Sénescence cellulaire radio-induite : application à l'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques

Frédéric Soysouvanh

▶ **To cite this version:**

Frédéric Soysouvanh. Sénescence cellulaire radio-induite : application à l'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS465 . tel-03139851

HAL Id: tel-03139851
https://theses.hal.science/tel-03139851

Submitted on 12 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

IRSN/PSE-SANTÉ/SERAMED/Laboratoire de Radiobiologie des expositions Médicales (LRMED)

Sénescence cellulaire radio-induite : application à l'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques

Présentée par

Frédéric SOYSOUVANH

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par le Dr. Fabien MILLIAT

Présentée et soutenue publiquement le 24 Janvier 2019

Devant un jury composé de :

Pr. Isabelle PETROPOULOS	Présidente
Dr. David BERNARD	Rapporteur
Dr. François PARIS	Rapporteur
Pr. Jacques BALOSSO	Examinateur
Dr. Nazanine MODJTAHEDI	Examinatrice
Dr. Fabien MILLIAT	Directeur de thèse

The happier we get, the less we see.

Random Asian

C'est la vie ici, pas le paradis !

Amélie Fréneau 2017

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres du jury d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce travail de thèse :

-Le Pr. Isabelle Petropoulos pour avoir accepté de présider ce jury
-Les Dr David Bernard et François Paris pour avoir accepté d'en être les rapporteurs
-Le Dr Nazanine Modjtahedi et Pr Jacques Balosso pour avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du service ex-SRBE, SERAMED/SESANE pour leur chaleureux accueil et leur bonne humeur (quoique) quotidienne. Je tiens à m'excuser d'avance si je ne cite pas tout le monde mais considérez que toutes les personnes avec qui j'ai discuté, croisé, manipé ne sont pas oubliés ♥.

Un grand Merci à Fabien de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse, au cours de laquelle j'ai énormément appris et rencontré des personnes aussi excentriques qu'extraordinaires. Cette thèse a été la source de nombreux *nœuds aux cerveaux*, de *trous dans la raquette*. On a *navigué à vue* car c'était la *nébuleuse*, *on s'est arraché les cheveux* et *pataugé dans la semoule*. Heureusement, on ne s'est pas *mis la rate au court bouillon*. Cela a souvent aussi été *la foire du slip*, on s'est souvent posé la question : *c'est quoi le rationnel* ? « *Oh putain »*, avec l'arrivée d'Amine ça a aussi été l'*usine à gaz* et beaucoup de *« rien avoir avec la choucroute »*. Pour au final *être dans les clous* et *ne pas avoir accouché d'une souris*. Avec toutes ces péripéties, ces 3 dernières années sous ta direction furent bien rigolotes. Je te remercie pour ta disponibilité, de tout le temps que tu m'as consacré et tes nombreux conseils.

Je remercie les « chefs » du LRMed : Agnès pour ta bonne humeur, tes bons conseils et pour m'avoir énormément appris, en particulier pour l'analyse histo. Merci à Olivier pour tes conseils et de m'avoir appris sur la biologie des systèmes. Tonton Vincent pour m'avoir accueilli dans ta famille, ton aide au cytomètre et tes précieux conseils pour l'après-thèse. Je tiens également à faire parvenir un message de la part de Caron a qui tu as fait exploser le chiffre d'affaire en 2016. Bien que tu sois plus au L3R je te mets dans le même sac, Morgane, merci pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces 3 années, tes précieux conseils, les irradiations au SARRP au cours desquelles on a quand bien rigolé, ta tablette de chocolat. Ne t'inquiète pas je n'oublie pas la K2000 et je te transmettrais d'autres dessins si besoin ^^ ! Un grand merci à Amine pour toutes les analyses mathématiques et ta grande disponibilité, ce fut très stimulant de travailler avec toi.

Un grand merci à Georges pour m'avoir pris sous ton aile au début de ma thèse et qui m'a tout montré en 107 et en 113... Un ENORME Merci à Maman Valérie qui, comme Vincent, m'a adopté dans sa famille (ça devient étrange). Plus sérieusement, la réussite de cette thèse est en grande partie grâce à toi et aux manips que tu as faite à la fin. Pour ça je t'avais promis trois pages d'éloges et de remerciements, finalement je ne m'y tiendrai pas car trop long... Merci également d'avoir joué la psy mais ton fauteuil rouge est trop confortable, il me fallait bien des prétextes.

Merci aux 3 mousquetairettes du LRMed à qui il reste maintenant environ 330 jours avant la fin de la thèse : Alexia, la reine du caca, à qui je souhaite le meilleur et j'espère que tu réussiras à placer un jour le mot « étron » dans une de tes présentations. Annaïg, j'espère que tu penseras à souffler de temps en temps et à déstresser mais je m'inquiète pas ça se passera très bien. Enfin à Mariam... Mariam, Mariam, Mariam... Que dire sur toi à part « Mariouma, c'est la meilleure » ? Pareil, je t'avais dit 3 pages mais j'ai un peu la flemme... Bref, sans toi la thèse n'aurait pas été la même, on s'est bien marré, tu m'a énormément fais ch*er mais tu m'as apporté à manger alors tu es pardonnée. Je te souhaite le meilleur du monde, enfin ça se passera bien si tu te prenais un peu moins la tête (vas-y au talent comme je te l'ai souvent répété). Je suis très heureux de t'avoir rencontré et ça m'attriste de t'abandonner, QUE VAS-TU DEVENIR ? Ségolène (Mini Prout-Prout) et Clément à qui je souhaite bon courage en ce début de thèse, j'espère que vous allez bien morfler !!
Aux petites nouvelles Cloé (ou fœtus) et Clémence à qui je souhaite le meilleur pour leur alternance. Mention spéciale pour Khadi qui m'a appris ces merveilleux mots en wolof : *Dama bougedem tchi douchebi*.

Merci aux « anciens du LR2I » : Alexandra, Christine, Claire, Christelle et Noëlle pour votre bonne humeur et vos grandes rigolades dans les couloirs. Je tiens à remercier en particulier Christine avec qui je me suis bien marré et que j'ai pas mal dérangée à son bureau. Merci à Alain pour m'avoir fait partager, durant ces 3 longues années, ses odeurs de chaussures, chaussettes, vêtements de sport en tout genre au bureau, mais aussi les sandwichs/croissants réchauffés au radiateur… Sans oublier les fameuses choucroutes et autres potées… Exquis.

Un grand merci aux anciens du L3R/LR2I : Benoît (pour sa bonne humeur légendaire), Elodie (pour sa crédulité déconcertante), Cyprien (pour son formidable dandysme), Jérémy (pour son accent toulousain) et Fanny (pour son rire quelque peu étrange) qui m'ont tous très bien accueillis quand je n'étais encore qu'un petit « chinois » tout timide. Aux ex-stagiaires du LRMed, Nicolas V, Nicolas P, Cory, Cyrielle (Petit Poney), Anne-Charlotte (Bébé Prout-Prout) qui ont été bien rigolos. Merci à la grande prêtresse du Secrétariat Sandra Barth-Adecco-Crit-Intérim pour ta disponibilité et ta bonne humeur contagieuse. Lisa, maintenant passée du côté obscur, qui continue de compter ses points et à faire des rouleaux de papier.

Merci à l'ensemble du LRAcc et du LRTOX, Gaëtan, Eric, Géraldine, Stéphane F, Delphine, Bruno, Céline L, Juan, Alexandre, Maâmar, Pascale, Céline B, Laure ; Jean-Marc, Alice, David, Christelle D, Teni, Christelle E, Céline G, Stéphane G, Chrystelle, Philippe, Victor, Nicolas et

Céline S (aux jolis cheveux); pour leur bonne humeur, disponibilité et échanges fructueux. Merci à Aurélie pour ta grande gentillesse et les bons moments passés au cours des soirées jeux. Un grand merci à Amélie, la co-pilote, qui au final aura passé sa soutenance avant moi et avec qui j'ai partagé de grands moments riches en émotions. Mention spéciale pour Dimitri, aussi connu sous le nom de Joli-Nez, avec qui j'ai dansé un slow inoubliable ♥.

Merci à Yoann, d'abord pour toutes les sessions d'irradiation au LINAC mais aussi aux grandes discussions à chaque pause et repas. Un grand merci à Michele pour les acquisitions de la boîte à lumière ainsi que tes bons conseils.

Merci à Amandine, Romain, Sébastien ainsi que tous les membres du GSEA pour vous être montrés disponibles et pour vos précieux conseils sur les animaux. Merci d'avoir pris soin de mes petites souris au quotidien.

Merci à Fabiola et Camille pour m'avoir fait participer à leur projet sur le rein.

Merci à Véronique pour ta disponibilité et à Chloé pour tes croissants et tes cris dans les couloirs.

Une pensée à tous mes amis : Victor, Sophie, Haithem, Pikachu, Gaby, Jessica, Güllen, Lucile, Alex, Marine, Pascal, Soven, Nouilly, Itow, Zlonn, Azen, Hiba, Tiffany, Janon Macquemin, Nadia, Ekoe, Antony, Nicolas T (le faux cousin), Nicolas T, Mr Tchawe, Thomas (le tocard)… etc etc.. Pardon si j'en oublie.

Un grand merci à tous les membres de ma belle-famille, les Métois-Philip, pour leur soutien indéfectible. Dédicace à mon beau-cousin, el BG-Pêcheur, pour les futures parties de pêche.

Une pensée affectueuse à tous les membres de la famille Soysouvanh qui ont toujours été là pour moi, qui m'ont appris à ne jamais abandonner, à serrer les dents et surtout à toujours garder le sourire. Je vous aime fort.

Une grande pensée à ma grand-mère, à qui je dédie ce manuscrit.

Enfin, un petit mot pour Ma Tartine qui a dû, maintes et maintes fois, supporter mes états d'âmes, mais qui est toujours restée à mes côtés pour me soutenir. Chu~

Table des Matières

Remerciements 3

Table des Matières 6

Publications & Communications 10

Table des abréviations 12

Table des illustrations et tableaux 14

Avant-propos 16

État de l'art 17

Chapitre I : La radiothérapie 18

I. Les rayonnements ionisants 19

a. Généralités 19

b. Effets des rayonnements ionisants sur les systèmes biologiques 20

- Impacts physico-chimiques et moléculaires 20
- Atteintes cellulaires 21
- Conséquences tissulaires 24

II. Application médicale des rayonnements ionisants : la radiothérapie 27

a. Histoire, principe et usages 27

b. Evaluation du risque et prédiction de traitement 28

- Notion d'efficacité biologique et fractionnement de la dose 29
- Notions de volumes cibles et organes à risques 31

c. Les différentes techniques de radiothérapie externe 33

- La radiothérapie conformationnelle en trois dimensions 33
- La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité 34
- La radiothérapie en conditions stéréotaxiques 34
- L'hadronthérapie 35

d. Les effets secondaires des radiothérapies 36

Chapitre II : Le compartiment vasculaire et ses réponses aux rayonnements ionisants 40

I. Le réseau vasculaire : structure et organisation 41

II. Les rôles et fonctions de l'endothélium vasculaire 43

a. Perméabilité vasculaire 43

b. Hémostase vasculaire 43
c. Tonus vasculaire 44
d. Angiogenèse 44
e. Réponse immunitaire et inflammatoire 45
III. La réponse de l'endothélium aux rayonnements ionisants 46
a. L'apoptose endothéliale 46
b. Acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire 47
• Activation de l'endothélium 47
• Sécrétion de cytokines 48
c. L'acquisition d'un phénotype pro-coagulant et pro-fibrosant 49
• Activation du système de coagulation 49
• Phénotype anti-fibrinolytique 50
d. L'impact sur le processus d'angiogenèse 50
e. La transition endothélium-mésenchyme 51
Chapitre III : La sénescence cellulaire 53
I. Caractéristiques de la cellule sénescente 54
a. Morphologie 54
b. Arrêt irréversible des divisions 56
c. Atteinte nucléaire, modifications de la chromatine et dommages à l'ADN 58
d. Sénescence ou apoptose ? 59
e. Phénotype sécrétoire 61
f. Stress oxydant : rôles des *Reactive Oxygen Species* et dysfonction mitochondriale 66
g. Activité β-galactosidase associée à la sénescence 68
II. Les différents types de sénescence cellulaire 70
a. La sénescence réplicative 70
• Découverte 70
• Télomères et télomérase 70
• Signal d'entrée en sénescence 72
• Activation du DNA Damage Response, de p53 et arrêt du cycle 73
• Remodelage chromatinien et maintien du phénotype sénescent 73
b. La sénescence induite par oncogène 75
• Stress réplicatif et dommages à l'ADN 75
• Conséquences de l'activation de Ras 76

c. La sénescence prématurée induite par le stress 80
- Dérivés Réactifs de l'Oxygène 80
- Dommages à l'ADN 81
- Atteintes du cycle cellulaire 81
- Le Senescence-Associated Secretory Phenotype 82
- Cas de la sénescence endothéliale radio-induite 82

III. Aspects physiologiques et physiopathologiques de la sénescence 85
a. Rôle dans le développement 85
b. Frein à la tumorigenèse 86
c. Réparation tissulaire 87
d. Sénescence, vieillissement et pathologies liées à l'âge 88
IV. La cellule sénescente, une cible thérapeutique ? 97
a. Ciblage des spécificités de la cellule sénescente 97
b. Potentialiser l'élimination par le système immunitaire 98
c. Inhibition du phénotype sécrétoire 99
Chapitre IV : La fibrose radio-induite : cas des poumons 100
I. Anatomie pulmonaire 101
II. Pathologies pulmonaires 103
a. La bronchopneumopathie chronique obstructive 103
b. La fibrose pulmonaire idiopathique 104
c. Les cancers pulmonaires 104
III. Radiopathologie pulmonaire 107
a. La pneumopathie aiguë radio-induite 107
b. La fibrose pulmonaire radio-induite 107
- Le TGFβ 107
- La protéine PAI-1 108
- PAI-1 et sénescence 110

IV. Modélisation de la fibrose pulmonaire radio-induite : utilisation du SARRP 112
a. Présentation du SARRP 112
b. Modèle de fibrose pulmonaire radio-induite par le SARRP 114
Problématique et objectifs 115
Résultats 116
Discussion & Perspectives 174

I. La Stereotactic Body Radiation Therapy pulmonaire en clinique 175
II. Développement des lésions pulmonaires radio-induites après irradiation en conditions stéréotaxiques 181
III. Détection des cellules sénescentes *in vivo* 191
IV. Hétérogénéité des cellules sénescentes 195
V. Caractérisation de la dynamique transcriptionnelle de la sénescence endothéliale radio-induite 198
VI. Le phénotype sécrétoire des cellules sénescentes : une cible thérapeutique ? 204
VII. Implication de la protéine PAI-1 dans l'acquisition du phénotype sénescent après irradiation ? 209
Conclusion générale 210
Bibliographie 212

Publications & Communications

Publications

Lavigne J, Soysouvanh F, Buard V, Tarlet G, Guipaud O, Paget V, Milliat F, François A. Conditional Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 deletion in the endothelial compartment has no beneficial effect on radiation-induced whole-lung damage in mice. International Journal of Radiation Oncology Biology, 2017.

