecting direct and non-targeted cellular effects of low dose ionizing radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **716**, 33–39 (2011).
192. Kam, W. W.-Y. & Banati, R. B. Effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* **65**, 607–619 (2013).
193. Bartoletti-Stella, A. *et al.* Gamma rays induce a p53-independent mitochondrial biogenesis that is counter-regulated by HIF1 α . *Cell Death Dis* **4**, e663–e663 (2013).

194. Dayal, D. *et al.* Mitochondrial Complex II Dysfunction Can Contribute Significantly to Genomic Instability after Exposure to Ionizing Radiation. *Radiation Research* **172**, 737–745 (2009).
195. Pearce, L. L., Epperly, M. W., Greenberger, J. S., Pitt, B. R. & Peterson, J. 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 (2001).
196. Barjaktarovic, Z. *et al.* Radiation-Induced Signaling Results in Mitochondrial Impairment in Mouse Heart at 4 Weeks after Exposure to X-Rays. *PLoS ONE* **6**, e27811 (2011).
197. Lestaevell, P. *et al.* Nitric Oxide Voltammetric Measurements in the Rat Brain after Gamma Irradiation. *Radiation Research* **160**, 631–636 (2003).
198. Azzam, E. I., Jay-Gerin, J.-P. & Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters* **327**, 48–60 (2012).
199. Leach, J. K., Tuyle, G. V., Lin, P.-S., Schmidt-Ullrich, R. & Mikkelsen, R. B. Ionizing Radiation-induced, Mitochondria-dependent Generation of Reactive Oxygen/Nitrogen. *Cancer Research* **61**, 3894–3901 (2001).
200. Shadyro, O. I., Yurkova, I. L. & Kisel, M. A. Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. *International Journal of Radiation Biology* **78**, 211–217 (2002).
201. Liao, W.-C. *et al.* Ataxia Telangiectasia-mutated Gene Product Inhibits DNA Damage-induced Apoptosis via Ceramide Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 17908–17917 (1999).
202. Vit, J.-P. & Rosselli, F. Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* **22**, 8645–8652 (2003).
203. Corre, I., Niaudet, C. & Paris, F. Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **704**, 61–67 (2010).
204. Ghosh, N. *et al.* Ceramide-Activated Protein Phosphatase Involvement in Insulin Resistance via Akt, Serine/Arginine-Rich Protein 40, and Ribonucleic Acid Splicing in L6 Skeletal Muscle Cells. *Endocrinology* **148**, 1359–1366 (2007).

205. Janssens, V. & Goris, J. Protein phosphatase 2A : a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal* **353**, 417–439 (2001).
206. Wolff, R. A., Dobrowsky, R. T., Bielawska, A., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 19605–19609 (1994).
207. Darios, F., Lambeng, N., Troadec, J.-D., Michel, P. P. & Ruberg, M. Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death: Mitochondrial calcium and cell death. *Journal of Neurochemistry* **84**, 643–654 (2003).
208. Heinrich, M. *et al.* Ceramide as an Activator Lipid of Cathepsin D. in *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2* (eds. Langner, J. & Ansorge, S.) vol. 477 305–315 (Kluwer Academic Publishers, 2002).
209. Endlich, B., Radford, I. R., Forrester, H. B. & Dewey, W. C. Computerized Video Time-Lapse Microscopy Studies of Ionizing Radiation-Induced Rapid-Interphase and Mitosis-Related Apoptosis in Lymphoid Cells. *Radiation Research* **153**, 36–48 (2000).
210. Chu, K., Teele, N., Dewey, M. W., Albright, N. & Dewey, W. C. Computerized Video Time Lapse Study of Cell Cycle Delay and Arrest, Mitotic Catastrophe, Apoptosis and Clonogenic Survival in Irradiated 14-3-3 σ and CDKN1A (p21) Knockout Cell Lines. *Radiation Research* **162**, 270–286 (2004).
211. Forrester, H. B., Albright, N., Ling, C. C. & Dewey, W. C. Computerized Video Time-Lapse Analysis of Apoptosis of REC:Myc Cells X-Irradiated in Different Phases of the Cell Cycle. *Radiation Research* **154**, 625–639 (2000).
212. Brown, J. M. & Attardi, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* **5**, 231–237 (2005).
213. Baatout, S., Derradji, H., Petitfour, O., Suchodoletz, H. von & Mergeay, M. Mécanismes de l'apoptose radio-induite. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80**, 629–637 (2002).

214. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* **35**, 495–516 (2007).
215. Kuwahara, Y. *et al.* Association between radiation-induced cell death and clinically relevant radioresistance. *Histochem Cell Biol* **150**, 649–659 (2018).
216. Bialik, S., Dasari, S. K. & Kimchi, A. Autophagy-dependent cell death – where, how and why a cell eats itself to death. *J Cell Sci* **131**, jcs215152 (2018).
217. Classen, F. *et al.* Autophagy induced by ionizing radiation promotes cell death over survival in human colorectal cancer cells. *Experimental Cell Research* **374**, 29–37 (2019).
218. Fink, J., Born, D. & Chamberlain, M. C. Radiation Necrosis: Relevance with Respect to Treatment of Primary and Secondary Brain Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* **12**, 276–285 (2012).
219. Su, Z., Yang, Z., Xie, L., DeWitt, J. & Chen, Y. Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death and Differentiation* **23**, 748–756 (2016).
220. Frey, B. *et al.* Cancer Cell Death-Inducing Radiotherapy: Impact on Local Tumour Control, Tumour Cell Proliferation and Induction of Systemic Anti-tumour Immunity. in *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy* (ed. Gregory, C. D.) vol. 930 151–172 (Springer International Publishing, 2016).
221. Sia, J., Szmyd, R., Hau, E. & Gee, H. E. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 41 (2020).
222. He, Y. *et al.* Cellular senescence and radiation-induced pulmonary fibrosis. *Translational Research* **209**, 14–21 (2019).
223. Fouillade, C. *et al.* FLASH Irradiation Spares Lung Progenitor Cells and Limits the Incidence of Radio-induced Senescence. *Clin Cancer Res* **26**, 1497–1506 (2020).
224. Zhang, L. *et al.* Inhibition of TAZ contributes radiation-induced senescence and growth arrest in glioma cells. *Oncogene* **38**, 2788–2799 (2018).

225. Le, O. N. L. *et al.* Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status: IR exposure and aging markers. *Aging Cell* **9**, 398–409 (2010).
226. Wang, H. *et al.* Senolytics (DQ) Mitigates Radiation Ulcers by Removing Senescent Cells. *Front. Oncol.* **9**, 1576 (2020).
227. Richardson, R. B. Ionizing radiation and aging: rejuvenating an old idea. *aging* **1**, 887–902 (2009).
228. Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J. & van Deursen, J. M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine* **21**, 1424–1435 (2015).
229. Soysouvanh, F. *et al.* Stereotactic Lung Irradiation in Mice Promotes Long-Term Senescence and Lung Injury. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* **106**, 1017–1027 (2020).
230. Demaria, M. *et al.* An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell* **31**, 722–733 (2014).
231. Citrin, D. E. *et al.* Role of Type II Pneumocyte Senescence in Radiation-Induced Lung Fibrosis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **105**, 1474–1484 (2013).
232. Stewart, F. A., Seemann, I., Hoving, S. & Russell, N. S. Understanding Radiation-induced Cardiovascular Damage and Strategies for Intervention. *Clinical Oncology* **25**, 617–624 (2013).
233. Borghini, A., Luca Gianicolo, E. A., Picano, E. & Andreassi, M. G. Ionizing radiation and atherosclerosis: Current knowledge and future challenges. *Atherosclerosis* **230**, 40–47 (2013).
234. Ilnytsky, Y., Koturbash, I. & Kovalchuk, O. Radiation-induced bystander effects in vivo are epigenetically regulated in a tissue-specific manner. *Environ. Mol. Mutagen.* **50**, 105–113 (2009).
235. Najafi, M. The Mechanisms of Radiation-Induced Bystander Effect. *J Biomed Phys Eng* 163–172 (2014).
236. Sapega, O. *et al.* Distinct phenotypes and ‘bystander’ effects of senescent tumour cells induced by docetaxel or immunomodulatory cytokines. *Int J Oncol* **53**, 1997–2009 (2018).

237. Marozik, P., Mothersill, C., Seymour, C. B., Mosse, I. & Melnov, S. Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident. *Experimental Hematology* **35**, 55–63 (2007).
238. Szatmári, T. *et al.* Extracellular vesicles mediate low dose ionizing radiation-induced immune and inflammatory responses in the blood. *International Journal of Radiation Biology* **95**, 12–22 (2019).
239. Konkova, M. S., Kaliyanov, A. A., Sergeeva, V. A., Abramova, M. S. & Kostyuk, S. V. Oxidized Cell-Free DNA Is a Factor of Stress Signaling in Radiation-Induced Bystander Effects in Different Types of Human Cells. *International Journal of Genomics* **2019**, 1–7 (2019).
240. Sergeeva, V. A. *et al.* Low-Dose Ionizing Radiation Affects Mesenchymal Stem Cells via Extracellular Oxidized Cell-Free DNA: A Possible Mediator of Bystander Effect and Adaptive Response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, 1–22 (2017).
241. Poleszczuk, J., Krzywon, A., Forys, U. & Widel, M. Connecting Radiation-Induced Bystander Effects and Senescence to Improve Radiation Response Prediction. *Radiation Research* **183**, 571–577 (2015).
242. Vautravers, C., Dewas, S., Truc, G. & Penel, N. Sarcomes en territoire irradié : actualités. *Cancer/Radiothérapie* **14**, 74–80 (2010).
243. Suit, H. *et al.* Secondary Carcinogenesis in Patients Treated with Radiation: A Review of Data on Radiation-Induced Cancers in Human, Non-human Primate, Canine and Rodent Subjects. *Radiation Research* **167**, 12–42 (2007).
244. Tucker, M. A. *et al.* Therapeutic Radiation at a Young Age Is Linked to Secondary Thyroid Cancer. *cancer research* **51**, 2885–2888 (1991).
245. Hans, H. S. Second primary cancer after treatment for cervical cancer. Late effects after radiotherapy. *Cancer* **61**, 679–688 (1988).
246. Storer, J. B., Mitchell, T. J. & Fry, R. J. M. Extrapolation of the Relative Risk of Radiogenic Neoplasms across Mouse Strains and to Man. *Radiation Research* **114**, 331 (1988).

247. Edmondson, E. F., Hunter, N. R., Weil, M. M. & Mason, K. A. Tumor Induction in Mice After Localized Single- or Fractionated-Dose Irradiation: Differences in Tumor Histotype and Genetic Susceptibility Based on Dose Scheduling. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* **92**, 829–836 (2015).
248. Diallo, I. *et al.* Frequency Distribution of Second Solid Cancer Locations in Relation to the Irradiated Volume Among 115 Patients Treated for Childhood Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* **74**, 876–883 (2009).
249. Sigurdson, A. J. & Jones, I. M. Second cancers after radiotherapy: any evidence for radiation-induced genomic instability? *Oncogene* **22**, 7018–7027 (2003).
250. Kim, K. S. *et al.* Radiation-Induced Sarcoma: A 15-Year Experience in a Single Large Tertiary Referral Center. *Cancer Res Treat* **48**, 650–657 (2016).
251. Nakanishi, H., Tomita, Y., Myoui, A. & *et al.* Mutation of the p53 gene in postradiation sarcoma. *Lab Invest.* **78**, 727–733 (1998).
252. Gonin-Laurent, N. *et al.* Specific TP53 mutation pattern in radiation-induced sarcomas. *Carcinogenesis* **27**, 1266–1272 (2006).
253. Lesluyes, T. *et al.* Genomic and transcriptomic comparison of post-radiation versus sporadic sarcomas. *Mod Pathol* **32**, 1786–1794 (2019).
254. Hadj-Hamou, N.-S. *et al.* A transcriptome signature distinguished sporadic from postradiotherapy radiation-induced sarcomas. *Carcinogenesis* **32**, 929–934 (2011).
255. Lhomme, J., Constant, J.-F. & Demeunynck, M. Abasic DNA structure, reactivity, and recognition. *Biopoly* **52**, 65–83 (1999).
256. Fortini, P., Raspaglio, G., Falchi, M. & Dogliotti, E. Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis* **11**, 169–175 (1996).
257. Speit, G. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology Letters* **146**, 151–158 (2004).

258. Duez, P., Dehon, G., Kumps, A. & Dubois, J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* **18**, 159–166 (2003).
259. Collins, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *MB* **26**, 249–261 (2004).
260. Montagne, L. *et al.* CoDE-seq, an augmented whole-exome sequencing, enables the accurate detection of CNVs and mutations in Mendelian obesity and intellectual disability. *Molecular Metabolism* **13**, 1–9 (2018).
261. Martinez-Soria, N. *et al.* The Oncogenic Transcription Factor RUNX1/ETO Corrupts Cell Cycle Regulation to Drive Leukemic Transformation. *Cancer Cell* **34**, 626–642.e8 (2018).
262. Steidl, C. *et al.* MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* **471**, 377–381 (2014).
263. Wehrle, A. *et al.* Hypomorphic mutations of TRIP11 cause odontochondrodysplasia. *JCI Insight* **4**, e124701 (2019).
264. Kim, H.-G., Jang, J.-H. & Koh, E.-H. TRIP11-PDGFRB fusion in a patient with a therapy-related myeloid neoplasm with t(5;14)(q33;q32) after treatment for acute promyelocytic leukemia. *Mol Cytogenet* **7**, 103 (2014).
265. Lee, C.-L. *et al.* Mutational landscape in genetically engineered, carcinogen-induced, and radiation-induced mouse sarcoma. *JCI Insight* **4**, e128698 (2019).
266. Yudkina, A. V., Shilkin, E. S., Endutkin, A. V., Makarova, A. V. & Zharkov, D. O. Reading and Misreading 8-oxoguanine, a Paradigmatic Ambiguous Nucleobase. *Crystals* **9**, 269 (2019).
267. Crohns, M., Saarelainen, S., Erhola, M., Alho, H. & Kellokumpu-Lehtinen, P. Impact of radiotherapy and chemotherapy on biomarkers of oxidative DNA damage in lung cancer patients. *Clinical Biochemistry* **42**, 1082–1090 (2009).
268. Schreiber, V., Illuzzi, G., Héberlé, E. & Dantzer, F. De la découverte du poly(ADP-ribose) aux inhibiteurs PARP en thérapie du cancer. *Bulletin du Cancer* **102**, 863–873 (2015).

269. Havaki, S. *et al.* The role of oxidative DNA damage in radiation induced bystander effect. *Cancer Letters* **356**, 43–51 (2015).
270. Ström, C. E. *et al.* CK2 phosphorylation of XRCC1 facilitates dissociation from DNA and single-strand break formation during base excision repair. *DNA Repair* **10**, 961–969 (2011).
271. Loizou, J. I. *et al.* The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell* **117**, 17–28 (2004).
272. Nassour, J. *et al.* Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nature Communications* **7**, 10399 (2016).
273. Bai, P., Nagy, L., Fodor, T., Liaudet, L. & Pacher, P. Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **26**, 75–83 (2015).
274. Bryant, H. E. *et al.* PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *The EMBO journal* **28**, 2601–2615 (2009).
275. Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. & Boulton, S. J. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* **47**, 497–510 (2012).
276. Karihtala, P., Kauppila, S., Puistola, U. & Jukkola-Vuorinen, A. Absence of the DNA repair enzyme human 8-oxoguanine glycosylase is associated with an aggressive breast cancer phenotype. *British Journal of Cancer* **106**, 344–347 (2012).
277. Pines, A., Mullenders, L. H., van Attikum, H. & Luijsterburg, M. S. Touching base with PARPs: moonlighting in the repair of UV lesions and double-strand breaks. *Trends in Biochemical Sciences* **38**, 321–330 (2013).
278. Wang, M. *et al.* PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Research* **34**, 6170–6182 (2006).
279. Beck, C., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Schreiber, V. & Dantzer, F. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: Focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Experimental Cell Research* **329**, 18–25 (2014).

280. Bryant, H. E. *et al.* PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J* **28**, 2601–2615 (2009).
281. Haince, J.-F. *et al.* PARP1-dependent Kinetics of Recruitment of MRE11 and NBS1 Proteins to Multiple DNA Damage Sites. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1197–1208 (2008).
282. Ko, H. L. & Ren, E. C. Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules* **2**, 524–548 (2012).
283. Burd, C. E. *et al.* Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a p16INK4a-Luciferase Model. *Cell* **152**, 340–351 (2013).
284. Erenpreisa, J. *et al.* Polyploid tumour cells elicit paradiploid progeny through depolyploidizing divisions and regulated autophagic degradation. *Cell Biol. Int.* **9** (2011).
285. Erenpreisa, J. & Cragg, M. S. Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal. *Cancer Cell Int* **13**, 92 (2013).
286. Puig, P.-E. *et al.* Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. *Cell Biology International* **32**, 1031–1043 (2008).
287. So, A., Le Guen, T., Lopez, B. S. & Guirouilh-Barbat, J. Genomic rearrangements induced by unscheduled DNA double strand breaks in somatic mammalian cells. *The FEBS Journal* **284**, 2324–2344 (2017).
288. Naumenko, K. N. *et al.* Regulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Activity by Y-Box-Binding Protein 1. *Biomolecules* **10**, 1325 (2020).
289. Suskiewicz, M. J. *et al.* HPF1 completes the PARP active site for DNA damage-induced ADP-ribosylation. *Nature* **579**, 598–602 (2020).
290. Rack, J. G. M., Palazzo, L. & Ahel, I. (ADP-ribosyl)hydrolases: structure, function, and biology. *Genes Dev.* **34**, 263–284 (2020).
291. Marques, M. *et al.* Oncogenic activity of poly (ADP-ribose) glycohydrolase. *Oncogene* **38**, 2177–2191 (2019).

292. Fatokun, A. A., Dawson, V. L. & Dawson, T. M. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities: Players in parthanatos. *British Journal of Pharmacology* **171**, 2000–2016 (2014).
293. Lord, C. J. & Ashworth, A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* **355**, 1152–1158 (2017).
294. Nutting, C., Dearnaley, D. P. & Webb, S. Intensity modulated radiation therapy: a clinical review. *BJR* **73**, 459–469 (2000).
295. Hall, E. J. & Wu, C.-S. Radiation-induced second cancers: the impact of 3D-CRT and IMRT. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **56**, 83–88 (2003).
296. Zwahlen, D. R. *et al.* Effect of Intensity-Modulated Pelvic Radiotherapy on Second Cancer Risk in the Postoperative Treatment of Endometrial and Cervical Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **74**, 539–545 (2009).
297. Murray, L. J. *et al.* Radiation-induced second primary cancer risks from modern external beam radiotherapy for early prostate cancer: impact of stereotactic ablative radiotherapy (SABR), volumetric modulated arc therapy (VMAT) and flattening filter free (FFF) radiotherapy. *Phys. Med. Biol.* **60**, 1237–1257 (2015).
298. Journy, N. M. Y., Morton, L. M., Kleinerman, R. A., Bekelman, J. E. & Berrington de Gonzalez, A. Second Primary Cancers After Intensity-Modulated vs 3-Dimensional Conformal Radiation Therapy for Prostate Cancer. *JAMA Oncol* **2**, 1368 (2016).
299. Xiang, M., Chang, D. T. & Pollom, E. L. Second cancer risk after primary cancer treatment with three-dimensional conformal, intensity-modulated, or proton beam radiation therapy. *Cancer* **126**, 3560–3568 (2020).
300. Jahreiß, M.-C. *et al.* The Risk of Second Primary Cancers in Prostate Cancer Survivors Treated in the Modern Radiotherapy Era. *Front. Oncol.* **10**, 605119 (2020).
301. Thariat, J. *et al.* Hadrontherapy Interactions in Molecular and Cellular Biology. *IJMS* **21**, 133 (2019).

302. Eaton, B. R., MacDonald, S. M., Yock, T. I. & Tarbell, N. J. Secondary Malignancy Risk Following Proton Radiation Therapy. *Front. Oncol.* **5**, 261 (2015).
303. Fontenot, J. D., Lee, A. K. & Newhauser, W. D. Risk of Secondary Malignant Neoplasms From Proton Therapy and Intensity-Modulated X-Ray Therapy for Early-Stage Prostate Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **74**, 616–622 (2009).
304. Manem, V. S. K. & Dhawan, A. Modelling recurrence and second cancer risks induced by proton therapy. *Mathematical Medicine and Biology: A Journal of the IMA* **35**, 347–361 (2018).
305. Athar, B. S. & Paganetti, H. Comparison of second cancer risk due to out-of-field doses from 6-MV IMRT and proton therapy based on 6 pediatric patient treatment plans. *Radiotherapy and Oncology* **98**, 87–92 (2011).
306. Trott, K.-R. Special radiobiological features of second cancer risk after particle radiotherapy. *Physica Medica* **42**, 221–227 (2017).

ANNEXES

Article n°1

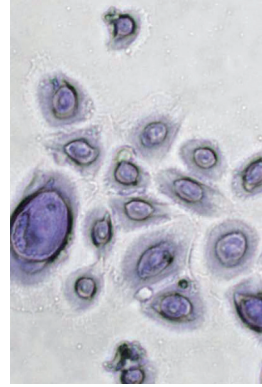
Goy, E. & Abbadie, C. Sénescence et cancer: Double jeu. *médecine/sciences* **34**, 223–230 (2018).

Sénescence et cancer

Double jeu

Erwan Goy, Corinne Abbadie

► Lorsqu'elles vieillissent, les cellules se reprogramment profondément pour entrer dans un état appelé sénescence. Si le lien entre sénescence et cancer ne fait plus de doute, la nature de ce lien reste ambiguë et controversée. Nous décrivons dans cette revue, les propriétés des cellules sénescents et examinerons en quoi elles pourraient favoriser ou, au contraire, défavoriser l'initiation des cancers et leur progression. Nous verrons également dans quelle mesure la sénescence intervient dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses classiques et comment en tirer parti pour augmenter l'efficacité de ces thérapies tout en diminuant leurs effets secondaires. ◀



Université de Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 - M3T - mécanismes de tumorigenèse et thérapies ciblées, F-59000 Lille, France. corinne.abbadie@ibl.cnrs.fr

cellulaire et nous discuterons leur impact potentiel à différents niveaux de l'histoire du cancer et de son traitement.

La sénescence cellulaire, ou comment se manifeste le vieillissement à l'échelle de nos cellules

Malgré des avancées très significatives dans la prise en charge des patients et dans l'efficacité des thérapies, la lutte contre le cancer fait encore aujourd'hui face à de nombreuses inconnues, tant en ce qui concerne les mécanismes fondamentaux de tumorigenèse, qu'en ce qui concerne les modes d'action précis des thérapies, les processus de résistance à ces thérapies ou les mécanismes de récurrence de la maladie.

Le corps humain est composé de plus de 200 types cellulaires différents, les plus communs étant les fibroblastes, encore appelés cellules stromales, et les cellules épithéliales. Ces dernières sont à l'origine des carcinomes et des adénocarcinomes, des cancers très fréquents dont l'incidence augmente fortement avec l'âge. En comparaison, les sarcomes, les cancers ayant pour origine les cellules stromales, sont beaucoup plus rares et leur incidence est indépendante de l'âge¹. Ces observations soulèvent la question d'un lien potentiel entre les mécanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement et ceux de la tumorigenèse, avec d'éventuelles spécificités liées au type cellulaire. Dans cette revue, nous exposerons ce qui, aujourd'hui, est connu des mécanismes du vieillissement

La sénescence est un état cellulaire spécifique qui a été décrit pour la première fois par Leonard Hayflick au début des années 1960. Il avait observé que des fibroblastes humains normaux (non issus d'un cancer) ont une durée de vie limitée lorsqu'ils sont mis en culture *in vitro* : après une phase de croissance exponentielle, ces cellules entrent dans une phase d'arrêt de prolifération stable, voire irréversible [1] (Figure 1). Loin d'être une mort cellulaire, cet état sénescents est associé à de nombreux changements morphologiques, métaboliques, génétiques et épigénétiques. On peut considérer en fait que les cellules sénescents sont entièrement reprogrammées : leur taille et leur étalement sur le support de culture augmentent considérablement (Figure 1) ; leur métabolisme énergétique se modifie ; elles développent un stress du réticulum endoplasmique et augmentent leur activité autophagique ; elles deviennent résistantes à l'apoptose ; elles expriment un transcriptome, un protéome et surtout un sécrétome spécifiques ; elles présentent des modifications épigénétiques complexes [2-4] (→).

Dès ses premiers travaux, Hayflick avait proposé que cet état sénescents correspondait au vieillissement des cellules, et qu'une horloge biologique interne liée à la division cellulaire en fixait la survenue. En fait, ce qu'avait découvert Hayflick est ce que l'on appelle désormais la *sénescence répllicative* ; elle s'établit à la suite du raccourcissement des télomères à chaque réplication, ce qui constitue l'horloge biologique, jusqu'à ce qu'ils atteignent une taille critique qui initiera la sénescence. Ainsi, si l'on

(→) Voir la Synthèse de Jean-Marc Bron-dello *et al.*, *m/s* n° 3, mars 2012, page 383

Vignette (Photo : génération de cellules transformées par échappement de la sénescence. © Corinne Abbadie).

¹ Statistiques du *National cancer institute*, États-Unis.

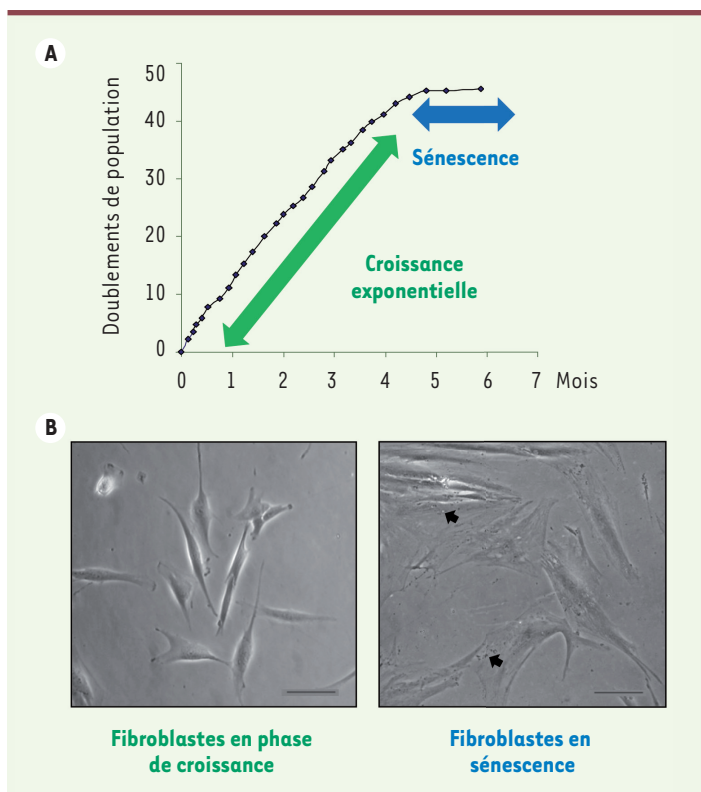


Figure 1. Définition de la sénescence cellulaire. **A.** En culture *in vitro*, des fibroblastes normaux (ici, isolés de derme humain) se divisent une cinquantaine de fois (phase de croissance exponentielle), et ceci durant environ 5 mois. Ils entrent ensuite en sénescence. Dans cet état, ils ne se divisent plus, comme on peut le voir sur la courbe de croissance qui atteint un plateau. Si on observe les cellules au microscope à contraste de phase (**B**), on constate qu'ils présentent une morphologie typique : ils sont beaucoup plus grands et étalés que des fibroblastes en phase de croissance et contiennent de nombreux éléments figurés (vésicules et agrégats, flèches noires) dans leur cytoplasme. La barre d'échelle représente 50 μm .

fait exprimer par les cellules la télomérase, une enzyme qui permet d'allonger les télomères, celles-ci n'entrent jamais en sénescence répliquative [5]. La sénescence peut cependant être induite prématurément, indépendamment d'un raccourcissement des télomères, par une variété de stress – c'est ce que l'on appelle la SIPS (*stress-induced premature senescence*, ou sénescence prématurée induite par le stress). Parmi ces stress, citons le stress oxydant, les stress génotoxiques comme ceux induits par la chimiothérapie et la radiothérapie anticancéreuse ou les radiations ultra-violettes (UV). De même, l'activation d'un oncogène, comme $\text{BRAF}^{\text{V600E}}$ ², ou l'inhibition d'un gène suppresseur de tumeur, comme *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), peuvent induire une sénescence appelée OIS (*oncogene-induced senescence* ou sénescence induite par les oncogènes).

² Le gène *BRAF* code la protéine oncogénique B-Raf. La mutation V600E correspond à un changement d'acide aminé en position 600 dans B-Raf, avec une valine (V) remplacée par un acide glutamique (E). Cette mutation se produit au sein du domaine kinase.

Dans tous ces contextes de sénescence, deux voies induisant l'arrêt du cycle cellulaire interviennent. L'une est la voie appelée DDR (*DNA damage response* ou voie de réponse aux dommages de l'ADN). Elle est activée en réponse à des dommages de l'ADN bien spécifiques : des télomères raccourcis, des cassures double-brin et des fourches de réplication bloquées. Elle aboutit à l'activation du gène suppresseur de tumeur *TP53* (codant p53), celui que l'on nomme souvent le gardien du génome, qui lui-même induit l'expression de p21³. L'autre voie est la voie dite p16/Rb (*retinoblastoma*) [4], connue pour être induite à la sénescence par le stress oxydant [6]. Néanmoins, les modalités précises de cette induction ne sont pas entièrement connues. Nous avons montré que, dans le cas des cellules épithéliales (notamment les kératinocytes d'épiderme et les cellules épithéliales mammaires), dont la sénescence est indépendante du raccourcissement des télomères, mais dépendante du stress oxydant, cette voie est induite par l'accumulation de cassures simple-brin de l'ADN [7] (Figure 2). p16, comme p21, inhibent l'activité de certains complexes cycline-cdk qui ont pour fonction de phosphoryler Rb, qui est, comme p53, un suppresseur de tumeur majeur. Lorsque ces complexes sont inhibés, Rb n'est pas phosphorylé. Il immobilise et inactive alors le facteur de transcription E2F dont l'expression des gènes cibles est nécessaire à la progression des cellules dans la phase S du cycle cellulaire. Ainsi la prolifération des cellules est arrêtée [8]. Le couple Rb/E2F, induit par l'expression de p16, est également impliqué dans la formation de foyers d'hétérochromatine (ou *senescence-associated heterochromatin foci* [SAHF]) préférentiellement au niveau des promoteurs des gènes cibles d'E2F, ce qui contribue à leur extinction et donc à l'arrêt du cycle cellulaire [9].

Une question longtemps débattue était de savoir si la sénescence était un artéfact dû à la prolifération extensive des cellules en culture *in vitro* ou si elle pouvait advenir *in vivo* en lien avec le vieillissement. Il est désormais établi que des cellules sénescents s'accumulent avec l'âge dans la quasi-totalité de nos organes. Plusieurs publications du groupe de Jan van Deursen (Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, États-Unis) ont par ailleurs montré chez la souris, que si l'on élimine, par un artifice transgénique, les cellules sénescents au fur et à mesure de leur apparition, la durée de vie des animaux pouvait être accrue de 20 à 25 % et l'incidence de nombreuses pathologies associées au

³ p53 induit l'expression de la protéine p21 qui inhibe les complexes cycline D/ Cdk (cyclin dependent kinase)4, cycline E-A / Cdk2, ce qui arrête le cycle.

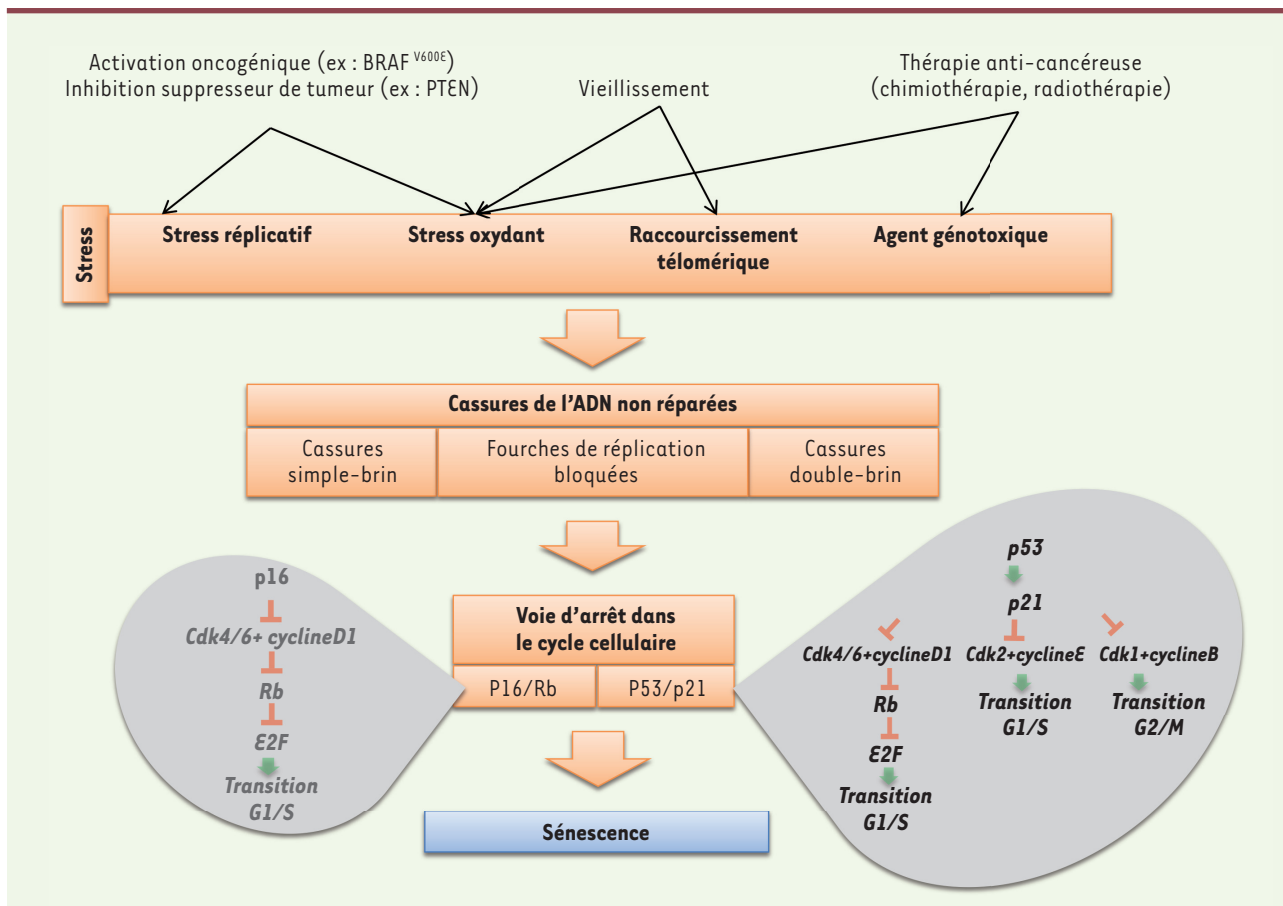


Figure 2. Mécanismes moléculaires d'induction de la sénescence. La sénescence est induite par différents stress à l'origine de dommages de l'ADN non réparés, responsables de l'activation des voies d'arrêt dans le cycle cellulaire p53/p21 et/ou p16/Rb. Les détails du mode d'action de ces deux voies sont indiqués dans les bulles. BRAF^{V600E} : forme activatrice du gène *BRAF* ; PTEN : *phosphatase and tensin homolog* ; Rb : rétinoblastome ; Cdk : *cyclin-dependent kinase*.

vieillesse diminuée [10, 11]. La sénescence cellulaire correspond donc bien au vieillissement cellulaire et contribue, au moins en partie, au vieillissement normal et pathologique de l'organisme.

Cancer et sénescence : l'évidence d'un lien, mais lequel ?

Chez l'homme, les cancers les plus fréquents, les carcinomes et les adénocarcinomes, sont clairement liés à l'âge et, chez la souris, l'élimination des cellules sénescents permet de retarder la survenue des cancers [12], suggérant que la sénescence serait pro-tumorale. Or, une des caractéristiques majeures des cellules sénescents est l'arrêt de leur cycle cellulaire, de façon très stable voire irréversible, par activation des deux gènes suppresseurs de tumeur, *TP53* et *RB*. Comment donc ces cellules pourraient-elles devenir cancéreuses, c'est-à-dire douées d'une capacité de prolifération non contrôlée alors qu'elles se trouvent en arrêt de leur cycle cellulaire ? Des marqueurs de sénescence sont retrouvés dans des hyperplasies ou des tumeurs bénignes, comme les *nævi* (ou grains de beauté) ou les hyperplasies bénignes de la prostate, mais ils ne sont plus détectés lorsque ces tumeurs

évoluent en tumeurs malignes [13]. Des marqueurs de sénescence ont cependant pu être détectés dans des tumeurs avancées, notamment des tumeurs mammaires exprimant l'oncogène *HER2* (*human epidermal growth factor receptor-2*) [14]. Par ailleurs, dans 90 % des cas, les cellules tumorales expriment de façon constitutive la télomérase, l'enzyme qui permet d'allonger les télomères, mais elles ont généralement des télomères très courts [15]. Une interprétation intégrée de l'ensemble de ces résultats n'est donc pas immédiatement évidente et reste, d'ailleurs, discutée : d'un côté, la corrélation positive entre présence de cellules sénescents et développement d'un cancer positionne la sénescence comme un mécanisme promoteur de tumeur, mais de nombreuses données de biologie expérimentale ou de biologie moléculaire l'identifient plutôt comme un mécanisme suppresseur de tumeur. Ce sont ces différentes facettes que nous allons explorer dans la suite de cette revue.

L'arrêt dans le cycle cellulaire associé à la sénescence : une barrière anti-tumorale ?

La sénescence est associée à un arrêt du cycle cellulaire très robuste et très stable dans le temps, voire irréversible, qui devrait donc se comporter comme une barrière anti-tumorale. C'est principalement l'activation de la voie DDR et, en aval, de p53/p21, qui contribuerait à rendre cet arrêt dans le cycle cellulaire très robuste. Et c'est parce que les dommages de l'ADN qui l'initient demeureraient non réparés que l'arrêt dans le cycle serait irréversible. Pourquoi ces dommages ne sont-ils pas réparés ? La réponse aujourd'hui n'est pas complètement définitive. Les cellules sénescences conservent la capacité de réparer leurs dommages de l'ADN. Elles ne réparent cependant pas ceux qui se localisent dans des séquences répétées comme les télomères [16]. Ainsi, ce n'est que la persistance d'un nombre très limité de dommages par cellule qui induirait le phénotype sénescence.

Ces données sur l'activation de la voie DDR lors de la sénescence résultent essentiellement d'études menées *in vitro*. Pour rechercher l'implication de cette voie *in vivo*, Norman Sharpless *et al.* ont évalué l'expression de plusieurs inhibiteurs de cycline-cdk, dont p16 et p21, au cours du vieillissement chez le rat et la souris. Leurs résultats indiquent qu'au cours du vieillissement, p16 est la protéine dont l'expression est la plus augmentée (d'un facteur 10 environ), alors que celle de p21 n'est amplifiée que d'un facteur 1,4 [17]. Dans les expériences d'élimination des cellules sénescences au cours du vieillissement réalisées par van Deursen chez la souris, les cellules éliminées sont en fait des cellules qui expriment fortement p16 [12] (à notre connaissance, aucune expérience d'élimination de cellules a concerné les cellules exprimant p21 jusqu'à présent). Ces résultats suggèrent donc que la voie DDR et son effet anti-tumoral n'interviendrait que peu au cours du vieillissement *in vivo*. Néanmoins, l'utilisation du modèle murin pourrait ne pas refléter la situation chez l'homme. En effet, chez la souris, toutes les cellules somatiques adultes expriment la télomérase. Il n'y a donc pas de sénescence répliquative chez cet animal, ce qui pourrait expliquer le peu d'activation de la voie DDR. Chez l'homme, nous avons confirmé, en réalisant des analyses sur des biopsies de peau, la faible activation de la voie DDR au cours du vieillissement. En effet, nous n'avons détecté des foyers de dommages de l'ADN activant la voie DDR que dans une très faible proportion de fibroblastes de derme d'individus âgés, et aucun dans les cellules épithéliales constituant l'épiderme [7].

La sénescence, un état favorisant les premières étapes de tumorigenèse ?

L'arrêt dans le cycle cellulaire des cellules sénescences dépend également de l'activation de la voie p16/Rb. Cette voie peut intervenir secondairement, renforçant la voie DDR (c'est ce que l'on observe, par exemple, dans des fibroblastes en sénescence répliquative *in vitro*) ou opérer seule (c'est ce que l'on observe, par exemple, pour des cellules épithéliales), ce qui semble être le plus fréquent *in vivo*, chez la souris comme chez l'homme [7, 8, 17]. Dans le cas des cellules épithéliales,

la voie p16/Rb est activée en réponse à des cassures simple-brin de l'ADN induites par une augmentation de stress oxydant. Ce type de dommage de l'ADN n'induit pas la voie DDR, mais une voie spécifique, la voie SSBR (*single-strand break repair*). Ces cassures restent, là encore, non réparées mais, dans ce cas, à cause de la perte par les cellules sénescences de leur capacité à les réparer en raison d'une diminution d'expression de PARP1 (*poly[ADP-ribose] polymerase 1*), l'enzyme qui reconnaît ce type de dommages et initie leur réparation [7]. Tant que les cellules épithéliales sénescences sont arrêtées dans le cycle cellulaire, elles présentent un état suppresseur de tumeur. L'arrêt dans le cycle cellulaire ayant pour origine l'activation de la voie SSBR est cependant moins robuste que celui induit par la voie DDR. En effet, une cellule épithéliale sénescence sur 10 000 cellules environ peut de nouveau entrer dans le cycle cellulaire et générer un clone de petites cellules proliférantes ayant perdu les caractères de sénescence (Figure 3). Ces cellules sont transformées, ont effectué une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), présentent des mutations, et sont à l'origine de la formation de carcinomes lorsqu'elles sont xénotransplantées sur des souris immunodéficientes [4, 7, 18-23]. Elles peuvent donc être considérées comme tumorales, ou pré-tumorales. Par différentes approches génétiques, nous avons montré que la présence de cassures simple-brin non réparées est non seulement indispensable pour l'établissement du phénotype sénescence des cellules épithéliales, mais également pour cette émergence néoplasique post-sénescence [7]. Ainsi, la présence de dommages de l'ADN non réparés dans les cellules sénescences favoriserait la formation de cellules mutées et, par conséquent, les premières étapes de cancérogenèse. Le mécanisme par lequel certaines cellules sénescences entrent de nouveau dans le cycle cellulaire n'est pas complètement établi. Il semblerait qu'une extinction épigénétique de l'expression de p16, par méthylation de son promoteur, puisse y participer [21, 24].

Une accumulation de cellules sénescences est observée dans de nombreuses lésions précancéreuses comme les nævi ou les hyperplasies bénignes de la prostate. Plusieurs de ces lésions pré-cancéreuses présentent des formes activées d'un oncogène de la voie Ras [25, 26]. Cette activation oncogénique augmente, dans un premier temps, la prolifération des cellules, ce qui mène à l'hyperplasie. Dans un deuxième temps, elle conduit à un accroissement du stress oxydant et du stress répliquatif (blocage des fourches de réplication à la suite de l'épuisement du réservoir de nucléotides) à l'origine de la sénescence [27]. Devenues sénescences, les cellules

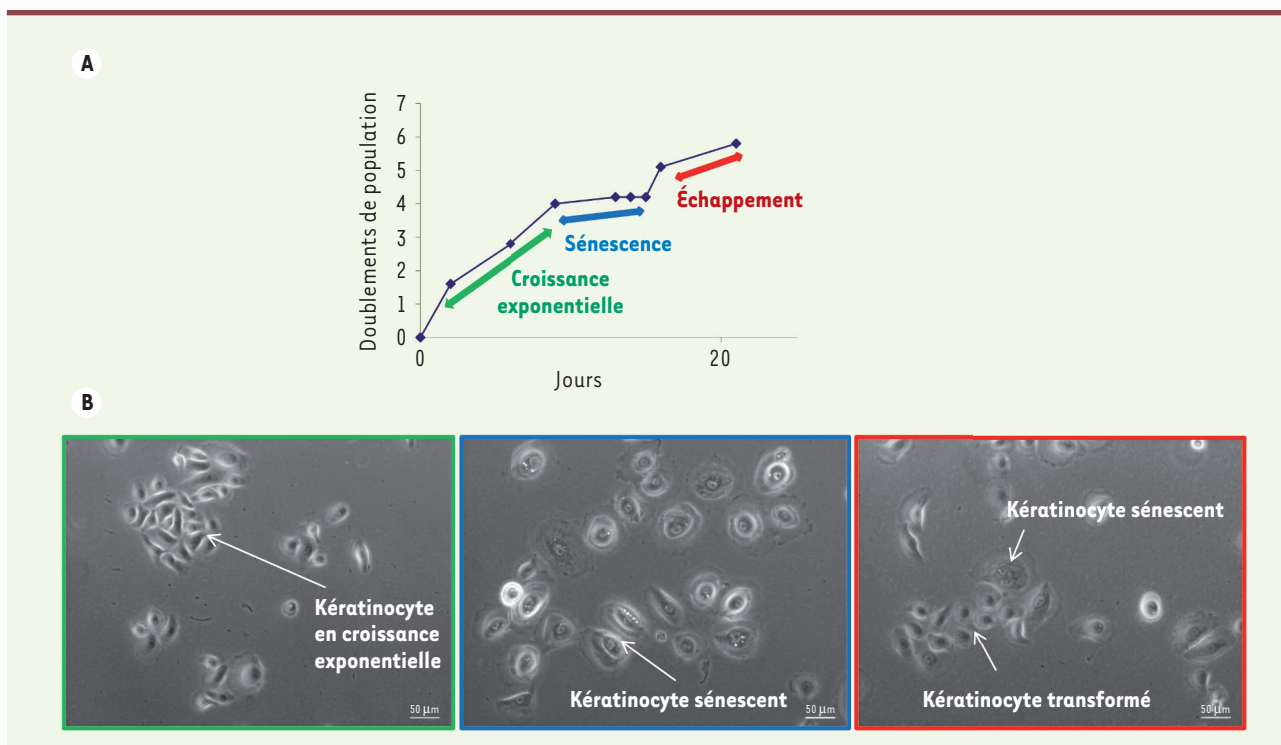


Figure 3. Génération de cellules transformées par échappement de la sénescence. **A.** Courbe de croissance de kératinocytes d'épiderme humain *in vitro*. Après une première phase de croissance exponentielle, les cellules entrent dans une phase de sénescence. Quelques très rares cellules sénescents entrent de nouveau dans le cycle cellulaire pour générer des cellules transformées. **B.** Image de microscopie photonique à contraste de phase montrant de gauche à droite : des kératinocytes en phase de croissance exponentielle, des kératinocytes sénescents de plus grande taille, et un clone de kératinocytes transformés, à proximité d'un kératinocyte sénescents. Les barres d'échelle représentent 50 μm .

arrêtent leur prolifération et l'hyperplasie demeure bénigne. À ce stade, la sénescence induite par les oncogènes (OIS) peut donc être considérée comme une protection anti-tumorale contre l'oncogène. Ces lésions pré-cancéreuses sont cependant des sites favorables au développement de tumeurs malignes. On peut donc penser que les cellules sénescents qui les constituent représentent un réservoir de cellules dont l'ADN est endommagé, à risque de générer des mutations cancérogènes.

Le sécrétome des cellules sénescents et ses effets sur la progression tumorale

La cellule sénescents présente un sécrétome⁴ particulier : il est enrichi en cytokines pro-inflammatoires, en facteurs de croissance, en protéases de remodelage de la matrice extracellulaire, en facteurs pro-angiogéniques, et appauvri en collagène [28, 29]. Ce sécrétome peut donc modifier considérablement le microenvironnement tissulaire, et ainsi influencer le développement tumoral. Généralement, le sécrétome des cellules sénescents permet le développement tumoral, en particulier en facilitant la prolifération de cellules pré-cancéreuses. Il favorise également la transition épithélio-mésen-

chymateuse et la chimiorésistance. Les modifications de la matrice extracellulaire qu'il induit, et son effet pro-angiogénique, peuvent créer une niche favorable à la progression de la tumeur [28]. Cependant, le sécrétome peut également présenter des effets anti-tumoraux en induisant la sénescence des cellules proches, en particulier des cellules cancéreuses, ce qui permet d'interrompre la progression tumorale au niveau tissulaire [30]. Ses effets sur la réponse immunitaire anti-tumorale restent ambigus : il peut se comporter comme un chimioattractant pour les cellules du système immunitaire permettant ainsi l'élimination des cellules tumorales, mais aussi pour des cellules qui favorisent l'immunotolérance de la tumeur [31, 32].

L'induction de sénescence comme thérapie anticancéreuse

Les thérapies anti-cancéreuses utilisant des agents génotoxiques comme certaines chimiothérapies et la radiothérapie peuvent induire l'apoptose ou la nécroptose des cellules cancéreuses (avec disparition de la tumeur), mais aussi leur sénescence prématurée (induisant ainsi la stabilisation de la tumeur) [33].

⁴ L'ensemble du matériel sécrété par la cellule.

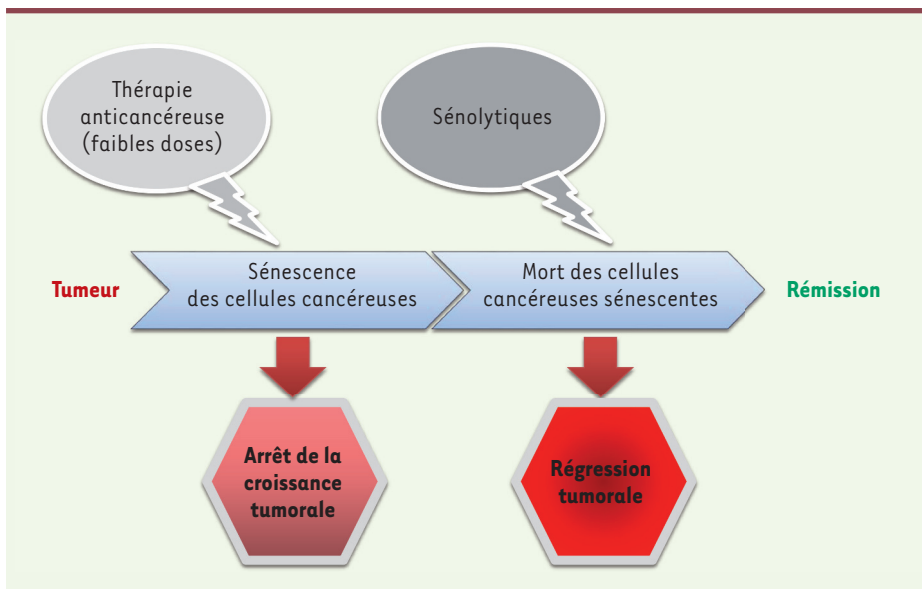


Figure 4. Principe d'une thérapie anti-cancéreuse à deux étapes. Les chimiothérapies anticancéreuses utilisant des agents endommageant l'ADN ainsi que la radiothérapie agissent, aux doses classiques, en induisant la mort des cellules cancéreuses et donc la régression tumorale. À doses plus faibles, ces mêmes thérapies induisent la sénescence des cellules cancéreuses. Un tel traitement ne permet pas d'éliminer les cellules cancéreuses, mais il limite la croissance tumorale, tout en générant peu d'effets secondaires. Néanmoins, les cellules tumorales étant toujours présentes, la maladie peut récidiver. Une stratégie pour éviter

cette récurrence serait d'ajouter une deuxième étape de traitement par des drogues pharmacologiques sénolytiques capables de tuer spécifiquement les cellules sénescents, y compris les cellules cancéreuses sénescents.

Paradoxalement, cette sénescence induite par les thérapies anti-cancéreuse peut également être à l'origine d'une certaine résistance au traitement, l'état sénescents étant associé à une résistance à l'apoptose [34]. Les mécanismes privilégiant l'orientation dans la voie de sénescence plutôt que dans celle de mort cellulaire en réponse au traitement sont peu connus et mal maîtrisés. Un paramètre important pourrait être la dose thérapeutique utilisée, c'est-à-dire la quantité et le type de dommages générés par le traitement, la sénescence étant préférentiellement induite par des doses faibles [33]. Il s'agit là d'un avantage puisque l'induction de sénescence pourrait se révéler être une stratégie thérapeutique entraînant peu d'effets secondaires. Malheureusement, la sénescence induite par les thérapies anticancéreuses est peu stable. En effet, des cellules cancéreuses traitées à la doxorubicine ou à l'irinotecan, par exemple, entrent en sénescence mais, au cours du temps, certaines d'entre elles échappent à cet état [35-38]. Pour une raison inconnue, les cellules cancéreuses deviennent plus invasives et transformées après s'être échappées de la sénescence induite par la thérapie par rapport aux mêmes cellules cancéreuses avant traitement [37]. Ce processus pourrait donc être l'un des mécanismes de récurrence et d'évolution de la maladie. Le sécrétome des cellules cancéreuses sénescents pourrait également promouvoir la croissance des cellules cancéreuses ayant résisté au traitement, leur transition épithélio-mésenchymateuse et leur capacité d'invasion [39, 40].

Malgré ces réserves, l'induction de sénescence comme thérapie anticancéreuse demeure d'actualité. Deux approches peuvent être envisagées. L'une consiste à cibler la télomérase, ou les protéines shelterine⁵ protectrices des télomères, afin d'induire un raccourcissement ou une

déstabilisation des télomères et donc l'activation de la voie DDR et une sénescence répllicative très stable [41, 42] (→).

(→) Voir la Synthèse de A. Londoño-Vallejo et al., m/s n° 4, avril 2008, page 383

Un tel traitement n'éliminera pas la tumeur, mais il pourrait la stabiliser durablement. La deuxième approche repose sur un traitement en deux étapes : l'induction initiale des cellules cancéreuses en sénescence, soit par des traitements classiques utilisés à faible dose, soit comme précédemment, en agissant sur les télomères, et, secondairement, l'élimination des cellules cancéreuses sénescents (Figure 4). La piste principale d'élimination des cellules sénescents actuellement envisagée consiste dans le ciblage de l'une de leur caractéristique majeure, négligée jusqu'à présent : leur résistance à l'apoptose. Le mécanisme de cette résistance a été identifié récemment : il repose notamment sur la surexpression par les cellules sénescents de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) [43]. Plusieurs inhibiteurs de cette famille de molécules existent déjà, d'autres sont en cours de développement. Un intérêt supplémentaire de cette approche est aussi la possibilité d'éliminer les cellules sénescents normales du microenvironnement tumoral et ainsi de supprimer l'effet promoteur de tumeur de leur sécrétome.

Conclusion

La sénescence joue donc un double, voire un triple jeu, vis-à-vis du cancer. D'un côté, elle pourrait être anti-

⁵ Le complexe shelterine est composé de six sous-unités dont certaines interagissent avec les séquences répétées de l'ADN télomérique.

tumorale parce qu'associée à un arrêt très robuste et très stable du cycle cellulaire induit par la voie DDR. Cependant, cet état semble peu présent *in vivo*, dans les tissus âgés. D'un autre côté, elle serait pro-tumorale, à deux niveaux du développement de la tumeur : aux toutes premières étapes de l'initiation cancéreuse, en étant un réservoir de dommages de l'ADN non réparés, et donc potentiellement mutagènes. Cela concernerait les cellules sénescences dont l'arrêt dans le cycle cellulaire dépend de p16 et n'implique pas la voie DDR, comme cela semble être le plus souvent le cas pour les cellules épithéliales ; la sénescence pourrait également promouvoir les étapes suivantes du développement tumoral, en modifiant le microenvironnement tissulaire et en stimulant la prolifération des cellules cancéreuses. La meilleure preuve du rôle globalement pro-tumoral de la sénescence a été apportée récemment par des expériences d'élimination de cellules sénescences qui retarde, chez la souris, le développement tumoral. Enfin et paradoxalement, induire de nouveau les cellules cancéreuses en sénescence pourrait représenter une stratégie anti-cancéreuse très efficace, si elle est couplée à une élimination secondaire des cellules sénescences en réactivant leur sensibilité à l'apoptose. Plus généralement, les drogues pharmacologiques permettant d'induire la mort des cellules sénescences, appelées désormais sénolytiques, pourraient diminuer l'incidence de nombreuses pathologies liées à l'âge. Il reste néanmoins à démontrer que ces drogues sont bien spécifiques des cellules sénescences, et qu'elles ne présentent pas d'effets secondaires majeurs. ♦

SUMMARY

Senescence and cancer: double-dealing

When ageing, cells profoundly reprogram to enter a state called senescence. Although the link between senescence and cancer is well established, the nature of this link remains unclear and debated. We will describe in this article the properties of senescent cells and make clear on how they could promote or oppose to cancer initiation and progression. We will also consider senescence as a response to classical anti-cancer therapies and discuss how to take advantage of senescence to improve the efficacy of these therapies while decreasing their toxicity. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

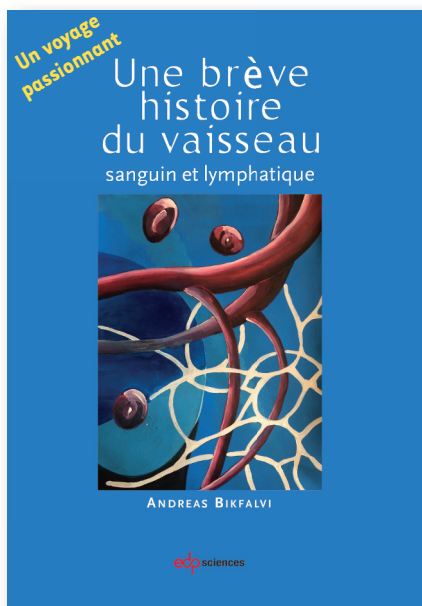
RÉFÉRENCES

- Hayflick L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965 ; 37 : 614-36.
- Brondello JM, Prieur A, Philipot D, et al. La sénescence cellulaire : un nouveau mythe de Janus ? *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 288-96.
- Pluquet O, Pourtier A, Abbadie C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014 ; 308 : C415-25.
- Abbadie C, Pluquet O, Pourtier A. Epithelial cell senescence: an adaptive response to pro-carcinogenic stresses? *Cell Mol Life Sci* 2017 ; 74 : 4471-509.
- Yang Q. Cellular senescence, telomere recombination and maintenance. *Cytogenet Genome Res* 2008 ; 122 : 211-8.
- Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol Med* 2012 ; 52 : 7-18.
- Nassour J, Martien S, Martin N, et al. Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 10399.
- Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 2005 ; 37 : 961-76.
- Narita M, Nunez S, Heard E, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003 ; 113 : 703-16.
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* 2015 ; 21 : 1424-35.
- He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell* 2017 ; 169 : 1000-11.
- Baker DJ, Childs BG, Durik M, et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 2016 ; 530 : 184-9.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peepers DS. BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene* 2008 ; 27 : 877-95.
- Zacarias-Fluck MF, Moranchó B, Vicario R, et al. Effect of cellular senescence on the growth of HER2-positive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 2015 ; 105-7.
- Ouellette MM, Wright WE, Shay JW. Targeting telomerase-expressing cancer cells. *J Cell Mol Med* 2011 ; 15 : 1433-42.
- Rossello F, Herbig U, Longhese MP, et al. Irreparable telomeric DNA damage and persistent DDR signalling as a shared causative mechanism of cellular senescence and ageing. *Curr Opin Genet Dev* 2014 ; 26 : 89-95.
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 1299-307.
- Gosselin K, Martien S, Pourtier A, et al. Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 7917-25.
- Martin N, Salazar-Cardozo C, Vercamer C, et al. Identification of a gene signature of a pre-transformation process by senescence evasion in normal human epidermal keratinocytes. *Mol Cancer* 2014 ; 13 : 151.
- Malaquin N, Vercamer C, Bouali F, et al. Senescent fibroblasts enhance early skin carcinogenic events via a paracrine MMP-PAR-1 axis. *PLoS One* 2013 ; 8 : e63607.
- Romanov SR, Kozakiewicz BK, Holst CR, et al. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 2001 ; 409 : 633-7.
- Deruy E, Nassour J, Martin N, et al. Level of macroautophagy drives senescent keratinocytes into cell death or neoplastic evasion. *Cell Death Dis* 2014 ; 5 : e1577.
- De Carne Trecesson S, Guillemin Y, Belanger A, et al. Escape from p21-mediated oncogene-induced senescence leads to cell dedifferentiation and dependence on anti-apoptotic Bcl-xL and MCL1 proteins. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 12825-38.
- Feijoo P, Terradas M, Soler D, et al. Breast primary epithelial cells that escape p16-dependent stasis enter a telomere-driven crisis state. *Breast Cancer Res* 2016 ; 18 : 7.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005 ; 436 : 720-4.
- Choi J, Shendrik I, Peacocke M, et al. Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2000 ; 56 : 160-6.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006 ; 444 : 638-42.
- Malaquin N, Martinez A, Rodier F. Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp Gerontol* 2016 ; 82 : 39-49.
- Mavrogatou E, Pratsinis H, Papadopoulou A, et al. Extracellular matrix alterations in senescent cells and their significance in tissue homeostasis. *Matrix Biol* 2017. Oct 21. pii: S0945-053X(17)30296-2. doi: 10.1016/j.matbio.2017.10.004.
- Kuilman T, Peepers DS. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* 2009 ; 9 : 81-94.
- Ruhland MK, Loza AJ, Capietto AH, et al. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 11762.
- Toso A, Di Mitri D, Alimonti A. Enhancing chemotherapy efficacy by reprogramming the senescence-associated secretory phenotype of prostate tumors: a way to reactivate the antitumor immunity. *Oncimmunology* 2015 ; 4 : e994380.
- Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010 ; 102 : 1536-46.

RÉFÉRENCES

34. Kirkland JL, Tchkonja T. Cellular senescence: a translational perspective. *EBioMedicine* 2017 ; 21 : 21-8.
35. Mosieniak G, Sliwinski MA, Alster O, et al. Polyploidy formation in doxorubicin-treated cancer cells can favor escape from senescence. *Neoplasia* 2015 ; 17 : 882-93.
36. Wang Q, Wu PC, Dong DZ, et al. Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape. *Int J Cancer* 2013 ; 132 : 1505-15.
37. Jonchere B, Vetillard A, Toutain B, et al. Irinotecan treatment and senescence failure promote the emergence of more transformed and invasive cells that depend on anti-apoptotic Mcl-1. *Oncotarget* 2015 ; 6 : 409-26.
38. Achuthan S, Santhoshkumar TR, Prabhakar J, et al. Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 37813-29.
39. Simova J, Sapaga O, Imrichova T, et al. Tumor growth accelerated by chemotherapy-induced senescent cells is suppressed by treatment with IL-12 producing cellular vaccines. *Oncotarget* 2016 ; 7 : 54952-64.
40. Tato-Costa J, Casimiro S, Pacheco T, et al. Therapy-induced cellular senescence induces epithelial-to-mesenchymal transition and increases invasiveness in rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2016 ; 15 : 170-8-e3.
41. Londono-Vallejo A, Lenain C, Gilson E. Cibler les télomères pour forcer les cellules cancéreuses à rentrer en sénescence. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 383-9.
42. Bilsland AE, Cairney CJ, Keith WN. Targeting the telomere and shelterin complex for cancer therapy: current views and future perspectives. *J Cell Mol Med* 2011 ; 15 : 179-86.
43. Zhu Y, Tchkonja T, Pirtskhalava T, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 2015 ; 14 : 644-58.

TIRÉS À PART
C. Abbadie



ISBN : 978-2-7598-1863-1

202 pages

25 €

Ce livre, intéressant et lisible à la fois pour le spécialiste et le grand public, apporte des observations originales et nouvelles concernant l'angiogenèse, et notamment l'histoire des différentes découvertes, et discute les aspects et les concepts plus généraux en les plaçant dans le contexte de la philosophie des sciences.

Facile à lire, bien illustré, cet ouvrage cherche à comprendre et à faire comprendre les enjeux de la recherche sur l'arbre vasculaire en développement et en pathologie. Il intéressera non seulement les étudiants et post-doctorants en biologie, mais aussi les chercheurs actifs dans ce domaine de recherche ainsi que toute personne intéressée par la biologie et la médecine et par l'histoire des sciences. Un voyage passionnant à travers l'histoire et les concepts les plus actuels concernant les recherches sur le vaisseau sanguin.

Andreas Bikfalvi est Professeur à l'université de Bordeaux et Directeur d'une unité de recherche Inserm sur le cancer et la biologie vasculaire. Il est, par ailleurs, membre senior de l'Institut Universitaire de France (IUF) et reconnu internationalement pour ses recherches dans le domaine de l'angiogenèse tumorale.

BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex, France
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : françois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir

Une brève histoire de vaisseau : 25 € + 3 € de port = 28 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | | | | N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | | | Signature :

Article n°2

The out-of-field dose in radiation therapy induces delayed tumorigenesis by senescence evasion

The out-of-field dose in radiation therapy induces delayed tumorigenesis by senescence evasion

Erwan GOY¹, Maxime TOMEZAK^{1, 6}, Caterina FACCHIN¹, Nathalie MARTIN¹, Emmanuel BOUCHAERT², Jérôme BENOIT³, Joe NASSOUR¹, Laure SAAS¹, Claire DRULLION¹, Priscille BRODIN⁴, Alexandre VANDEPUTTE⁴, Olivier MOLENDI-COSTE⁵, Laurent PINEAU⁵, Gautier GOORMACHTIGH¹, Olivier PLUQUET¹, Albin POURTIER¹, Fabrizio CLERI⁶, Eric LARTIGAU⁷, Nicolas PENEL⁷, and Corinne ABBADIE^{1*}.

1. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

2. Oncovet Clinical Research, Plateforme PRECI, F-59120 Loos, France

3. Oncovet, Plateforme PRECI, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

4. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR9017 - CIIL - Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, F-59000 Lille, France

5. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011- EGID, F-59000 Lille, France

6. Univ. Lille, CNRS, UMR8520, Institut d'Electronique, Microélectronique et Nanotechnologie, F-59652, Villeneuve d'Ascq, France

7. Lille University, Medical School and Centre Oscar Lambret, Lille, France

* Corresponding author: corinne.abbadie@ibl.cnrs.fr

Short title: Senescence in second primary cancers

Summary

Curative-intent radiation therapy relies mostly on the generation of DNA double-strand breaks lethal for cancer cells. A rare but severe complication of radiation therapy is the induction of second primary cancers. These cancers preferentially develop not inside the planning target volume (PTV) but around, over several centimeters, after a latency period of 1 to 40 years. We show here that normal fibroblasts submitted to the out-of-field dose scattering at the margin of a PTV receiving a mimicked patient's treatment do not die but enter in a long-lived senescent state resulting from the accumulation of unrepaired DNA single-strand breaks, in the almost absence of DNA double-strand breaks. Most importantly, we show that after a while a few of these senescent cells systematically and spontaneously escape from the cell cycle arrest to generate daughter cells harboring mutations and increased invasive capacities. These findings highlight single-strand break-induced senescence as the mechanism of second primary cancer initiation, with clinically relevant spatio-temporal specificities. Senescence being pharmacologically targetable, they open avenue for second primary cancer prevention.

Keywords

Radiotherapy, second primary cancer, sarcoma, normal human dermal fibroblasts, senescence, DNA single-strand breaks, DNA double strand breaks, PARP, DNA repair

Introduction

Curative-intent radiation therapy relies mainly on the generation of DNA damages lethal for cancer cells. Paradoxically, because DNA damages are mutagenic, ionizing radiations also have tumorigenic effects. A severe complication of radiation therapy is therefore the induction of second primary cancers (SPCs), also called radiotherapy-induced second cancers, second cancers after radiation therapy, or cancers in irradiated fields¹⁻⁴. SPCs are not a recurrence of the initial cancer but are neoformed from normal cells affected by the radiations. Data on the increased risk of developing a SCP after radiation therapy are quite divergent in the available studies: it ranges from zero in a cohort of 13,457 patients with rectal cancer having received radiation therapy after surgery compared to surgery alone⁵, to 14.0 in a cohort of 1,136 patients diagnosed with Hodgkin Lymphoma at a median age of 11 years⁶.

Although the causal relationship between the initial radiation therapy and the induction of the SPC is impossible to definitely prove, SCPs are highly suspected to be radiation-induced. However, lifestyle, exogenous stressors and genetic factors could also be contributing factors³. Amazingly, in radiation therapy using external X-rays, SPCs preferentially develop not inside the Planning Target Volume (PTV), i.e. the volume having received 100% of the therapeutic dose, but preferentially close to the edge of the beams, or farther around, on several centimeters^{7,8}. In a clinical linear accelerator, the region surrounding a beam (which will be called in the entire article the margin) receives photons leaking and scattering from the primary and secondary collimators, scattering from the flattening filter and scattering inside the patient from the PTV towards normal peri-tumoral tissues⁹. Although the marginal dose (also called peripheral dose or out-of-field dose) emanating from the collimator and the flattening filter could be reduced by optimizing the accelerator's technology, the scattering inside the patient is unavoidable⁹. This internal scatter component was shown to be the major determinant of the dose deposited in the most proximal margin⁹. The marginal radiation has three characteristics: (i) the deposited dose exponentially decreases with the distance, (ii) the deposited dose is approximately proportional to the PTV size, and (iii) the photon's spectral energy fluence distribution is shifted to lower energies compared with those inside the PTV^{9,10,11,12}. It was suggested that this photon quality change has the potential to increase the relative biological effectiveness (RBE)^{11,12}, but the underlying specific cellular damages, if any, are unknown.