Lavigne J, Suissa A, Verger N, Dos Santos M, Benadjaoud M, Hamard L, Momken I, Soysouvanh F, Buard V, Guipaud O, Paget V, Tarlet G, Milliat F and François A. Lung stereotactic arc therapy in mice : development of radiation pneumopathy. *Soumis à International Journal of Radiation Oncology Biology*, 2018.

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Bertho A, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A, Milliat F. Stereotactic lung irradiation in mice promotes long-term senescence and lung injury. *Soumis*.

Communications orales

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A, Milliat F. Sénescence endothélial radio-induite et conséquences sur les lésions radiques aux tissus sains. Journées des Thèses de l'IRSN, Carry-le-Rouet, France, 2017.

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A, Milliat F. Radiation-induced endothelial senescence and consequences on healthy tissues. Journées de l'Ecole Doctorale.
Paris, France, 2017

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A, Milliat F. Radiation-induced endothelial senescence and role in normal tissue injury. International Cell Senescence Conference.
Paris, France, 2017

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A, Milliat F. Sénescence endothélial radio-induite et conséquences sur les lésions radiques aux tissus sains. Journées des Thèses de l'IRSN.
Annecy, France, 2018.

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A, Milliat F. Ionizing radiation-induced endothelial senescence and role in normal tissue injury. 44th European Radiation Research Congress, Pècs, Hongrie, 2018.

Communications affichées

Soysouvanh F, Lavigne J, Buard V, Tarlet G, Paget V, Guipaud O, François A, Milliat F. Sénescence endothéliale radio-induite et conséquences sur les lésions radiques aux tissus sains. Journées des Thèses de l'IRSN.
Le Croisic, France, 2016.

Soysouvanh F, Lavigne J, Lavarenne M, Buard V, Tarlet G, Paget V, Guipaud O, François A, Milliat F. Dynamic profile of molecular players involved in radiation-induced endothelial senescence. Journées des Thèses de l'Ecole Doctorale.
Paris, France, 2016.

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A, Milliat F. Ionizing radiation-induced endothelial senescence and role in normal tissue injury. Journées des Thèses de l'Ecole Doctorale.
Paris, France, 2018.

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A, Milliat F. Ionizing radiation-induced endothelial senescence and role in normal tissue injury. 4th Radiobiology Symposium – International Military Radiation & Innovation Symposium.
Paris, France, 2018.

Prix et distinctions

Travel Award for the 63rd annual meeting of the Radiation Research Society

Soysouvanh F, Lavigne J, Mondini M, Dos Santos M, Buard V, Tarlet G, Benadjaoud M, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A & Milliat F. Ionizing radiation-induced endothelial senescence and role in normal tissue injury.
Cancùn, Mexique, 2017.

Prix Poster 4th Radiobiology Symposium – International Military Radiation & Innovation Symposium (IMRIS)

Soysouvanh F, Benadjaoud M, Dos Santos M, Mondini M, Lavigne J, Buard V, Tarlet G, Adnot S, Deutsch E, Guipaud O, Paget V, François A & Milliat F. Ionizing radiation-induced endothelial senescence and role in normal tissue injury.
Paris, France, 2018.

Table des abréviations

3D-CRT	Three-Dimensional Conformal Radiation Therapy
53BP1	Tumor Protein p53 Binding Protein 1
53BP1	p53-Binding Protein 1
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AKT	AKR mouse Thymoma
Alt-EJ	Aternative End-Joining
aSMaSe	Sphingomyélinase acide
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine Triphosphate
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
ATRIP	ATR Interacting Protein
BAX	BCL-2 Associated X apoptosis regulator
BCL-2	B-cell CLL/Lymphoma 2
BCL-xL	BCL-2 related protein long isoform
BED	Biologically Effective Dose
BER	Base Excision Repair
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMI1	B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1 homolog
BRCA1	Breast Cancer 1
BrdU	Bromodésoxyuridine
C/EBPβ	CCAAT/Enhancer Binding Protein β
CBCT	Cone Beam Computed Tomography
CCL2	Chemokine (C-C) Ligand 2
CD16	Cluster Differentiation 16
CD226	Cluster Differentiation 226
CD56	Cluster Differentiation 56
CDC25A	Cell Division Cycle 25A
CDC6	Cell Division Cycle 6
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
cGAS	cGMP-AMP Synthase
CHK1	Checkpoint Kinase 1
CHK2	Checkpoint Kinase 2
CML	Cellules Musculaires Lisses
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CSF	Colony Stimulating Factor
CSF	Colony Stimulating Factor
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CTV	Clinical Target Volume
CYR61	Cystein-Rich, angiogenic inducer 61
DAMPs	Damage-Associated Molecular Pattern
DCR2	Decoy Receptor 2
DDR	DNA Damage Response
DPI	Diphenyleneiodonium
EBR	Efficacité Biologique Relative
EDHF	Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
EHMT2	Euchromatic Histone-lysine N-Methyltransferase 2
ETS1 -2	Avian Erythroblastosis virus E26 homolog-1 -2
FACS	Flourescent-Activated Cell Sorting
FGF	Fibroblast Growth Factor
GMPc	Guanosine Monophosphate cyclique
GROα	Growth-Related Oncogene α
GSK3	Glycogen Synthase 3
GTV	Gross Tumor Volume
HBP1	HMG-Box transcription factor 1
HDV	Histogramme dose-volume
HEY2	Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2
HIS	Hybridation in situ
HPV	Human Papillomavirus
HR	Homologous Recombination
HUS1	HUS1 checkpoint clamp component
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule type 1
ICAM-2	Intercellular Adhesion Molecule type 2
ID1	Inhibitor of DNA binding 1
IFNγ	Interferon γ
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
IL-1	Interleukine 1
IL1R1	Interleukin 1 Receptor type 1
IL-6	Interleukine 6
IMRT	Intensity Modulated Radiation Therapy
ING1	Inhibitor of Growth
IPF	Idiopathic Pulmonary Fibrosis
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
kb	kilobase
KLRK1	Killer Cell Lectin Like Receptor 1
LAP	Latency Associated Peptide
LET	Linear Energy Transfer
MAP	Mitogen-activated Protein
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MDM2	MDM2 Proto-oncogene
MDSC	Myeloid-derived Suppressor Cells
MEK	MAK/ERK Kinase
MiDAS	Mitochondrial Dysfunction-Associated Senescence
MLL1	Mixed Lineage Leukemia gene 1
MMP	Matrix Metallopeptidase
MnSOD	Manganese Superoxide Dismutase
MOS	Moloney murine Sarcoma viral oncogene homolog
MRE11	MRE11 homolog, double-strand break repair nuclease
MTD	Maximum Tolerated Dose
mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
N1ICD	Notch1 Intracellular Domain
NBN	Nibrin

endoMT	Transition endothélio-mésenchymateuse
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NK	Lymphocyte Natural Killer
NO	Monoxyde d'azote
NOX	NADPH Oxidase
NSCLC	Non Small Cells Lung Cancer
OAR	Organes à risques
OIS	Oncogene-Induced Senescence
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor type 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed cell Death protein 1
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule type 1
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PolyI:C	Acide polyinosinique-polycytidylique
POT1	Protection Of Telomeres 1
pRB	protéine du Rétinoblastome
Pro-SFPC	Pro-Surfactant Protein C
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTOP	POT1 and TIN2 Organizing Protein
PTV	Planning Target Volume
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAD1	RAD1 checkpoint DNA exonuclease
RAD17	RAD17 checkpoint clamp loader component
RAD50	RAD50 double-strand break repair protein
RAD9	RAD9 checkpoint clamp component
Raf	Rat Fibrosarcoma
RAP1	transcription Repressor/Activator Protein 1
Ras	Rat Sarcoma
RCF2	Replication Factor subunit 2
RILD	Radiation-Induced Lung Disease
RIS	Radiation-Induced Senescence
ROI	Region of Interest
ROS	Reactive Oxygen Species
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
SAHF	Senescence-Associated Heterochromatin Foci
SAI	Syndrome Aigu d'Irradiation
SAM	Senescence-Associated Macrophages
SARRP	Small Animal Radiation Research Platform
SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype
SA-β-Gal	Senescence-Associated β-galactosidase
SBRT	Stereotactic Body Radiation Therapy
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SDI1	Senescent cell-derived Inhibitor 1
SHH	Sonic Hedgehog
SIPS	Stress-Induced Premature Senescence
siRNA	small interfering RNA
SIRT1	Sirtuine 1
SM22-α	Smooth Muscle 22 α
Smases	Sphingomyélinases
SMS	Senescence Messaging Secretome
SNC	Système nerveux central
NF1	Neurofibromatosis type 1
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
Sp1	Specificity protein 1
STING	Stimulator of Interferon Genes
SV40	Simian virus 40
TBI	Total Body Irradiation
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitors
TGF	Transforming Growth Factor
TIFs	Telomeres dysfunction induced foci
TIN2	TRF1 Interacting Nuclear factor 2
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumor Protein p53
t-PA	tissue Plasminogen Activator
TRAIL-R	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor
TRF1	TTAGGG Repeats Factor 1
TRF2	TTAGGG Repeats Factor 2
u-PA	urokinase Plasminogen Activator
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule type 1
VE Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand Factor
α-SMA	α Smooth Muscle Actin
β-gal	β-galactosidase

Table des illustrations et tableaux

Figure 1. Représentation schématique de la densité d'ionisation et de la pénétration des rayonnements α, β^- et γ 19
Figure 2. Séquence d'évènements depuis le dépôt d'énergie à l'apparition des effets biologiques 21
Figure 3. Représentation schématique des voies impliquées dans l'apoptose induite par les rayonnements ionisants 24
Figure 4. Modélisation de courbes de survie cellulaire. 30
Figure 5. Les volume-cibles en radiothérapie. 32
Figure 6. Courbes dose-réponse en radiothérapie: concept de fenêtre thérapeutique. 33
Figure 7. Comparaison des isodoses entre un traitement par 3D-CRT et IMRT d'un cancer anal. 34
Figure 8. Comparaison entre radiothérapie classique et hadronthérapie. 35
Figure 9. Cinétique d'évènements impliqués dans la réponse tissulaire radio-induite. 38
Figure 10. Structure d'une artère et d'une veine. 41
Figure 11. Principaux effets des rayonnements ionisants sur le compartiment endothélial. 52
Figure 12. Modifications morphologiques des HUVECs sénescentes. 55
Figure 13. Le cycle cellulaire et ses régulateurs. 56
Figure 14. Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF). 59
Figure 15. Les voies NF-κB et C/EBPβ : régulateurs du *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP). 65
Figure 16. Marquage au X-gal de cellules endothéliales irradiées. 68
Figure 17. Principaux marqueurs de sénescence cellulaire. 69
Figure 18. Le télosome. 71
Figure 19. Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la sénescence réplicative. 74
Figure 20. Principales voies de signalisation impliquées dans l'induction de la sénescence induite par oncogène. 77
Figure 21. Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans *l'Oncogene-Induced Senescence* (OIS) 78
Figure 22. Représentation schématique des principales voies de signalisation impliquées dans la sénescence radio-induite. 84
Figure 23. Expression de la Senescence-Associated β-galactosidase dans les tissus embryonnaires 85
Figure 24. Modèle unifié de la sénescence proposé par Muñoz-Espín et Serrano. 88
Figure 25. Deux souris C57BL/6 INK-ATTAC âgées de 22 mois. 89
Figure 26. Augmentation de la bioluminescence en fonction de l'âge chez des animaux $p16^{LUC}$. 90
Figure 27. Les poumons et l'arbre trachéo-bronchique 101
Figure 28. Le parenchyme respiratoire. 102
Figure 29. Rôle de PAI-1 dans le développement de la fibrose. 109
Figure 30. Le *Small Animal Radiation Research Platform* (SARRP) 113

Figure 31. Modifications scanographiques précoces après radiothérapie en conditions stéréotaxiques pour le traitement de NSCLC (T1 N0). 182
Figure 32. Modifications scanographiques tardives après radiothérapie en conditions stéréotaxiques pour le traitement de NSCLC (T1 N0). 182
Figure 33. Détection des cellules sénescentes in vitro et in vivo par marquage au GL13. ..194

Tableau 1. Principaux acteurs impliqués dans la reconnaissance et la signalisation des dommages à l'ADN. 22
Tableau 2. Principales formes du SAI : évolution temporelle typique, doses seuils, principaux effets et risques à long terme. 26
Tableau 3. Les principaux composants du Senescence-Associated Secretory Phenotype endothélial. 62
Tableau 4. Liens entre sénescence et pathologies associées à l'âge. 96
Tableau 5. Indications des radiothérapies du cancer du poumon 106

Avant-propos

La découverte des rayonnements ionisants par le docteur Röntgen, en 1895, a rapidement abouti à une révolution dans le domaine médical. La capacité de ces rayons à traverser la matière a été utilisée à des fins diagnostiques en radiologie, dont les premiers centres ouvrirent au début de l'année 1896. En France, les premiers centres de radiologie apparurent en 1897 sous l'impulsion d'Antoine Béclère. Le potentiel thérapeutique des rayonnements ionisants a par la suite été démontré, ainsi la roentgenthérapie, la radiumthérapie et la curiethérapie ont évolué au fil des nouvelles connaissances et de l'innovation pour aboutir à la radiothérapie moderne. Malgré les progrès récents en radio-oncologie avec la planification du traitement et la radiothérapie guidée par imagerie, la toxicité aux tissus sains demeure un facteur limitant la dose pour un contrôle local optimal des tumeurs. De plus, à mesure que le nombre de survivants du cancer, à long terme, augmente, de graves complications apparaissent et nuisent considérablement à la qualité de vie des patients.

Dans ce contexte, le Laboratoire de Radiobiologie des expositions Médicales (LRMed) de l'IRSN a identifié la réponse du système vasculaire, en particulier l'endothélium, comme facteur influençant l'apparition des effets secondaires de la radiothérapie. De nombreux travaux ont identifié la sénescence cellulaire comme réponse des cellules endothéliales aux rayonnements ionisants. La sénescence cellulaire est un état de différentiation avancé défini comme l'arrêt complet et irréversible de la division cellulaire. Ce phénotype est capable d'influencer le microenvironnement tissulaire par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et le recrutement de cellules de l'immunité.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la sénescence endothéliale radio-induite et avons tenté d'élucider son implication dans le développement des lésions radio-induites. Pour cela, nous avons mis en place un modèle d'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques chez la souris et tenté d'identifier les types cellulaires sénescents. Par une approche *in vitro* nous avons également décrypté le profil transcriptionnel des cellules endothéliales après irradiation. Ce travail de thèse a permis la caractérisation de la sénescence endothéliale radio-induite, l'implication de la voie de l'IL-1 dans ce processus et l'identification de cellules sénescentes après irradiation en conditions stéréotaxiques.