X-rays induce, among others, DNA single- and double-strand breaks (SSBs and DBSs)¹³⁻¹⁵. DSBs are defined as two breaks in the sugar-phosphate backbone on each DNA strand, at less than 10bp. Their signalization and repair involve the activation of the DNA Damage Response (DDR) pathway with, downstream, the activation of the tumor suppressor TP53 that induces either a transitory cell

cycle arrest favoring DNA repair or apoptosis. A SSB is a break in the sugar-phosphate backbone on only one DNA strand, often accompanied by a nucleotide loss and often displaying abnormal 5' and 3' ends¹⁶. The SSB repair (SSBR) pathway involves a first step of break detection initiated by the poly(ADP)ribose polymerase (PARP) 1 which, once activated by its linkage to the broken DNA, synthesizes long chains of poly(ADP)ribose (PAR). The accumulated PAR chains favor the recruitment of the X Ray Repair Cross-Complementing Group (XRCC) 1 scaffold protein. XRCC1 is then phosphorylated and recruits the repair enzymes themselves, including the polynucleotide kinase phosphatase (PNKP) and the polymerase β . These last steps are common with the base exchange pathway (BER)¹⁷. It is known for a long time that the curative effect of ionizing radiations results from the formation of DSBs too many to be repaired, leading to cancer cell death by apoptosis or mitotic catastrophe^{13,14,18}. SSBs are less detrimental than DSBs, but 1Gy deposited in the PTV generates 10 to 25 more SSBs than DSBs¹⁹. Presently, nothing is known about the respective quantities of SSBs and DSBs generated in the margin of the PTV and the consequences on the outcome of the affected normal cells.

Besides their spatial distribution related to the PTV, another amazing property of SCPs is their long latency period before emergence, ranging from 1 to 40 years after the treatment of the first cancer^{1,3,4,7,20}. Moreover, the cumulative incidence of SPCs increases with time^{3,21}: for instance, the cumulative incidence of second sarcoma in a cohort of 16,705 patients treated by radiation therapy for non-metastatic breast carcinoma was calculated at 0.7% at 5 years, at 0.27% at 10 years, and at 0.48% at 15 years after the initial treatment time²². This suggests that the normal cells that were affected by the scattered photons remain dormant in the organism while maintaining a constant neoplastic transformation potential. However, the precise biological form of this dormant cell state is completely unknown. We assayed in this study whether it was senescence.

Indeed, although initially described as the state reached by normal human fibroblasts after a finite doubling number, senescence is now recognized as a more general reprogrammed state established to adapt to several stresses, such as telomere shortening, DNA damages, oxidative damages, or hyper-activation of some oncogenes^{23,24}. By producing DNA damages and oxidative stress, ionizing radiations are senescence inducers^{14,25}. The senescence program includes an increase in cell size, complex epigenetic changes, an increase in reticulum endoplasmic stress, an increase in autophagy, changes in the composition of the secretome, and above all a long-term cell cycle arrest in G1 associated with a resistance to apoptosis, making senescent cells non-proliferating long-lived cells *in vivo*^{24,26}. The senescent cell cycle arrest results from the persistence of unrepaired DNA damages. When these damages are of a type signaled through the DDR pathway, such as DSBs or shortened telomeres, the cell cycle arrest is very stable, almost irreversible, considered as tumor suppressor²⁷.

In contrast, when the unrepaired damages are SSBs, as we have shown in a seminal work on oxidative stress-induced senescence, about one senescent cell on 10,000 systematically and spontaneously re-enters in cell cycle to give rise to a progeny of cells we named post-senescent neoplastic emergent (PSNE) cells because displaying mutations, markers of transformation, markers of epithelial-to-mesenchyme transition, and able to form small hyperplasias or carcinomas in *in vivo* assays²⁸⁻³⁰.

We investigated in this study whether SSB-induced senescence could be a step in the generation of SPCs after conformational 3D radiotherapy using X-rays. As SPC type, we focused on sarcomas which represent a large part of SPCs⁸, and whose outcome is very poor with a survival rate at 5 years of 10 to 40%^{4,31}. We report that normal fibroblasts located in the margin of a PTV receiving 2Gy/day as patients enter after two weeks of treatment in premature senescence associated with an accumulation of SSBs. We also report that about 10 days after the end of irradiations, a few senescent cells re-enter cell cycle and generate a progeny of cells resuming proliferation and displaying mutations and increased invasive capacities. These findings lead to propose for the first time a mechanism explaining how photons scattering inside the patient from the PTV towards the normal peritumoral tissues could induce a delayed development of sarcomas. They also pave the way for using senolytics to prevent second sarcoma development.

Results

Characterization of the experimental setting for cell irradiations

To determine the type and quantity of DNA breaks generated in a stromal tissue localized at the margin of a PTV and to analyze their effects on the stromal cell behavior, we applied a simulated standard radiotherapy protocol to *in vitro* cultured normal human dermal fibroblasts (NHDFs) using a linear accelerator, the Varian Primus CLINAC® (Sup Fig1A), commonly used for treating patients by 3D conformal radiotherapy at the Anti-Cancer Center of Lille, France (Centre Oscar Lambret). The experimental setting was designed in the respect of the mode, energies, unitary dose, dose rate, total dose and fractioning commonly applied to patients.

We first characterized the depth profile of dose deposition at 6 or 20 MegaVolts (MV), the two energies used in photon mode with this accelerator. The results indicated that the maximum of the dose was deposited at 16 to 30mm deep for 6MV and at 25 to 45mm deep for 20MV (Sup Fig1B). Therefore, cell plates (6-, 12- or 96-well plates) were putted down a 2 or 4cm-thick poly(methyl methacrylate) (PMMA) plate for irradiation from below, at 6 or 20MV respectively (Sup Fig2A).

The lateral positioning laser was used to position the isocenter at the bottom of the wells, on which cells adhere (Sup Fig2A). The light field was used to delimit a square PTV of 25x25cm. Cell plates were positioned straddling the light field boundary indicating the isodose 50, in order to get at least one well column inside the PTV and several well columns spreading over the margin up to several centimeters from the limit of the beams (Sup Fig2B).

To check the accuracy of this experimental setting, cell plates were scanned and the deposited doses were calculated using the planning treatment system of the Centre Oscar Lambret. The dose profile diagram and the isodose curves indicated that, for the columns positioned inside the PTV, 100% of the dose was indeed deposited at the bottom of the wells, where the cells lay, and that the dose was almost homogeneous in the wells positioned inside the PTV. They also indicated that the dose exponentially dropped down in the wells positioned in the margin (Sup Fig2C and D). Notice that in this experimental setting, since the wells are independent and insulated from each other, the cells positioned at the margin of the PTV were not submitted to a bystander effect relying on molecules secreted by the cells located inside the PTV.

NHDFs positioned at the margin of the PTV during a simulated radiation therapy are growth retarded but do not undergo massive death

As a first experiment to evaluate whether normal fibroblasts surrounding a PTV could suffer in some way from the irradiation of the PTV, we performed growth curves of NHDFs submitted or not to a simulated French standard radiation treatment made of successive weeks of irradiation at 2Gy per day, except week-ends. As a control of the curative lethal effect of such a simulated treatment, we followed in parallel the growth of MDA-MB231 cells (triple negative mammary cancer cells). As expected, both MDA-MB231 and NHDFs positioned inside the PTV underwent cell death after three weeks of irradiation. In contrast, NHDFs positioned in the margin did not die: those in the most distal margin continued to grow as control non-irradiated cells or underwent a slight slowdown, whereas those positioned in the most proximal margin underwent a growth arrest (Fig1A and B and Sup Fig3A).

Since ionizing radiations are able to induce cell death, we measured apoptotic and non-apoptotic cell death levels using Vybrant Fam Poly Caspases (Molecular Probes) and AnnexinV/Propidium iodide (Life technologies) assay kits. The results indicated that MDA-MB231 began to suffer from caspase-independent cell death after 4 irradiations. In the meantime, NHDFs positioned inside the PTV also underwent cell death, but to a lower extent, both by caspase-dependent and independent mechanisms. In contrast, NHDFs positioned at the margin, even the most proximal, did not die at a significant level (Fig1C and Sup Fig3B and C).

NHDFs positioned at the margin of the PTV during a simulated radiation therapy enter senescence

We then investigated whether the growth retardation of NHDFs positioned at the margin of the PTV could be due to senescence induction. Senescence was first assayed by flow cytometry according to three senescence markers: the SA- β -Galactosidase (SA- β -Gal) activity using the fluorogenic C12FDG substrate, the cell size reflected by the FSC value, and the cell granularity reflected by the SSC value. The results indicate that the SA- β -Gal activity increased with successive irradiations, both in NHDFs positioned inside the PTV or at the margin, up to 7cm. The activity reached in cells positioned inside the PTV aimed at that of replicative senescent NHDFs, whereas that reached in cells located at the margin was lower (Fig2A and B, Sup Fig4A). Cell size and granularity also increased with successive irradiations at significant levels in cells positioned at the margin. In the PTV, cell size and granularity increased during the first week of irradiation and then decreased (Fig2A and C, Sup Fig4B). The careful examination of the dot plots and histograms indicated that two subpopulations appeared in the PTV after 3 weeks of irradiation: one comprising the biggest and most granular cells with a high

SA- β -Gal activity, which are *bona-fide* senescent cells, and another one comprising very granular but very small cells with a very low β -Gal activity, which probably correspond to dying cells (Fig2A).

Another major characteristic of senescent cells is their cell cycle arrest in G1³². To establish whether NHDFs also acquired this senescence marker after a simulated radiation therapy protocol, we performed a cell cycle analysis by flow cytometry. After 13 irradiations, NHDFs positioned at the margin were cell cycle arrested in G1, with even less cells in S phase than in a population of NHDFs at the replicative senescence plateau (Sup Fig5).

The most universally activated CKIs responsible of the cell cycle arrest of senescent cells are p16 (CDKN2) and p21 (CDKN1A)^{23,24}. To establish whether the cell cycle arrest of irradiated NHDFs positioned at the margin was associated with these canonical markers, we measured their expression by RT-PCR during two weeks of irradiation. The results show that p16 mRNA levels increased in NHDFs positioned inside the PTV as soon as the second irradiation, but then dropped back during further irradiations. P21 appears to take the reins with an up-regulation from the second week of irradiation. In NHDFs positioned in the margin, P16 and p21 mRNA levels followed approximately the same induction pattern, mainly from the end of the first week of irradiation. The level of p16 protein examined by western blot and immunofluorescence followed the same expression pattern than the mRNA (Sup Fig6). These results indicate that the senescence induced in NHDFs positioned at the margin classically involved both p16 and p21.

Senescent cells are also characterized by a certain degree of multinucleation³³. To establish whether the cells affected by the marginal radiations could also harbor this marker of senescence, we quantified the percentage of multinucleated cells by DAPI staining followed by microscopic examination. The results indicate that the percentage of multinucleated cells approximately doubled in NHDFs positioned at the margin after 2 weeks of irradiation. This percentage did not significantly increase in NHDFs positioned in the PTV (Sup Fig7).

Taken together, these results indicate that during a simulated radiation therapy protocol, NHDFs positioned at the margin of the PTV undergo senescence, whereas those positioned inside the PTV go through a senescent-like phenotype and then die.

NHDFs positioned at the margin of the PTV develop a SSB signature

Since the cell outcomes differed whether they were positioned inside or at the margin of the PTV, we next wanted to characterize potential quantitative or qualitative differences regarding the DNA

breaks generated in the two areas. We firstly irradiated NHDFs cultured in 96-well plates once at 2Gy and searched for SSBs and DSBs by performing an immunodetection of the signaling proteins XRCC1 and 53BP1 respectively. In NHDFs positioned inside the PTV, we detected both XRCC1 and 53BP1 foci as expected. In NHDFs positioned at the margin, we detected almost only XRCC1 foci. Surprisingly, they were as much numerous in the margin as in the PTV, whatever the distance, up to 5 centimeters. In contrast, the quantity of 53BP1 foci per cell rapidly dropped down with the distance from the limit of the PTV, as expected (Fig3A).

To further challenge this surprising repartition of XRCC1 foci, we searched DNA breaks by comet assays, a single-cell electrophoresis technique that allows a direct detection of the physical breaks, in contrast to XRCC1 and 53BP1 immunofluorescences which detect only the DNA breaks that are sensed and signaled by the cell. When the comet-assay electrophoresis is performed at pH12.3, the double helix is denatured and the DNA fragments that migrate come from both SSBs and DSBs. When the electrophoresis is performed at pH8, the DNA fragments that migrate and form the comet tail come from DSBs. Thus, comparing the results at pH8 and 12.3 enables to evaluate the quantity of DSBs and SSBs. Comet assays at pH12.3 revealed the presence of breaks in NHDFs positioned at the margin up to about 5cm. Comet assay results at pH8 confirmed the lack of DSB formation in NHDFs positioned at the margin (Fig3B, Sup Fig8). Therefore, the breaks in the margin corresponded almost only to SSBs, hence confirming the immunofluorescence results. As in immunofluorescence results, they were as numerous in the proximal and distal margins. Comet assay results also confirmed the formation of both SSBs and DSBs in NHDFs positioned inside the PTV (Fig3B, Sup Fig8).

In order to target the tumor at best in its tri-dimensional volume, the planning treatment system combines the use of beams at 6 and 20MV. To determine whether the energy of the incident photons could impact on the nature or quantity of breaks generated in NHDFs positioned inside the PTV or at its margin, we measured the quantity of XRCC1 and 53BP1 foci generated in NHDFs irradiated at 6 *versus* 20MV. The results indicate that there was no statistically significant difference in the quantity of SSBs and DSBs generated inside the PTV or at the margin after one irradiation at 2Gy at 6 or 20MV (Sup Fig9).

Therefore, a unitary 2Gy irradiation generates in non-tumoral fibroblasts surrounding the PTV a specific SSB signature. As expected³⁴, the quantity of generated DSBs followed approximately the dose gradient that exponentially decreases from the PTV to the most distal margin. In contrast and surprisingly, the quantity of generated SSBs was almost constant from the PTV to the most distal margin assayed here (about 5cm).

The SSB generation in the margin necessitates continuity in the material from the PTV

It was established that the major determinant of the dose deposited at the margin of a PTV results from the scattering of ionizing particles inside the patient ⁹. To investigate whether the generation of SSBs in cells positioned in the margin was due to the propagation of photons inside the material, we aligned a second culture plate after the one straddling the limit of the PTV, and the two aligned plates were sealed or not by an ultrasound gel (Sup Fig10A). We irradiated once at 2Gy and analyzed DNA breaks by immunofluorescence anti-XRCC1 and -53BP1. Regarding SSBs, we recorded XRCC1 foci in NHDFs positioned inside the PTV and at the margin in only the first plate when the two plates were not sealed, but also in the second plate, when the plates were sealed, up to 18.7cm. Regarding DSBs, we recorded 53BP1 foci only in NHDFs positioned inside the PTV and, to a less extent, in the most proximal margin of the first plate, confirming the previous results (Sup Fig10B). This result suggests that SSBs are generated by ionizing particles that propagate inside the material, here in the plastic of the culture plates.

The SSB signature of the margin is not affected by the cycling *versus* quiescent status of NHDFs

All the above experiments were performed using proliferating NHDFs cultured in a basal medium complemented by 2.0% fetal bovine serum (FBS), FGF and insulin. However, *in vivo* in the dermis, fibroblasts are rather quiescent, except during tissue repair. We therefore wanted to determine whether the quantity of DNA breaks recorded after irradiation could be affected by the proliferating *versus* quiescent status of NHDFs. Cell cycle-slowed down NHDFs (cultured in 0.1% FBS) and proliferating NHDFs (cultured in 2.0% FBS) were irradiated at 2Gy daily for 5 days. The amount of DSBs plus SSBs was quantified by comet assays at pH12.3. The results indicate that there was no difference in SSB plus DSB quantity generated in cells positioned in the margin when cultured in 0.1% FBS compared to 2.0% (sup Figure 11).

The SSB signature of the margin is also recorded *in vivo*

To go further on the physiopathological relevance of the SSB signature of the margin, we quantified the marginal DNA damages in mice. For that, mice were positioned in close contact (sealed with an ultrasound gel) to a phantom which was irradiated using the Elekta Precise of the OncoVet veterinary clinic (Villeneuve d'Ascq, France). This linear accelerator is very similar to the Varian Clinac[®] we used for irradiating cells. The isocenter was positioned at the level of the mouse skin. A square PTV of

25x25cm was delimited. The phantom was positioned inside the PTV, aligned along one of its limits, and the mouse was glued to it (Fig4A). The phantom was irradiated once at 2Gy. Mice were sacrificed 2hrs later, their skin collected and fractioned at different distances from the contact with the phantom, and processed for detecting XRCC1 and 53BP1 foci. Mice irradiated whole body (isocenter at the level of the skin) were used as positive control. As expected, both SSBs and DSBs developed in dermal cells of total body-irradiated mice. In contrast, only SSBs, but not DSBs, were generated in dermal cells of the skin of mice positioned at the margin of the phantom, up to 2cm from the contact with the phantom (Fig4B). Therefore, the peri-PTV *in vivo* tissues also specifically develop a SSB signature upon irradiation.

SSBs generated in NHDFs positioned at the margin accumulate with successive irradiations because of an exhaustion of the repair capacity

A standard conformal 3D radiation therapy regimen in France is made of irradiations at 2Gy every day, except week-ends. We wondered whether the DNA breaks generated in the PTV and at the margin could accumulate along the successive irradiations of such a therapeutic protocol. To address this question, we first compared SSBs and DSBs formation by comet assays after only one irradiation to that after the last irradiation of a series of five. Regarding DSBs in NHDFs positioned inside the PTV, the results of comet assays at pH8 show that there was no significant difference between cells irradiated once or five times. Regarding DSBs in NHDFs positioned at the margin, the results confirmed again their almost absence. Regarding SSBs, the comparison of the results at pH8 and 12.3 indicated that in NHDFs positioned inside the PTV, SSBs were less numerous after five irradiations than after just one. In contrast, in NHDFs positioned at the margin, SSBs were more numerous after five irradiations than after just one (Sup Fig12). Therefore, the SSBs generated in NHDFs positioned at the margin accumulate with successive irradiations, in contrast to both DSBs and SSBs generated in cells positioned inside the PTV that do not.

The above results could be explained by a decrease in the SSBR capacities with successive irradiations. To assay this hypothesis, we submitted NHDFs to a unique irradiation at 2Gy or to a series of five, and we performed the comet assays either just after the last irradiation or after a 72hr delay, to evaluate the repair. The results indicate that SSBs, either in the PTV or the margin, were fully repaired within 72hrs after a unique irradiation, whereas they were still detected 72hrs after the last irradiation of a series of five (Sup Fig13), indicating that the SSB repair capacities decreased with successive irradiations. In contrast, the DSBs were ever fully repaired within 72hrs, whatever the cells were submitted to 1 or 5 irradiations, indicating that the DSB repair capacities were not affected

along successive irradiations (Sup Fig13). The same results were obtained by analyzing the breaks by immunofluorescence against XRCC1 and 53BP1: XRCC1 foci (SSBs) generated in the PTV were also partly resolved within 72hrs, but those generated in the margin were still significantly present after 72hrs; 53BP1 foci (DSBs) generated in NHDFs positioned inside the PTV or at the proximal margin after 4 successive irradiations at 2Gy were partly resolved within 72hrs (Sup Fig14). These results confirm that the SSBR capacity declines with successive irradiations.

Since this decline could be due to an exhaustion of the pool of NAD⁺ (the substrate of PARP1) because of the high and continuous demand, we evaluated the evolution of the PARylation capacity of the cells along irradiations. NHDFs were irradiated at 2Gy, once or during two weeks, and just after the last irradiation they were challenged by H₂O₂ to evaluate their capacity to synthesize PAR chains in response to numerous SSBs. Immunofluorescences against PAR chains show that after one irradiation, NHDFs do synthesize PAR chains in response to H₂O₂, whereas after 10 successive irradiations they have become unable to do so (Sup Fig15).

Taken together, these results suggest that the successive irradiations of a standard fractionated radiotherapy protocol could lead to an exhaustion of the PARylation capacity, provoking the accumulation of unrepaired SSBs.

A few radio-induced senescent cells generated in the margin give rise to transformed daughter cells.

As unrepaired SSBs could be mutagenic, we wondered whether the marginal senescent cells could be a source of (pre)-neoplastic cells. To investigate this point, we irradiated NDHFs positioned inside the PTV or at its margin at 2Gy/day during 2 weeks, up to the induction of senescence. Since all cells located in the margin were probably not fully senescent at the end of this treatment, we sorted the most senescent NHDFs according to their SA-β-Gal activity, size and granularity (Fig5A and Sup Fig16). Sorted cells were plated again and monitored for post-senescent emergence. After 2 to 4 weeks post-sorting according to the experiment, we noticed the reappearance of small proliferating cells amongst senescent cells emanating from the margin (Fig5A and B and Sup Fig17A) referred as PSNE for post-senescent neoplastic emergent. To determine whether these cells displayed (pre)-neoplastic properties, we evaluated their invasive properties. We first assayed whether they were mutated by performing an HPRT assay. As expected, exponentially growing cells did not survive a 6-thioguanine treatment, meaning their *hpert* gene, taken as a reporter of the genome condition, was not loss-of-function mutated. In contrast, PSNE cells having emerged from senescent cells of the margin resisted the 6-thioguanine treatment, suggesting they were carrying mutations (Fig5C and

Sup Fig17B). Then, we searched for a potential matrix metalloproteinase (MMP) activity by in-gel zymography. Gelatinase activity was detected in PSNE cells emanating from NHDFs positioned in the margin compared to exponentially growing NHDFs taken as control (Fig5D). Then, we assayed their migrating and invading capacities in Boyden chamber assays using respectively Matrigel®-uncoated or -coated filters. PSNE cells having emerged from senescence induced in the margin did not show any increased migration compared to non-irradiated exponentially growing cells. However, their invasive capacities were multiplied about 4-fold compared to control cells (Fig5E). Taken together, these results evidence that along irradiations normal fibroblasts of the vicinity of a PTV enter premature senescence from which, after a while, few rare cells evade to give rise to a progeny of proliferative, mutated and invading cells.

A SSB accumulation is sufficient to induce both senescence and neoplastic escape

Ionizing radiations induce SSBs and DSBs, but also several other damages to DNA or other cell components³⁵. Therefore, we wondered if the sole SSB accumulation was sufficient to induce senescence and post-senescence neoplastic escape. To address this question, we set a protocol to specifically and solely induce unrepaired SSBs, independently of an irradiation. For that, we daily treated NHDFs with a very mild 5 μ M concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) to induce SSBs. To inhibit their repair, we co-treated the cells with ABT-888, also called Veliparib, a specific inhibitor of PARP1 and PARP2³⁶. We checked that the combined treatment did induce a significant accumulation of XRCC1 foci, whereas the treatments with H₂O₂ alone or Veliparib alone were very much less efficient. The accumulation of XRCC1 foci began from the 14th day of the combined treatment (Fig6A). We also checked that the combined treatment did not induce either an accumulation of DSBs, oxidative base damage visualized by OGG1 foci, or oxidative damage to mitochondria analyzed with the JC1 probe (Sup Fig18). We also analyzed the phosphorylation of XRCC1 and the recruitment of PNKP at the damage foci to check the SSBR blockage by their absence (Sup Fig19). We then followed-up the consequence of the accumulation of unrepaired SSBs on the cell behavior. For that, we stopped the H₂O₂ treatment at day 21 of the combined treatment, but maintained at long term the Veliparib treatment, to maintain the SSBs unrepaired. We observed a rise in the number of SA- β -Gal-positive cells (Fig6B, Sup Fig20B and Sup Fig21B). This SA- β -Gal activity rising was correlated with a cell growth arrest from the 25th day (Fig6C and Sup Fig20A), an increased cell size, spreading and granularity (Fig6D and Sup Fig21A), an up-regulation of p16 expression, and a hypophosphorylation of Rb (Sup Fig21C). These data attest that a specific accumulation of SSBs results in premature senescence. This senescence was also accompanied by an increase in cell death (Sup Fig21D).

We then monitored the outcome of these senescent cells. We observed a growth recovery from the day 35 to 50 according to the experiment (Fig6C and Sup Fig20A), due to the appearance in the culture dishes of small cells with a stellate shape (Fig6D), which were SA- β -Gal negative (Fig6B) and resistant to 6-thioguanine in HPRT assays (Fig6E).

All these results suggest that the sole SSB accumulation is sufficient to induce a premature senescent state from which a few cells escape to generate repropagating, morphologically transformed and mutated daughter cells.

Discussion

Second sarcomas are a rare but very severe late side effect of radiation therapy. Several studies conclude that they could be due to the out-of-field dose affecting normal cells surrounding the treated volume^{9,11}. In this study, we investigated the effects of this out-of-field dose on normal fibroblasts in terms of DNA damage and cell outcome. We show that the out-of-field dose induces the formation of SSBs, but nearly no DSBs. Importantly, the SSBs accumulate during a mimicked standard therapeutic protocol, because of a lack of repair due to a decrease in the PARylation activity which establishes in the cells along the successive daily irradiations. The fibroblasts affected by this specific accumulation of unrepaired SSBs do not undergo cell death but enter in premature senescence. They remain stable in this senescent state for a while, and then a few of them re-enter cell cycle to generate a progeny of daughter cells displaying hallmarks of cancerous transformation. This scenario was established by robust *in vitro* experiments using proliferating or quiescent normal human fibroblasts derived from different donors, as well as by *in vivo* experiments in mice. It is, to our knowledge, the first scenario which could explain at the same time the latency period of second sarcoma emergence, underpinned by the long-life of senescent cells, and the preferential location of second sarcomas around the treated volume, underpinned by the specific accumulation in this area of non-lethal but mutagenic unrepaired DNA damages.

It is known that the marginal dose exponentially decreases with the distance from the limit of the beam^{9,10}. In accordance, we found that the quantity of DSBs approximately follows this exponentially decreasing dose. In contrast and surprisingly, SSBs were almost as numerous at several centimeters from the limit of the beam as inside the PTV. Moreover, we demonstrated that their formation necessitates continuity in the material from the PTV. This indicates that SSBs are induced by photons propagating inside the material, confirming several studies showing that the internal scattering is the major source of the dose deposited in the most proximal margin^{9,38}. Moreover, it can be hypothesized that the preferential generation of SSBs on DSBs in the margin could be the consequence of the tightening of the scattered photon spectral energy fluence distribution around lower energies^{9,11,12}. The experimental set-up of this study was designed to only address the question of the potential role of photons scattering from the PTV, without mixing with the bystander effect relying on molecules secreted by the irradiated cancer and normal cells present inside the PTV. Of course, in the patient context, these two mechanisms could add, even synergize, or perhaps oppose for the induction of DNA damages.

The results of this study also suggest that the ratio DSBs/SSBs is very important in the cell outcome determination. Indeed, our data show that cells, whether they are cancerous or normal, developed

both DSBs and SSBs when positioned inside the PTV, as already known³⁵, and consequently either underwent apoptosis in a few days, or more slowly entered a senescent-like state and then died. In contrast, normal cells positioned at the margin, which developed almost exclusively SSBs, or normal cells in which we induced almost exclusively SSBs by a co-treatment with a mild concentration of H₂O₂ associated with a PARP inhibitor did not die at a significant level but entered senescence. Normal human epithelial cells (keratinocytes and mammary epithelial cells) undergoing oxidative-stress induced senescence display an accumulation of unrepaired SSBs, in the absence of DSBs or telomere shortening²⁹.

Very importantly, in all these situations of SSB-induced senescence, a few cells systematically re-enter in S-phase to generate a progeny of daughter cells displaying neoplastic or pre-neoplastic properties (^{28,29} and results herein). In contrast, normal human dermal fibroblasts (the same as those used in the irradiation experiments of this study) having entered in replicative senescence because of DSBs and shortened telomeres, never undergo apoptosis and remain very stably arrested in G1 without ever escaping^{29,39}. This state of replicative senescence fits very well with the dogma equating senescence with tumor suppression⁴⁰. In contrast, SSB-induced senescence which is not so stable for a few of cells and source of cells harboring cancerous hallmarks has to be considered as a tumor-promoting state.

Senescence establishment implies the accumulation of DNA breaks, some of which having to remain unrepaired to sustain a prolonged activation of the cell cycle arrest pathways. This is true for replicative senescence in which shortened telomeres, which are assimilated to unrepaired DSBs, constantly activate the DDR pathway and downstream the tumor suppressor TP53 and its target p21, a Cyclin CDK Inhibitor (CKI)⁴¹. This is also true for SSB-induced senescence of human keratinocytes and mammary epithelial cells where unrepaired SSBs activate the up-regulation of p16²⁹, a major *in vivo* and *in vitro* senescence-associated CKI⁴². We now demonstrate this mechanism in the present study also for fibroblasts in which SSBs were induced by a mild H₂O₂ treatment associated with a PARP inhibitor. And most importantly, we now demonstrate this mechanism for cells submitted to out-of-field radiations in a radiotherapy-mimicking context. But why SSBs are not repaired in this radiotherapy context is not yet completely established. We established in this study that the repair capacities decline with the daily irradiations of a fractionated protocol, in correlation with a decline in the PARylation activity. However, we have not found any correlated PARP1 expression decline (data not shown). Therefore, our present simplest hypothesis is that PARP activity could decline just because of a progressive exhaustion of the NAD⁺ pool facing the high and continuous demand for SSB repair along the successive irradiations.

One major characteristic of cancer cells is their multiple mutations affecting oncogenes and tumor suppressor genes. The (pre-)neoplastic cells that are formed by SSB-induced senescence evasion display mutations and transformed characteristics including morphologic change and increased invasion capacity (²⁹ and results herein). The accumulation of unrepaired SSBs is the inducer of senescence, but paradoxically it is also the fuel for post-senescence evasion ²⁹, probably because of the mutagenic potential of unrepaired DNA breaks.

The results of this study open at least two therapeutic avenues to decrease the risk of developing a second cancer after radiotherapy. One could be to decrease the accumulation of unrepaired SSBs in peri-PTV cells by supplementing the patient by NAD⁺ precursors. However, this also should decrease the accumulation of SSBs in cancer cells, could decrease their rate of death and thereby compromise the cure. The other avenue could be to try to eliminate the senescent cells after the end of the treatment. It is now widely established that senescence contributes to multiple age-related dysfunctions and diseases, and eliminating senescent cells in mice delays or decreases the incidence of these disorders, including cancer ⁴³. This prompted several teams to develop drugs, called senolytics, specifically targeting senescent cells, to alleviate age-related disorders. There are presently two major senolytics whose efficacy was demonstrated *in vitro* and in mouse models, and which are subject to clinical trials ^{44,45}: (i) The BH3 mimetics ABT-737 and ABT-263 (an orally bioavailable derivative of ABT-737, also called Navitoclax). They target anti-apoptotic proteins of the BCL2 family (BCL2, BCLX, BCLW, MCL-1) ⁴⁶ whose overexpression at senescence contributes to the apoptosis resistance of senescent cells; (ii) The association of Dasatinib + Quercetin. Dasatinib is a large spectrum tyrosine kinase inhibitor known to interfere, amongst other, with ephrin dependence receptor pathways which protect senescent cells from apoptosis. Quercetin is a natural flavonoid which inhibits several types of kinases and serpins involved in survival pathways. Interestingly, Navitoclax, Dasatinib and Quercetin are or were used in anti-cancer treatments, meaning that their use after radiation therapy to prevent from a second cancer emergence should not hamper the efficacy of the radiotherapy, even could act additionally or synergistically with the treatment.

To conclude, in addition to have a clinical interest, studying post-radiotherapy second sarcoma is a model to study the very initial steps of tumorigenesis. Indeed, most often, these steps are inaccessible because affecting too few cells, of unknown type, altered by an unknown stressing or damaging agent. In the context of post-radiotherapy second sarcomas, the affected cells and the inducer are known. The very first tumorigenic event we highlight in this study involves the formation of discreet DNA damages –SSBs- often assumed to be of no consequence because easily repaired and not affecting the genome stability. We show here that cells adapt to these damages and survive at

long time by adopting the senescent phenotype. They thereby become a reservoir of potentially tumorigenic mutations.

References

- 1 M. Tubiana, *Radiother Oncol* **91** (1), 4 (2009).
- 2 L. B. Travis, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15** (11), 2020 (2006); K. R. Trott, *Phys Med* **42**, 221 (2017); A. Berrington de Gonzalez, E. Gilbert, R. Curtis et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **86** (2), 224 (2013).
- 3 J. Doyen, A. Courdi, and J. P. Gerard, *Cancer Radiother* **14** (4-5), 255 (2010).
- 4 C. Vautravers, S. Dewas, G. Truc et al., *Cancer Radiother* **14** (1), 74 (2010).
- 5 A. Martling, K. E. Smedby, H. Birgisson et al., *The British journal of surgery* **104** (3), 278 (2017).
- 6 A. S. Holmqvist, Y. Chen, J. Berano Teh et al., *Cancer* **125** (8), 1373 (2019).
- 7 W. Dorr and T. Herrmann, *J Radiol Prot* **22** (3A), A117 (2002).
- 8 I. Diallo, N. Haddy, E. Adjadj et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **74** (3), 876 (2009).
- 9 N. Chofor, D. Harder, K. C. Willborn et al., *Physics in medicine and biology* **57** (6), 1733 (2012).
- 10 S. F. Kry, U. Titt, D. Followill et al., *Medical physics* **34** (9), 3489 (2007); T. Wiezorek, A. Schwahofner, and K. Schubert, *Strahlenther Onkol* **185** (10), 696 (2009).
- 11 N. Chofor, D. Harder, K. Willborn et al., *Zeitschrift fur medizinische Physik* **21** (3), 183 (2011).
- 12 C. Kirkby, C. Field, M. MacKenzie et al., *Physics in medicine and biology* **52** (12), 3563 (2007).
- 13 E. C. Jonathan, E. J. Bernhard, and W. G. McKenna, *Curr Opin Chem Biol* **3** (1), 77 (1999).
- 14 R. A. Panganiban, A. L. Snow, and R. M. Day, *Int J Mol Sci* **14** (8), 15931 (2013).
- 15 E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin, and D. Pain, *Cancer Lett* **327** (1-2), 48 (2012).
- 16 K. W. Caldecott, *Nat Rev Genet* **9** (8), 619 (2008).
- 17 K. W. Caldecott, *Exp Cell Res* **329** (1), 2 (2014); R. E. London, *DNA Repair (Amst)* **30**, 90 (2015).
- 18 C. J. Norbury and I. D. Hickson, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 367 (2001).
- 19 J. Dahm-Daphi, C. Sass, and W. Alberti, *International journal of radiation biology* **76** (1), 67 (2000).
- 20 A. Berrington de Gonzalez, A. Kutsenko, and P. Rajaraman, *Clinical sarcoma research* **2** (1), 18 (2012); D. G. Sheppard and H. I. Libshitz, *Clinical radiology* **56** (1), 22 (2001).
- 21 H. H. Storm, *Cancer* **61** (4), 679 (1988); J. H. Olsen, T. Moller, H. Anderson et al., *J Natl Cancer Inst* **101** (11), 806 (2009); D. L. Friedman, J. Whitton, W. Leisenring et al., *J Natl Cancer Inst* **102** (14), 1083 (2010).
- 22 Y. M. Kirova, J. R. Vilcoq, B. Asselain et al., *Cancer* **104** (4), 856 (2005).
- 23 I. Ben-Porath and R. A. Weinberg, *Int J Biochem Cell Biol* **37** (5), 961 (2005).
- 24 C. Abbadie, O. Pluquet, and A. Pourtier, *Cell Mol Life Sci* (2017).
- 25 J. Cmielova, R. Havelek, A. Jiroutova et al., *Physiol Res* **60** (4), 667 (2011); M. Suzuki, M. Yamauchi, Y. Oka et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **83** (2), e241 (2012); M. A. Seol, U. Jung, H. S. Eom et al., *J Vet Sci* **13** (4), 331 (2012).
- 26 S. Martien and C. Abbadie, *Ann N Y Acad Sci* **1119**, 51 (2007); O. Pluquet, A. Pourtier, and C. Abbadie, *Am J Physiol Cell Physiol* **308** (6), C415 (2014).
- 27 J. Campisi and F. d'Adda di Fagagna, *Nat Rev Mol Cell Biol* (2007).
- 28 E. Deruy, J. Nassour, N. Martin et al., *Cell Death Dis* **5**, e1577 (2014); K. Gosselin, S. Martien, A. Pourtier et al., *Cancer Res* **69** (20), 7917 (2009); N. Martin, C. Salazar-Cardozo, C. Vercamer et al., *Mol Cancer* **13** (1), 151 (2014).
- 29 J. Nassour, S. Martien, N. Martin et al., *Nat Commun* **7**, 10399 (2016).
- 30 N. Malaquin, C. Vercamer, F. Bouali et al., *PLoS One* **8** (5), e63607 (2013).
- 31 A. L. Depla, C. H. Scharloo-Karels, M. A. A. de Jong et al., *Eur J Cancer* **50** (10), 1779 (2014).
- 32 V. Gire and V. Dulic, *Cell Cycle* **14** (3), 297 (2015).
- 33 T. Matsumura, *Adv Exp Med Biol* **129**, 31 (1980); D. Dikovskaya, J. J. Cole, S. M. Mason et al., *Cell reports* **12** (9), 1483 (2015).
- 34 U. Hagen, *Radiation and environmental biophysics* **33** (1), 45 (1994).
- 35 J. A. Reisz, N. Bansal, J. Qian et al., *Antioxid Redox Signal* **21** (2), 260 (2014).

36 C. K. Donawho, Y. Luo, Y. Luo et al., *Clin Cancer Res* **13** (9), 2728 (2007).
37 A. Furlan, C. Vercamer, X. Desbiens et al., *J Cell Physiol* **215** (3), 782 (2008).
38 B. Lee, S. H. Ahn, H. Kim et al., *Journal of applied clinical medical physics* **17** (5), 124 (2016).
39 F. d'Adda di Fagagna, P. M. Reaper, L. Clay-Farrace et al., *Nature* **426** (6963), 194 (2003).
40 J. L. Kirkland and T. Tchkonja, *EBioMedicine* **21**, 21 (2017); J. W. Shay and I. B. Roninson, *Oncogene* **23** (16), 2919 (2004); J. Campisi, *Trends Cell Biol* **11** (11), S27 (2001); J. Campisi, *Cell* **120** (4), 513 (2005).
41 F. Rossiello, U. Herbig, M. P. Longhese et al., *Curr Opin Genet Dev* **26**, 89 (2014).
42 S. He and N. E. Sharpless, *Cell* **169** (6), 1000 (2017); H. Rayess, M. B. Wang, and E. S. Srivatsan, *Int J Cancer* **130** (8), 1715 (2012).
43 D. J. Baker, T. Wijshake, T. Tchkonja et al., *Nature* **479** (7372), 232 (2011); E. O. Wissler Gerdes, Y. Zhu, T. Tchkonja et al., *The FEBS journal* (2020).
44 J. Pan, D. Li, Y. Xu et al., *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **99** (2), 353 (2017).
45 J. Chang, Y. Wang, L. Shao et al., *Nat Med* **22** (1), 78 (2016).
46 C. M. Adams, S. Clark-Garvey, P. Porcu et al., *Frontiers in oncology* **8**, 636 (2019).

Acknowledgments

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Lille, the Ligue contre le Cancer (Comité du Pas-de-Calais, Comité de la Somme, Comité du Nord), the Institut Pasteur de Lille, the SIRIC OncoLille (Grant INCa-DGOS-Inserm 6041), the Agence Nationale de Recherche (ANR-10-EQPX-04-01), and the Feder (12001407 (D-AL)). E.G has a fellowship from the Institut Pasteur de Lille and the Région Hauts-de-France. M.T. had a fellowship from the Université de Lille. C.F. had a fellowship from the European Erasmus program. J.N. had fellowships from the Université de Lille and from the Association pour la Recherche sur le Cancer. L.S. and C.D. had fellowships from the Région Hauts-de-France. We thank Thomas Lacornerie for giving access to the Varian Clinac® and for performing dose profiles. We thank the Bioimaging Center Lille-Nord de France (Campus Calmette), especially Antonino Bongiovanni and Hélène Bauderlique for imaging and cytometry facilities. We thank the PLETHA animal facility, especially Thierry Chassat and David Hannebique. We thank David Dombrowicz for giving access to the BD Influx (Becton Dickinson®). We thank Benoit Vatrinet, Anaïs Engrand and Olivier Samyn for technical help. The authors have no conflicting financial interests.

Author contributions

E.G. conceived and performed experiments, and help writing the paper. M.T., C.F., N.M., E.B., L.S., C.D., A.V., and O.M-C. conceived and performed experiments. N.P. provided initial idea, expertise and feedback. J.B provided expertise and feedback and performed experiments. P.B., G.G., O.P., A.P. F.C., and E.L. provided expertise and feedback. C.A. directed the research, designed the experiments, secured fundings and wrote the paper.

Declaration of interest

The authors declare no competing interests.

Figure legends

Figure 1: Growth curves and cell death level of MDA-MB231 and NHDFs positioned at the margin or inside a PTV receiving 2Gy/day

(A) Growth curves of MDA-MB231 positioned inside the PTV and irradiated or not during 3 weeks. (B) Growth curves of NHDFs (donor F6MC1, PD=30.36 at the beginning of the experiment) positioned straddling the PTV and the margin irradiated or not during 3 weeks. Cells were counted at each passage using a Malassez chamber. Each point represents the mean +/- SD of 3 counts from 3 independent culture plates. T-tests were performed for each counting in comparison to non-irradiated cells. (C) MDA-MB231 positioned inside the PTV and NHDFs (donor F6MC1, PD= 33.05 at the beginning of the experiment) positioned straddling the PTV and the margin were irradiated or not up to 6 times. The level of cell death was measured 8hrs after the last irradiation. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 measures. Caspase-independent cell death refers to cells negative for caspase activity and positive for propidium iodide. Early apoptosis refers to cells positive only for caspase activity. Late apoptosis refers to cells positive for both caspase activity and propidium iodide. T-tests were performed between the total percentages of cell death of each condition in comparison to non-irradiated condition.

Figure 2: NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day undergo senescence

Six-well plates of NHDFs (donor F1MC1, PD=25.8 at the beginning of the experiment) positioned straddling the PTV and the margin were irradiated during 3 weeks at 2Gy per day except week-ends. Cells were analyzed 24hrs or 72hrs after the last irradiation by flow cytometry for their SSC and FSC values, representing the granularity and the size of the cells respectively, and for their SA- β -Gal activity using the fluorogenic C12FDG substrate. (A) Examples of dot plots used to characterize senescent cells. The dot plots represent the size (FSC) and granularity (SSC) measures of NHDFs. The gate P2 correspond to cells with the highest size and granularity established by comparing non-irradiated exponentially growing NHDFs to replicative senescent NHDFs. The color scale of the dots represents their SA- β -Gal activity, with the blue color representing a low activity and an orange color a high activity. The middle panels are examples of C12FDG measures after 15 irradiations (Day 25). The right panel illustrate the gate of the biggest and most granular cells that was set by comparing non-irradiated exponentially growing NHDFs (left panel) to NHDFs at replicative senescence plateau

(PD=61.03). (B) SA- β -Gal activity measured 24 or 72hrs after the last irradiation by flow cytometry using the fluorogenic C12FDG substrate. The results are given as the mean C12FDG fluorescence intensity. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean \pm SD of the 3 measures. T-tests were performed for each condition in comparison to non-irradiated cells. (C) SSC and FSC values, representing the granularity and the size of the cells respectively, were measured by flow cytometry on the same cells and at the same time as the C12FDG fluorescence. Each bar shows the percentage of cells with the highest FSC and SSC values. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean \pm SD of the 3 measures. T-tests were performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

Figure 3: SSBs and DSBs generated in NHDFs positioned at the margin or inside a PTV having received 2Gy

(A) Proliferating NHDFs (donor F1MC1, PD=32) positioned straddling the PTV and the margin were irradiated once at 2Gy. Cells were fixed 20min or 2hrs later for the immunodetection of XRCC1 and 53BP1 respectively. XRCC1 and 53BP1 foci were quantified by high content microscopy. The bar chart represents the mean number \pm SD of foci per cell in 100 cells of all wells of a column. An ANOVA test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs. (B) Proliferating NHDFs (F6MC1, PD=20.53) were irradiated as in A, immediately put at 10°C for 30min and then processed for comet assays. Each dot in the scatter plots represents the value of the tail moment of one cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean \pm SD of tail moment values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

Figure 4: Mice positioned at the margin of a phantom mimicking a PTV irradiated once at 2Gy have a significant increase of XRCC1 foci

(A) Schematic representation of how mice were irradiated. (B) Mice were sacrificed 1hr after irradiation. Skin samples at different distances from the isodose 50 (the spine), established as the zero, were dissected and fixed for the immunodetection of XRCC1 and 53BP1. XRCC1 and 53BP1 foci of dermal cells were quantified by confocal microscopy. Each dot in the scatter plots represents the number of XRCC1 or 53BP1 foci of one dermal cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean \pm SD of foci number values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni

correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated mice. The lower panel shows representative fluorescent microscopic images of XRCC1 or 53BP1 foci in red and nucleus stained by DAPI in blue.

Figure 5: Some radio-induced senescent cells generated in the margin escape from senescence to generate a progeny of cells which repropagate, have an increased invasion capacity and display mutations

(A) NHDFs (donor F6MC1, PD=29.6 at the beginning of the experiment) positioned straddling the PTV and the margin were irradiated or not during 2 weeks ($10 \times 2\text{Gy}$). Cells were counted at each passage using a Malassez chamber. After two weeks of irradiation, the senescent cells generated in the margin were sorted according to their size, granularity, and SA- β -Gal activity (see parameters of sorting in Sup Fig16). After sorting, cells were put again in culture and followed at long term. (B) Phase contrast microscopic images of cells of the margin 24hrs and 2 weeks post-sorting. The blue arrows indicate cells with a senescent morphology. The black arrows indicate cells that have not replated. The white arrows indicate small repropagating cells. (C) HPRT assays performed on cells having regrown from sorted senescent cells generated in the margin referred as PSNE (Post Senescence Neoplastic Emerging cells) and on non-irradiated exponentially growing NHDFs at 17PDs (used as control for normal cells). The bars indicate the mean \pm SD of three measures of the percentage of 6-TG resistant cells. (D) MMP activity analysis of culture supernatant from PSNE or exponentially growing cells by 0.1% gelatin Zymograph. Arrows show bands of digested gelatin. (E) Migrating and invasive capacities were assayed in Boyden chambers without or with Matrigel respectively. Cells that have passed across the filters were counted in 5 fields per chamber in 3 different chambers for each condition. Each bar represents the mean \pm SD of the number of cells per field. T-tests were performed for comparing exponentially growing and PSNE cells.

Figure 6: An SSB accumulation is enough to induce senescence and post-senescence neoplastic escape

(A) Analysis of XRCC1 foci by immunofluorescence on NHDFs (F1MC1, DP=44.07 at the beginning of the experiment) treated daily or not with Veliparib at $1\mu\text{M}$ in combination with H_2O_2 at $5\mu\text{M}$ during 21 days and then with Veliparib alone. Each point represents the mean number of XRCC1 foci per nuclear focal plane at indicated time of treatment from 100 nuclei per condition. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point. (B) SA- β -Gal assays.

Each bar represents the mean \pm SD percent of SA- β -Gal-positive cells in an X-gal assay from 5 independent microscopic fields. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point. (C) Growth curves of the same cells. (D) Representative phase contrast microscopy images of cell morphologies. (E) HPRT assays performed on PSNE cells having regrow after the senescent plateau and on non-treated exponentially growing NHDFs (Exp. Growth) at 22PDs as control. The bars indicate the mean \pm SD of three measures of the percentage of 6-TG resistant cells. T-tests were performed for comparing exponentially growing cells and emerging cells.

Materials and Methods

Cell cultures

NHDFs were purchased from Promocell. Batches from three different donors were used in this study: F1MC1 from a male Caucasian donor 1 year-old, F6MC1 from a male Caucasian donor 6 years-old, and F26FC1 from a female Caucasian donor 26 years-old. Cells were grown at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and at the atmospheric O₂ tension. The culture medium was the FGM-2 bulletkit medium (CC-3132, Lonza). It consists in Fibroblast Basal Medium (FBM, CC-3131 from Lonza) supplemented by 2% Fetal Bovine Serum (FBS), human Fibroblast Growth Factor (hFGF), Insulin at 5mg/mL, Gentamicin at 50µg/mL and Amphotericin at 50µg/mL. Cells were seeded at 3,500 cells/cm² and subcultured at 70% confluence. The number of population doublings (PDs) was calculated at each passage by using the following equation: $PD = \log(\text{number of collected cells}/\text{number of plated cells})/\log 2$.

MDA-MB-231 were purchased from European Collection of Authenticated Cell Cultures (92020424, ECACC). They were cultivated in DMEM (high glucose: 4,5g/L) medium (41965039, Lifetech) supplemented by 1mM sodium pyruvate (11360070, Gibco), 10% FBS (CVFSVF00-0U, Eurobio), 0,1mM non-essential amino acids (11140-035, Gibco), and 10µg/mL gentamicin (15710-049, Gibco).

Irradiations

Cells were plated 10hrs before irradiation in 6-, 12- or 96-well plates, according to the experiment. Plates were positioned straddling the light field boundary indicating the isodose 50, in order to get at least one well column inside the PTV and several well columns spreading over the margin. In each figure, the margin is indicated in terms of distance from the limit of the light field which is referred as the 0. At this position, the deposited dose is 50% of that in the PTV. The exact size of the margin varied with the used plate and its exact position in each experiment. Cells were irradiated using a Varian Primus CLINAC® used in photon mode at 20MV in all experiments, except in Sup Figure 11 where it was also used at 6MV. In all experiments, non-irradiated plates were kept outside the bunker. Cells were always irradiated at 2Gy, either once or each day except week-ends, up to 3 weeks.

SKH1-E mice were anesthetized using isoflurane (5% for induction and 2% during the experiment with 0.8L/min of oxygen). They were putted beside a phantom made of PMMA plates. The contact between the mouse and the phantom was ensured by an ultrasound transmission gel. The irradiation was planned in depth so that 100% of the dose was deposited in the phantom at the level of the

mouse flank skin, and in width so that the isodose 50 was juxtaposed to the spine. A group of mice, used as positive control, was irradiated total body at 2Gy. Another group of mice, used as negative control, was manipulated as the others and kept outside the bunker. The irradiations were performed using an Elekta Precise® accelerator used in photon mode at 6MV.

Cell death analysis

Vibrant FAM polycaspase assay (V35117, Molecular Probes) was used as recommended by the manufacturer. Briefly, cells were harvested, incubated with the kit reagent solution for 1hr at 37°C. After having been washed with the wash buffer provided in the kit, cells were incubated with propidium iodide (1µg/mL) for 15min on ice. Then, cells were analyzed by flow cytometry on a BD FACSCanto II (Becton Dickinson). Data analyses were made using the FACSDiva 6.0 software (BD Biosciences).

Cell senescence marker analyses

Cells were incubated for 2hrs with 33µM C12FDG (a fluorogenic substrate of β-Galactosidase). Cells were washed with PBS and analyzed by flow cytometry for the forward scatter factor and side scatter factor values and C12FDG intensity on a BD FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson) or on a BD Influx (Becton Dickinson). Data analyses were made using the FACSDiva 6.0 software (BD Biosciences) or FlowjoV10.

Alternatively to using C12FDG as a substrate for the β-Galactosidase, we used X-Gal. Cells were fixed with 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde in PBS for 4min on ice. After a rapid wash with PBS, cells were incubated at 37°C for 7hrs in the X-Gal reaction mixture (1mg/mL X-Gal, 40mM phosphate buffer (pH6), 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂). The blue cells considered as SA-β-Gal positive were manually counted in at least 5 independent fields for a total of at least 100 cells for each condition.

Immunofluorescence

Cells were fixed on ice with cold acetone/methanol (v/v) or with PFA 4% at room temperature for 10min and washed with PBS. Cells were permeabilized with a triton X-100 solution at 0.2% in PBS followed by PBS washing. Unspecific sites were blocked by incubation at room temperature with a

5% non-fat milk solution in PBS. Then, epitopes were detected by incubation overnight with antibodies against XRCC1 (ab47920 or ab1838, Abcam; sc-11429, SantaCruz Biotechnology), 53BP1 (sc-22760, SantaCruz Biotechnology), pXRCC1 (A300-059A, Bethyl Laboratories), hOGG1 (B01P, Abnova), PNKP (Ab 170954, Abcam), or PAR chains (AM80, Calbiochem). After washing with PBS, cells were incubated with the secondary antibody (Life Technologies, A21206 and A-21202) followed by nuclear staining with 300nM DAPI (Life technologies, D1306).

The 96-well plates were analyzed on a high content microscope (Operetta High-Content Imaging System). For each well, a hundred images were taken. The images were analyzed using the Columbus software (associated to the machine) to detect the nuclei and the fluorescent foci inside the nuclei. The other plates were analyzed using a confocal microscope LSM 880 or an AxioImager Z1-Apotome from Zeiss. Images were analyzed using Zen (Zeiss) or ImageJ (NIH) softwares.

Comet assays

Cells were suspended in low melting point agarose at 0.5% in PBS at 42°C. The suspension was then immediately spread on a comet slide (4250-200-03, Trevigen). Agarose was allowed to cool-down 20min at 4°C. Then, cell membranes were permeabilized with a lysis solution (1.2M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 (pH10)) at 4°C, for 1hr. Slides were then equilibrated in electrophoresis buffer (for pH8: 89mM Tris-base, 89mM boric acid and 2mM EDTA; for pH12.3: 300mM NaOH, 1mM EDTA) at 4°C. Then, an electrophoresis field of 40V (15mA) was applied during 30min for pH8 and of 60V (90mA) during 5min for pH12.3, at 4°C. The electrophoretic migration was stopped by neutralizing the pH in a bath of cold water for 10min. DNA was stained with SYBRGreen (X1000; Molecular Probes) according to manufacturer's recommendation. The slides were photographed under an AxioImagerZ1 Apotome (Zeiss) microscope. The images were analyzed using an ImageJ in-home macro in which the head (the nucleus) and the tail (the DNA that migrated) of the comet are delimited in order to get the fluorescence intensity of the head, the fluorescence intensity of the tail and the length of the tail. The calculation of tail moments was done using the formula: (length of the comet tail x fluorescence intensity of the tail)/total fluorescence intensity (head+tail).

Senescent cell sorting

Senescent NHDFs were sorted on a BD Influx (Becton Dickinson®) equipped with a 200µm nozzle, tuned at a pressure of 3.7psi and a frequency of 6,200 kHz. Sample fluid pressure was adjusted to

reach an event rate of 1,000 events/sec. Senescent cells were gated as those having the highest fluorescent intensity for the C12FDG staining accompanied by the highest forward and side scatter factor values. This senescent population was electrostatically sorted in air, collected in complete culture medium and cultured again as described above.

In-gel zymography assays

The presence of latent and active forms of MMPs secreted into the culture medium was assayed as previously described³⁷. Cells were incubated overnight with a serum free (i.e. gelatinase free) medium. Cell culture media were collected and concentrated using a Vivaspin 6.5kDa (VS0611, Sartorius stedim). Cell culture media were diluted in 4X non-denaturing sample buffer (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 40% glycerol, 10% SDS, 0.1% bromophenol blue) and separated on 10% acrylamide-bisacrylamide (v/v) gels containing 1% gelatin as a MMP substrate. After running at a steady voltage of 125V for 90min, the gels were incubated at room temperature with 2.5% Triton X-100 for 1hr. Subsequently, the gels were incubated in 50mM Tris-HCl pH7.5, containing 0,2M NaCl, 5mM CaCl₂ and 0.25% triton X100 at 37°C for 15hrs. Then, they were stained for 3hrs with a solution containing 0.5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 5% (v/v) methanol and 10% (v/v) acetic acid, then destained for getting contrast with 10% (v/v) methanol and 5% (v/v) acetic acid.

Migration and invasion assays

NHDFs were suspended in a serum free FGM-2 medium at 1×10^5 cells/mL. 200 μ L of this suspension was loaded on the top of Boyden chambers, uncoated for migration assays (353097, corning) or coated with Matrigel for invasion assays (354480, corning). A complete FGM-2 medium with serum was added in the lower chamber. Cells were incubated 24hrs at 37°C with 5% CO₂. Afterward, cells were fixed with cold ethanol on ice for 10min. Cells remaining on the upper side of the filters were removed using a cotton swab. Cells which have reached the bottom side of the filters were stained with a 0.25% Crystal violet (C3886, Sigma-Aldrich) solution in 70% ethanol and manually counted.

HPRT assays

Cells were exposed to 100 μ M 6-thioguanine (6-TG) (A4882, Sigma) twice per day for up to 14 days. At different time points, cells were stained with 0.05% crystal violet in 70% ethanol. For quantifying the

results, the crystal violet was re-dissolved in 2% SDS in distilled water. The color intensity was then quantified by measuring the absorbance at 570nm. To get the percentage of 6-TG resistant cells, the absorbance value of 6-TG treated cells was divided by that of DMSO-treated cells and normalized by that of cells at day 0.

Statistical analyses

We used the D'Agostino-Pearson normality test to determine if the data distribution was normal. When the data distribution followed a normal law, we used one-way ANOVA to evaluate the differences among more than three groups, and/or Student's t-test to evaluate the differences between two groups. When the data distribution was not normal, we used a Kruskal-Wallis test to evaluate the differences among more than three groups, and/or a Wilcoxon test to evaluate the differences between two groups. We used a Chi-squared test to evaluate the difference between populations of 10,000 cells analyzed by flow cytometry. The p values are indicated in the diagrams with * for p values < 0.05, ** for p values < 0.01 or *** for p values < 0.001. When p values > 0.05, differences were considered as non-significant and noted NS.

Supplementary Materials and Methods

Determination of the depth profile of the Varian Primus CLINAC®

The depth profile of the Varian Primus CLINAC® was established using a water tank and an ionization chamber. The Varian Primus CLINAC® was used in photon mode at 20 MV. The measures were done at the isocenter.

Determination of the dose deposited in well culture plates by the Varian CLINAC®

96-, 12- or 6-well culture plates laid down a 4cm-PMMA plate was imaged using a tomodensitometer. A dosimetry study was then performed using the System Treatment Planning of the Centre Oscar Lambret for an irradiation beam of 20 MV covering half of the plate, the other half being in the margin.

AnnexinV/PI assay

The Annexin V/PI assay (V13241, Molecular Probe) was used as recommended by the manufacturer. Briefly, cells were harvested, incubated with Alexafluor488-AnnexinV and propidium iodide (1µg/mL) for 15min at room temperature. Then, the cells were diluted in the buffer provided by the kit and analyzed by flow cytometry on a BD FACSCanto II (Becton Dickinson). Data analyses were made using the FACSDiva 6.0 software (BD Biosciences).

Cell cycle analysis

Cells were fixed overnight in ethanol 70% at 4°C. Then, they were rinsed with PBS and incubated 30min at 37°C with PBS containing 10µg/mL RNase A, 20µg/mL propidium iodide, and 0,5% triton X-100. Cells were kept on ice until analysis with a BD FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson). Data analyses were made using FlowjoV10.

Quantitative real-time PCR

RNAs were extracted using the NucleoSpin RNA kit (REF 740955, Macherey-Nagel). 1µg of total RNA was reverse-transcribed with Superscript IV (18091050, Invitrogen) completed with random hexamers and dNTPs according to manufacturer instruction. Mx3005P (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used for the real-time PCR. Primers were designed with the qPrimerDepot software (<http://primerdepot.nci.nih.gov/>). For p16 (*cdkn2a*): TGCCTTTTCACTGTGTTGGA and GCCATTTGCTAGCAGTGTGA; for EAR: GAGGCTGAGGCAGGAGAATCG and GTCGCCCAGGCTGGAGTG; for p21 (*cdkn1a*): ATGAAATTCACCCCTTCC and CCCTAGGCTGTGCTCACTTC. PCR products were detected using SYBR Green fluorescence (SYBR Green Master Mix, Life Technologies). Measures were performed in triplicate for each data point. Results were analyzed by the manufacturer software MxPro (Agilent). The expressions of p16 and p21 were normalized to that of EAR.

Multinucleated cell counting

Immunofluorescence experiments were reanalyzed to count the number of nuclei per cells. Fluorescent microscopy photos were taken with the AxioImager Z1 Apotome (Zeiss) with the filter sets from Zeiss® 43 (excitation: BP 550+/-25; emission: BP 605+/-70) or 38 (excitation: BP 470 +/-40; emission: BP 525+/-50). Multinucleated cells were manually counted. We considered a cell as multinucleated when two or more nuclei were located in the same continuous fluorescent area.

JC-1 staining

Mitochondrial viability was assessed by incubating cells with the JC-1 probe (T3168, Thermofisher) at 1µM in FBM medium without serum and antibiotics for 30min at 37°C. Then, fibroblasts were harvested and washed twice in PBS. The fluorescence was analyzed with a BD FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson) at 488nm (green) and 590nm (red). Data analyses were made using the FACSDiva 6.0 software (BD Biosciences). The ratio red/green was normalized on that of non-treated cells.

Western-blot

Cells were lysed in Laemmli buffer (25mM Tris-HCl pH6.8; 2% SDS; 10% glycerol; 2.5% β-mercaptoethanol; 0.01% bromophenol blue). Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred on nitrocellulose membranes (88018, Thermo Fischer Scientific). Membranes were blocked with 5% non-fat dried milk or 5% BSA in PBS. Then, membranes were

incubated overnight with the primary antibody at the dilution recommended by the manufacturer: anti-PAR (AM80, Calbiochem), anti-GAPDH (sc-32233, Santa Cruz Biotechnology), anti-Rb (#9309, Cell Signaling), anti-Phospho-Rb (#9308, Cell Signaling), anti-p16 (550834, BD Pharmingen). Secondary antibodies used were: anti-mouse and anti-rabbit peroxidase conjugated (respectively 715-035-151, 711-035-152, Jackson-immuno research Laboratories) or anti-mouse fluorescent dye conjugated secondary antibody (926-32210, Li-cor). The peroxidase activity was revealed using an ECL kit (RPN2106, Amersham Biosciences) or SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (34076, Thermo Fischer Scientific). For fluorescent western-blot, total protein used for normalization was detected by using the Revert 700nm Total Protein Stain (926-110.21, Li-cor).

Supplementary Figure legends

Supplementary Figure 1: Physical parameters of the linear accelerator (Varian Primus CLINAC®)

(A) Image of the Varian Primus CLINAC® used in the study (except experiments on mice). (B) Varian Primus CLINAC®'s depth profile recorded in photon mode at 6 or 20MV.

Supplementary Figure 2: Cell irradiation set-up

(A) Schematic representation of how 96-, 12- or 6-well plates were irradiated. Plates were putted down a 2- or 4cm-thick poly(methyl methacrylate) (PMMA) plate laid on the carbon fiber table for an irradiation at 6 or 20MV respectively and irradiated from below. (B) Schematic representation of how well plates were positioned in order to have at the same time wells inside the PTV and outside, in the margin. The red line represents the limit of the light field at which the deposited dose is 50% of that in the PTV. (C) Scanning of a 12-well plate and calculation of the dose deposited by a 20MV beam using the treatment planning system of the Centre Oscar Lambret (Lille). The limit of the beam (isodose 50) is indicated by the yellow line. (D) Isodose curves for a 12-well plate. Note that the bottom of the wells inside the PTV did receive 100% of the dose. Similar results were obtained with 96- and 6-well plates.

Supplementary Figure 3 (in complement to Fig1): Growth curves and cell death level of NHDFs positioned at the margin or inside a PTV receiving 2Gy/day

(A) Growth curves of NHDFs (donor F1MC1, PD=26.3 at the beginning of the experiment) cultured in 6-well plates irradiated at 2Gy per day except week-ends during three weeks. The days of irradiation are indicated with an arrow. Cells were counted at each passage using a Malassez cell counting chamber. Each point represents the mean +/- SD of three measures from three independent culture plates. T-tests were performed for each counting in comparison to non-irradiated cells. (B) MDA-MB231 cultured in 100mm dishes were irradiated or not at 2Gy per day except week-ends up to 6 irradiations. The dishes were entirely located inside the PTV. NHDFs (in A: donor F1MC1, PD=28 at the beginning of the experiment; in B: donor F6MC1, PD=20.29 at the beginning of the experiment) cultured in 6-well plates were irradiated, positioned as indicated in sup figure 2A. The level of cell death was measured 8hrs or 96hrs after the last irradiation by flow cytometry using the Alexa Fluor

488 AnnexinV/Dead Cell Apoptosis kit (Life Technologies). Apoptosis was recorded as AnnexinV-positive and PI-negative cells. Non-apoptotic cell death was recorded as AnnexinV-positive and PI-positive cells. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 measures. (C) Total cell death was recorded as AnnexinV-positive cells. Each condition was performed in triplicate. Each bar represents the mean +/- SD of the 3 measures. T-tests were performed between the total percentages of cell death of each condition in comparison to non-irradiated condition.

Supplementary Figure 4 (in complement to Fig3): NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day undergo senescence

NHDFs (donor F6MC1, PD=32.4 at the beginning of the experiment) cultured in 12-well plates were irradiated or not at 2Gy each day except week-ends for a total of 10 irradiations. Plates were positioned with one row of wells inside the PTV and three rows in the margin. (A) The SA- β -Gal activity was measured 72hrs after the 10th irradiation by flow cytometry using the fluorogenic C12FDG substrate. NHDFs at replicative senescence plateau (PD= 55.8) were used for comparison. The results are given as the median C12FDG fluorescence intensity. A Chi-square test was done to compare the fluorescence intensity of each of the 10,000 irradiated or senescent NHDFs to non-irradiated NHDFs. (B) The SSC and FSC values were measured by flow cytometry on the same cells and at the same time as the C12FDG fluorescence. Each bar gives the percentage of cells with the highest FSC and SSC values. The gate was established by comparing non-irradiated exponentially growing NHDFs to NHDFs at the replicative senescence plateau (PD= 55.8).

Supplementary Figure 5: NHDFs positioned at the margin of the PTV receiving 2Gy/day become cell cycle arrested in G1

NHDFs (donor F1MC1, PD=25.8 at the beginning of the experiment) cultured in 6-well plates were irradiated or not at 2Gy per day except week-ends up to 13 times. NHDFs at replicative senescence plateau (PD=61.03) were used for comparison. Cells were analyzed 24hrs after the 13rd irradiation by flow cytometry with propidium iodide staining. Each condition was performed in duplicate and analyzed with Flowjo V10. The upper panels show representative cell cycle histograms. The lower bar charts represent the mean of the 2 measures. Each bar represents a cell cycle phase. Sub-G1 represents dying cells. Super-G2 represents polyploid cells or doublets.

Supplementary Figure 6: Induction of p16 and p21 expression in NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day

NHDFs (donor F6MC1, PD=18 at the beginning of the experiment) cultured in 12-well plates were irradiated or not at 2Gy per day except week-ends for different durations (2x2Gy, 5x2Gy, 10x2Gy). The expressions of p16 (A) and p21 (B) were analyzed by RT-qPCR. Each condition was done in triplicate. The bar charts represent the mean fold change \pm SD of p16 or p21 mRNA abundance compared to non-irradiated cells from the three measures of each condition. A student-test was performed for each condition in comparison to non-irradiated cells. (C) Western Blot analysis of p16 protein levels after 10x2Gy with a resting time of one week. Total protein stain is used as loading control. P16 expression was compared to the non-irradiated cells for each condition. (D) The percent of p16-positive nuclei was calculated from immunofluorescence anti-p16 of almost 100 cells. A Chi-square test was done to compare the percent of p16-positive cells between irradiated and non-irradiated cells. (E) Representative images of immunofluorescence used to calculate the percent of p16-positive nuclei. The scale bar represents 20 μ m.

Supplementary Figure 7: A significant proportion of NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day become multinucleated

Three independent series of fluorescent microscopy photos from 3 immunofluorescence experiments were analyzed for the presence of multinucleated cells. In these experiments, NHDFs were irradiated in 12-well plates at 2Gy/day for two weeks. Nuclei were detected by the DAPI staining and the cell limits were determined by using the cell autofluorescence at 605 \pm 70nm or 525 \pm 50nm. (A) About 100 cells were manually counted for each condition. Each bar represents the mean \pm SD of the percent of multinucleated cells in the three series. T-tests were performed for each condition in comparison to the non-irradiated condition. (B) Representative images of multinucleated cells visualized at 605 \pm 70nm or 525 \pm 50nm. The white arrows point multinucleated cells. Scale bar = 50 μ m.

Supplementary Figure 8 (in complement to Fig4): SSBs and DSBs generated in NHDFs derived from different donors positioned at the margin or inside a PTV receiving 2Gy

Proliferating NHDFs (F26MC1, PD=6.2; F1MC1, PD=24.3) cultured in 12-well plates were irradiated at 2Gy and then processed for comet assays as in Figure 4B. Each dot in the scatter plots represents the value of the tail moment of one cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of tail moment values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

Supplementary Figure 9 (in complement to Fig4): 53BP1 and XRCC1 foci after an irradiation with 6 and 20 MV photon beams

Proliferating NHDFs (donor F1MC1, PD=39) cultured in 96-well plates were irradiated as in Figure 4 at 2Gy by a photon beam of 6 or 20MV. XRCC1 and 53BP1 foci were detected and analyzed as in Figure 4A. An ANOVA with a Bonferroni correction was performed for each condition in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs. A T-test was performed to compare for each distance the number of XRCC1 or 53BP1 foci between 20MV and 6MV.

Supplementary Figure 10: A propagation of ionizing particles in the material is necessary for SSB induction at distance from the PTV

(A) Schematic representation of how the 12-well plates were aligned, sealed or not together with an ultrasound gel (250820, Asept Inmed), in order to have wells inside the PTV and wells in the margin, in continuity or not with the PTV. The red line represents the limit of the light field at which the deposited dose is 50% of that in the PTV. (B) Immunodetection of XRCC1 and 53BP1 foci in NHDFs (F6MC1, PD: 27.93) irradiated at 2Gy as represented in A. Cells were fixed 20min or 2hrs after the irradiation for the immunodetection of XRCC1 or 53BP1 respectively. Each dot in the scatter plots represents the number of foci in a focal plane of one nucleus. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of foci number of 50 cells. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

Supplementary Figure 11: The proliferating *versus* quiescent status of NHDFs does not interfere with the generation of SSBs

NHDFs (F6MC1, PD=27.8) proliferation was slowed down by starvation in 0.1% FBS compared to the normal 2% FBS concentration. (A) Cell cycle analysis performed after 48hrs of starvation by flow cytometry. The shown histograms are representative of three independent experiments. (B) Bar chart representing the dispersion of cells in the different cell cycle phases. This analysis is based on the DNA content measurements by flow cytometry of three independent samples. (C) Bar chart representing the percentage of EdU-positive cells. (D) Proliferating and starved NHDFs cultured in 12-well plates were positioned at the margin of a PTV irradiated or not at 2Gy daily (20 MV) for 5 days. After the last irradiation, cells were put at 10°C for 30min and processed for comet assays at pH12.3. Each dot in the scatter plots represents the value of the tail moment of one cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of tail moment values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs or in comparison to cells cultured in 2% FBS.