État de l’art

Chapitre I : La radiothérapie

I. Les rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants furent découverts à la fin du XIX^{ème} siècle par Wilhelm Conrad Röntgen. Cette découverte et les travaux qui en découlèrent ont permis l'exploitation des rayonnements ionisants dans le domaine industriel, de l'énergie, de la défense et celui de la santé.

a. Généralités

Un rayonnement, ou radiation, est une émission ou une propagation d'énergie et de quantité de mouvement impliquant une onde ou une particule. Un rayonnement est dit ionisant lorsqu'il est capable de produire des ions, en arrachant les électrons des atomes et molécules de la matière qu'il traverse. Ce phénomène est appelé ionisation. On distingue deux types de rayonnements ionisants :

1) les radiations électriquement chargées, qui émettent leur énergie sous forme de particules : α (noyau d'Hélium), β (électrons ou positrons), les protons et les ions lourds. Ces particules sont dites directement ionisantes, c'est-à-dire qu'elles déposent leur énergie en continu dans la matière.

2) les rayonnements électromagnétiques γ et X, de nature photonique. Ces rayonnements ne possèdent pas de charge et sont indirectement ionisants. L'énergie est déposée lorsque le rayonnement interagit avec une particule chargée présente dans la matière.

Outre la nature de l'énergie émise, ces rayonnements vont avoir des capacités de transfert d'énergie (LET, *Linear Energy Transfer*) et de pénétration différentes. Les low-LET, comprenant les rayonnements β, γ et X, entrainent un faible dépôt d'énergie dans la matière. Tandis que les high-LET, comme les particules α, provoquent beaucoup plus d'ionisations sur leur passage. Néanmoins, celles-ci, comme les β, sont peu pénétrantes. Les radiations électromagnétiques sont, quant à elles, très pénétrantes (Figure 1).

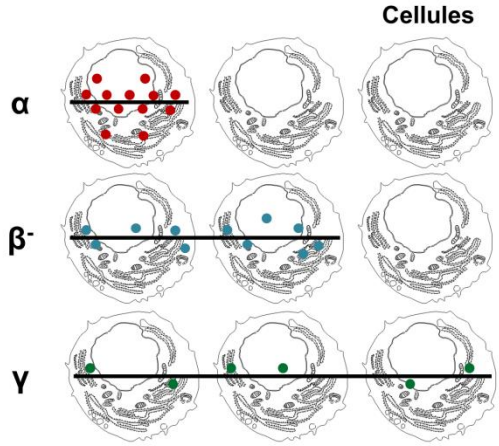


Figure 1. Représentation schématique de la densité d'ionisation et de la pénétration des rayonnements α, β$^-$ et γ

La radioactivité est la source la plus connue de rayonnements ionisants. La désintégration de noyaux atomiques instables, appelés radioisotopes, est accompagnée d'une émission de rayonnements α, β, γ ou X. Ces radiations transfèrent une partie ou la totalité de leur énergie dans la matière qu'elles traversent. La quantité d'énergie absorbée est plus communément appelée « dose absorbée ». Dans le système international, la dose absorbée, notée D, est exprimée en Gray ou Gy. Un gray correspond à un transfert d'énergie d'un joule à un kilogramme de matière ($1\ Gy = 1\ J/kg$).

b. Effets des rayonnements ionisants sur les systèmes biologiques

Comme évoqué précédemment, les rayonnements ionisants, particulaires ou électromagnétiques, provoquent l'ionisation des atomes composant la matière. Dans le tissu, le passage des rayonnements ionisants induit des altérations cellulaires générées par effets directs ou indirects. On parle d'action directe lorsque l'énergie d'ionisation est absorbée au niveau des « sites vitaux » de la cellule (acides nucléiques, protéines, lipides). Les radiations peuvent également induire la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Ces radicaux libres sont issus de la décomposition de la molécule d'eau par les rayonnements, appelée radiolyse de l'eau (LaVerne, 2000). Les espèces chimiques ainsi formées peuvent causer d'importants dégâts moléculaires et cellulaires, on parle alors d'effets indirects. On estime que la proportion de ces deux actions est de l'ordre de 30% pour les effets directs et 70% pour les effets indirects (Nikjoo *et al.*, 2002).

Les effets moléculaires exposent les cellules à un stress important pouvant aboutir à leur mort. Ce stress cellulaire va également avoir des conséquences au niveau tissulaire en impactant l'organisation et la fonctionnalité de l'organe.

- *Impacts physico-chimiques et moléculaires*

Au niveau moléculaire, l'irradiation de systèmes biologiques génère une succession d'évènements possédant une fenêtre temporelle extrêmement large, de l'attoseconde (10^{-18} s) à des années (Figure 2).

Lorsqu'un rayonnement ionisant traverse un système biologique, de l'énergie va être absorbée au niveau des macromolécules, telles que l'ADN, les protéines et les lipides, causant ainsi des dommages (effets directs) (Reisz *et al.*, 2014). Cependant, la composante principale d'un tissu, ou d'une cellule, est l'eau. L'exposition de la molécule d'eau à des radiations ionisantes va produire un ion positif H_2O^+ et un électron libre (e^-) (Spinks and Woods, 1990).

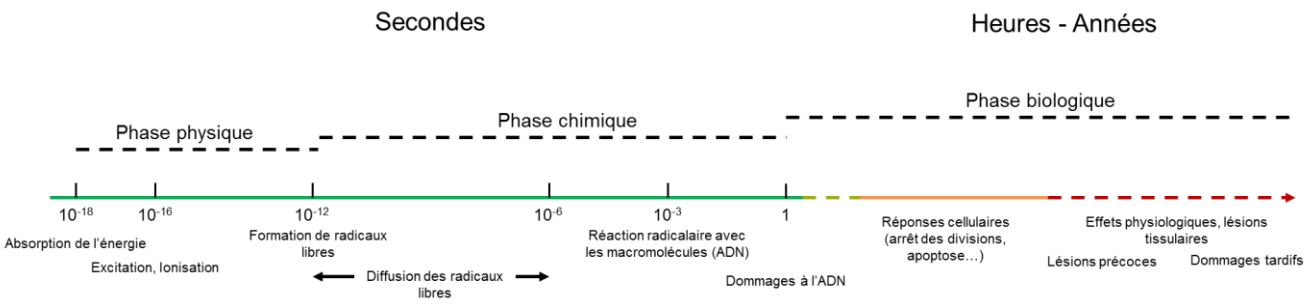


Figure 2. Séquence d'évènements depuis le dépôt d'énergie à l'apparition des effets biologiques
D'après Shrieve, D. C & Loeffler, J. S. *Human Radiation Injury* (2010)

Ces particules chargées vont interagir avec d'autres molécules d'eau formant les radicaux libres primaires : le radical hydroxyl ($OH^{\bullet}$), le radical hydrogène ($H^{\bullet}$) et l'électron aqueux (e^-_{aq}). Ceux-ci peuvent se recombiner et former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le dihydrogène (H_2).

Ces radicaux libres sont responsables de la majorité des dommages cellulaires. En particulier le radical hydroxyl, produit le plus abondant, il induit d'importants dégâts au niveau de la molécule d'ADN (Reisz *et al.*, 2014). Ce dernier va réagir de manière préférentielle avec les bases azotées et les riboses créant ainsi la formation de sites abasiques et des cassures simple- et/ou double-brin.

Les protéines sont également une cible des ROS. Les réactions radicalaires avec les protéines vont induire l'oxydation des celles-ci. Ces oxydations incluent des cassures du squelette de la protéine, des modifications des acides aminés, des carbonylations et l'oxydation des composés soufrés. Ces modifications vont déstabiliser les interactions protéine-protéine, favoriser leur dégradation et modifier l'expression du protéome en privilégiant la réponse anti-oxydante et inflammatoire (Reisz *et al.*, 2014).

Enfin, les radicaux libres attaquent les lipides, qui subissent une peroxydation. Les acides gras polyinsaturés en sont les cibles préférentielles. Les lipides composent majoritairement la membrane cellulaire. Une fois peroxydés, la perméabilité membranaire est augmentée, le potentiel électrochimique de membrane est dérégulé et l'activité des protéines membranaires est altérée (Reisz *et al.*, 2014).

- *Atteintes cellulaires*

Les rayonnements ionisants vont donc réagir, directement ou indirectement, avec les différentes molécules qui composent la cellule. Les dommages à l'ADN sont les plus pernicieux car ils mettent en péril l'intégrité du génome. Les cellules mammifères peuvent répondre de plusieurs manières face à ces lésions : l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de

ses points de contrôle, la mise en place des systèmes de réparation de l'ADN et la mort programmée (Turesson *et al.*, 2003; Reisz *et al.*, 2014).

Les rayonnements ionisants vont induire différents types de dommages à l'ADN. Parmi les plus représentés, on retrouve les altérations des bases azotées, les cassures simple- et double-brin (Turesson *et al.*, 2003). Ces atteintes sont reconnues par la cellule via un réseau protéique composé de senseurs, de transducteurs et d'effecteurs (Iliakis *et al.*, 2003). Les senseurs reconnaissent les dommages et initient la cascade de signalisation. Les transducteurs relayent et amplifient le signal. Ils stimulent les effecteurs, principalement par phosphorylation, qui activent les checkpoints du cycle cellulaire. Les principaux acteurs sont listés dans le Tableau 1.

Fonctions	*Gènes*	
Senseurs	*RAD17*	
	RFC2-5	
	RAD9	
	RAD1	*Complexe 9-1-1*
	HUS1	
	MRE11	
	RAD50	Complexe MRN
	NBN	
Transducteurs	*ATR/ATRIP*	
	ATM	
	53BP1	
	CHK1	
	CHK2	
Effecteurs	*TP53*	
	MDM2	
	CDC25A	

Tableau 1. Principaux acteurs impliqués dans la reconnaissance et la signalisation des dommages à l'ADN.
En bleu, protéines impliquées dans la voie médiée par ATM. En rouge, les protéines impliquées dans la voie ATR. RAD17 (*RAD17 checkpoint clamp loader component*), RFC2 (*Replication Factor subunit 2*), RAD9 (*RAD9 checkpoint clamp component*), RAD1 (*RAD1 checkpoint DNA exonuclease*), HUS1 (*HUS1 checkpoint clamp component*), MRE11 (*MRE11 homolog, double-strand break repair nuclease*), RAD50 (*RAD50 double-strand break repair protein*), NBN (*Nibrin*), ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*), ATRIP (*ATR Interacting Protein*), ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), 53BP1 (*Tumor Protein p53 Binding Protein 1*), CHK1 (*Checkpoint Kinase 1*), CHK2 (*Checkpoint Kinase 2*), TP53 (*Tumor Protein p53*), MDM2 (*MDM2 proto-oncogene*), CDC25A (*Cell Division Cycle 25A*). D'après Iliakis G et al. *Oncogene* (2003)

Les points de contrôle du cycle s'effectuent en transition G1/S, en phase S ou en transition G2/M (Giglia-Mari, Zotter and Vermeulen, 2011). Très schématiquement, les lésions au niveau de l'ADN vont être reconnues précocement par les protéines ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) ou ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*). Lorsqu'il s'agit de cassures double-brin, ATM est recruté au site de la lésion et activé par le complexe MRN. ATM initie une cascade de signalisation aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire, au niveau de

ses checkpoints, via la stabilisation de la forme phosphorylée de la protéine p53. Le rôle d'ATR est similaire à celui d'ATM mais il est recruté lors de cassures simple-brin (Iliakis *et al.*, 2003).

Les protéines ATM et ATR activent également des acteurs impliqués dans la réparation de l'ADN, notamment la protéine BRCA1 et le complexe Ku70/80. La plupart des anomalies au niveau de l'ADN sont prises en charge par des mécanismes de réparation adéquats. Par exemple, les modifications chimiques survenues au niveau des bases sont réparées par excision de base (BER, *Base Excision Repair*). Les cassures simple-brin sont réparées par complémentarité des brins. Enfin, les cassures double-brin peuvent être résolues par recombinaison homologue (HR, *Homologous Recombination*), par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) ou par *Alternative End-Joining* (Alt-EJ) (Giglia-Mari, Zotter and Vermeulen, 2011; Herskind *et al.*, 2017). Parmi ces mécanismes de réparation, la recombinaison homologue est la plus fidèle. La NHEJ, peu fidèle, entraîne souvent des délétions. L'*Alternative End-Joining* augmenterait l'instabilité chromosomique. Il semblerait également que cette voie de signalisation soit favorisée après une forte dose d'irradiation (Herskind *et al.*, 2017).

L'ensemble des mécanismes, incluant la reconnaissance des dommages à l'ADN, l'activation des checkpoints du cycle et la mise en place des systèmes de réparation fait partie d'un même réseau moléculaire appelé *DNA Damage Response* (DDR) (Giglia-Mari, Zotter and Vermeulen, 2011).

Si la réparation réussie, la cellule repartira en cycle. Par contre, si les dommages persistent, la cellule enclenchera sa mort programmée ou apoptose. L'apoptose est le processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal ou à un stress. Ce phénomène est enclenché par le DDR (Watters, 1999). L'apoptose peut également survenir lorsque la cellule présente des altérations au niveau de la membrane (Figure 3). Celle-ci fait intervenir des récepteurs et plus particulièrement des enzymes membranaires, les sphingomyélinases (SMases). Les SMases sont des hydrolases impliquées dans le métabolisme des sphingolipides, elles clivent les sphingomyélines en phosphocholine et céramides. Il existe cinq types de SMases, la sphingomyélinase acide (aSMase) est considérée comme la principale candidate pour la production de céramides, activateurs de l'apoptose, en réponse à un stress cellulaire (Kolesnick and Fuks, 2003).

L'apoptose n'est cependant pas l'unique finalité réservée aux cellules irradiées. Nous verrons par la suite que d'autres mécanismes cellulaires sont enclenchés après exposition aux rayonnements ionisants.

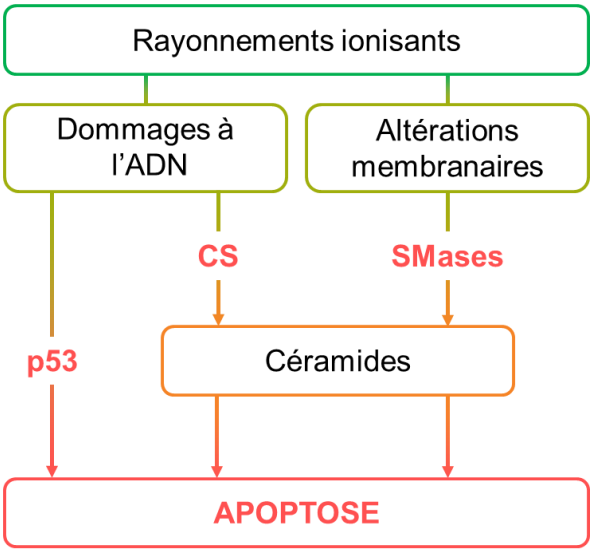


Figure 3. Représentation schématique des voies impliquées dans l'apoptose induite par les rayonnements ionisants.
CS : Ceramide Synthase
D'après Kolesnick R et al. *Oncogene* (2003)

- *Conséquences tissulaires*

Les dommages cellulaires évoqués précédemment peuvent avoir de graves répercussions sur le tissu ou l'organe atteint. La sévérité des dommages radio-induits dépend de la radiosensibilité, de la capacité de réparation mais également du taux de prolifération du tissu touché. En effet, les tissus à fort renouvellement cellulaire (épithéliums, moelle osseuse ou les cellules cancéreuses) sont plus sensibles aux rayonnements ionisants et présenteront, donc, des effets tissulaires plus rapidement. C'est sur ce principe que repose l'utilisation des rayonnements ionisants dans le traitement des cancers.