Supplementary Figure 12: SSBs accumulate with successive irradiations in NHDFs positioned at the margin of a PTV receiving 2Gy/day

Proliferating NHDFs (donor F6MC1, PD=22.67) cultured in 12-well plates were irradiated or not only one time at 2Gy or during 5 days at 2Gy daily. Just after the last irradiation, cells were put at 10°C for 30min and then processed for comet assays. Each dot in the scatter plots represents the value of the tail moments of one cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of tail moment values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs or between cells irradiated one or five times.

Supplementary Figure 13: SSBs generated in NHDFs positioned at the margin of the PTV are no more repaired after 5 successive irradiations at 2Gy

Proliferating NHDFs (F6MC1, PD=20.3 at the beginning of the experiment) cultured in 12-well plates were irradiated at 2Gy per day for one (1x2Gy) or five days (5x2Gy). After the last irradiation, cells were either put at 10°C for 30min and processed for comet assays, or put in culture at 37°C and processed for comet assays 72hrs later. Each dot in the scatter plots represents the value of the tail moment of one cell. The columns regroup all the values for each condition and give the mean +/- SD of tail moment values. A Kruskal-Wallis test with a Bonferroni correction was performed for each counting in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs.

Supplementary Figure 14: The repair of SSBs generated in NHDFs positioned at the margin of the PTV becomes poorly efficient after 4 successive irradiations at 2Gy

Proliferating NHDFs (F6MC1, PD=19) cultured in 96-well plates were irradiated at 2Gy per day for 4 days (4x2Gy). Then, they were fixed at indicated time and an immunodetection of XRCC1 (upper panels) or 53BP1 (bottom panels) foci was performed as in figure 4A. The results were analyzed by high content microscopy. The bar chart represents the mean number +/- SD of foci per cell in 100 cells of all wells of a column. An ANOVA with a Bonferroni was performed for each condition in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs. T-tests were performed to compare the number of foci 72hrs versus 30min post-irradiation.

Supplementary Figure 15: The PARylation capacity decreases with successive irradiations

(A) Analysis of the PARylation activity in NHDFs (F6MC1, PD=32.4 at the beginning of the experiment) positioned at the margin or inside a PTV irradiated or not for 1 or 10 days at 2Gy per day. PAR chain detection was made by immunofluorescence after challenging cells of all conditions by 100µM hydrogen peroxide for 10min at room temperature followed by a recovery at 37°C for 3min in fresh medium. The bar chart represents the mean +/- SD of fluorescence intensity per cell in 100 cells. An ANOVA with a Bonferroni correction was performed for each condition in comparison to non-irradiated exponentially growing NHDFs. T-tests were performed to compare the fluorescence intensity after 10x2Gy *versus* 1x2Gy. (B) Representative fluorescent microscopic images of the PAR chain immunostaining. Scale bar = 50µm

Supplementary Figure 16 (in complement to Fig6): Principle of senescent cell sorting

Dot plots showing of how senescent cells were sorted in Figure 6. The time of cell sorting is indicated in Figure 6A. First, by comparing the intensity of the C12FDG staining in exponentially growing NHDFs versus NHDFs at replicative senescence, we set the threshold to separate the C12FDG high (red dots) and C12FDG low (green dots) cells. Then, in the C12FDG high subpopulation, we delimited the subpopulation of 50% of cells with the highest FSC and SSC values. The gate thus defined was applied to all conditions to sort the cells.

Supplementary Figure 17: Similar experiment as in Figure 6 with NHDFs derived from another donor

(A) NHDFs (donor F6MC1, PD=26.83 at the beginning of the experiment) cultured in 6-well plates were irradiated or not at 2Gy per day except week-ends during 2 weeks (10*2Gy). Cells were counted at each passage using a Malassez cell counting chamber. After two weeks of irradiation, the senescent cells generated in the margin were sorted according to their size, granularity, and SA- β -Gal activity. The sorted cells were put again in culture and followed at long term. (B) HPRT assays performed on cells having regrow from sorted senescent cells referred as PSNE and on non-irradiated exponentially growing NHDFs at 28.01PDs as control for normal cells. The bars indicate the mean +/- SD of three measures of the percentage of 6-TG resistant cells. T-tests were performed for comparing exponentially growing and emerging cells.

Supplementary Figure 18 (in complement to Fig6): The combined PARP inhibitor + H₂O₂ treatment does not induce other oxidative damages than SSBs

(A) PARylation activity assay on NHDFs (F1MC1, PD=46) treated during 24hrs with different concentrations of Veliparib and challenged for 10min with 100 μ M H₂O₂. (B) NHDFs (F1MC1, DP=44.07 at the beginning of the experiment) were treated daily or not with Veliparib + H₂O₂ as in Figure 6. 53BP1 foci were analyzed by immunofluorescence during the first 25 days of treatment. (C) hOGG1 foci were analyzed by immunofluorescence at day 26. The bar chart represents the mean number +/- SD of foci per nuclear focal plane in 100 nuclei. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point. (D) The mitochondrial membrane potential was evaluated by the JC-1 dye at day 25 by flow cytometry. Each bar gives the mean of the red / green fluorescence ratio in a population of 10,000 cells normalized to the non-treated population.

Supplementary Figure 19 (in complement to Fig6): The repair of SSBs is blocked during a Veliparib + H₂O₂ treatment

NHDFs (F1MC1, DP=44.07 at the beginning of the experiment) were treated daily or not with Veliparib + H₂O₂ as in Figure 6. PhosphoXRCC1 (A) and PNKP (B) foci were analyzed by immunofluorescence at day 26. The bar chart represents the mean number +/- SD of foci per nuclear focal plane in 100 nuclei T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point.

Supplementary Figure 20: Same experiment as in Figure 6 with another NHDF donor

NHDFs (F6MC1, DP=40.04 at the beginning of the experiment) were submitted daily to the combined Veliparib +H₂O₂ treatment as in Figure 7 for 31 days. Then, the H₂O₂ treatment was stopped but the Veliparib treatment maintained up to day 75. (A) Growth curves. (B) SA-β-Gal assays. T-tests were performed for comparing non-treated and treated cells for each time point.

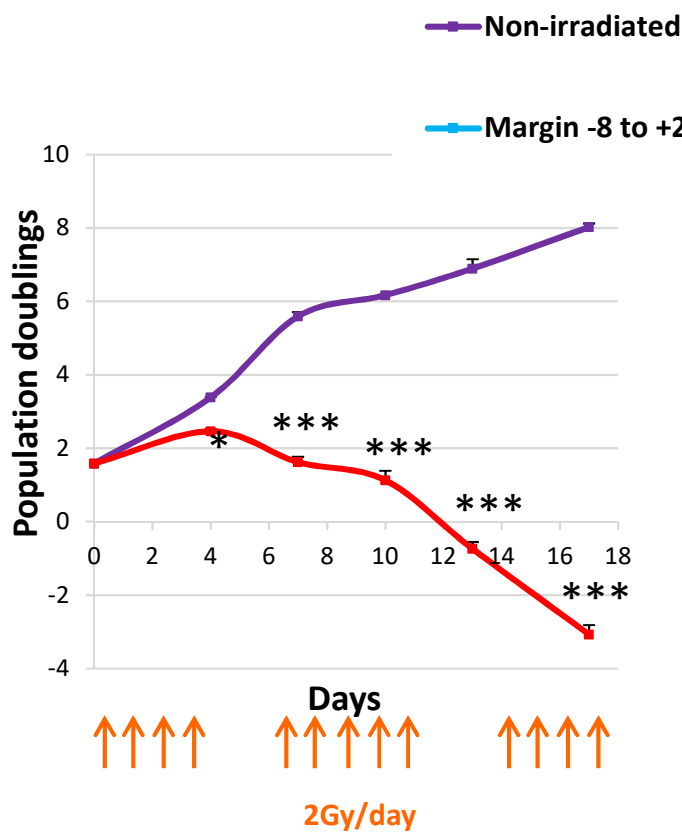
Supplementary Figure 21 (in complement to Fig6): The combined PARP inhibitor + H₂O₂ treatment induces a panel of senescence markers

NHDFs (F1MC1, DP=40.01 at the beginning of the experiment) were treated daily or not with Veliparib + H₂O₂ as in Figure 7. (A) At day 25, cell morphologies were analyzed by flow cytometry. The bar chart reports the percentage of cells with high FSC and SSC values among 10,000 cells. (B) SA-β-Gal activity evaluated at day 25 by flow cytometry using the C12FDG fluorescent substrate. The bar chart reports the mean C12FDG fluorescence intensity of 10,000 cells. A Chi-square test was done to compare the fluorescence intensity of each of the 10,000 irradiated or senescent NHDFs to non-irradiated NHDFs. (C) Western Blot analysis of Rb, phospho-Rb (pRb), p16 and GAPDH (loading control) protein levels after 25 days of treatment. (D) Level of cell death measured at day 20 by flow cytometry using the AnnexinV/PI assay. The indicated percentage of dead cells regroups AnnexinV and/or PI-positive cells.

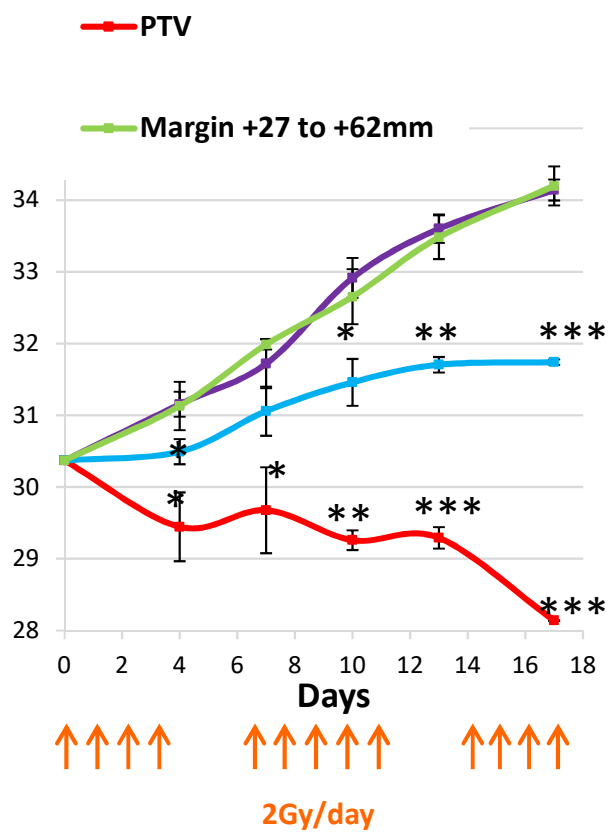
X

Figure 1

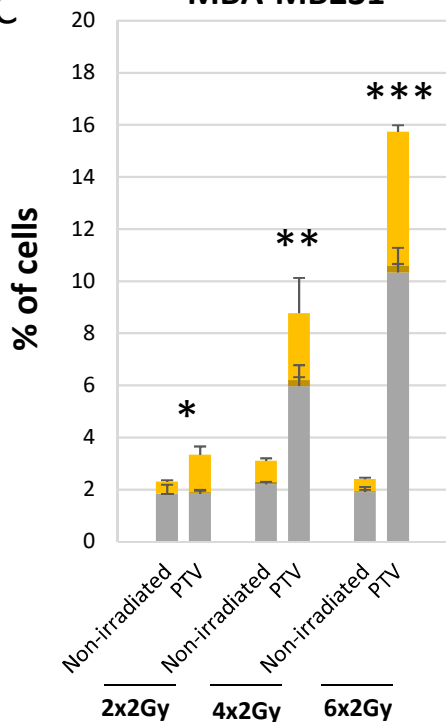
A MDA-MB231



B NHDFs (F6MC1)



C MBA-MB231



NHDFs (F6MC1)

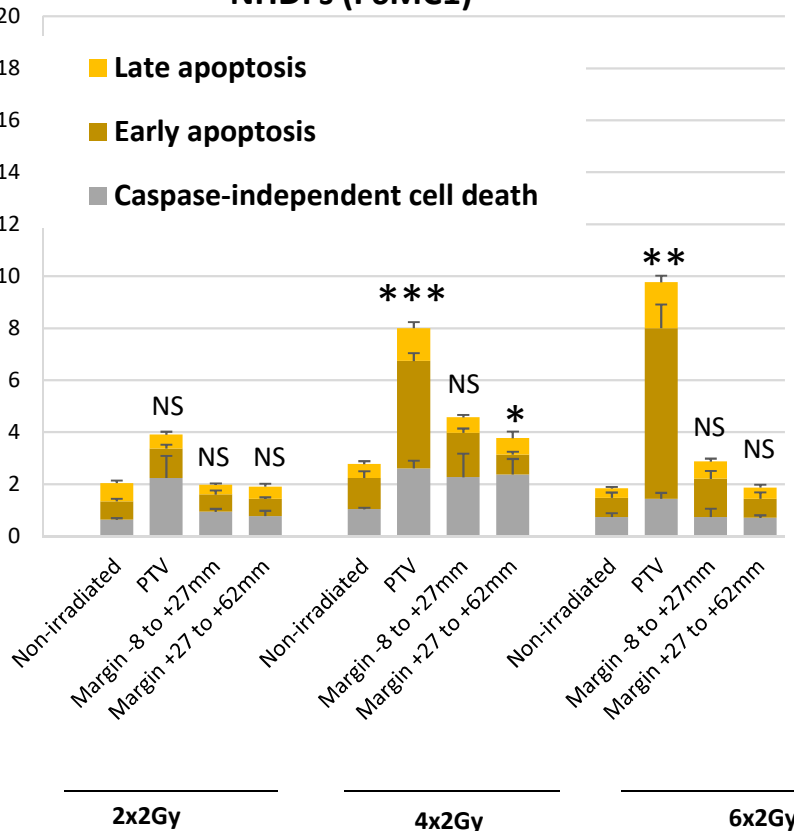
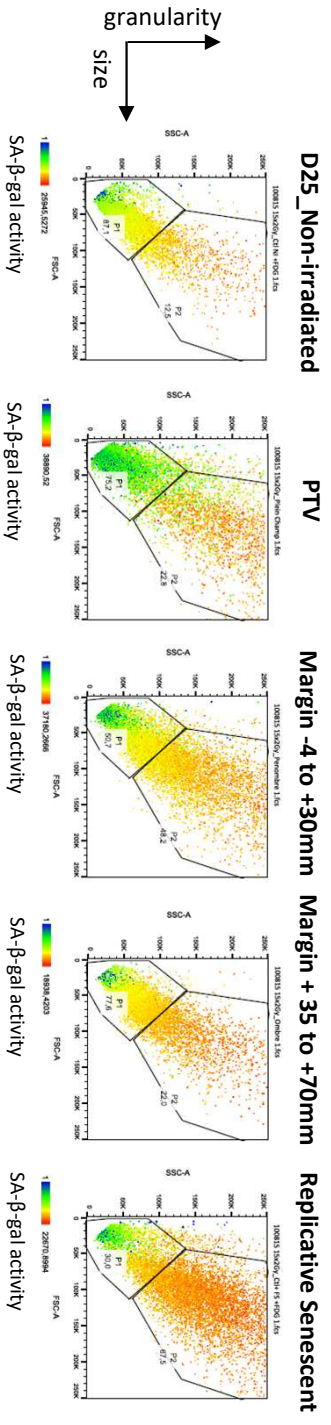
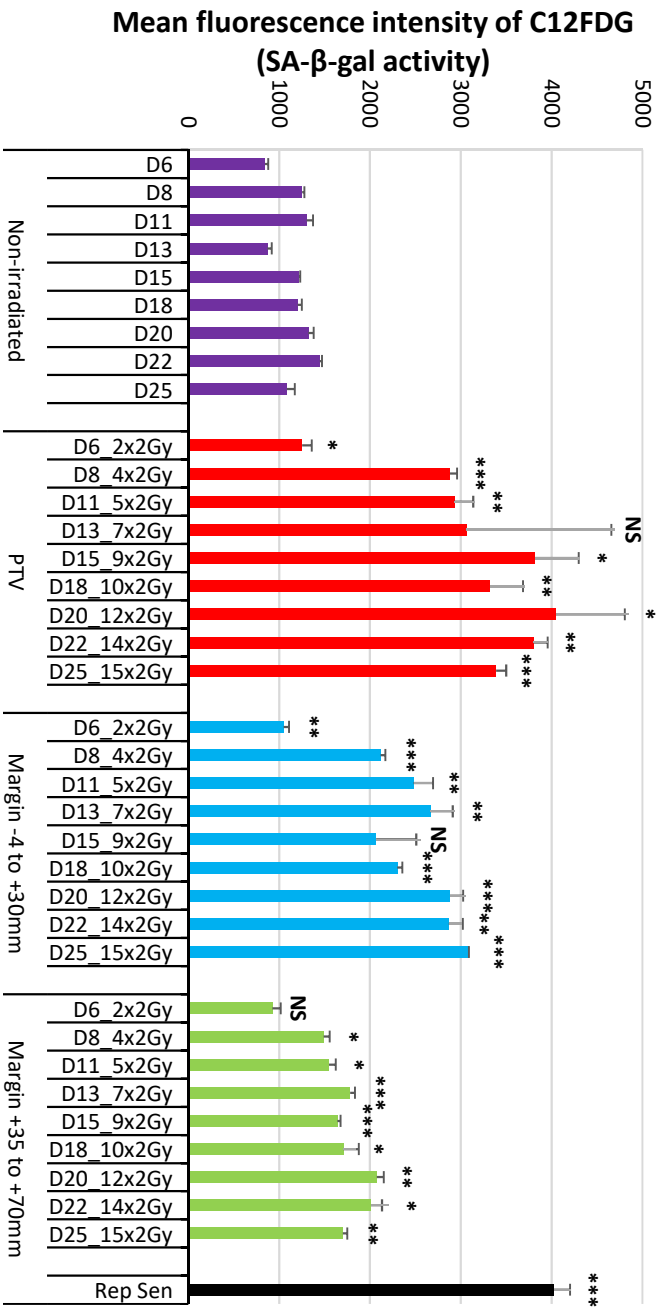


Figure 2

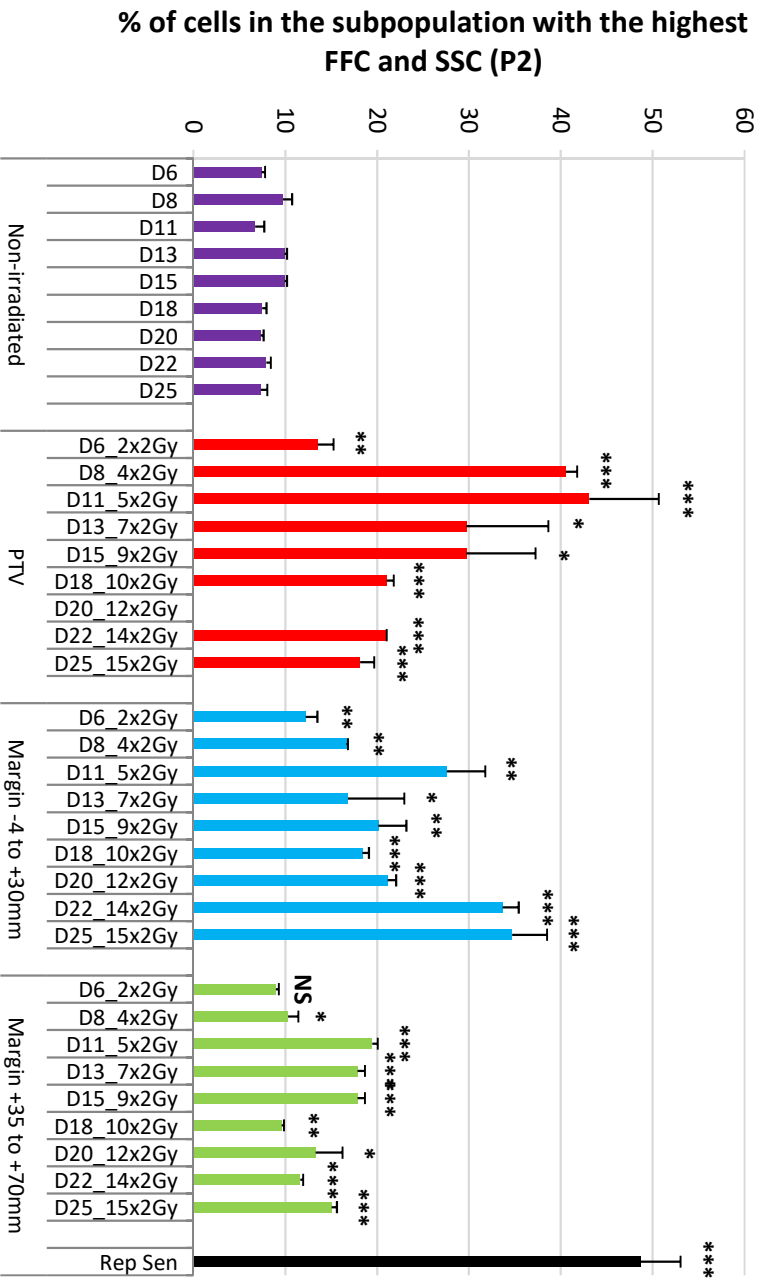
A



B
NHDFs (F1MCl1)

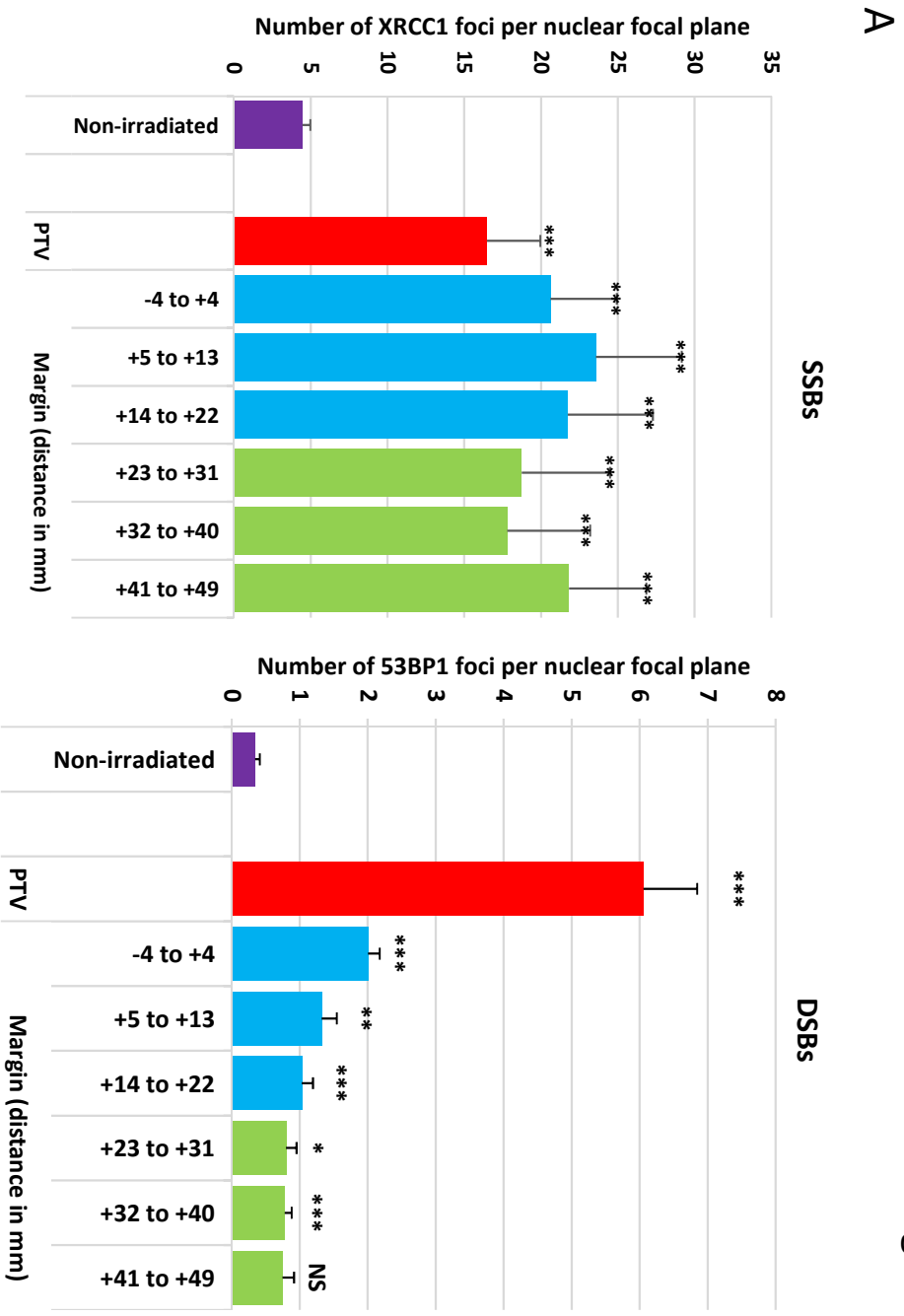


C
NHDFs (F1MCl1)



NHDFs (F1MCl)

Figure 3



NHDFs (F6MCl)

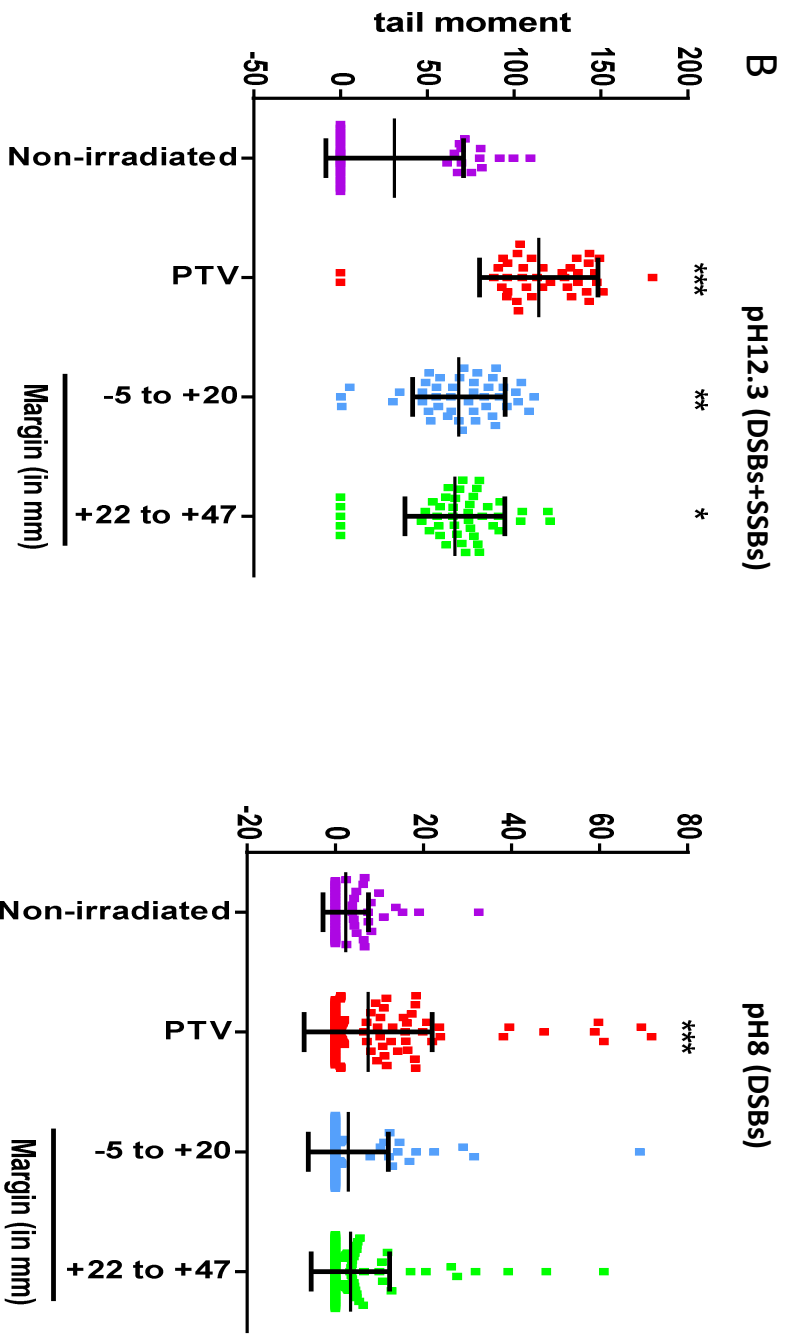


Figure 4

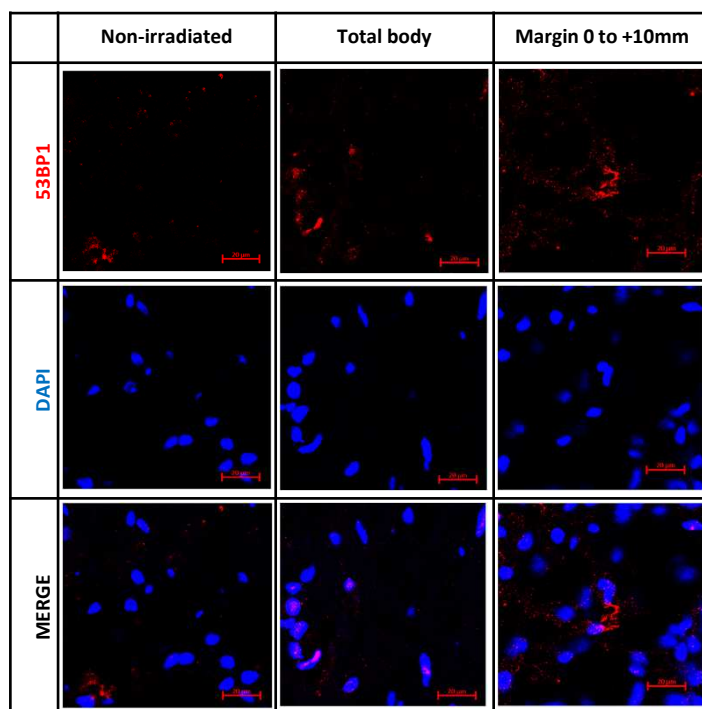
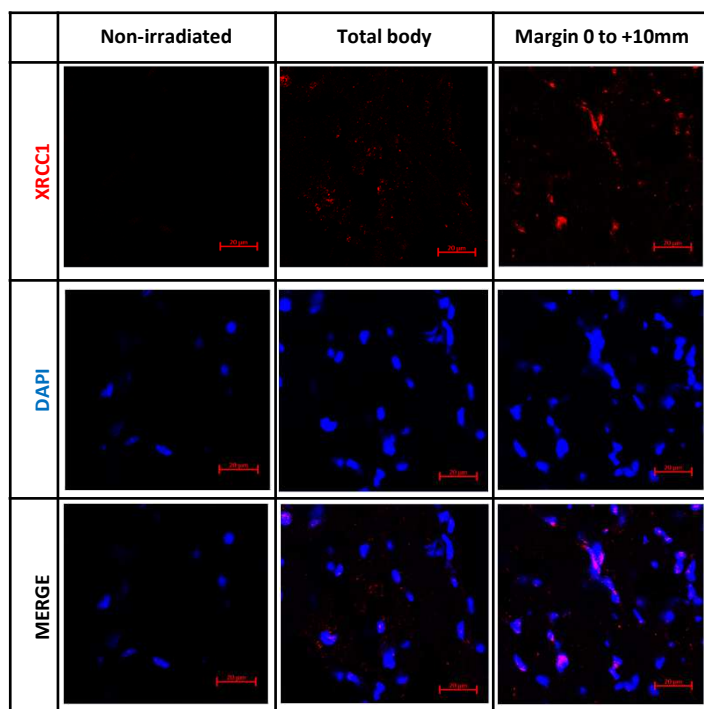
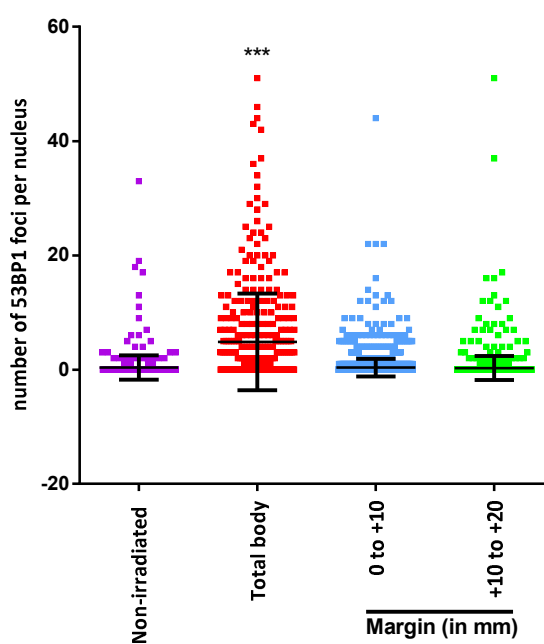
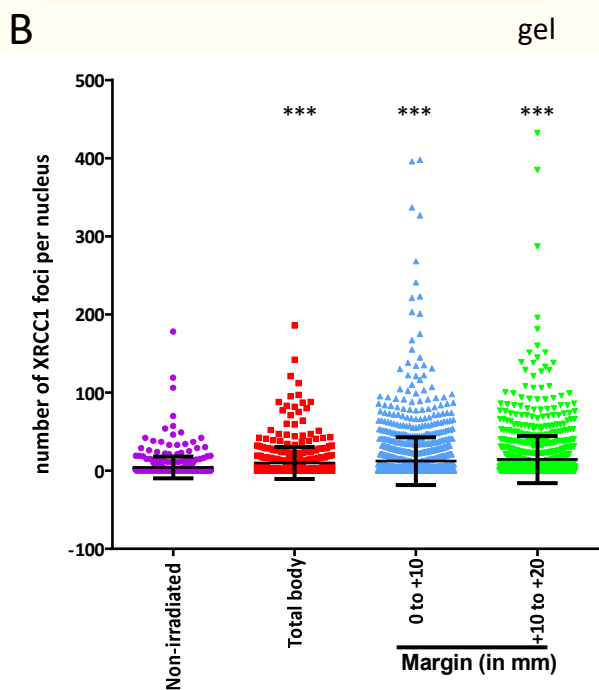
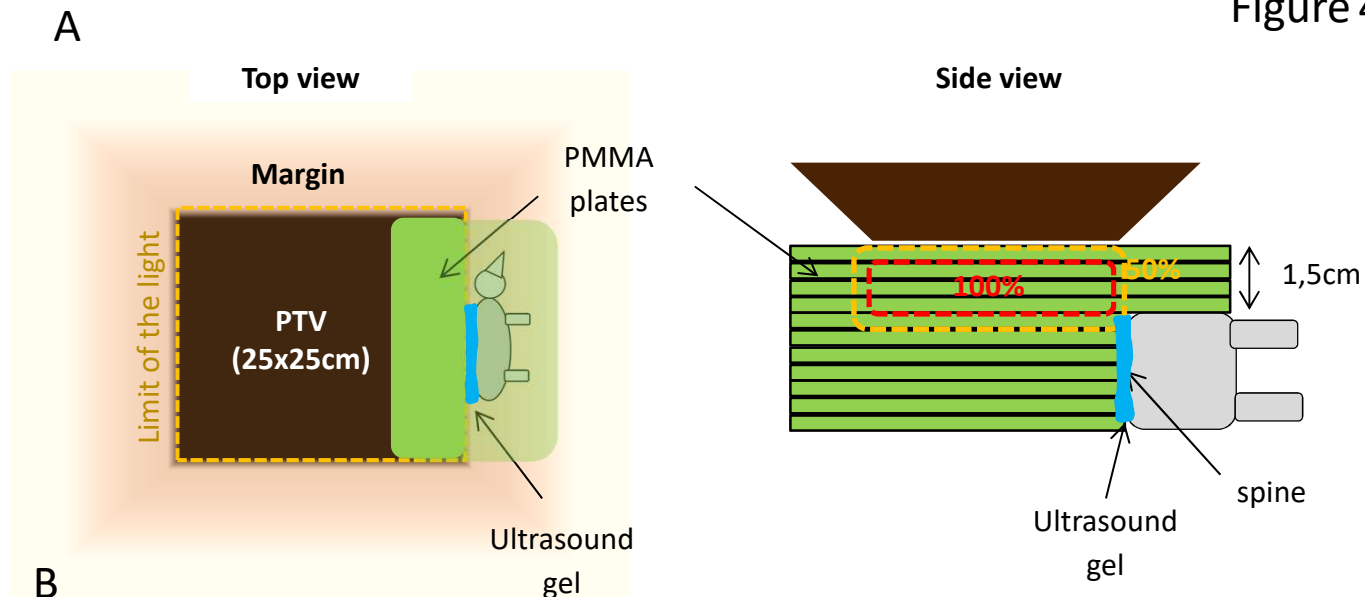
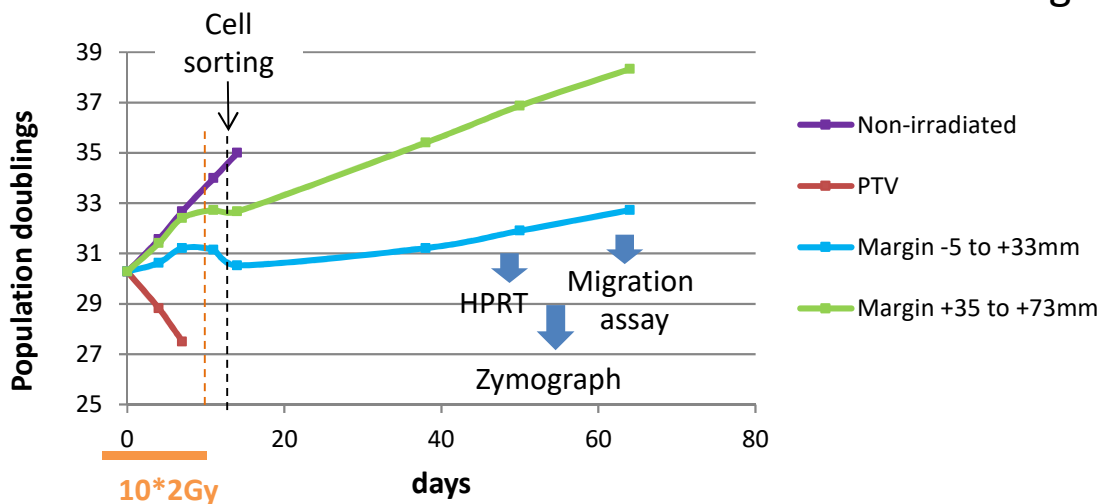
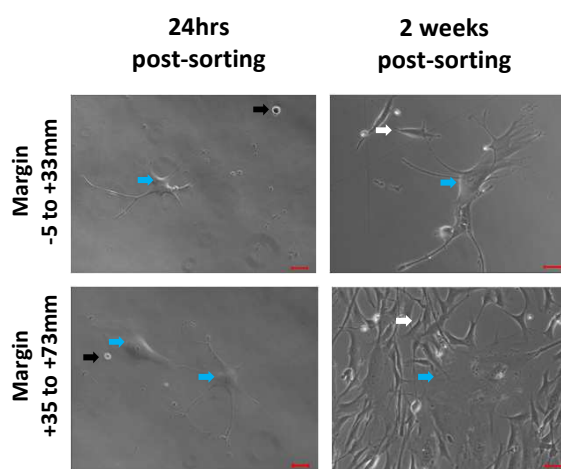