L'irradiation d'une cellule peut conduire à sa mort, principalement par mort mitotique ou apoptose. Ce constat a permis l'avènement, dans les années 1980, d'un concept exclusivement basé sur la mort radio-induite, celui de la « cellule cible ». L'hypothèse de la cellule cible stipule que la sévérité des effets tissulaires est principalement due à la déplétion d'un compartiment cible, par mort radio-induite, et ayant pour conséquence une déficience fonctionnelle de l'organe. Cette hypothèse est envisageable pour les effets précoces, elle a permis d'élucider les réponses aiguës à l'irradiation. Cependant, la mort cellulaire n'explique pas, à elle seule, les effets tardifs observés. En effet, de nombreux travaux ont montré que la

communication intercellulaire joue un rôle important dans la réponse à l'irradiation. Il a été décrit que la mort d'une cellule peut survenir sans que celle-ci soit présente dans le champs d'irradiation, ce phénomène est appelé effet *bystander* (Prise *et al.*, 2005).

Cette réponse à distance est certainement médiée par des messagers solubles, les cytokines. De nombreuses cascades de cytokines pro-inflammatoires sont activées rapidement après irradiation (Bentzen, 2006; Kim, Jenrow and Brown, 2014). Les cytokines forment un groupe fonctionnel de molécules solubles jouant un rôle fondamental dans la signalisation cellulaire. On distingue différentes familles de cytokines : les interférons, les interleukines (IL), les chimiokines, la famille des *Tumor Necrosis Factor* (TNF), la famille des *Colony Stimulating Factor* (CSF) et la famille des *Transforming Growth Factor* (TGF). Parmi la pléthore de facteurs solubles produits dans les premiers temps qui suivent l'irradiation, l'IL-1, l'IL-6, le TNFα et le TGFβ sont les plus représentés (Kim, Jenrow and Brown, 2014). Ce contexte est favorable à l'établissement d'une inflammation chronique pouvant évoluer vers une dysfonction tissulaire tardive, telle que la fibrose radio-induite (Bentzen, 2006).

L'apparition des lésions radio-induites tardives est donc orchestrée par un continuum d'évènements complexes, initié par la mort cellulaire massive et l'activation des différents compartiments tissulaires. L'ensemble des mécanismes évoqués ci-dessus seront décrit de manière plus détaillée dans la partie *Les effets secondaires de la radiothérapie*.

Les rayonnements ionisants modifient donc le microenvironnement tissulaire qu'il soit exposé ou non. Ces effets sont évidemment dépendants de la dose reçue. On appelle effets déterministes, les effets observés systématiquement au-delà d'une dose seuil et dont la gravité augmente avec la dose reçue. Ils apparaissent, en général, de manière précoce et sont la cause directe de la mort cellulaire (hypothèse de la cellule cible). Par exemple, la radiodermite aiguë survient dès 12 Gy chez les patients à phototype clair. Les effets appelés stochastiques, ou probabilistes, apparaissent dans des délais beaucoup plus longs et ne se manifestent pas systématiquement. Leur probabilité d'apparition augmente lorsque la dose augmente.

Le volume et la localisation du tissu irradié sont également à prendre en compte. On distingue les irradiations corps entier (*Total Body Irradiation*, TBI), des irradiations localisées. Chez l'Homme, la dose létale 50/60, dose à laquelle on observe le décès de 50% des individus en 60 jours, pour une irradiation corps entier, est comprise entre 3,5 et 4 Gy (López and Martín, 2011). En cas d'exposition d'un volume important, voire d'une TBI, les victimes développent un syndrome aigu d'irradiation (SAI).

Ce syndrome est caractérisé par trois phases successives (Tableau 2) :

- le syndrome initial ou phase prodromale : apparition des premiers symptômes dans les premières vingt-quatre heures ;
- la phase de latence : asymptomatique, d'autant plus courte que la dose est élevée ;
- la phase d'état ou clinique : manifestations cliniques et biologiques qui peuvent aboutir au décès.

Le SAI peut se manifester sous différentes formes : hématopoïétique, gastro-intestinale, pulmonaire, cutanée ou cérébro-vasculaire.

<table>
<tr><th>Dose (Gy)</th><th>1er – 2e jour</th><th>1re sem.</th><th>2e sem.</th><th>3e sem.</th><th>2e - 3e mois</th><th>4e – 8e mois</th></tr>
<tr><td>> 20 - 50</td><td>Forme neuro-vasculaire
Nausées, vomissements, céphalée, ataxie, coma, convulsions
Mort inévitable</td><td rowspan="6">Phase de latence</td><td colspan="4" rowspan="2"></td></tr>
<tr><td>> 6 - 10</td><td rowspan="5">Phase prodromique
Nausées, vomissements, céphalée, fatigue, érythème, anorexie</td></tr>
<tr><td>> 6 – 9</td><td colspan="2" rowspan="3">Forme gastro-intestinale
Nausées, vomissements, diarrhée, fièvre, prostration
Mort inévitable</td><td colspan="2" rowspan="2">Forme pulmonaire
Toux, dyspnée, fièvre, douleurs thoraciques, insuffisance respiratoire
Mort possible</td></tr>
<tr><td>> 4 – 7</td><td rowspan="2">Forme cutanée
Erythème, alopécie, desquamation, nécrose, ulcération
Mort possible</td></tr>
<tr><td>> 1 - 2</td><td>Forme hématopoïétique
Asthénie, anorexie, fièvre, hémorragies
Mort possible</td></tr>
<tr><td>< 1 - 2</td><td colspan="6">Absence de symptômes
Baisse temporaire du nombre de globules rouges, probabilité accrue d'infections, oligospermie/azoospermie temporaire</td></tr>
</table>

Tableau 2. Principales formes du SAI : évolution temporelle typique, doses seuils, principaux effets et risques à long terme.

II. Application médicale des rayonnements ionisants : la radiothérapie

La découverte des rayonnements ionisants a rapidement débouché sur des applications médicales. En effet, les médecins qui avaient accès à ces découvertes ont très vite observés que les rayons X et γ produisaient des effets sur les tissus vivants et, en particulier, avaient la propriété de faire régresser ou stériliser les tumeurs malignes.

a. Histoire, principe et usages

Au début du XX^{ème} siècle, les premiers appareils de radiothérapie délivraient déjà des rayonnements X. Cependant, ceux-ci étaient produits à partir de différences de potentiel pouvant atteindre 200 kV, ils ne possédaient donc pas l'énergie ni la pénétration nécessaires à l'irradiation de tumeurs situées à plus de 5 cm de profondeur. À la fin de la seconde guerre mondiale, les sources de Cobalt 60 (^{60}Co) virent le jour. Ces sources produisent des rayonnements γ, de forte énergie, plus pénétrants. En revanche, les appareils de télécobalthérapie ont pour inconvénient la décroissance radioactive naturelle du ^{60}Co, il faut donc changer la source tous les quatre ans. Les accélérateurs linéaires de particules ont peu à peu remplacé les « bombes au Cobalt ». Ces appareils, utilisés aujourd'hui, produisent des électrons. Ces derniers sont projetés vers une cible métallique en tungstène ou en or, des rayons X de forte énergie sont alors générés par rayonnement de freinage. Les accélérateurs linéaires produisent des faisceaux beaucoup plus énergétiques, leur voltage se situe entre 4 et 25 MV.

En France, en 2015, plus de 384 000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués. Chez la femme, le cancer du sein est le plus fréquent, avec plus de 54 000 nouveaux cas par an, devant le cancer colorectal (> 19 500 nouveaux cas) et le cancer du poumon (> 14 800 nouveaux cas). Chez l'homme, le cancer de la prostate prédomine avec environ 54 000 nouveaux cas par an devant le cancer du poumon et du colon-rectum, 30 000 et 23 500 nouveaux cas, respectivement (Institut National du Cancer, 2015). À ce jour, on estime que plus de la moitié des patients traités pour un cancer recevront une radiothérapie (Delaney *et al.*, 2005; Institut National du Cancer, 2015).

La radiothérapie est une méthode de traitement des tumeurs utilisant des rayonnements ionisants dont l'objectif est de délivrer une dose maximale tout en préservant l'intégrité des tissus sains présents dans le champ. Utilisée seule ou en association avec la chimiothérapie et la chirurgie, elle constitue l'une des principales armes thérapeutiques efficaces contre les cancers.

La radiothérapie peut être utilisée selon trois finalités : curative, palliative ou symptomatique. Dans le cas d'une radiothérapie curative, l'objectif va être le contrôle ou, idéalement, la stérilisation totale de la tumeur. Elle peut être utilisée seule ou associée à la chirurgie et la chimiothérapie en prenant en compte, la localisation, la taille de la tumeur et son degré d'avancement. Lorsque le cancer est à un stade trop avancé, voire métastatique, la radiothérapie palliative est employée afin de soulager la douleur des patients. Enfin, la radiothérapie symptomatique vise à abroger un ou plusieurs symptômes gênants via l'utilisation des propriétés antalgiques, hémostatiques et décompressantes des rayons.

On distingue trois techniques de radiothérapie. La radiothérapie externe, dans laquelle la source de rayonnements est située en dehors de l'organisme. C'est la technique la plus utilisée. La radiothérapie interne utilise des sources radioactives placées à l'intérieur de l'organisme, pour le traitement des cancers gynécologiques par exemple. Enfin, la radiothérapie métabolique consiste à injecter des radioéléments qui se fixeront sur les cellules tumorales, par exemple, le traitement des cancers thyroïdiens par l'iode radioactif.

À des fins curatives, la radiothérapie cherche donc à détruire les cellules cancéreuses. Bien qu'elle ne soit pas un traitement spécifique, elle s'appuie sur le fait qu'il existe une différence de radiosensibilité entre des cellules saines et tumorales. La probabilité de contrôler la tumeur par irradiation est proportionnelle à la dose délivrée (Barnett *et al.*, 2009).

La dose de contrôle tumoral est la dose nécessaire pour obtenir, dans 90% des cas, la stérilisation locale et définitive de la tumeur. Cette dose peut varier entre 30 à plus de 70 Gy, suivant le type histologique de la tumeur, son volume et son aspect. Dans un protocole de radiothérapie classique, la dose totale sera délivrée de manière fractionnée de 2 Gy par jour, à raison de cinq séances par semaine, on parle de protocole normofractionné.

b. Evaluation du risque et prédiction de traitement

La dose absorbée, exprimée en Gy, s'avère être une information insuffisante pour prédire les effets biologiques lors d'une exposition aux rayonnements ionisants (mort cellulaire, mutation, régression d'une masse tumorale, etc...). Des études *in vitro* ont alors été entreprises afin de modéliser les effets des rayonnements sur la survie cellulaire (Puck and Marcus, 1956). À dose absorbée égale, les effets biologiques varient en fonction de nombreux paramètres, dont la nature du rayonnement (α, β, γ, X, protons, neutrons…).

- *Notion d'efficacité biologique et fractionnement de la dose*

L'Efficacité Biologique Relative ou EBR permet de comparer les effets biologiques de deux rayonnements ou deux modalités d'irradiation. Il est défini par le rapport de la dose d'un rayonnement de référence (D_{ref}) et de la dose du rayonnement étudié (D_{test}) produisant le même effet biologique. Il s'agit donc d'un concept iso-effet. Un EBR supérieur à 1 signifie que, pour un effet donné, la dose du rayonnement d'étude sera inférieure à la dose du rayonnement de référence (Figure 4a).

$$EBR = \frac{D_{ref}}{D_{test}}$$

L'EBR est utilisé pour prédire les effets biologiques, suite à diverses expositions, notamment celles employées lors des protocoles de radiothérapie. La détermination de l'EBR est essentiellement basée sur le test de survie clonogénique. Ce test permet de calculer les fractions survivantes et d'établir les courbes de survie de différentes lignées cellulaires exposées à différents types de rayonnements. La modélisation de ces courbes de survie a, par ailleurs, donné naissance au modèle « linéaire-quadratique ». Ce modèle combine deux composantes :

- une composante létale d'emblée α, linéaire : chaque particule traversant une cellule est susceptible de provoquer un évènement directement létal
- une composante d'accumulation de lésions sub-létales β, quadratique : conjonction, au sein, d'une même cible, de deux évènements sub-létaux provenant de deux particules distinctes

Ainsi, la fraction survivante (S) est déterminée par l'équation :

$$S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)} \quad (1)$$

Avec D, la dose totale.

À partir de cette équation, le rapport α/β peut être déterminé. La valeur de ce rapport correspond à la dose, en Gy, pour laquelle les mortalités sont dues, en parts égales, aux dommages directement létaux et à l'accumulation de dommages sub-létaux (Figure 4b). Pour la plupart des tissus sains, à renouvellement lent, ce rapport est généralement considéré comme étant égale à 3 Gy (Nahum, 2015). Au contraire, pour les tissus à renouvellement cellulaire rapide, tels que les muqueuses et un grand nombre de cellules cancéreuses, la valeur de ce rapport se rapproche de 10 Gy (Nahum, 2015).

Lorsqu'il a été estimé, la valeur du rapport α/β s'avérait être inversement proportionnelle à la sensibilité du tissu au fractionnement (Hennequin and Dubray, 2013).

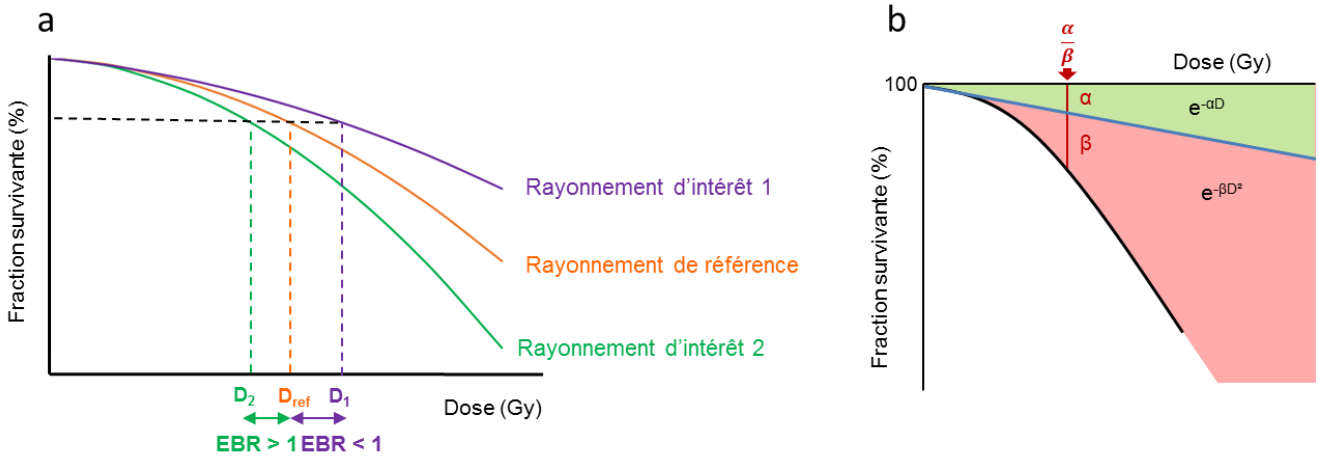


Figure 4. Modélisation de courbes de survie cellulaire.
a) Représentation graphique du concept d'EBR. b) Représentation graphique du modèle linéaire-quadratique. La tangente à l'origine renseigne de la radiosensibilité de la lignée étudiée (bleu). Le rapport α/β renseigne de la sensibilité au fractionnement.

En prenant en compte le fractionnement de la dose, l'équation (1) va donc être modifiée. La dose totale (D) correspondra au produit entre le nombre de fractions (n) et la dose par fraction (d). On obtient l'équation (2) :

$$D = n \,.\, d$$

$$S = e^{-(\alpha n d + \beta n d^2)} \quad (2)$$

Ainsi, les tissus à réponse rapide, responsables des effets précoces, sont peu sensibles au fractionnement de la dose, contrairement aux tissus à réponse lente, à l'origine des effets tardifs. C'est pourquoi le protocole normofractionné, standardisé à 2 Gy par jour, permet d'obtenir le meilleur ratio efficacité anti-tumorale/tolérance des tissus sains (Hennequin and Dubray, 2013).

De nombreux types de protocoles sont utilisés en radiothérapie. Afin de les normaliser pour pouvoir les comparer, la Dose Efficace Biologique (BED, *Biologically Effective Dose*) a été établie à partir du modèle linéaire-quadratique. La BED correspond à une dose, conceptuelle, biologique délivrée.

$$BED = D\left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta}\right) \quad (3)$$

Elle prend en compte la dose par fraction (d) et la dose total (D) délivrée à un tissu, caractérisé par un rapport α/β spécifique. La BED est utilisée en clinique afin de comparer les effets biologiques de différents protocoles de fractionnements. Enfin, elle peut être convertie en

dose biologique équivalente, généralement à 2 Gy, en référence aux protocoles normofractionnés (EQD_2).

$$EQD_2 = \frac{BED}{1+\frac{2}{\alpha/\beta}} \quad (4)$$

Ces paramètres mathématiques ont, depuis longtemps, été utilisés par les cliniciens. Le modèle linéaire-quadratique n'est, toutefois, pas idéal et possède un certain nombre de limites : nécessité de connaître le rapport α/β, s'appuie uniquement sur le test de survie clonogénique, non valable pour les très faibles doses (< 1 Gy) et les très fortes doses par fraction, ne prend pas en compte les actes chirurgicaux et séances de chimiothérapie impliqués dans le traitement etc.

Il apparaît peu à peu que d'autres paramètres doivent également être pris en compte, le débit de dose par exemple. Les récents travaux d'*Oktaria et al* ont montré une différence de sensibilité de cellules tumorales *in vitro* après irradiation à débits de dose variables (Oktaria *et al.*, 2017). Des travaux actuellement en cours au laboratoire montrent également des réponses différentes lors d'irradiation par rayonnement X de forte ou de faible énergies.

Un autre problème pouvant remettre en cause le modèle linéaire-quadratique est l'utilisation des fortes doses par fraction (hypofractionnement sévère). Pour des doses par fraction supérieures à 7 - 10 Gy, la survie cellulaire chute drastiquement (Hennequin and Dubray, 2013). L'application de fortes doses par fraction n'est donc pas compatible avec le modèle linéaire-quadratique. Tandis que les progrès technologiques et l'amélioration de la balistique permettent de mieux détourer la zone à irradier et limitent au maximum les tissus sains, l'utilisation de l'hypofractionnement devient plus répandue. L'amélioration du modèle est donc nécessaire.

- *Notions de volumes cibles et organes à risques*

Lors de la mise en place d'un protocole d'irradiation, il est nécessaire de déterminer le volume de tissu à irradier. Ainsi, on distingue le volume tumoral macroscopique (GTV, *Gross Tumor Volume*), le volume-cible clinique (CTV, *Clinical Target Volume*), le volume-cible planifié (PTV, *Planning Target Volume*), le volume traité et le volume irradié (Figure 5) :

- Volume tumoral macroscopique : zone tumorale observable par imagerie Scanner ou IRM ;
- Volume-cible clinique : inclut le GTV et les extensions tumorales non-détectables par imagerie mais connue par l'évolution classique de la pathologie ;

- Volume-cible planifié : inclut le CTV et prend en compte l'incertitude de positionnement et les potentiels mouvements de l'organe et/ou du patient ;
- Volume traité : inclut le PTV, reçoit la dose de traitement ;
- Volume irradié : inclut le volume traité et les tissus se trouvant à proximité recevant une dose partielle.

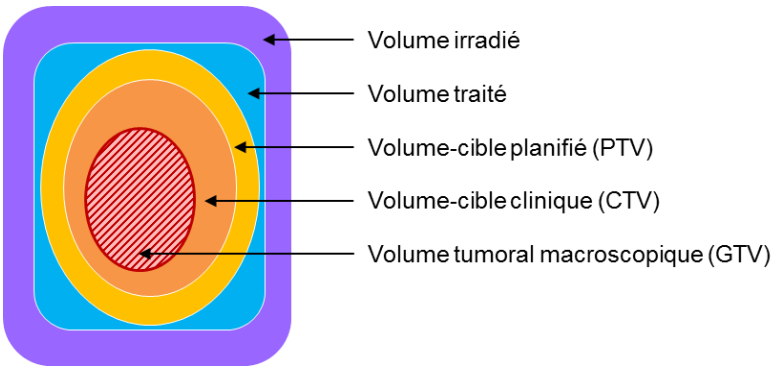


Figure 5. Les volume-cibles en radiothérapie.
D'après Hennequin C et Coujou C. *Les volumes-cibles en radiothérapie. La Lettre du Cancérologue* (1998)

La détermination de ces volumes permet à la fois de traiter au mieux les cancers et de protéger les tissus sains adjacents. En effet, la tumeur à irradier est entourée d'organes et de tissus sains recevant une dose plus ou moins importante de rayonnements. Ces tissus sont appelés « organes à risques » (OAR) et leur tolérance à l'irradiation constitue la principale limite à l'escalade de dose. Les tissus possèdent des radiosensibilités différentes pouvant être classées en trois catégories : très radiosensibles (œil, ovaires, testicules), moyennement radiosensibles (intestin, cœur, poumon) et peu radiosensibles (os, muscle, gros vaisseaux) (Société Française de Radiothérapie Oncologique, 2007).

La plupart des OAR sont constitués de plusieurs types de tissus, certains à réactions précoces et d'autres à réactions tardives. La tolérance globale d'un organe à l'irradiation doit donc prendre en compte les différents tissus qui le composent. Par exemple, l'intestin grêle comporte une muqueuse (tissu à renouvellement rapide) responsable d'entérite radique aiguë qui se manifeste pendant ou après radiothérapie à l'abdomen (Yeoh and Horowitz, 1987). L'organe est également constitué de tissus conjonctifs de soutien, à renouvellement lent, qui peuvent entraîner une fibrose radio-induite tardive (Hauer-Jensen, Wang and Denham, 2003).

Par ailleurs, la tolérance fonctionnelle des organes à l'irradiation dépend de leur architecture. Chaque organe est constitué de sous-unités ayant une organisation particulière. On distingue :

- les tissus avec structure en série (moelle épinière, tube, digestif, nerfs) dans lesquels la destruction d'une sous-unité altère toute la fonction de celui-ci ;

- les tissus avec structure en parallèle (poumon, rein, foie) sont constitués de sous-unités indépendantes entre elles, la fonction de l'organe est altérée lorsqu'un certain nombre de sous-unités sont détruites.

Ainsi, les organes organisés en parallèle sont, dans leur ensemble, très radiosensibles mais une dose élevée sur un petit volume est tolérable. Par exemple, au niveau du poumon, une dose supérieure à 20 Gy ne doit pas être délivrée dans plus de 35% du volume pulmonaire total, par contre, une irradiation à 65 Gy est possible dans un très petit volume, de l'ordre de quelques cm^3.

Il est donc primordial de prendre en compte la tolérance des tissus sains présents dans le champ d'irradiation. Le radiothérapeute dispose d'une « fenêtre thérapeutique » dans laquelle la dose utilisée doit offrir le meilleur contrôle tumoral possible, tout en limitant les dommages aux tissus sains (notion de balance bénéfice/risque, Figure 6).

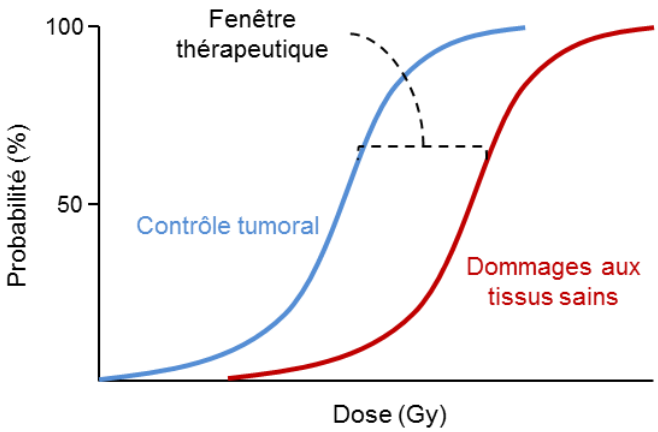


Figure 6. Courbes dose-réponse en radiothérapie: concept de fenêtre thérapeutique.
D'après Barnett G et al. *Nat Rev* (2009)

c. Les différentes techniques de radiothérapie externe

La radiothérapie externe représente, à elle seule, 90% des protocoles de radiothérapie. Les appareils employés pour ce type de traitement sont des accélérateurs linéaires produisant des photons ou des particules (électrons, protons, ions carbone, neutrons). Les accélérateurs produisant des photons de fortes énergies (6 – 20 MV) sont de loin les plus utilisés. Au cours de ces dernières décennies, les avancées scientifiques et technologiques ont permis d'améliorer l'efficacité du traitement, la survie des patients et leur qualité de vie.

- *La radiothérapie conformationnelle en trois dimensions*

La radiothérapie conformationnelle en trois dimensions ou 3D-CRT (*Three-dimensional Conformal Radiation Therapy*) est la technique la plus avancée et la plus

exploitée aujourd'hui en routine. Elle permet de faire correspondre, le mieux possible, le volume traité au volume-cible planifié (PTV). Couplée à l'imagerie (scanner, IRM, TEP), la modélisation tridimensionnelle de la tumeur et des organes à risque avoisinants est possible afin de simuler la forme des faisceaux et la distribution des doses d'irradiation.

- *La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité*

Cette technique avec modulation d'intensité (IMRT, *Intensity Modulated Radiation Therapy*) permet de traiter des volumes complexes en limitant l'irradiation des tissus sains. À l'aide d'un collimateur multi-lames, qui se déplacent au cours du traitement, l'intensité des faisceaux va être modifiée pour les adapter à la forme de la tumeur. Cette technique diminue grandement le volume irradié et la dose aux organes à risques comparée à la 3D-CRT (Figure 7) (Liauw, Connell and Weichselbaum, 2013). Pour autant, l'IMRT n'a pas montré de bénéfices par rapport à la 3D-CRT dans certains types de tumeurs, notamment le cancer pulmonaire non-à petites cellules (NSCLC, *Non Small Cells Lung Cancer*) (Hu *et al.*, 2016).

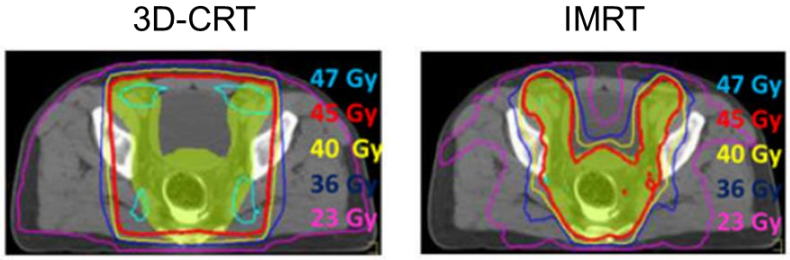


Figure 7. Comparaison des isodoses entre un traitement par 3D-CRT et IMRT d'un cancer anal. Pour l'IMRT, la dose de prescription - 45 Gy (ligne rouge) - correspond mieux au volume-cible (coloré en vert) par rapport à la 3D-CRT. Les tissus sains seront plus épargnés.
D'après Liauw S et al. *Science Translational Medicine* (2013)

- *La radiothérapie en conditions stéréotaxiques*

L'utilisation de faisceaux de gros calibres n'est pas idéale pour le traitement de petites tumeurs et la chirurgie ne peut, dans certains cas, être réalisée. Ainsi, à la fin des années 1960, le neurochirurgien Lars Leksell développa le *Gamma Knife*. Ce système permet de délivrer de façon très localisée une dose élevée de rayonnements γ, générés par des sources de ^{60}Co. Le *Gamma Knife* fut élaboré afin de traiter des désordres cérébraux, des malformations artério-veineuses et des tumeurs intracrâniennes.

La radiothérapie en condition stéréotaxique ou SBRT (*Stereotactic Body Radiation therapy*) découle du système développé par Leskell. La SBRT s'utilise en extra-crânien, elle s'emploie en une seule ou plusieurs fractions de 6 à 20 Gy (on parle de doses ablatives) sur des tumeurs de petites tailles (< 3,5 cm de diamètre). Bien qu'il s'agit d'une technique assez récente, le nombre de patients traités par cette méthode croît chaque année (Institut National

du Cancer, 2013). L'utilisation de cette technique est, en effet, indiquée dans le traitement des NSCLC aux stades précoces (stades 1 et 2) (Onishi *et al.*, 2011). Pour ce type de tumeurs, les médecins avaient recours à la chirurgie (résection lobaire ou infra-lobaire, chirurgie mini-invasive). Or, la SBRT offre un très bon contrôle tumoral, une survie à 5 ans de 92% et 73% pour les stades 1 et 2, respectivement, comparable à la chirurgie. La SBRT est proposé, depuis une dizaine d'années, aux patients inopérables ou refusant la chirurgie (Kelley *et al.*, 2015).

- *L'hadronthérapie*

L'hadronthérapie utilise des faisceaux d'hadrons, dont des protons (protonthérapie) ou des ions Carbone (carbonethérapie). Les propriétés balistiques des hadrons sont caractérisées par un fort dépôt d'énergie localisé à la fin de leur parcours, appelé « pic de Bragg » et d'une dose en aval nulle (Figure 8a). Il est ainsi possible, en faisant varier l'énergie du faisceau, de faire coïncider la profondeur du pic de Bragg avec celle de la tumeur. Cela permet de délivrer une dose maximale à cette dernière tout en épargnant les tissus sains situés en aval du pic (Figure 8b). Ces techniques sont particulièrement indiquées pour des applications thérapeutiques où la tumeur est directement située à proximité d'OAR. C'est le cas par exemple des tumeurs oculaires et intracrâniennes où une haute conformation de la dose au PTV est cruciale pour protéger au mieux les yeux et le cerveau.