Figure 5

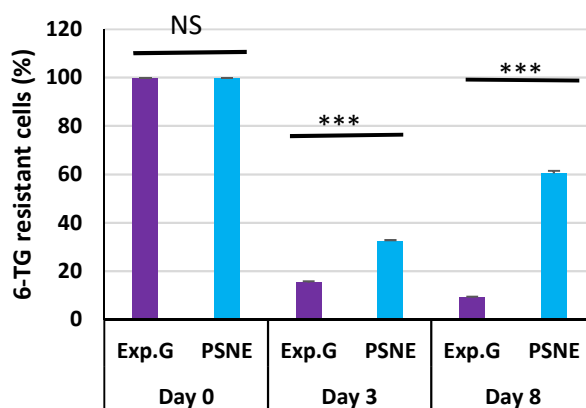
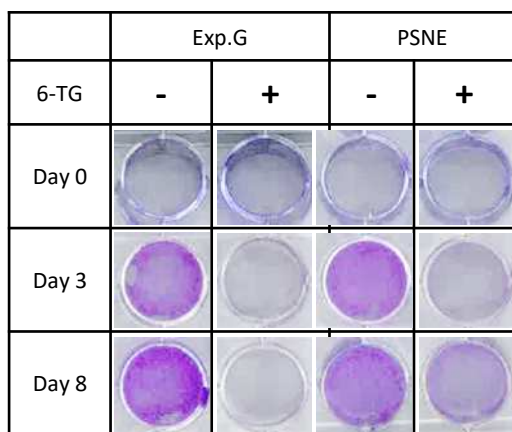
A



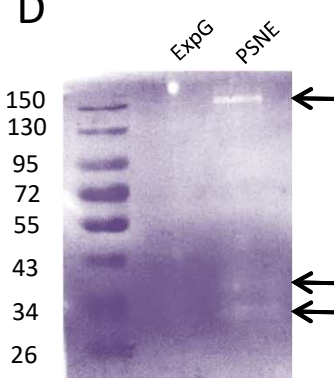
B



C



D



E

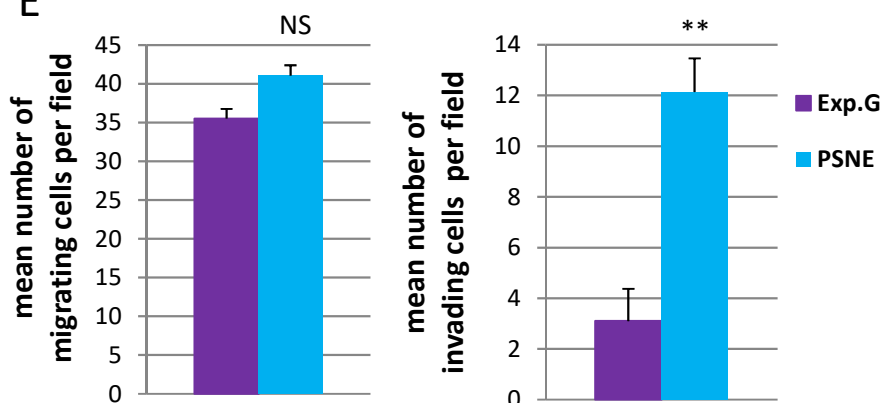
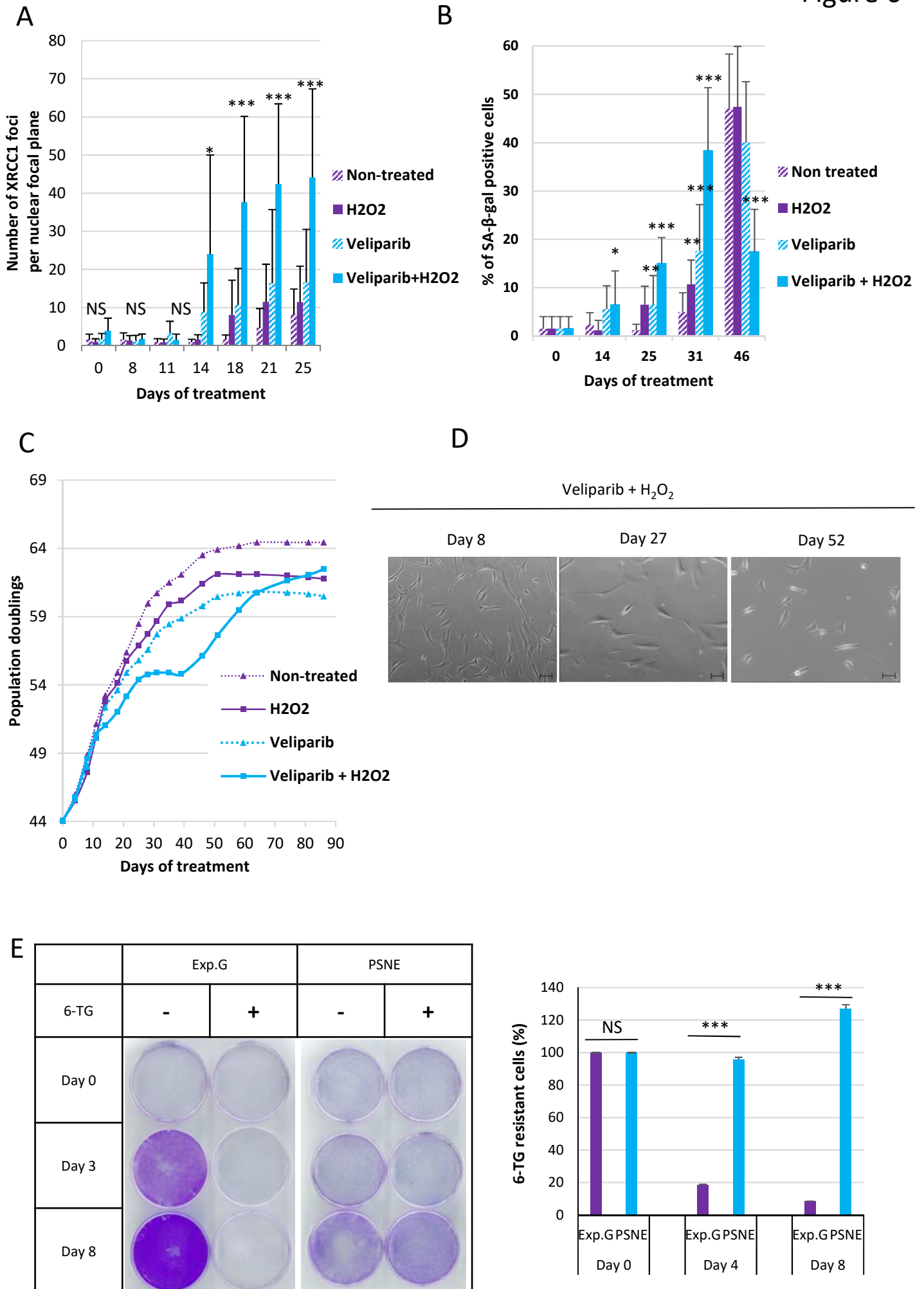


Figure 6

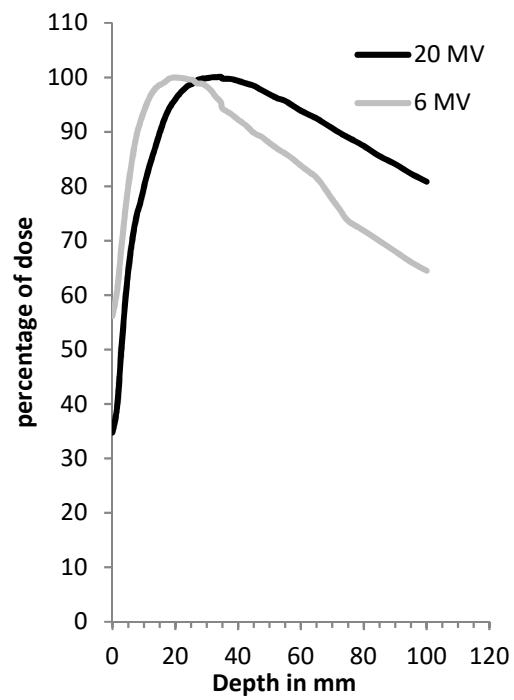


A

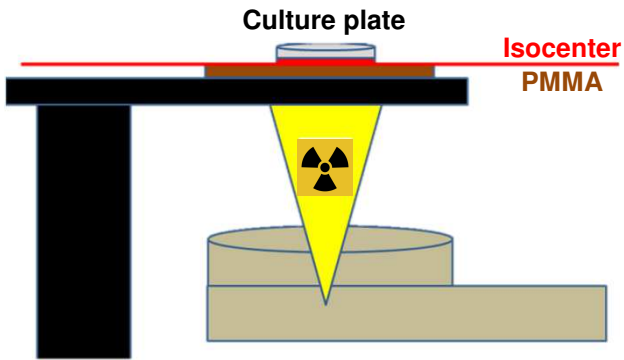


**Linear accelerator
(Varian Primus CLINAC®)**

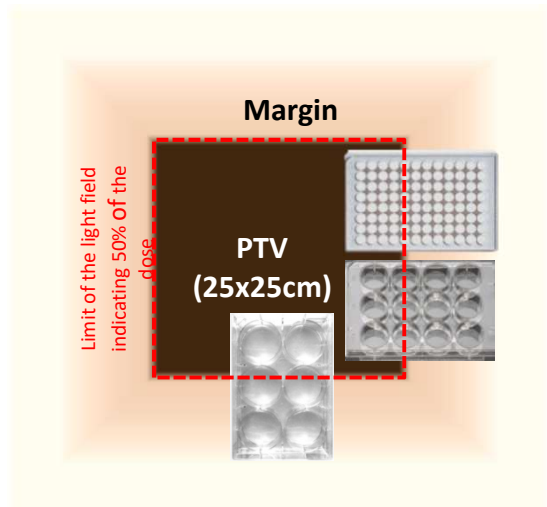
B



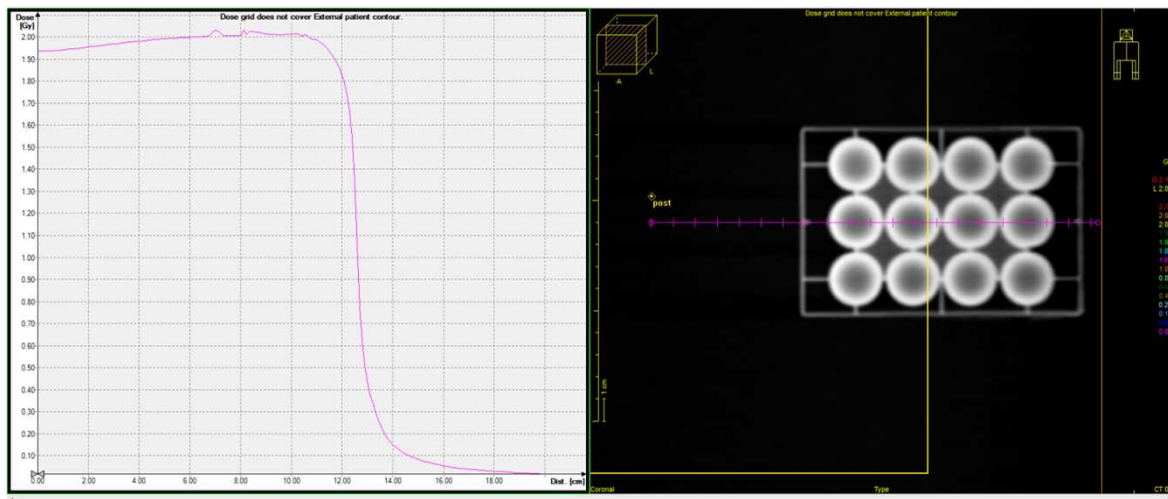
A



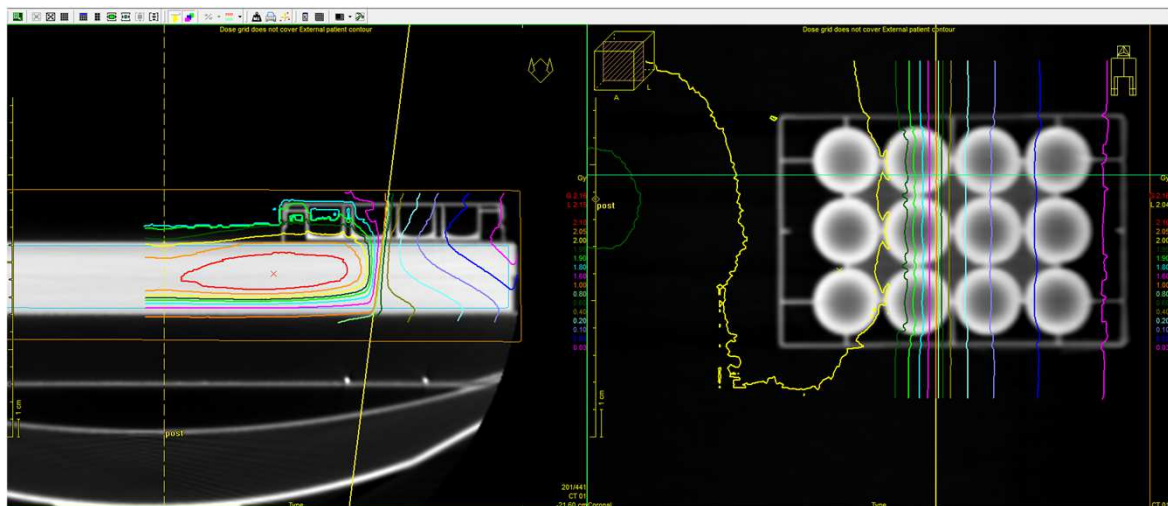
B



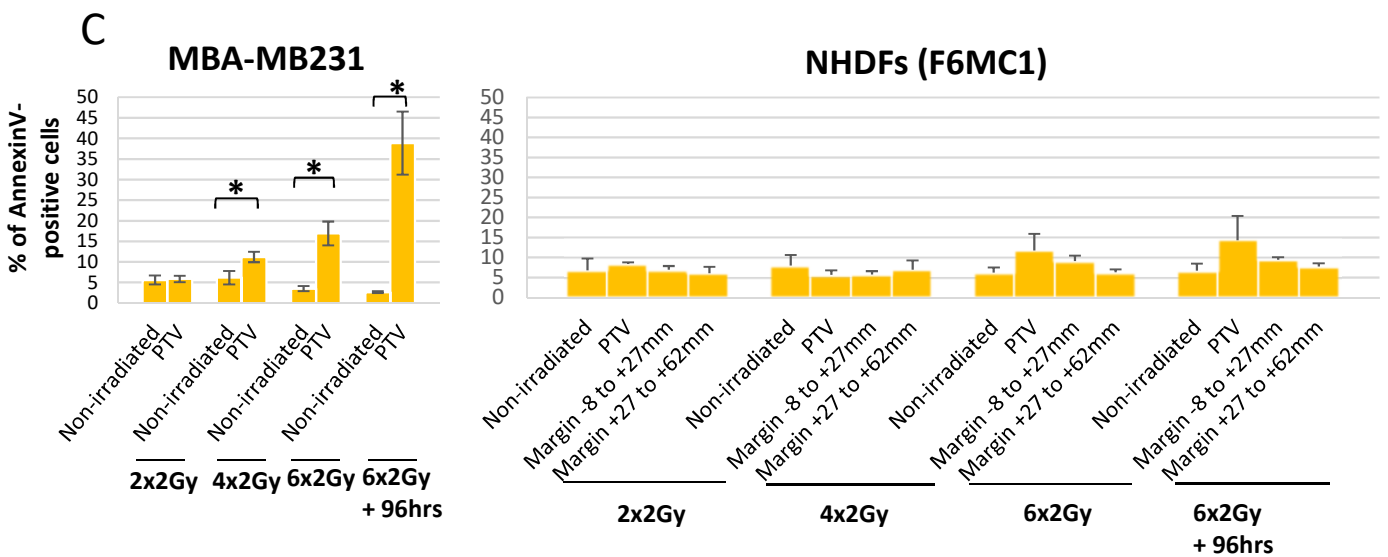
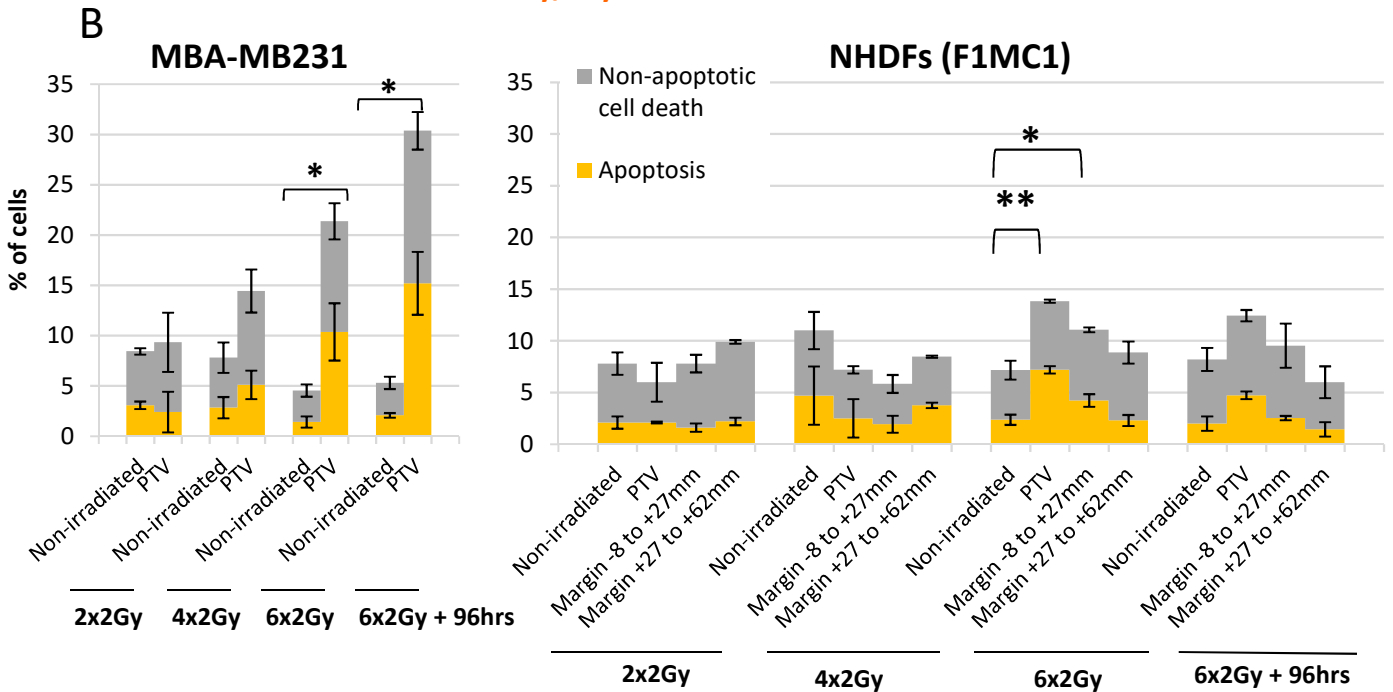
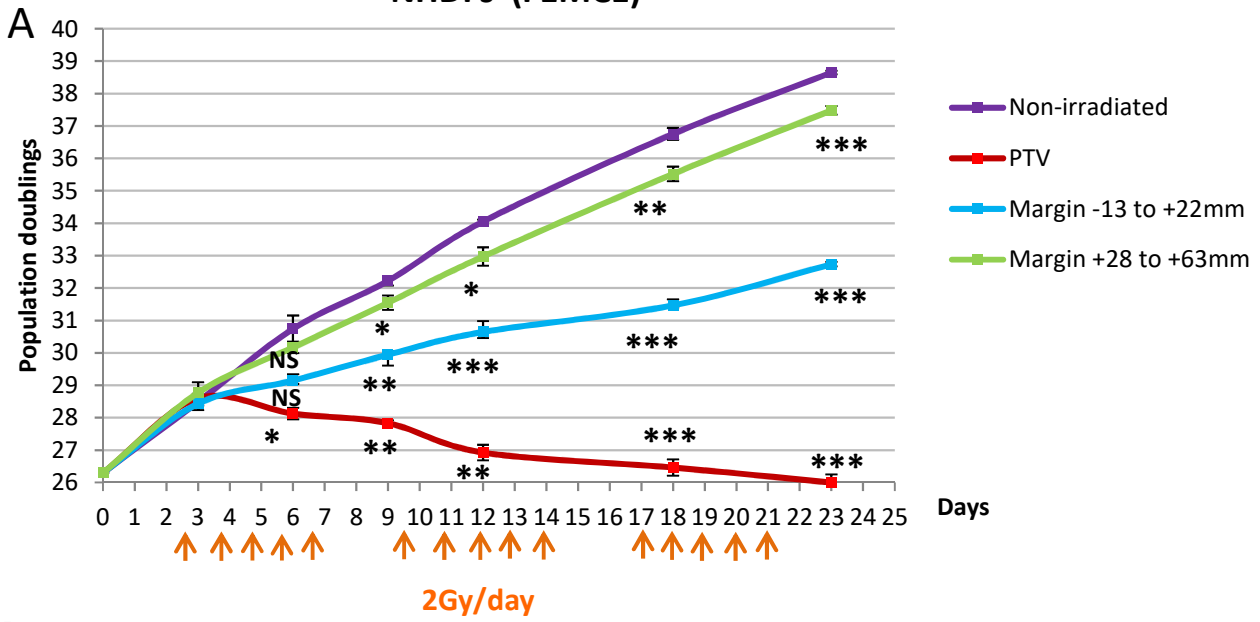
C

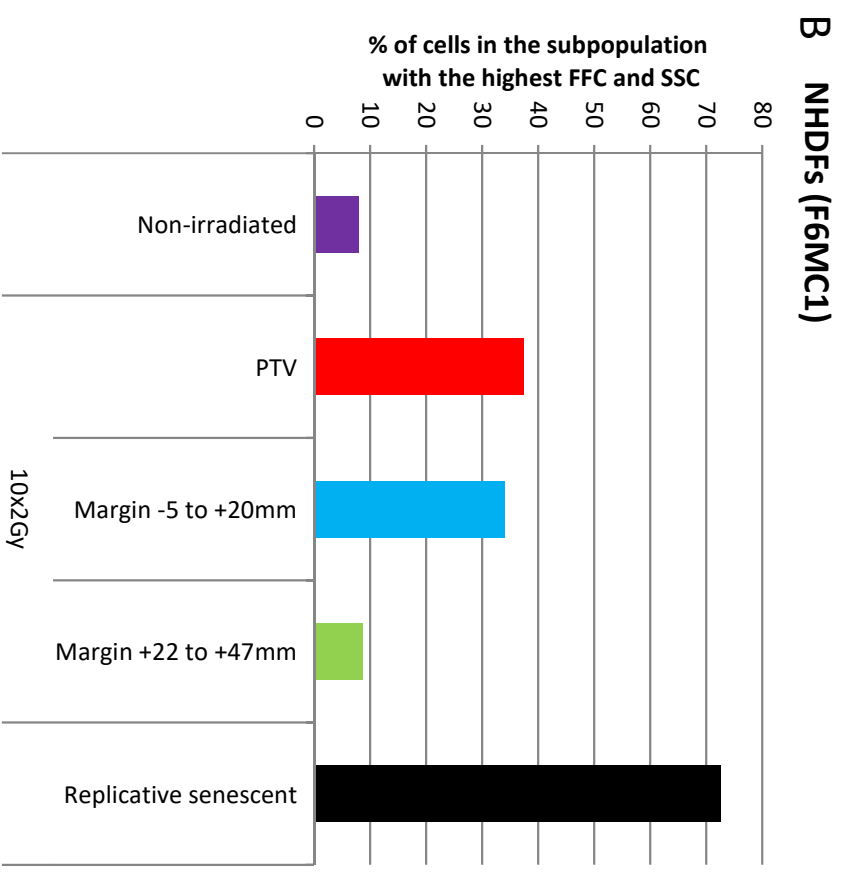
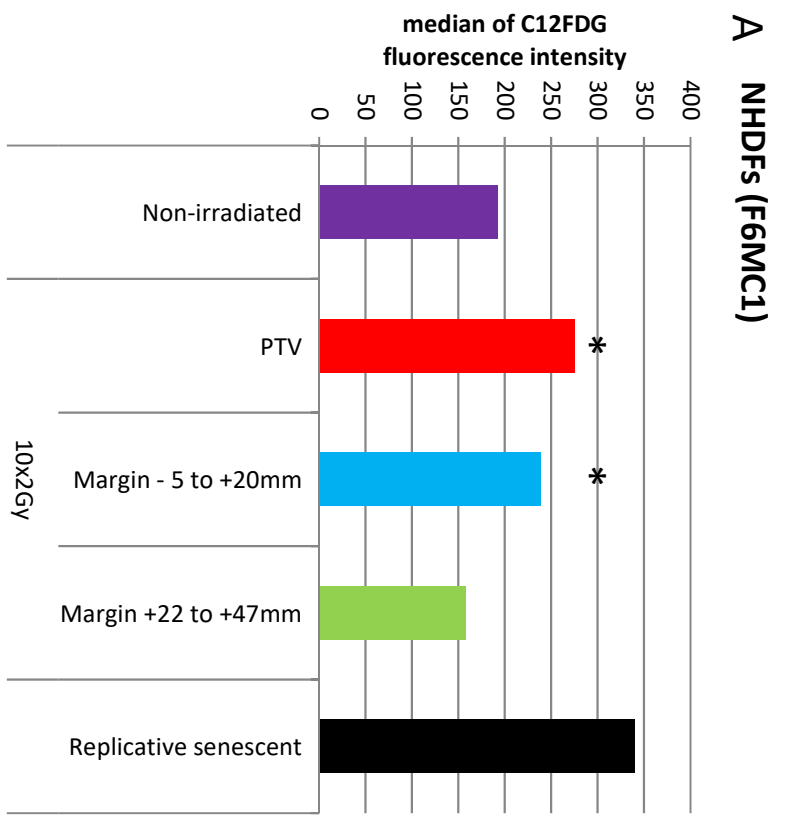


D



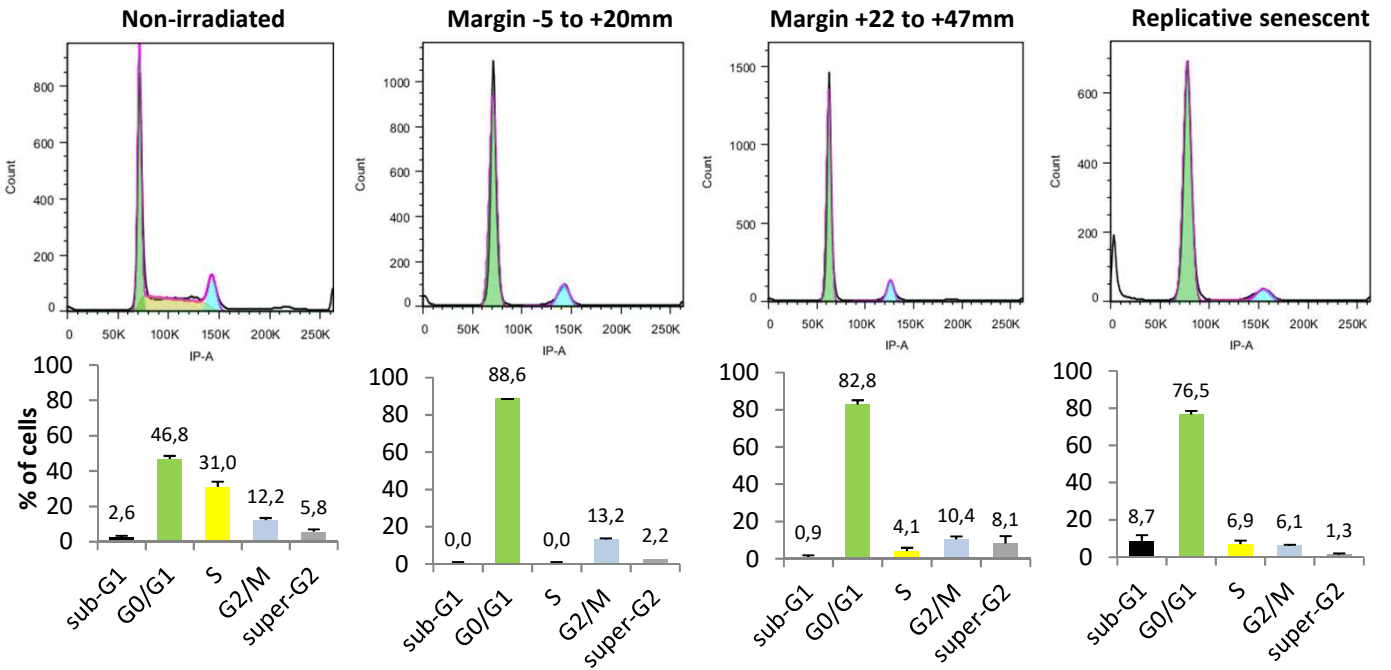
NHDFs (F1MC1)





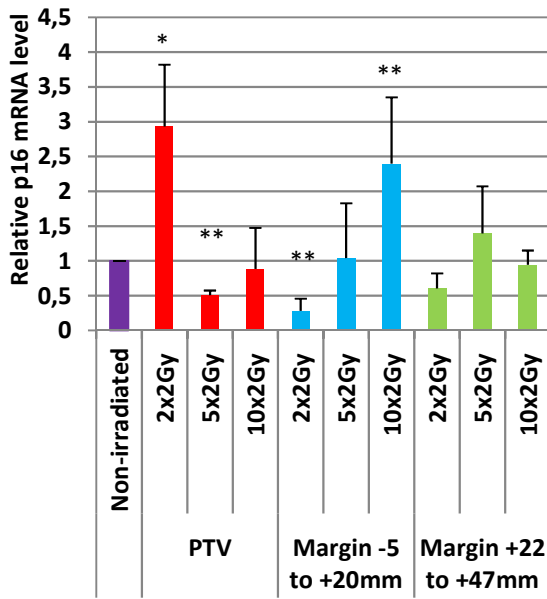
NHDFs (F1MC1)