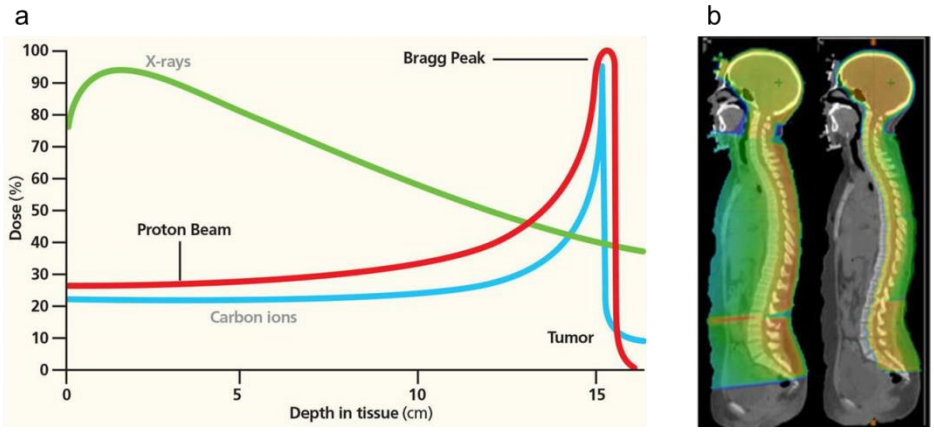


Figure 8. Comparaison entre radiothérapie classique et hadronthérapie.
a) Courbes de Bragg des rayons X et de faisceaux d'hadronthérapie. Les protons et les ions carbones sont caractérisés par un dépôt d'énergie maximal en profondeur (pic de Bragg) et d'une dose nulle en fin de parcours. b) Comparaison de courbes iso-doses entre une radiothérapie classique (gauche) et d'une protonthérapie (droite) dans le cadre d'une irradiation cranio-spinale. Le volume cible étant la colonne vertébrale. D'après Liauw S et al. *Science Translational Medicine* (2013).

Malgré ces avancées technologiques, l'exposition de tissus sains à l'irradiation reste inéluctable et engendre l'apparition d'effets secondaires indésirables altérant la qualité de vie des patients.

d. Les effets secondaires des radiothérapies

Comme nous venons de le voir, la radiothérapie s'impose aujourd'hui comme un outil indispensable dans le traitement des cancers. Néanmoins, l'efficacité de cette technique est souvent accompagnée d'effets secondaires.

À l'échelle de l'organisme, les rayonnements ionisants provoquent des effets indésirables précoces et/ou tardifs. La nature des effets secondaires dépend du type de radiothérapie, de la dose reçue et de la localisation de la zone irradiée. Les effets secondaires précoces généralement observés sont fatigue, anémie, érythème cutané, alopécie, perte d'appétit, nausées et vomissements. Dans les temps plus tardifs, on estime que 5 à 10% des patients développeront des séquelles plusieurs années après leur traitement. Les patients peuvent développer fibrose radio-induite, atrophie, pathologies vasculaires, infertilité, dérégulation hormonale et cancers secondaires (Barnett *et al.*, 2009). Parmi ces effets tardifs, la fibrose radio-induite est sans doute la plus connue et la plus étudiée. Cette pathologie se traduit par une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire et de collagènes dans le tissu. Elle intègre une composante inflammatoire chronique et affecte tous les types de tissus. La fibrose radio-induite est un processus dynamique et évolutif se caractérisant par une activation cellulaire chronique et un remodelage constant.

À l'échelle tissulaire, nous avons évoqué la production importante de cytokines pro-inflammatoires en réponse à l'irradiation. Ces facteurs pro-inflammatoires activent des voies de signalisation impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène, principalement par dérégulation des fonctions mitochondriales (Schaue, Kachikwu and McBride, 2012). Cette augmentation des ROS, secondaire à la radiolyse de l'eau et plus durable, tend à rompre l'équilibre redox du tissu. Ces ROS permettent également de maintenir la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment par activation des voies NF-κB (*Nuclear Factor-Kappa B*) et MAP kinases (*Mitogen-activated protein*) (Schaue, Kachikwu and McBride, 2012).

Les cytokines libérées et les débris engendrés par l'apoptose précoce des cellules du tissu irradié (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Pattern*) génèrent un microenvironnement pro-inflammatoire et pro-oxydant. Cet environnement inflammatoire active les macrophages résidents qui recrutent, via la sécrétion de chimiokines, les cellules dérivées de la moelle ou MDSC (*Myeloid-derived Suppressor Cells*) (Schaue, Kachikwu and McBride, 2012; Schaue *et al.*, 2015). Une fois au site irradié, les MDSC se différentient en macrophages ou granulocytes matures (Schaue *et al.*, 2015). La présence de ces cellules

immunitaires dans le tissu signe une inflammation aiguë, dite stérile, c'est-à-dire sans infection bactérienne ou virale.

Les macrophages vont jouer un rôle important dans la réponse du tissu à l'irradiation. Ces derniers produisent de manière abondante des cytokines pro- et anti-inflammatoires, des ROS, des pro- et antioxydants. Ils sont également capables de différenciation en type M1 « *killer* », présentateur d'antigènes ou en type M2 « *healer* », immunosuppresseur (François *et al.*, 2013; Schaue *et al.*, 2015). La différenciation des macrophages dépendra du contexte inflammatoire du tissu. Les molécules pro-inflammatoires, telles que le TNFα, l'IL-6 ou l'INFγ, tendent à générer des macrophages M1 (Schaue, Kachikwu and McBride, 2012). Ces derniers expriment les marqueurs CD68 et CD80, ce sont les médiateurs d'une inflammation aiguë. Les macrophages M2 sont, quant à eux, activés en présence d'IL-1, IL-10, TGFβ. Ils expriment les marqueurs CD68 et CD163. Les macrophages M2 possèdent un rôle immunosuppresseur et interviennent dans les processus d'angiogenèse, de régénération et de fibrose (Schaue, Kachikwu and McBride, 2012).

Ces sous-types de macrophages sécrètent des lymphokines capables d'activer les cellules de l'immunité adaptative. Ils vont agir de concert avec les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs ou Th0 et peuvent se différentier en trois sous-types selon une stimulation cytokinique précise :

- les Th1 : induits par l'IL-12, sécrètent principalement l'IFNγ et le TNFα. Ils s'associent avec les macrophages M1 ;
- les Th2 : induits par l'IL-4, sécrètent l'IL-4, l'IL-6, l'IL-13 et s'associent avec les M2 ;
- les Treg : les lymphocytes T régulateurs sont retrouvés sous deux formes, naturelle (nTreg) et induite par le TGFβ (iTreg). Les iTreg collaborent avec les Th2 et les macrophages M2. Leurs actions s'opposent au tandem M1/Th1.

Des études réalisées chez la souris montrent qu'il existerait une réponse cytokinique divisée en deux phases (Chiang *et al.*, 2005). Une phase d'inflammation aiguë dans laquelle les macrophages de type M1 et les lymphocytes Th1 exerceraient une forte pression pro-inflammatoire. Au cours du temps, ce profil va être modifié vers un profil d'inflammation chronique puis, un état anti-inflammatoire propice au remodelage tissulaire, médié par les M2/Th2/iTreg (Chiang *et al.*, 2005; Schaue, Kachikwu and McBride, 2012). Ce contexte serait alors favorable à l'établissement d'une fibrose (Figure 9).

La fibrose radio-induite est comparable à une cicatrisation incomplète dans laquelle les fibroblastes jouent un rôle important. La cicatrisation est régulée par une balance de molécules pro-fibrotiques, telles que le TGFβ et le CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*), et anti-fibrotiques, telles que l'IFNγ et le TNFα. Au cours de la cicatrisation, sous l'effet du TGFβ, les cellules épithéliales, endothéliales et fibroblastiques peuvent se différencier en myofibroblastes, producteur de matrice extracellulaire (Wynn, Yugandhar and Clark, 2013; Mintet *et al.*, 2015). L'activation chronique des myofibroblastes due aux dérégulations des facteurs pro-, anti-fibrotiques et à l'inflammation chronique va générer une production excessive de matrice et transforme le mécanisme cicatriciel en fibrose (Wynn, Yugandhar and Clark, 2013).

Le TGFβ joue un rôle central dans le processus fibrotique. Il existe sous trois iso-formes, TGFβ 1 – 3, et est excrété sous forme latente combiné au *Latency Associated Peptide* (LAP). Il existe ainsi une quantité abondante de TGFβ inactif dans le milieu extracellulaire. Celui-ci peut être directement activé après irradiation, même à faible dose (0,1 Gy), par dissociation du LAP (Bentzen, 2006). Le TGFβ peut ainsi se lier à ses récepteurs et activer les voies de signalisation Smad qui permettent la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la différentiation terminale des fibrocytes en fibroblastes ou myofibroblastes, la transition épithélio-mésenchymateuse ou endothélio-mésenchymateuse (Bentzen, 2006).

Au cours de la fibrose, les principaux états d'équilibre cellulaire et moléculaire ont disparu dans un tissu pathologique qui présente des caractéristiques remarquables : un état inflammatoire chronique, un déséquilibre de la balance entre l'état quiescent et prolifératif des fibroblastes avec une persistance des myofibroblastes, une destruction progressive du tissu envahi avec un déséquilibre de la balance entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire.

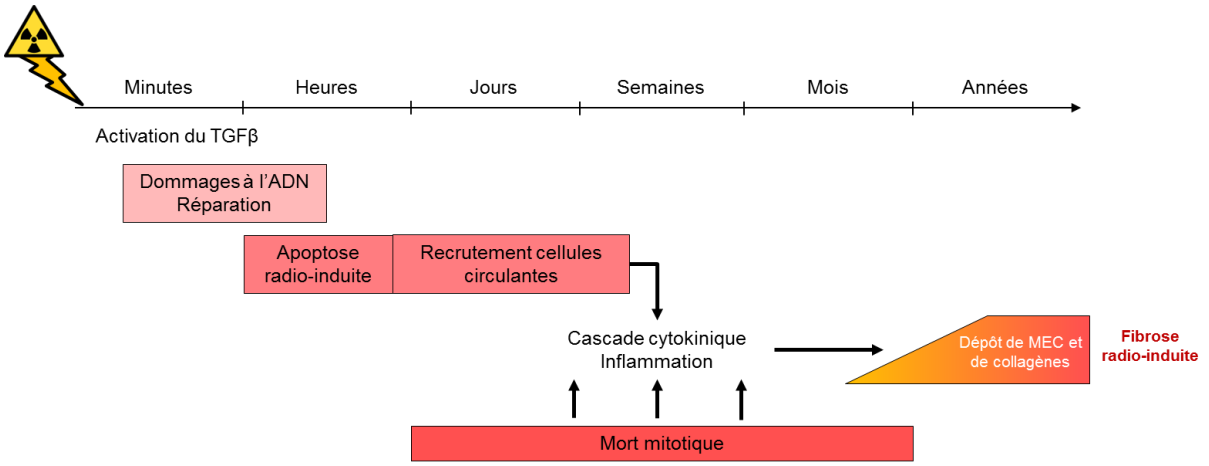


Figure 9. Cinétique d'évènements impliqués dans la réponse tissulaire radio-induite.

À la différence d'une cicatrisation classique, la blessure radiologique met en jeu la génération de ROS et l'accumulation de dommages à l'ADN. Ces phénomènes participent à une cicatrisation étalée dans le temps.

Au cœur de l'ensemble de ces phénomènes, le compartiment vasculaire semble y jouer un rôle principal. Il a déjà été démontré que l'un des premiers effets de la blessure radio-induite est l'apoptose des cellules endothéliales (Paris, 2001). Sous l'effet de l'irradiation, les cellules endothéliales sont activées et acquièrent un phénotype pro-coagulant et pro-inflammatoire. Les cellules endothéliales sécrètent une quantité abondante de cytokines après irradiation et expriment à leur surface des molécules d'adhésion, propices au recrutement des cellules du système immunitaire dans le tissu irradié (Stewart and Dörr, 2009). Enfin, elles sont capables de se transformer en cellules mésenchymateuses, impliquées dans le processus fibrotique.

Plusieurs travaux, dont ceux réalisés par le laboratoire, montrent que le réseau vasculaire est impliqué dans la propagation des lésions radio-induites. La réponse de l'endothélium face à l'irradiation fera l'objet d'une partie dans le chapitre suivant.

Chapitre II : Le compartiment vasculaire et ses réponses aux rayonnements ionisants

I. Le réseau vasculaire : structure et organisation

Le système cardio-vasculaire est constitué du cœur et des vaisseaux sanguins. Il distribue aux organes, via le sang, l'oxygène et les nutriments indispensables à leur fonctionnement. Il collecte également les déchets issus du catabolisme cellulaire, comme le dioxyde de carbone ou l'urée, pour les acheminer vers leur site d'élimination. Le sang circule à l'intérieur de « canalisations », aux calibres adaptés à leurs fonctions : les artères, depuis l'aorte (2,5 cm de diamètre) jusqu'aux artérioles (40 à 100 µm de diamètre), conduisent le sang, chargé en dioxygène, du cœur vers les organes ; les capillaires assurent la circulation du sang dans chaque organe ; les veines ramènent le sang chargé en dioxyde de carbone aux poumons.

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois tuniques distinctes, l'intima, la media et l'adventice (Figure 10). L'importance de ces tuniques varie selon le type de vaisseau, de la simple monocouche de cellules endothéliales à des vaisseaux très épais.

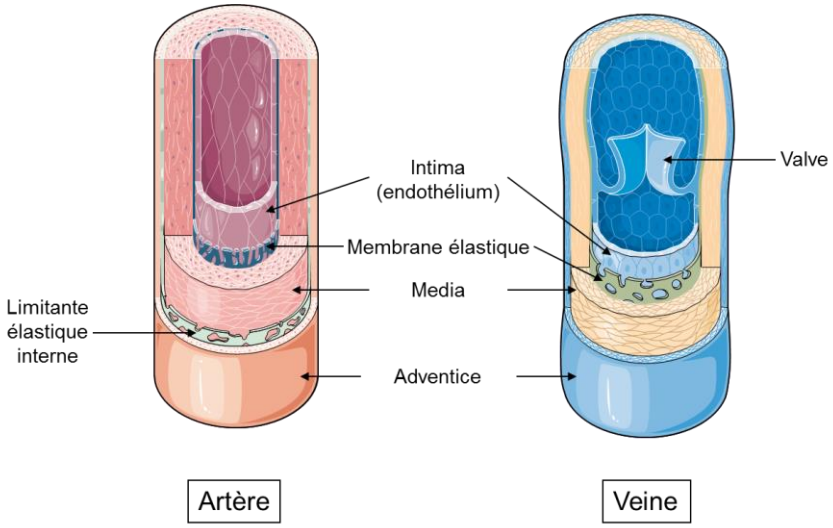


Figure 10. Structure d'une artère et d'une veine.

La couche la plus interne, l'intima, est constituée d'une simple couche de cellules plates et polarisées, les cellules endothéliales. La face apicale des cellules endothéliales est en contact avec le sang. Les cellules reposent sur une lame basale formée de collagènes et de fibres élastiques. La media est la couche intermédiaire, elle contient exclusivement des cellules musculaires lisses vasculaires et des constituants matriciels. La media est très développée dans les gros vaisseaux et est quasiment inexistante dans les capillaires. L'adventice est la couche externe de la paroi vasculaire, elle est constitué principalement de collagènes et de fibroblastes, notamment dans les veines. Des nerfs du système nerveux autonome sont présents dans l'adventice permettant l'innervation du muscle lisse de la media.

À partir de grosses artères élastiques comme l'aorte, la carotide, l'artère sous-clavière et l'artère rénale, on retrouve les artères musculaires dont le diamètre diminue au fur et à mesure de leurs ramifications. Ces dernières deviennent des artérioles, composées d'une media d'une à quatre couches de cellules musculaires lisses, qui feront suite à de petits vaisseaux composés d'une monocouche de cellules endothéliales, les capillaires. Les capillaires relient les artérioles aux veinules, fermant ainsi la boucle du réseau vasculaire. Les veinules deviennent des veines dont le diamètre augmente progressivement en se rapprochant du cœur.

II. Les rôles et fonctions de l'endothélium vasculaire

Dans ce travail de thèse, nous nous intéresserons uniquement à la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, l'endothélium.

L'endothélium vasculaire est un tissu de type épithélial et est omniprésent dans l'organisme. L'ensemble de l'endothélium est composé de 1 à 6.10^{13} cellules chez l'Homme. Sa surface est de l'ordre de 4000 à 7000 m². Le rôle premier de l'endothélium est de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Il va permettre les échanges entre les nutriments et le milieu intérieur. Il possède également un rôle dans l'hémostase et la coagulation, l'inflammation, le tonus vasculaire et l'angiogenèse.

a. Perméabilité vasculaire

L'endothélium s'associe à la lame basale pour former un filtre moléculaire permettant les échanges entre le sang et le tissu. Cette perméabilité vasculaire est régulée par les jonctions intercellulaires. Parmi elles, on retrouve les jonctions serrées, formées d'occludines et de claudines, les jonctions communicantes, formées de connexines et les jonctions adhérentes, formées de VE cadherin *(Vascular Endothelial Cadherin*) (Michel and Curry, 1999). L'organisation de ces jonctions varie selon le type de vaisseau et d'organe. Par exemple, les jonctions serrées sont quasiment inexistantes de l'endothélium sauf au niveau des vaisseaux irrigant le cerveau, où celles-ci forment la barrière hémato-encéphalique.

La perméabilité de l'endothélium est déterminante dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Des modifications de cette dernière peuvent entraîner l'extravasation des protéines sériques dans les tissus, conduire à un œdème périvasculaire et tissulaire et affecter la fonction de l'organe.

b. Hémostase vasculaire

L'endothélium joue un rôle primordial dans le maintien de l'hémostase vasculaire. La monocouche de cellules endothéliales représente une surface non thrombogène, via la production de substances anticoagulantes et antiagrégantes. Si la continuité de l'endothélium est rompue, la révélation des couches sous-endothéliales participe aux processus thrombotiques et à la coagulation.

Les cellules endothéliales synthétisent, à leur surface, des héparanes sulfates, capables d'inhiber la cascade de coagulation en liant l'antithrombine III (Capila and Linhardt, 2002). Le facteur tissulaire (TF, *Tissue Factor*) et le facteur de coagulation VIIa forment le complexe

initiateur de la coagulation et activent le facteur X. Cette cascade aboutit à l'activation de la thrombine. Les cellules endothéliales inhibent le complexe TF-facteur VIIa par synthèse et expression de TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitors*) (Price, Thompson and Kam, 2004). La thrombine, ou facteur IIa, convertit le fibrinogène soluble en fibrine insoluble et peut également être activé via les facteurs Va, VIIIa, IX et X (Price, Thompson and Kam, 2004). Ces derniers peuvent à leur tour être activés par rétroaction positive. Enfin, la thrombine peut être associée à la thrombomoduline, dans ce cas-là, son substrat change. Le complexe thrombine-thrombomoduline active la protéine C, inhibiteur de la coagulation, notamment des facteurs Va et VIIIa.

Pour finir, les cellules endothéliales expriment l'eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*) qui convertit l'arginine en monoxyde d'azote (NO), inhibiteur de l'agrégation plaquettaire.

c. Tonus vasculaire

Le tonus vasculaire fait référence à la relation entre le degré de constriction et de dilatation qu'un vaisseau peut subir. Le tonus vasculaire est contrôlé par les cellules musculaires lisses présentes dans la media. Les capacités de relaxation et de contraction de ces dernières déterminent le diamètre du vaisseau, influençant ainsi l'écoulement du sang. Le contrôle de la vasodilatation et de la vasoconstriction, par les cellules endothéliales, est exercé localement par synthèse et dégradation de facteurs hémodynamiques. Les principaux vasoconstricteurs sont l'endothéline, les prostaglandines, le thromboxane A2 et l'angiotensine II. À l'inverse, la prostacycline (PGI_2), l'EDHF (*Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor*) et le NO sont vasodilatateurs.

Par exemple, l'endothéline peut se fixer sur l'un de ses trois récepteurs (A, B et C). En se fixant sur le récepteur A, elle conduit à la vasoconstriction du vaisseau, tandis que la fixation sur le récepteur B induit la vasodilatation indirecte par libération de NO et de PGI_2. Le NO, produit par l'eNOS, agit sur les cellules musculaires lisses en augmentant la production de GMPc (*Guanosine Monophosphate cyclique*). Celui-ci inhibe la contraction des muscles lisses.

d. Angiogenèse

L'angiogenèse est un processus biologique complexe, caractérisé par la formation de nouveaux vaisseaux à partir de ceux préexistants, en condition physiologique ou pathologique. De nombreuses molécules ont été identifiées comme participant au processus

angiogénique. On retrouve parmi elles le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et ses récepteurs, le PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) ou encore les angiopoïétines.

On distingue deux types d'angiogenèse, par bourgeonnement « *sprouting* » et par intussusception. L'angiogenèse par bourgeonnement permet l'extension de l'arbre vasculaire à partir du réseau existant. En condition hypoxique, les molécules pro-angiogéniques, émises par les cellules mésenchymateuses, dégradent les membranes basales, induisent la prolifération endothéliale et leur migration conduisant à la formation de tubes endothéliaux. L'angiogenèse par intussusception consiste en la scission d'un vaisseau existant en deux nouveaux vaisseaux fils. La création de nouveaux vaisseaux peut également résulter du recrutement, de la différentiation et de la prolifération de progéniteurs endothéliaux, on parle alors de vasculogenèse.

e. Réponse immunitaire et inflammatoire

En régulant le trafic de leucocytes entre le sang et les tissus, l'endothélium joue un rôle clé dans la réponse immunitaire et inflammatoire. Les cellules endothéliales sécrètent des chimiokines capables de recruter les cellules immunitaires. Elles expriment à leur surface les molécules d'adhésion VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule type 1*), ICAM-1 et 2 (*Intercellular Adhesion Molecule type 1 - 2*), PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule type 1*) et les sélectines E et P. Par ailleurs, les cellules endothéliales sécrètent également des cytokines pro- et anti-inflammatoires telles que le TNFα, l'IFNγ ou l'IL-6 et participent activement au statut inflammatoire du tissu.

L'endothélium peut recruter les cellules immunitaires à travers deux mécanismes. L'activation de type I est mise en place dans les premières minutes qui suivent le stimulus. Les sélectines sont alors exprimées à la surface des cellules endothéliales permettant la capture et le *rolling* des leucocytes. Les CAM (VCAM, ICAM, PECAM) interviennent pour l'arrêt, l'adhésion ferme et la transmigration à travers la barrière endothéliale. L'activation de type II intervient en aval du type I et nécessite une réponse inflammatoire plus soutenue. Le TNFα et l'IL-1, sécrétés par les cellules immunitaires, sont les médiateurs de cette réponse. Ils induisent le remodelage du cytosquelette, permettant le relâchement des jonctions intercellulaires et la fuite de protéines plasmatiques. Le recrutement des leucocytes est également plus efficace au cours de l'activation de type II.

III. La réponse de l'endothélium aux rayonnements ionisants

Les dommages vasculaires induits par une irradiation thérapeutique sont décrits depuis de nombreuses années. L'atteinte vasculaire est considérée comme la cause majeure de morbidité radio-induite à long terme chez les survivants de cancers traités par radiothérapie. Ainsi, il est aujourd'hui admis que l'endothélium joue un rôle central dans les réponses aiguë et chronique à l'irradiation. L'apoptose endothéliale, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'expression de cytokines, de chimiokines, de molécules d'adhésion et la baisse de la thromborésistance contribuent à la formation d'œdèmes périvasculaires, à l'inflammation et l'accumulation de fibrine. Ces phénomènes sont observés précocement et empêchent le fonctionnement normal du compartiment. La chronicité de cette dysfonction génère des zones d'hypoxie tissulaire qui peuvent également être alimentées par la fibrose radio-induite et l'ischémie vasculaire (Vujaskovic *et al.*, 2001).

Ces zones hypoxiques semblent être associées à une augmentation du dépôt matriciel de collagènes, de l'expression de TGFβ et de VEGF. Ces observations ont été réalisées dans un modèle de fibrose pulmonaire radio-induite mais n'ont pas été confirmées dans d'autres organes (Vujaskovic *et al.*, 2001).

D'un point de vue morphologique, les lésions vasculaires diffèrent selon la taille du vaisseau. Les capillaires sont plus radiosensibles que les gros vaisseaux, on observe après irradiation, une hypertrophie et un détachement des cellules endothéliales, la formation de pseudopodes pouvant obstruer la lumière et des thromboses. Concernant les gros vaisseaux, les lésions se caractérisent par des réductions luminales, des dépôts de matrice extracellulaire, des hyperplasies néo-intimales et la formation de thrombus (Fajardo, 2005).

a. L'apoptose endothéliale

Comparées à d'autres types cellulaires, les cellules endothéliales sont considérées comme radiosensibles. La mort de ces cellules par apoptose résulte principalement de la génération de céramides par la sphingomyélinase acide (aSMase) (Haimovitz-Friedman, 1994; Kolesnick and Fuks, 2003). La radiosensibilité accrue des cellules endothéliales aurait pour origine une quantité importante d'aSMase à l'état basal, elles en auraient vingt fois plus par rapport à d'autres types cellulaires (Marathe *et al.*, 1998). Il a également été observé que les capillaires sanguins semblent être plus sensibles à l'irradiation que les vaisseaux de plus gros calibre. Cette radiosensibilité spécifique semble être associée à la présence de bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). Des injections, chez la souris, de bFGF diminuent

l'apoptose endothéliale et augmentent la survie des animaux après irradiation (Peña, Fuks and Kolesnick, 2000; Paris, 2001). Le bFGF est retrouvé de manière ubiquitaire dans la lame basale. Puisque les capillaires en sont dépourvus, l'absence de bFGF pourrait, en partie, expliquer cette radio sensibilité (Paris, 2001).

De plus, aucune apoptose endothéliale n'est observée chez des souris déficientes en aSMase, 10h après une irradiation corps entier à 20 Gy (Santana *et al.*, 1996). Les travaux de *Paris et al* ont montré que l'apoptose du compartiment endothélial est l'évènement initiateur dans le développement d'un syndrome gastro-intestinal chez la souris. En effet, celle-ci précèderait la perte du compartiment souche épithélial après une irradiation à 15 Gy corps entier (Paris, 2001). Dans la même étude, les auteurs ont également démontré l'effet radioprotecteur du bFGF qui augmente la survie des animaux. Cette radioprotection possède toutefois des limites, elle n'a pas été observée pour une dose d'irradiation de 18 Gy. En 2006, les travaux de *Schuller et al* contestent les observations faites par *Paris*. *Schuller* montre que la perte du compartiment endothélial, par irradiation spécifique utilisant la Boron-thérapie, ne semble pas avoir d'effet sur le compartiment souche intestinal (Schuller *et al.*, 2006).

Le caractère initiateur de l'apoptose endothéliale dans les lésions radio-induite reste encore un mystère à élucider. Quoiqu'il en soit, l'apoptose des cellules endothéliales conduit à une augmentation de la perméabilité vasculaire, les débris cellulaires engendrés ou DAMPs sont reconnus par le système immunitaire et peuvent conduire à une inflammation.

b. Acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire

L'acquisition par l'endothélium vasculaire d'un phénotype pro-inflammatoire survient à travers deux mécanismes, l'activation de celui-ci d'une part et la sécrétion de molécules solubles d'autre part.

- *Activation de l'endothélium*

L'endothélium est dit « activé » lorsque l'expression des molécules d'adhésion est augmentée. Nous avons vu ci-dessus, le rôle que possèdent ces glycoprotéines de surface (sélectines, VCAM, ICAM, PECAM). Les interactions endothélium-leucocytes vont ainsi jouer un rôle clé dans la mise en place de la réponse inflammatoire, qu'elle soit aiguë ou chronique. Après exposition aux rayonnements ionisants, les cellules endothéliales surexpriment ces molécules, qui participent à l'adhésion leucocytaire et plaquettaire (Quarmby *et al.*, 1999; Gaugler *et al.*, 2004). Cette surexpression peut provenir de la modification du profil transcriptomique des gènes impliqués dans la glycosylation.

L'altération du glycome endothélial aurait des répercussions sur les interactions endothélium-leucocytes (Jaillet *et al.*, 2017).

De plus, les cellules eucaryotes possèdent à leur surface une couche de polysaccharides liée aux lipides et protéines de la membrane. Cette couche, appelée glycocalyx, protège la membrane externe des cellules et permet de masquer les motifs de reconnaissance des cellules immunitaires et donc leur adhésion (Schött *et al.*, 2016). Suite à l'irradiation, un phénomène appelé « *shedding* » se produit au niveau du glycocalyx. Celui-ci est perdu et expose les glycoprotéines de surface à d'éventuelles interactions (Jaillet *et al.*, 2017). Il a également été démontré le lien entre la perte du glycocalyx endothélial et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Rahbar *et al.*, 2015).

In vivo, l'utilisation de souris *ICAM-1-/-* montre une réduction de l'inflammation pulmonaire et intestinale par rapport aux souris sauvages après irradiation (Hallahan and Virudachalam, 1997). Une diminution de l'adhésion leucocytaire chez ces animaux a de plus été démontrée (Mollà *et al.*, 2003). Ces études suggèrent que l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, après irradiation, par les cellules endothéliales, joue un rôle déterminant dans le recrutement des cellules circulantes et la mise en place de l'inflammation.

- *Sécrétion de cytokines*

Le recrutement des cellules immunitaires passe également par la sécrétion de cytokines. Comme nous l'avions déjà indiqué, les cellules endothéliales sont d'importants producteurs de cytokines après irradiation (Stewart and Dörr, 2009).

En réponse à l'irradiation, l'augmentation de l'expression et la sécrétion de cytokines est connue depuis plus de deux décennies (Chiang *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1997; Meeren *et al.*, 1997; Daigle *et al.*, 2001). *In vitro*, la sécrétion de cytokines a été observée chez différents types de cellules endothéliales post-irradiation (Meeren *et al.*, 1997; Riquier *et al.*, 2013). Ces observations ont été confirmées *in vivo*, chez l'Homme, dans une étude transcriptomique regroupant 13 patients traités par radiothérapie, de 4 à 500 semaines. Les artères irradiées issus des patients montrent la surexpression des gènes codant pour l'IL-6, IL-8 et IL-1β (Halle *et al.*, 2010). Cette étude montre également l'implication de la voie NF-κB dans la réponse à l'irradiation. En effet, la plupart des gènes dérégulés sont liés à cette voie de signalisation qui reste activée plusieurs années après exposition (Halle *et al.*, 2010).

c. L'acquisition d'un phénotype pro-coagulant et pro-fibrosant

- *Activation du système de coagulation*

L'activation du système de coagulation est la première réponse à toutes blessures traumatiques. Bien que l'irradiation n'altère pas physiquement le vaisseau sanguin, le système de coagulation est tout de même activé dans celui-ci. Suite à l'irradiation, l'expression de molécules impliqués dans le système de coagulation, telles que le facteur tissulaire ou la thrombomoduline, est altérée (Denham and Hauer-Jensen, 2002; Boerma *et al.*, 2004; Goldin-Lang *et al.*, 2007).