13x2Gy +24hrs

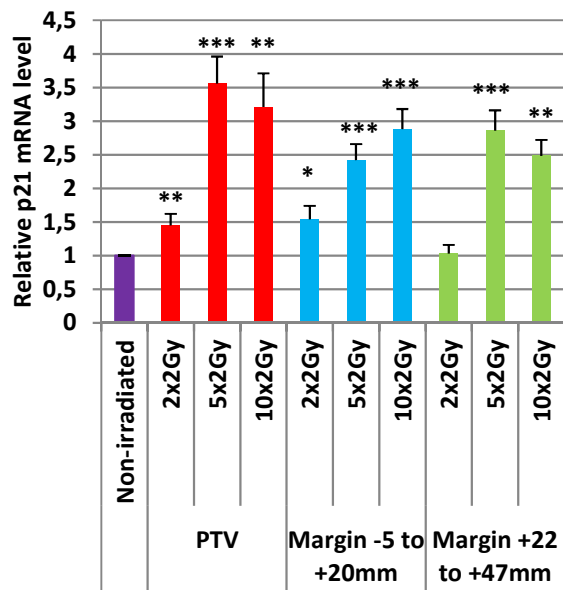


NHDFs (F6MC1)

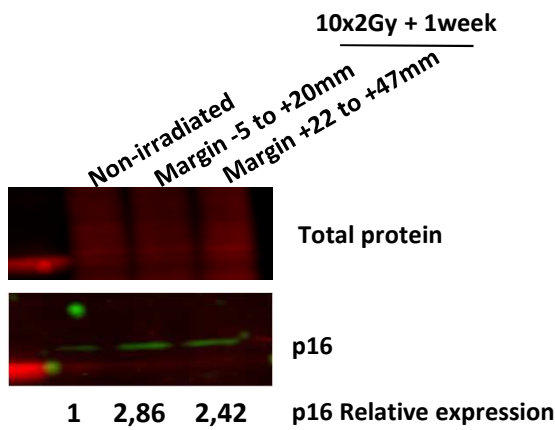
A



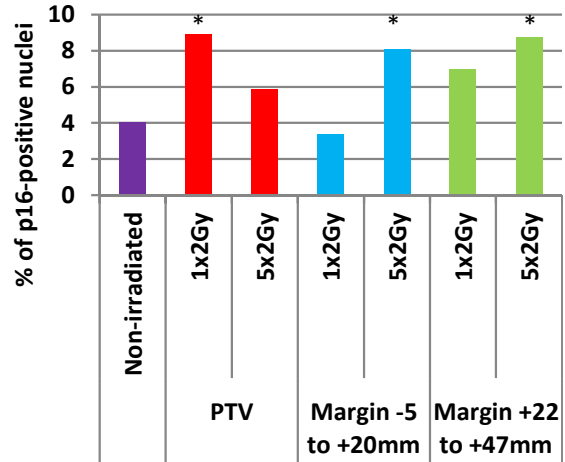
B



C



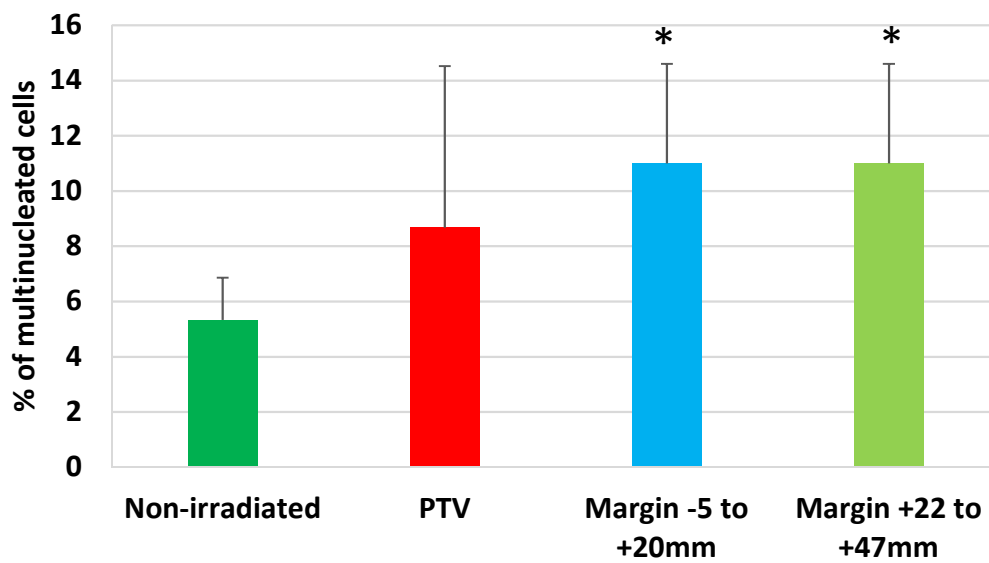
D



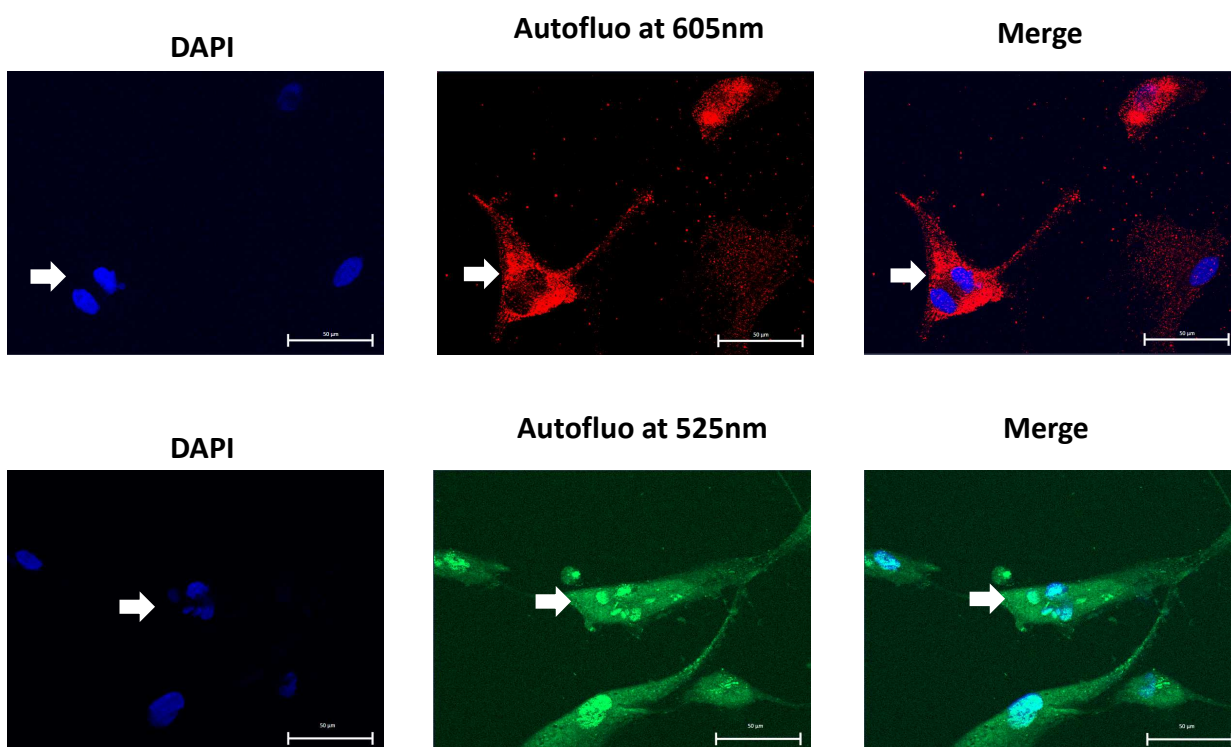
E

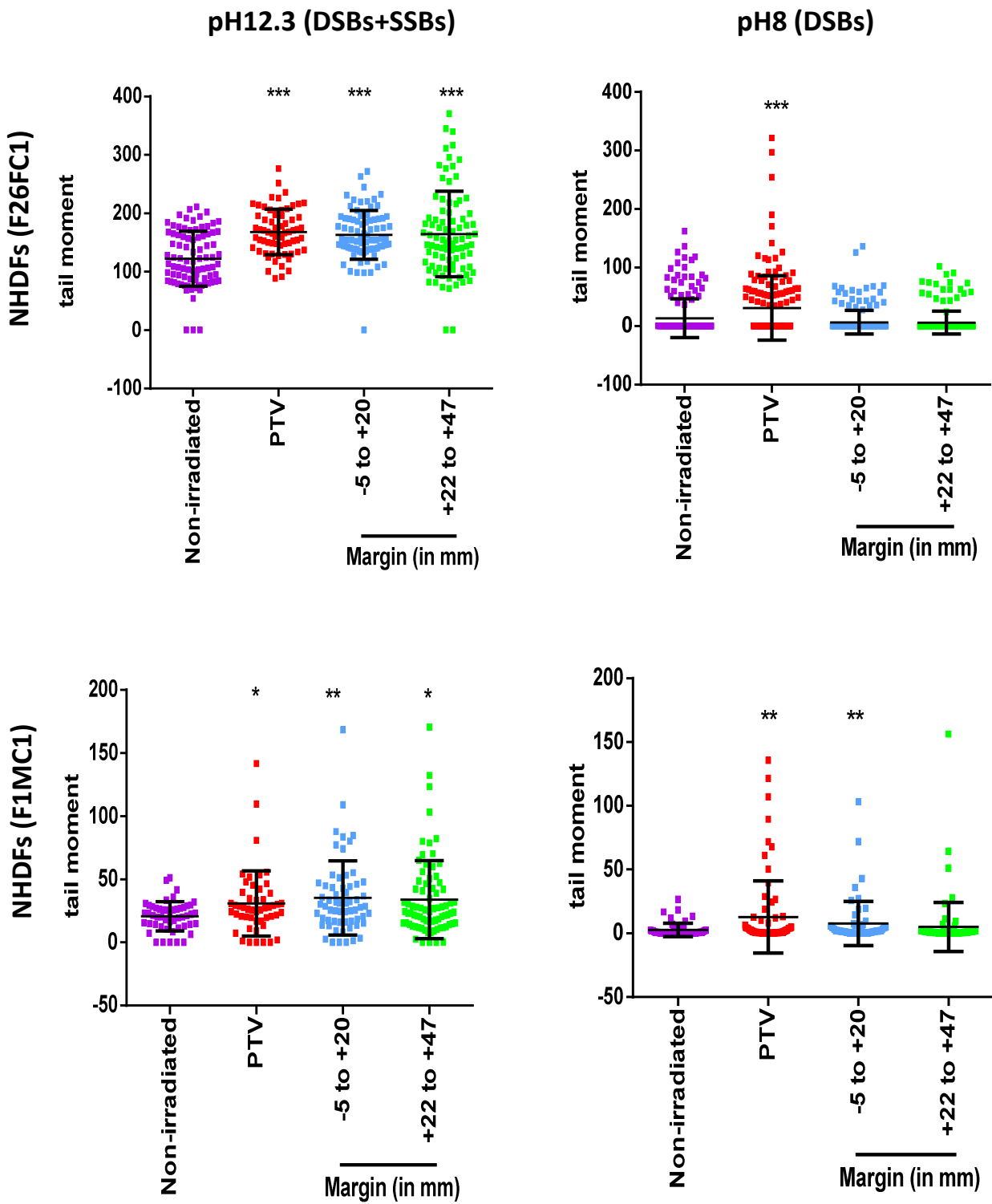
	DAPI	p16	Merge		DAPI	p16	Merge
Non-irradiated							
	1x2Gy			5x2Gy			
	DAPI	p16	Merge	DAPI	p16	Merge	
PTV							
Margin -5 to +20mm							
Margin +22 to +47mm							

A

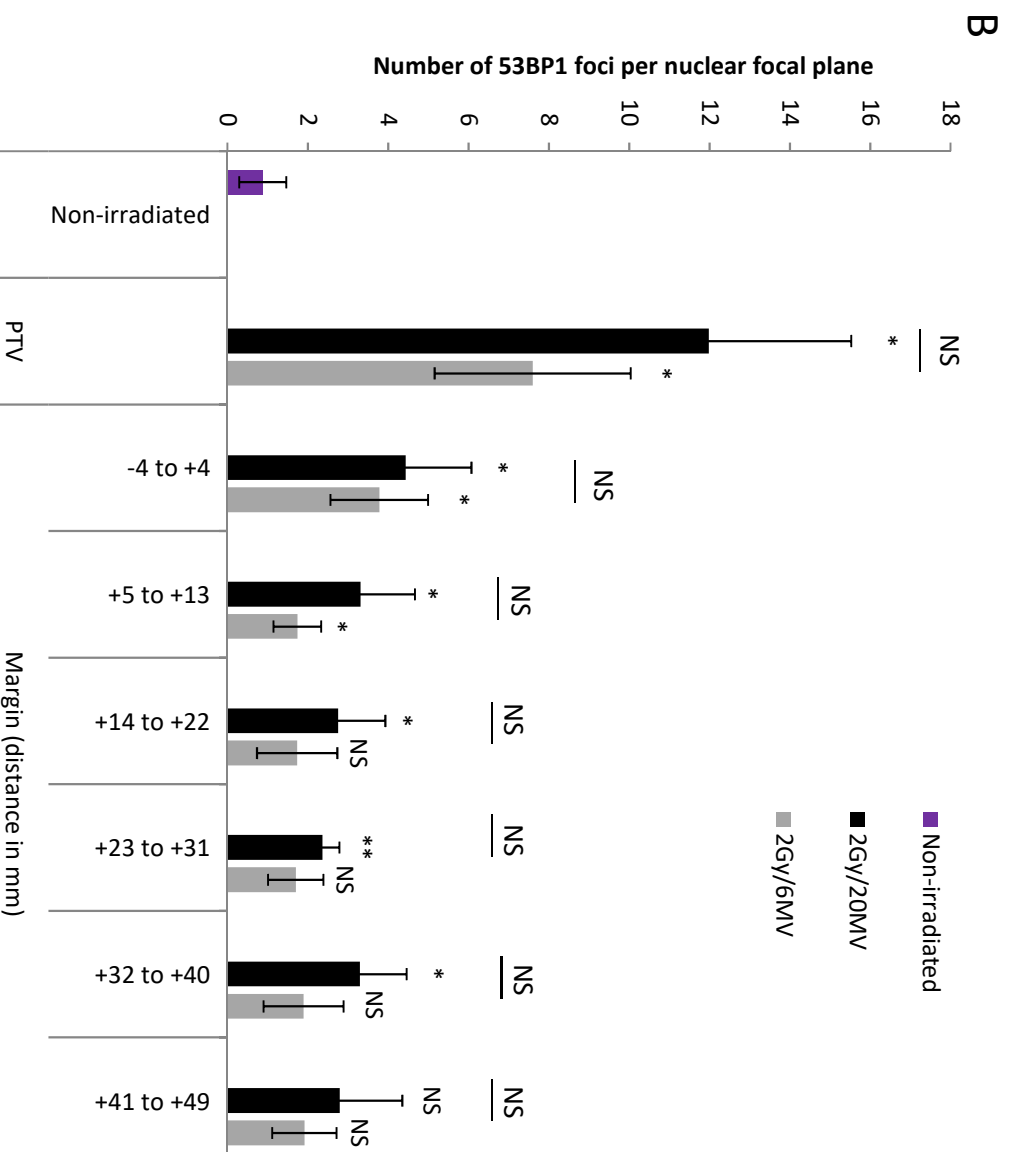
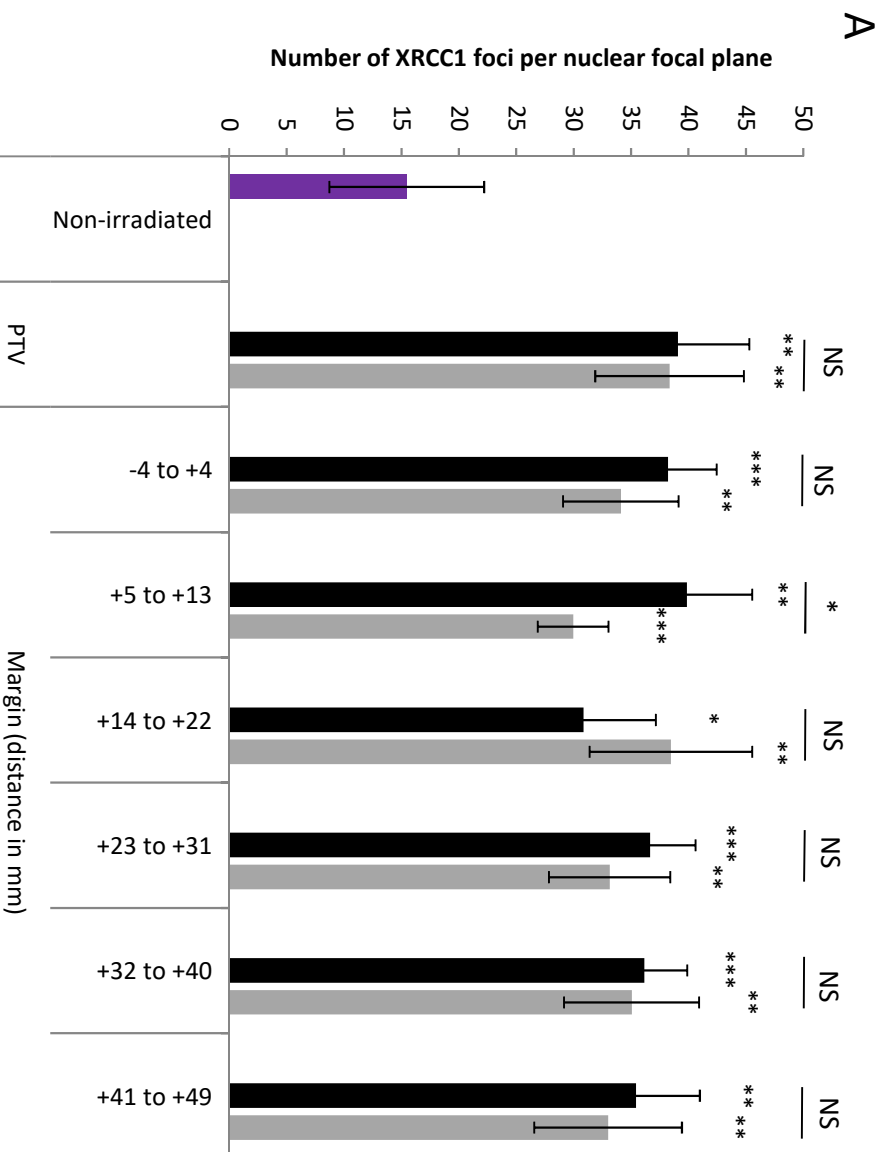


B

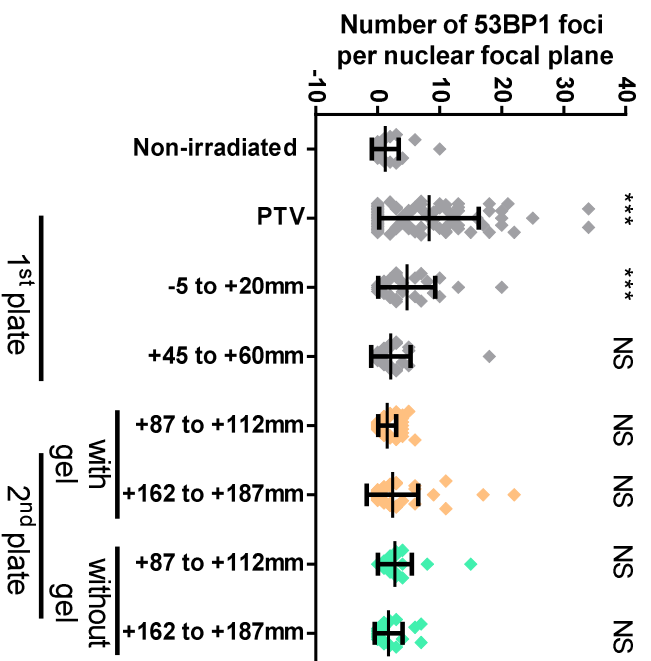
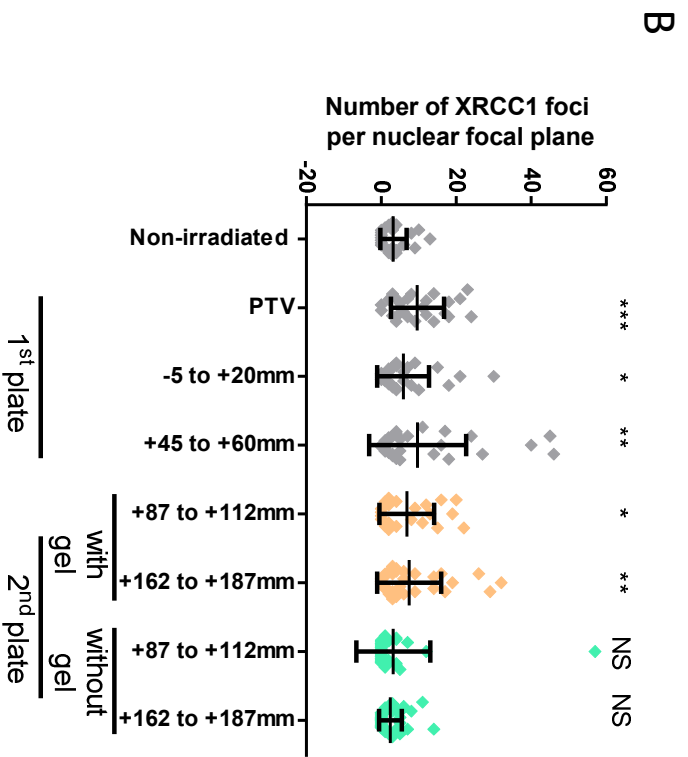
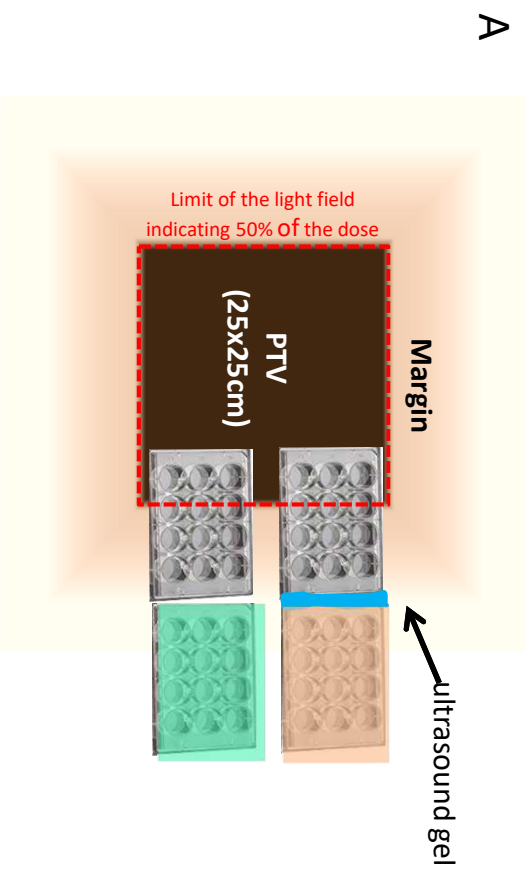


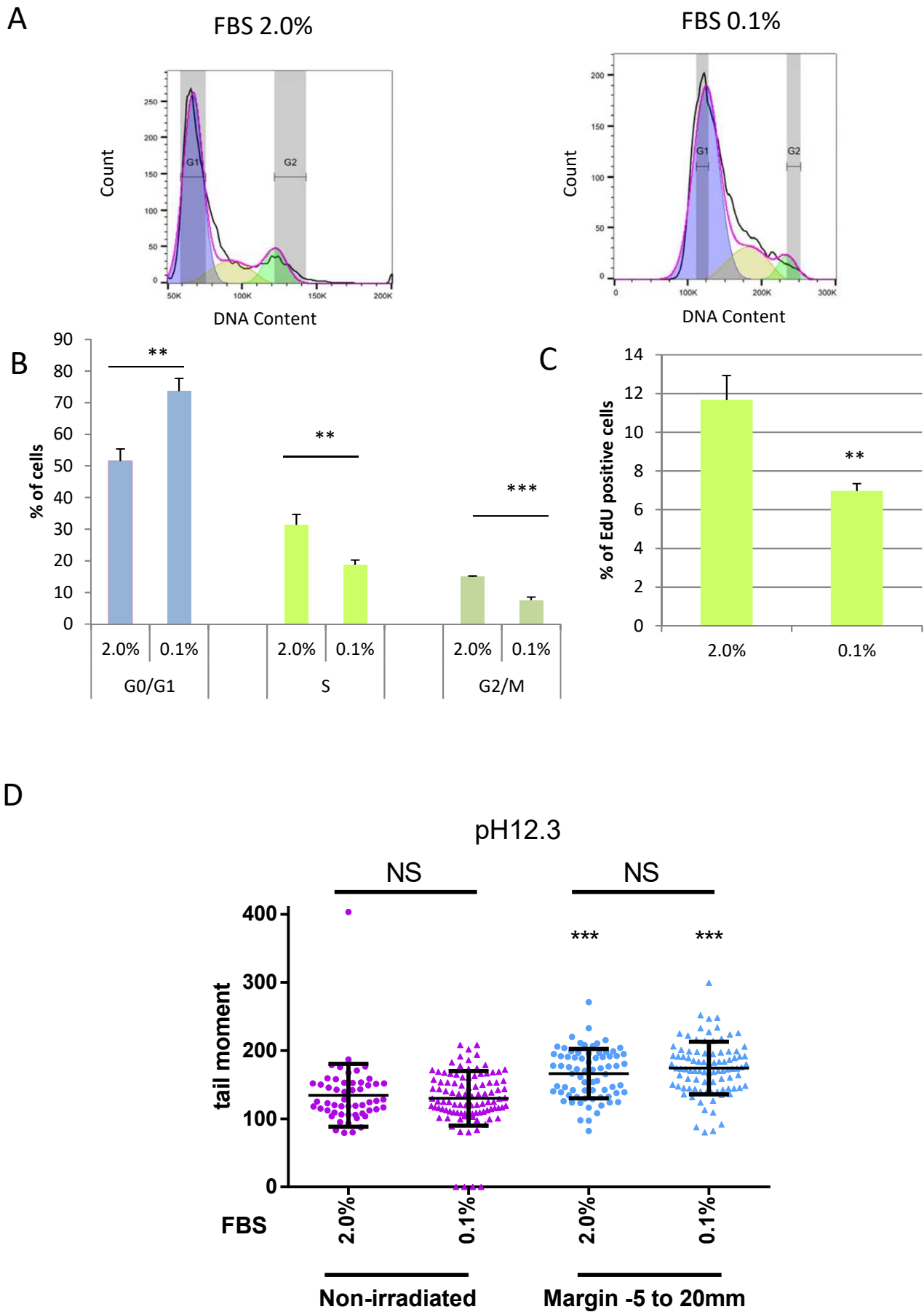


Sup Figure 9

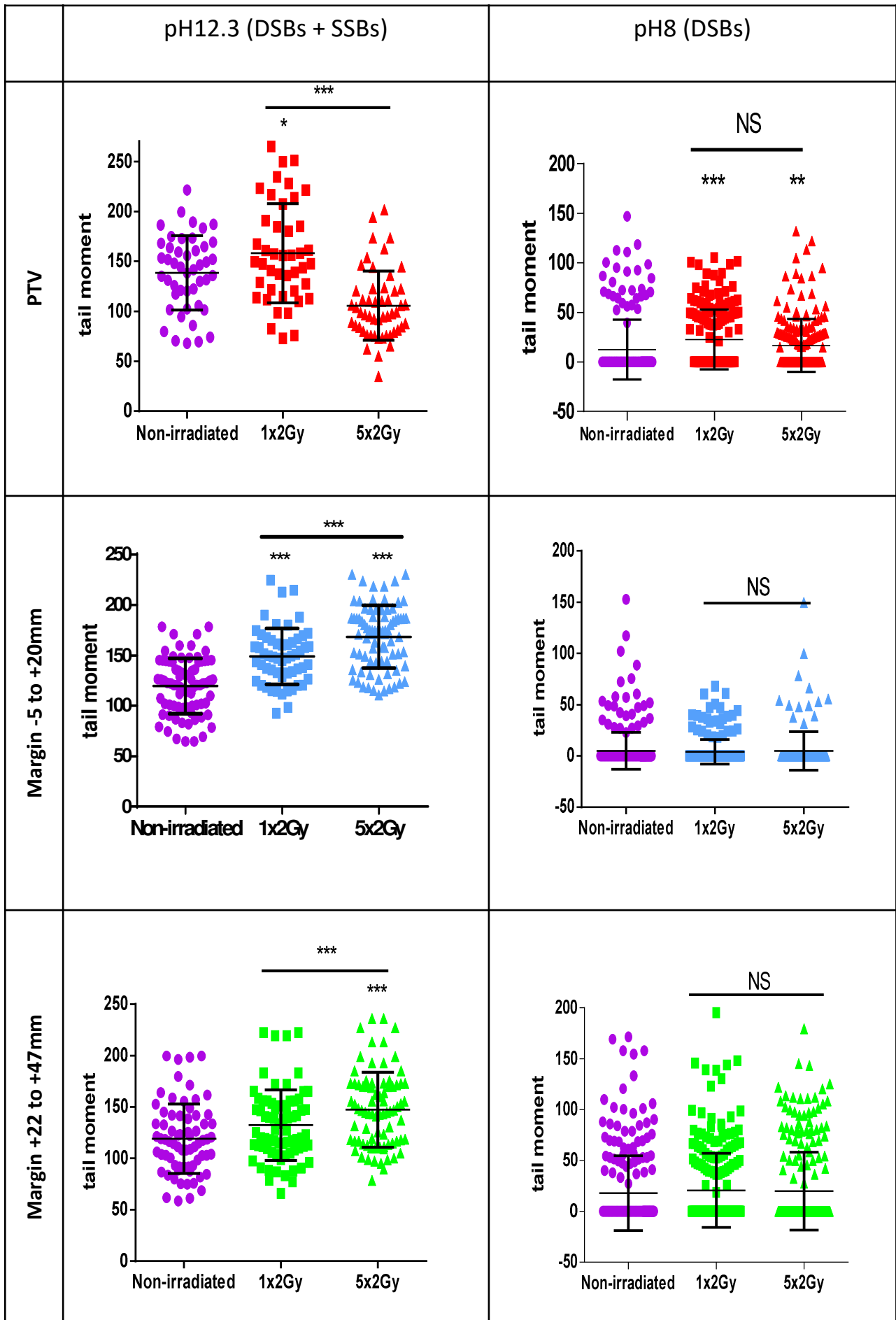


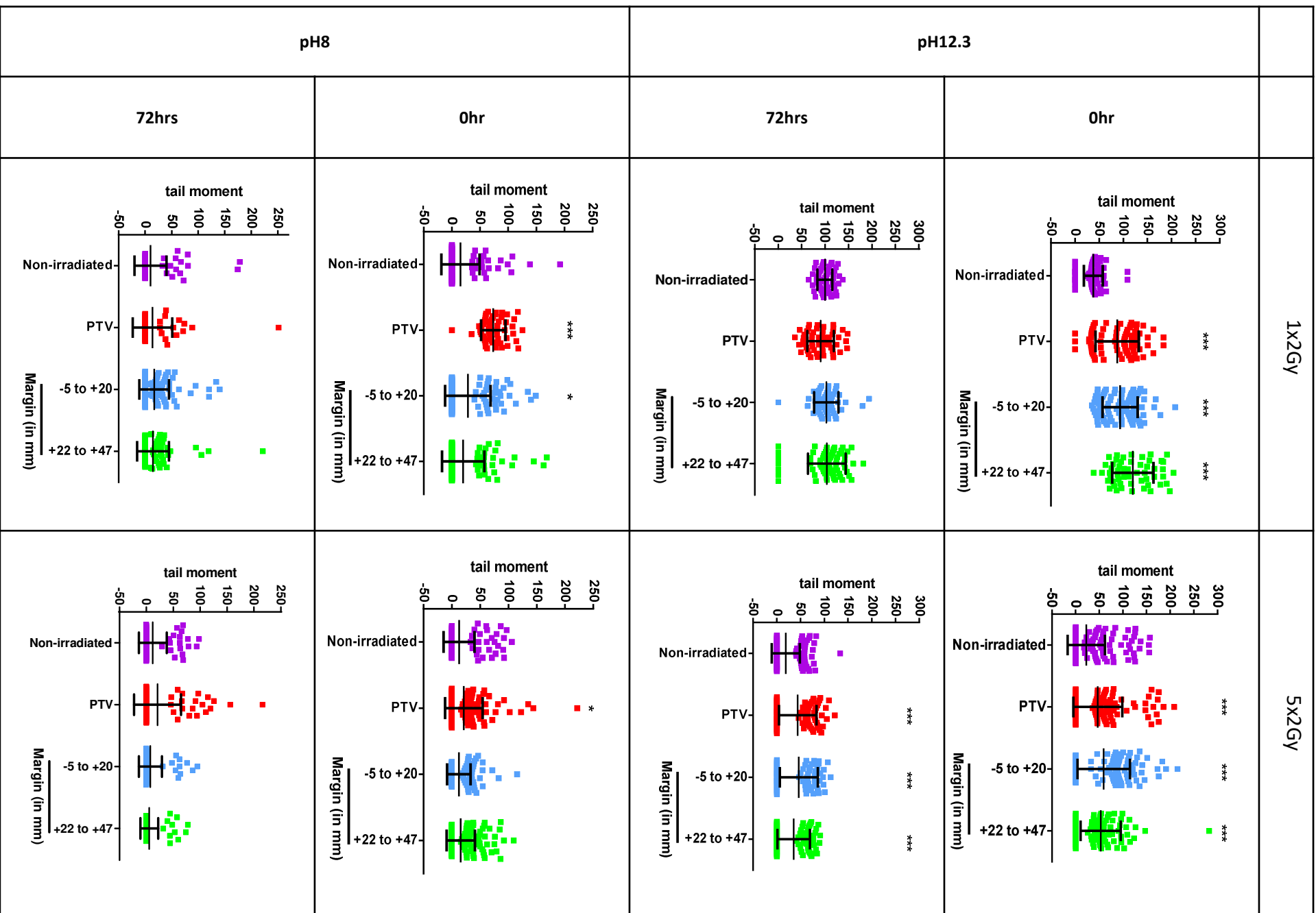
Sup Figure 10



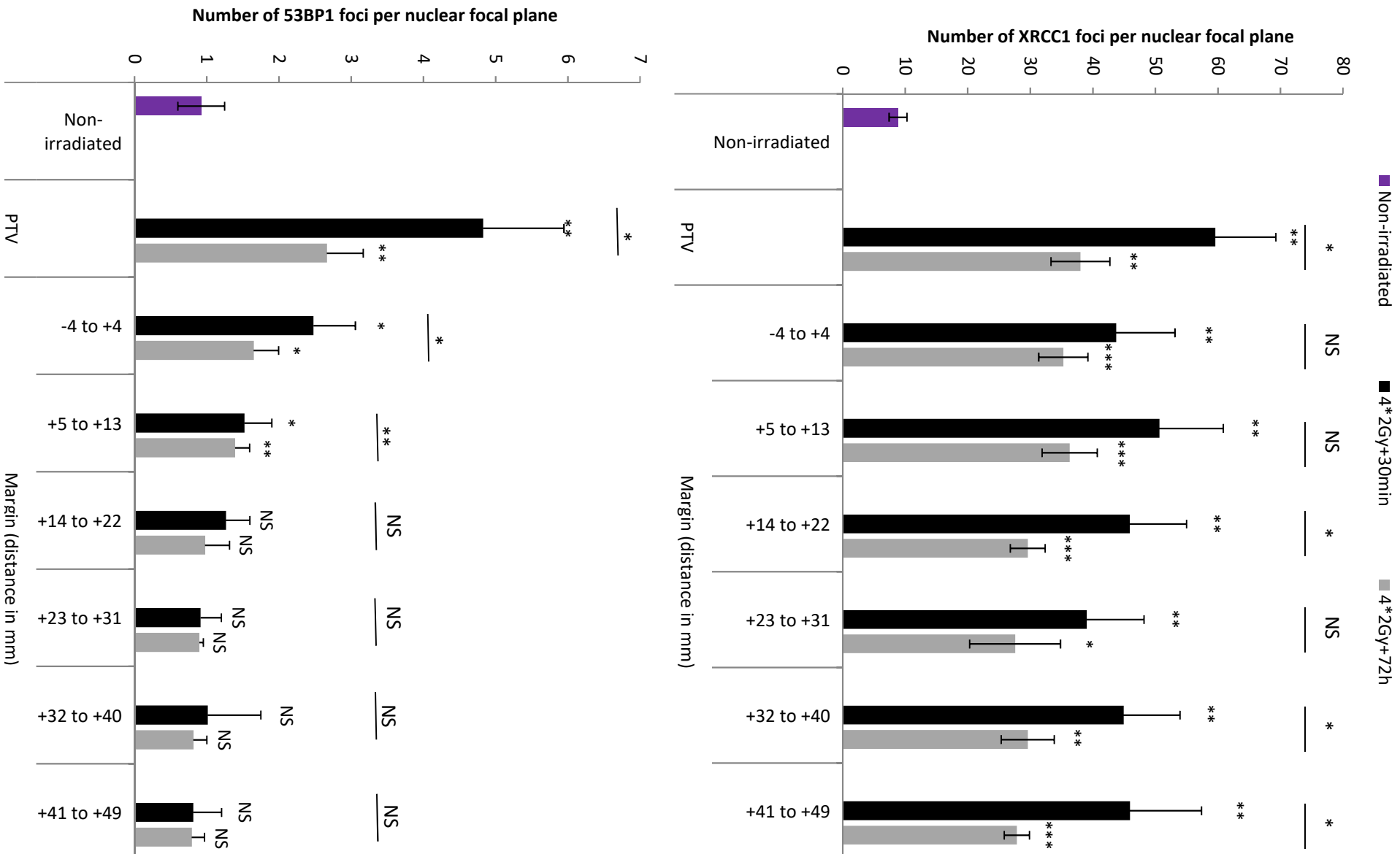


Sup Figure 12

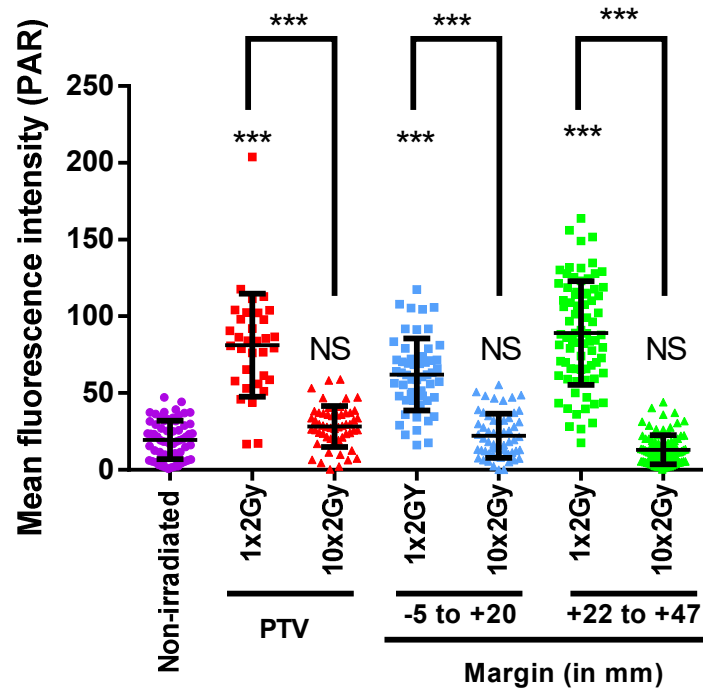




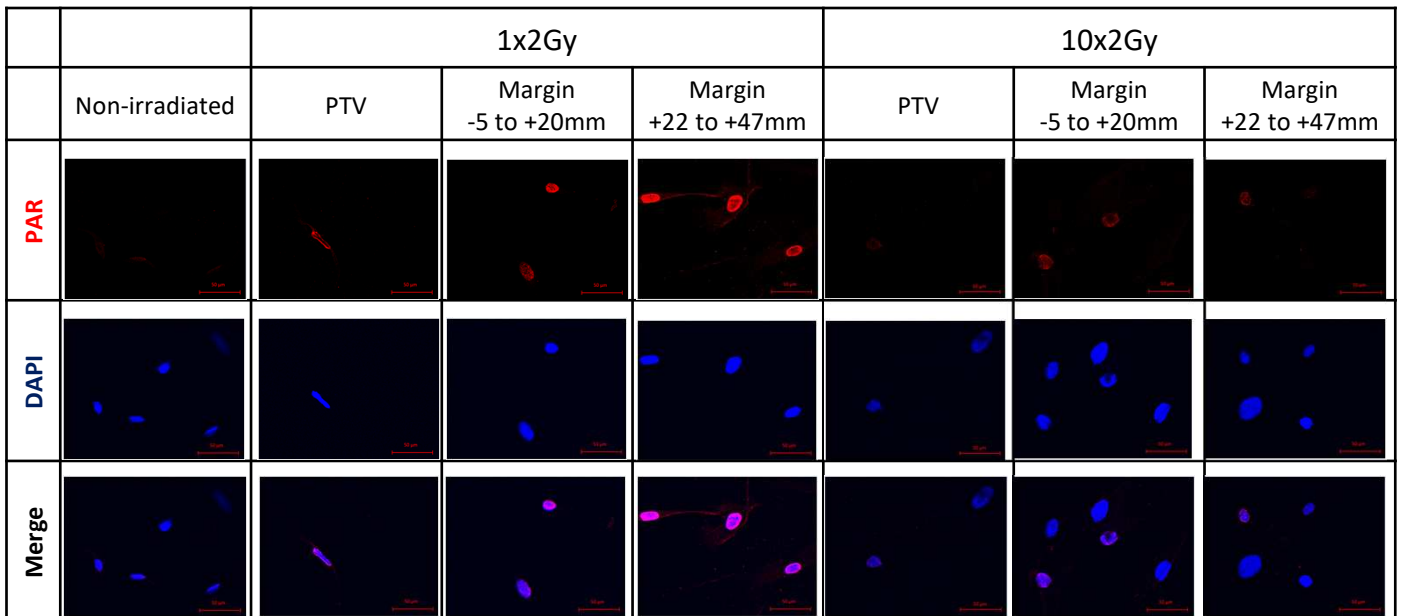
Sup Figure 14

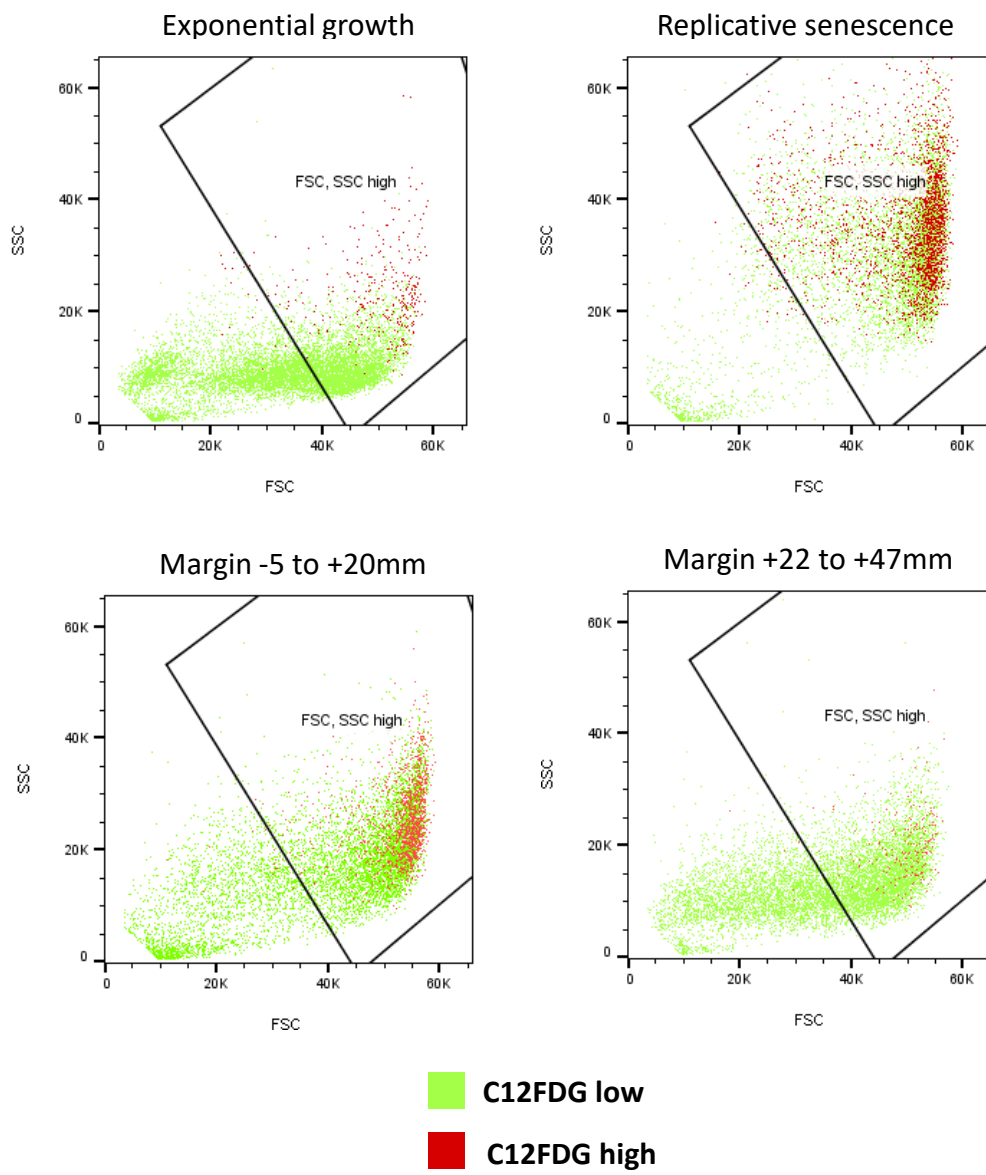


A

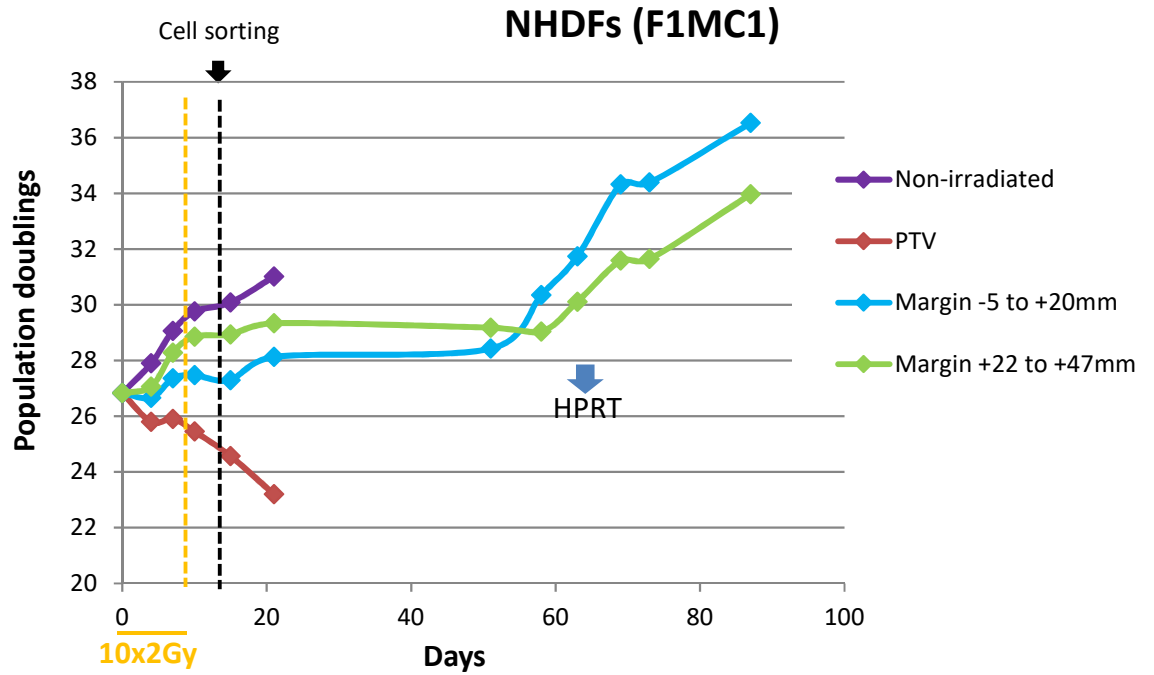


B



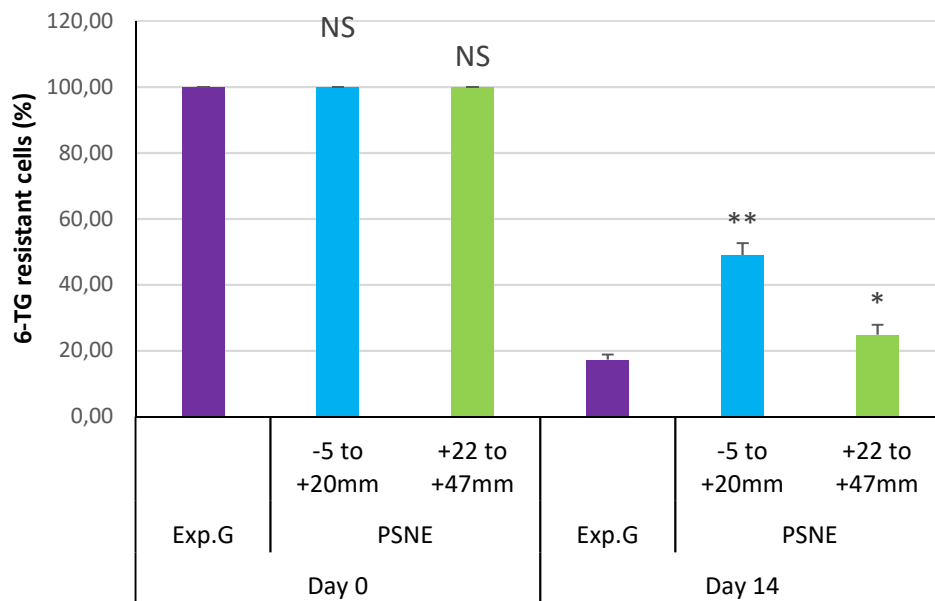


A

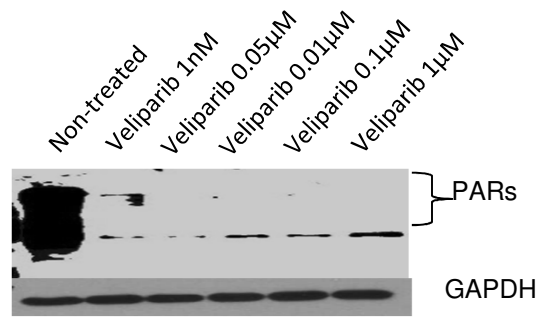


B

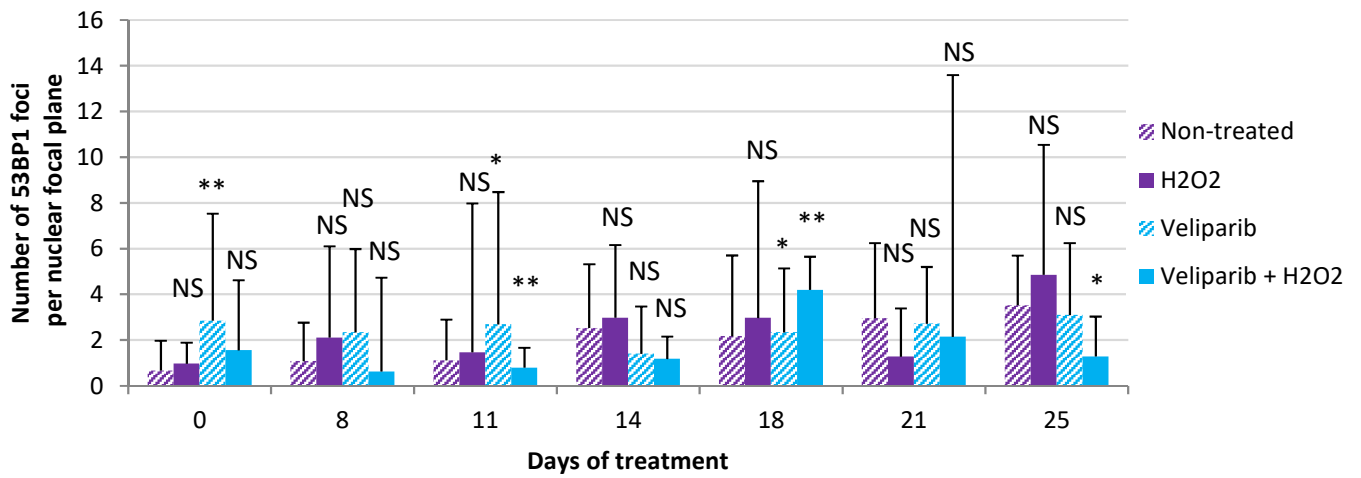
	Exp.G		PSNE -5 to +20mm		PSNE +22 to 47mm	
6-TG	-	+	-	+	-	+
Day 0						
Day 14						



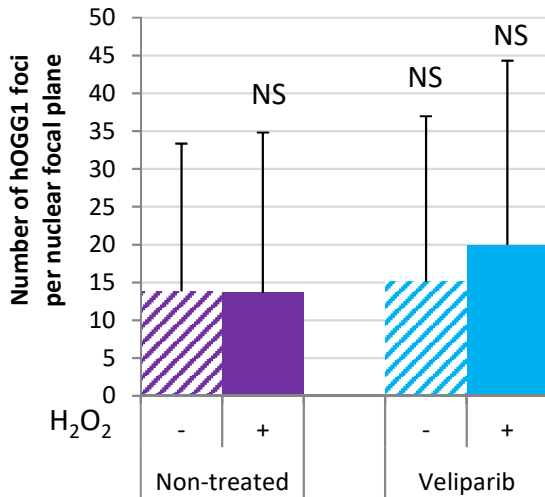
A



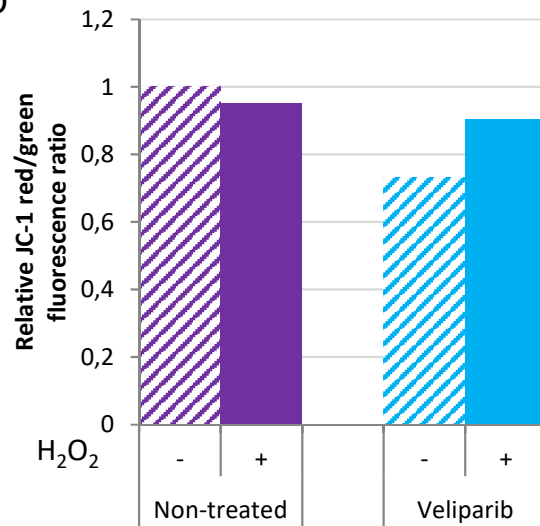
B



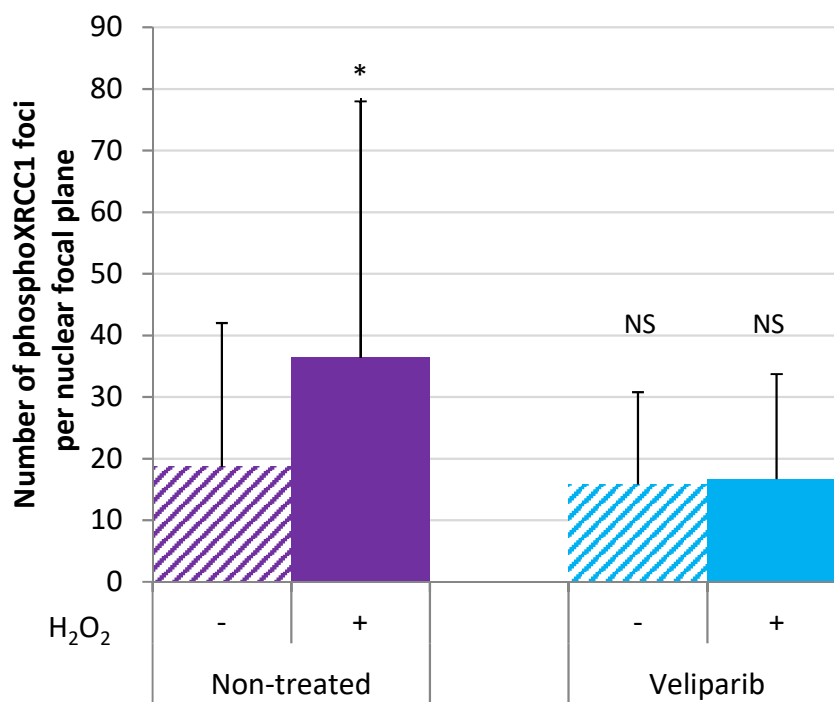
C



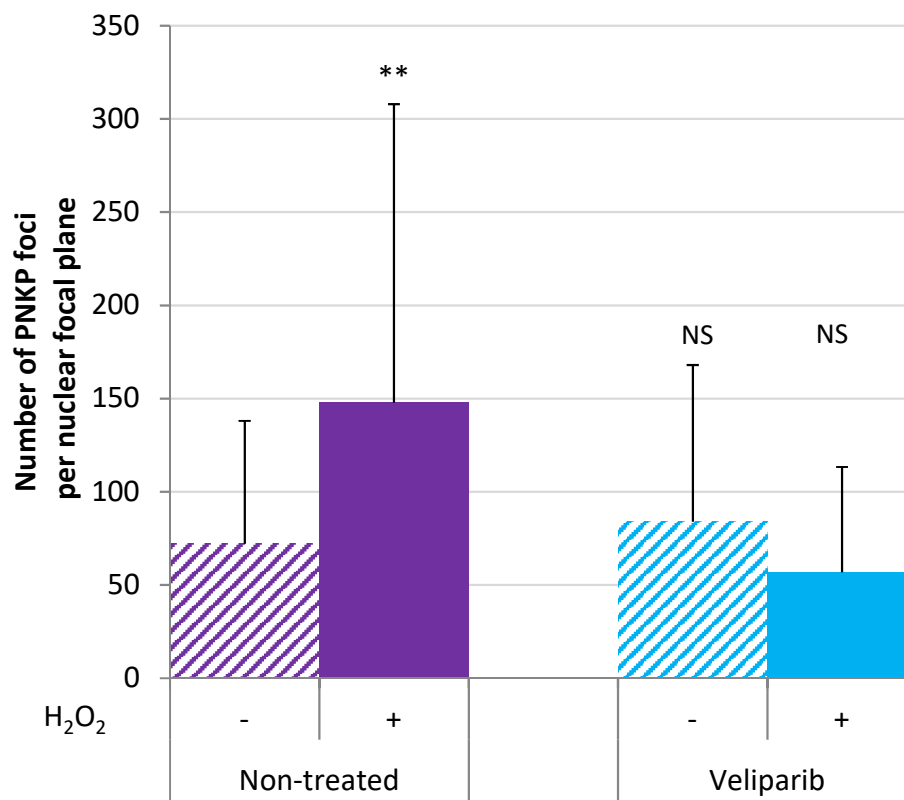
D

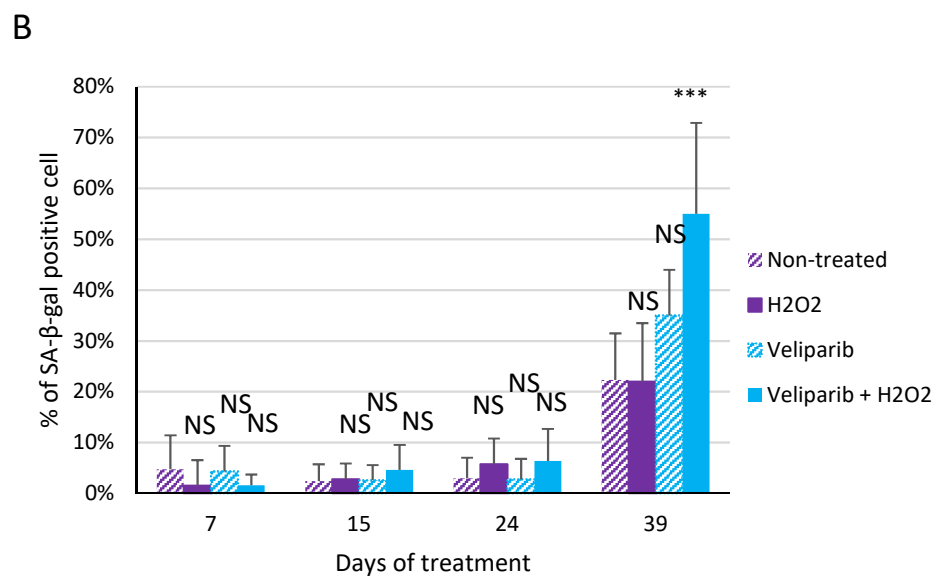
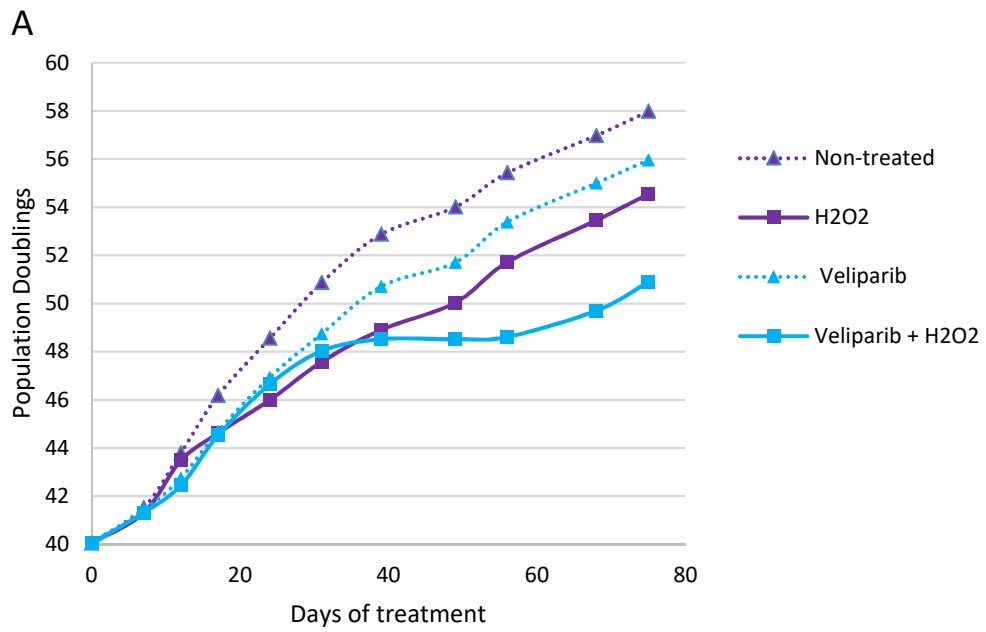


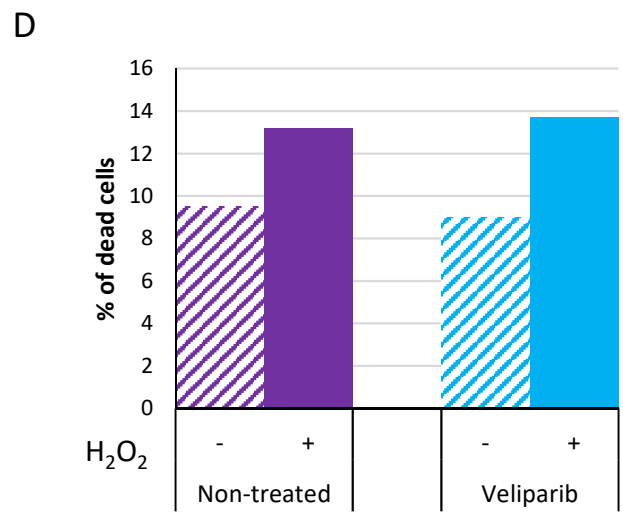
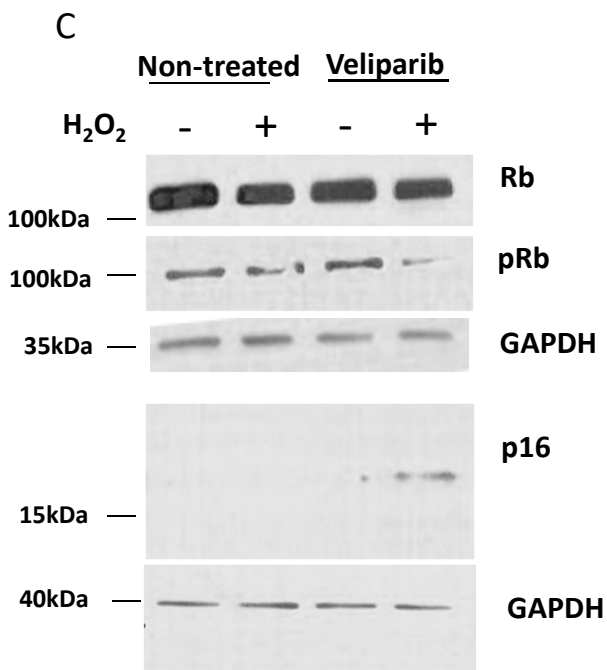
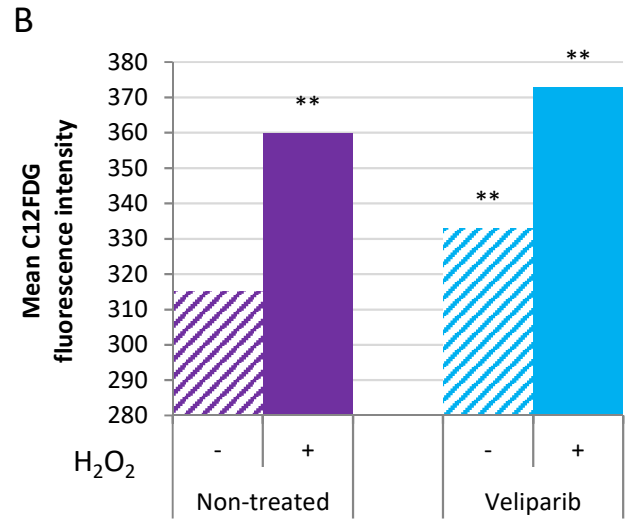
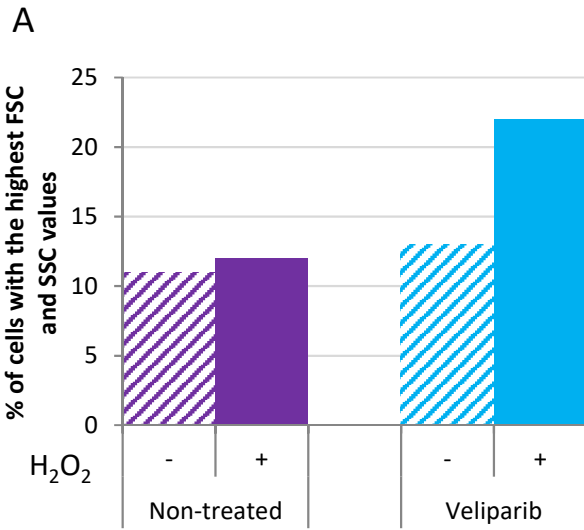
A



B







Résumé : Rôle de la sénescence dans l'initiation des sarcomes secondaires survenant en territoire irradié

La radiothérapie est une technique majeure dans le traitement contre le cancer. Elle a pour but d'induire la mort des cellules tumorales, principalement en générant des cassures double-brin (DSB) et simple-brin de l'ADN (SSB). Paradoxalement, la radiothérapie est associée dans de rares cas à la survenue de cancers secondaires. Les données de la littérature montrent que ces seconds cancers sont majoritairement des sarcomes et surviennent préférentiellement en marge du volume-cible planifié (PTV). Cette marge, composée de cellules non-tumorales, est caractérisée par une faible dose d'irradiation et un décalage du spectre d'énergie des particules ionisantes en faveur des énergies les plus faibles. Le premier objectif de ma thèse a été de caractériser les cassures de l'ADN induites dans des fibroblastes normaux de derme humain (NHDF) irradiés dans cette marge. Pour cela, l'équipe a mis en place un système expérimental permettant d'irradier des cellules positionnées en marge du PTV. En utilisant ce système expérimental, nous avons observé qu'un protocole de radiothérapie fractionnée induit une accumulation de SSB en marge du PTV, sans induire de DSB. Cette accumulation de SSB est associée à un défaut de réparation des SSB, corrélé à une baisse d'activité de la PARP, une enzyme essentielle de la voie de réparation des SSB.

Le second objectif a été d'étudier les conséquences de cette accumulation de SSB sur les NHDF. Pour cela, nous avons suivi la croissance des cellules irradiées en marge. Nos résultats montrent que l'irradiation en marge induit un arrêt de croissance. Nous avons évalué la mort cellulaire et montré que les cellules irradiées en marge du PTV ne meurent pas. Nous avons alors testé l'hypothèse d'une induction de sénescence en marge du PTV. La sénescence cellulaire est un état d'arrêt du cycle cellulaire associé à une survie à long terme. Par l'utilisation de différents marqueurs, nous avons montré qu'une partie de la population des NHDF irradiés en marge entrait en sénescence.

La population des cellules irradiées étant hétérogène du point de vue de la survenue de sénescence, nous avons trié les cellules présentant des marqueurs de sénescence très marqués et les avons suivis sur le long terme. Nous avons observé que certaines d'entre-elles étaient capables d'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence pour donner naissance à des cellules filles proliférantes, invasives et mutées. Néanmoins, la xénogreffe de ces cellules dans des souris SCID n'a pas permis de développement tumoral, ce qui suggère que ces cellules sont seulement pré-cancéreuses.

En combinant un traitement au peroxyde d'hydrogène combiné à un inhibiteur de PARP (le Véliparib), nous avons démontré que l'induction de SSB est suffisante pour induire la sénescence de NHDF et l'échappement de l'arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence.

In vivo, nous avons confirmé une partie de ces résultats en mettant en évidence l'induction de foyers XRCC1 (marqueurs de SSB) dans le derme de souris irradiées en marge du PTV. De même, nos premières expériences, qui restent à reproduire, utilisant des souris p16-LUC mettent en évidence une induction de sénescence in vivo en marge du PTV.

Ainsi, ces différents résultats montrent que des fibroblastes normaux placés en marge d'un PTV irradié par un protocole mimant une thérapie standard accumulent des SSB et entrent en sénescence prématurée. Certaines cellules sénescents sont capables d'échapper de l'arrêt du cycle cellulaire pour donner naissance à des cellules filles pré-transformées.