Le facteur tissulaire est le principal initiateur du système de coagulation. Des études *in vitro* ont montré l'augmentation transitoire du facteur tissulaire d'origine endothéliale dans les heures qui suivent l'irradiation (Goldin-Lang *et al.*, 2007). *In vivo*, chez la souris après irradiation corps entier, une augmentation de l'expression du facteur tissulaire dans l'endothélium pulmonaire est observée (Van der Meeren *et al.*, 2003). Des résultats similaires sont retrouvés chez le rat après irradiation intestinale (Wang *et al.*, 2004). La surexpression du facteur tissulaire est associée à l'augmentation de l'activité de la thrombine et un dépôt de fibrine plus important (Wang *et al.*, 2004). Le facteur tissulaire permet, *in fine*, l'activation de la thrombine. Outre son rôle pro-coagulant et activateur de la fibrogenèse, la thrombine stimule, la prolifération fibroblastiques, la synthèse de matrice extracellulaire, la différentiation myofibroblastique et la synthèse de CTGF (Bogatkevich *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2012; Danckwardt, Hentze and Kulozik, 2013). De plus, les études menées par *Wang et al* ont montré que l'irradiation localisée de l'intestin chez le rat est associée à la surexpression du facteur tissulaire *in vivo* (Wang *et al.*, 2004). L'injection en intrapéritonéale d'hirudine, inhibiteur de la thrombine, chez ces animaux réduit significativement les lésions de la muqueuse et l'épaisseur de la paroi intestinale. L'hirudine semble également réduire le dépôt de collagène chez les animaux traités (Wang *et al.*, 2004). La thrombine semble donc avoir un rôle déterminant dans l'initiation des lésions radio-induites.

À l'inverse, les molécules anticoagulantes, tels que la thrombomoduline, sont inactivées après irradiation (Denham and Hauer-Jensen, 2002; Milliat, 2008). La thrombomoduline est un important régulateur de la coagulation, c'est un co-facteur de la thrombine. En modifiant son substrat, elle inhibe la cascade de coagulation via l'activation de la protéine C. Les études menées par *Richter et al* sur l'entérite radique montrent, par marquage tissulaire, une diminution de la thrombomoduline chez les patients irradiés (Richter *et al.*, 1997). Cette diminution est maintenue longtemps après irradiation et serait associée à

une augmentation du risque de fibrose radio-induite (Richter *et al.*, 1997). La perte de la thrombomoduline affecte le système de coagulation qui basculerait vers une hyper-coagulation augmentant ainsi la formation de fibrine, l'activité du facteur tissulaire et l'agrégation plaquettaire. Une augmentation de l'immunoréactivité au TGFβ est également montrée par les auteurs et contribuerait à la dérégulation de la thrombomoduline (Richter *et al.*, 1997).

- *Phénotype anti-fibrinolytique*

La fibrinolyse est un processus physiologique de dissolution des caillots sanguins, constitués de fibrine, par la plasmine. Ce mécanisme clôture la coagulation sanguine et empêche le développement de thromboses. La plasminogène possède une forte affinité avec la fibrine et est incorporé dans le caillot lors de sa formation. Les activateurs du plasminogènes, *tissue Plasminogen Activator* (t-PA) et *urokinase Plasminogen Activator* (u-PA), activent le plasminogène en plasmine. La plasmine étant une protéase, elle dégrade la fibrine. Ce processus est régulé pour s'interrompre : l'alpha-2-antiplasmine inhibe la plasmine et l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1, *Plasminogen Activator Inhibitor type 1*) inhibe le t-PA et l'u-PA.

En réponse à l'irradiation, de nombreux travaux réalisés par le laboratoire ont montré, *in vitro* et *in vivo*, l'augmentation de l'expression de PAI-1 (Milliat *et al.*, 2008; Rannou *et al.*, 2015). Cette surexpression inhiberait le processus fibrinolytique et favoriserait la formation d'une fibrose radio-induite (Milliat *et al.*, 2008). La délétion spécifique de PAI-1 dans l'endothélium a également montré un bénéfice en termes de survie dans un modèle préclinique d'atteinte intestinale radio-induite (Rannou *et al.*, 2015). Nous reviendrons plus en détails sur la protéine PAI-1 ainsi que son rôle dans l'évolution des lésions radio-induites.

d. L'impact sur le processus d'angiogenèse

À une dose de 2 Gy, une stimulation de l'angiogenèse est observée, aussi bien dans la tumeur que dans les tissus sains. Elle s'explique en partie par l'augmentation de l'expression de VEGF, acteur essentiel dans l'angiogenèse et la vasculogenèse (Milliat, 2008). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'angiogenèse radio-induite sont actuellement peu connus, mais la présence de cytokines pro-inflammatoires semble jouer un rôle central dans l'initiation de ce processus. En effet, un microenvironnement pro-inflammatoire semble propice à la formation de nouveaux vaisseaux et à la prolifération des cellules endothéliales (Naldini and Carraro, 2005). Plus récemment, les travaux de *Oh et al* ont montré une

augmentation de la formation de tubes et une activation de la signalisation angiogénique après exposition à 4 Gy de cellules endothéliales mammaires saines issues de patientes atteintes de cancer du sein (Oh *et al.*, 2014). L'augmentation de l'angiogenèse post-irradiation pourrait avoir un effet délétère car elle participerait à l'exacerbation de la réponse inflammatoire.

e. La transition endothélium-mésenchyme

La transition endothélium-mésenchyme (endoMT) est un type de transdifférenciation cellulaire récemment identifiée. L'endoMT est un processus biologique complexe dans lequel les cellules endothéliales perdent progressivement leurs marqueurs spécifiques, tel que la VE cadhérine, au profit de marqueurs myofibroblastiques. Les myofibroblastes transformés sont ainsi capables d'exprimer l'actine des muscles lisses (α-SMA, *α Smooth Muscle Actin*), la transgéline ou SM22-α (*Smooth Muscle 22 α*) et le collagène de type I. L'endoMT est connu physiologiquement comme participant à la formation des valves cardiaques au cours de l'embryogénèse. Ce mécanisme est induit par le TGFβ et semble participer à la mise en place du processus fibrotique, notamment au niveau du cœur, des reins et des poumons (Piera-Velazquez, Li and Jimenez, 2011; Lavigne *et al.*, 2017).

Des travaux menés par le laboratoire ont montré que la transition endothélio-mésenchymateuse jouerait un rôle dans l'évolution de la rectite radique. En effet, des cellules endothéliales possédant à la fois les marqueurs endothéliaux (vWF) et mésenchymateux (αSMA) ont été observées chez des patients souffrant de rectite radique (45 Gy, 1,8 ou 2 Gy par fraction, résection chirurgicale entre 6 et 8 semaines post-traitement) (Mintet *et al.*, 2015). Cette dualité d'expression n'est pas retrouvée dans les tissus sains. Des observations similaires ont été faites dans un modèle préclinique murin après irradiation colorectale à 27 Gy (Mintet *et al.*, 2015). Pour aller plus loin, le laboratoire a identifié le gène *HEY2* (*Hairy/Enhancer-of-split related with YRPW motif protein 2*) comme acteur impliqué dans ce processus. L'irradiation d'HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) à 10 Gy déclenche l'endoMT des cellules, associée à la surexpression de *HEY2*. La surexpression de ce gène, toujours chez les HUVECs, via l'apport d'un plasmide, a montré d'une part, l'augmentation de SM22-α et de TGFβ-2 ainsi que la diminution du vWF d'autre part. L'invalidation spécifique de *HEY2* dans l'endothélium montre une réduction de la fréquence d'endoMT ainsi qu'une baisse de la sévérité de rectites radiques après irradiation colorectale de 22 Gy chez la souris. Enfin, la surexpression de *HEY2* est également retrouvée chez des patients souffrant de rectite radique (Mintet *et al.*, 2017). Les travaux menés par le laboratoire ont permis d'illustrer l'importance que peut avoir la transition endothélio-mésenchymateuse

dans l'évolution de fibroses radio-induites.

Les rayonnements ionisants vont donc avoir énormément d'effets sur les cellules endothéliales. L'ensemble des mécanismes évoqués précédemment sont schématisés en figure 11. L'irradiation intervient dans la mise en place de la dysfonction endothéliale radio-induite qui participe à l'évolution des dommages radiques.

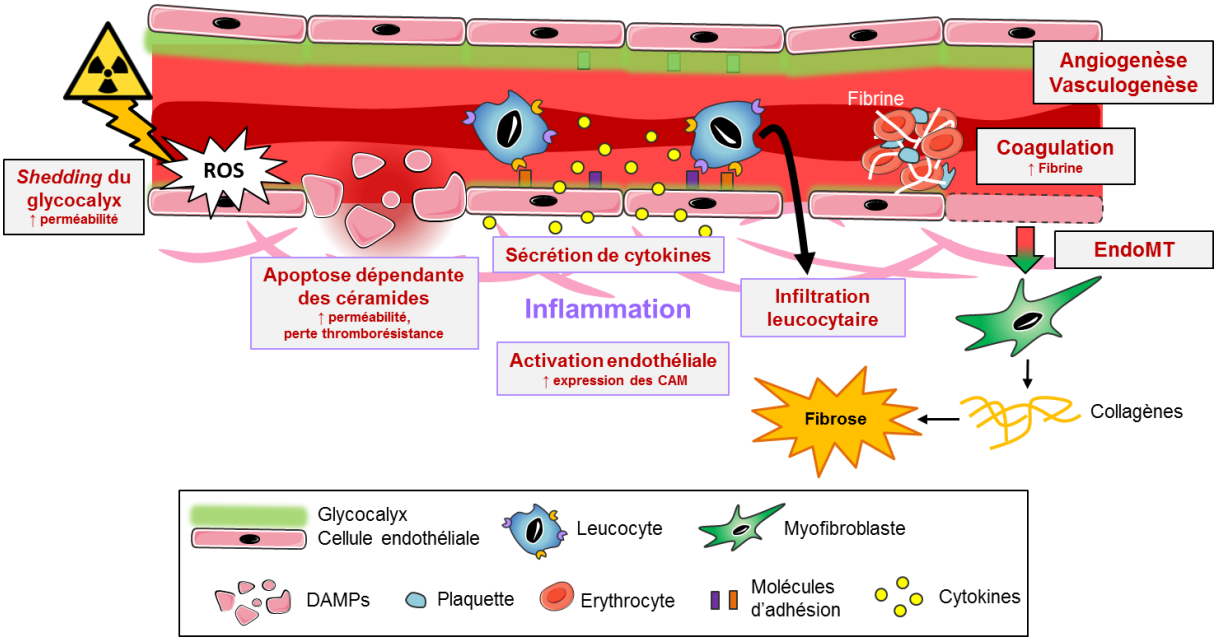


Figure 11. Principaux effets des rayonnements ionisants sur le compartiment endothélial.
L'exposition de l'endothélium aux rayonnements ionisants va induire la formation de ROS, l'apoptose des cellules endothéliale via la voie des céramides, la perte du glycocalyx, l'augmentation du processus angiogenique, la sécrétion de cytokines et l'expression des molécules d'adhésion. Ces phénomènes vont aboutir à une augmentation de la perméabilité vasculaire et au recrutement des cellules immunitaires circulantes permettant la mise en place et l'exacerbation de l'inflammation. Les cellules endothéliales irradiées vont également activer le système de coagulation et sont également capables de transdifférenciation en myofibroblastes producteurs de collagènes. Ces processus participent au développement de fibrose radio-induite.

Les travaux de différents groupes ont montré *in vitro* et *in vivo* que les cellules endothéliales peuvent également acquérir un phénotype sénescent sous l'effet d'une exposition aux rayonnements ionisants. La sénescence est un phénotype cellulaire connu depuis plus d'un demi-siècle et peut être induite par de nombreux stimuli. Elle serait associée à de nombreuses pathologies et aurait des effets, à la fois, délétères et bénéfiques selon le type d'affection. L'implication de la sénescence dans l'évolution des lésions tissulaires radio-induite sera discutée dans le chapitre suivant.

Chapitre III : La sénescence cellulaire

Étymologiquement, le terme « sénescence » provient du latin *senex* qui signifie « vieil homme, grand âge ». Survenant après la phase de maturité, la sénescence est définie comme le vieillissement lent et progressif des tissus et des organes. Ce processus irréversible entraîne un ralentissement des fonctions et de l'activité de l'organisme, créant son affaiblissement général et aboutissant à sa mort.

On appelle sénescence cellulaire, un état de différenciation avancé, caractérisé par un arrêt irréversible du cycle cellulaire, majoritairement en phase G1. En imposant l'arrêt de la prolifération, la sénescence limite les divisions des cellules « vieilles » et/ou altérées, faisant d'elle, un puissant mécanisme suppresseur de tumeurs. Aujourd'hui, il est admis que la sénescence joue un rôle prépondérant dans le vieillissement et est impliquée dans de nombreuses pathologies liées à l'âge. Ce chapitre traitera du phénotype sénescent, les grandes catégories de sénescence cellulaire, la sénescence endothéliale *in vivo* et son ciblage en clinique.

I. Caractéristiques de la cellule sénescente

Les cellules endothéliales, comme la quasi-totalité des types cellulaires, peuvent entrer en sénescence. L'acquisition de ce phénotype n'est pas anodin, les cellules endothéliales sénescentes contribuent fortement au développement d'une dysfonction vasculaire pouvant conduire à des conséquences tissulaires notables. Les cellules sénescentes présentent des caractéristiques phénotypiques remarquables, des modifications morphologiques, un arrêt de la prolifération, une résistance à l'apoptose, la sécrétion de facteurs solubles…

a. Morphologie

Au niveau morphologique, les cellules sénescentes sont plus grosses et plus étalées que les cellules normales. L'origine des modifications morphologiques des cellules sénescentes n'est pas clairement établie, mais semble faire intervenir plusieurs acteurs : la protéine du Rétinoblastome (pRB), les protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette, les protéines d'adhésion et les voies de synthèse protéique (Chen *et al.*, 2000). La morphologie des cellules sénescentes varie selon le type cellulaire.

Les cellules endothéliales sénescentes arborent une hypertrophie cellulaire par rapport aux cellules normales. De morphologie plate et très étalée, elles présentent une augmentation de leur granularité, associée à une vacuolisation plus importante. Une fois sénescentes, les cellules endothéliales manifestent de nombreuses polynucléisations qui résulteraient de la fusion de deux cellules adjacentes (Figure 12) (Satoh *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 2001;

Erusalimsky and Kurz, 2006). Enfin, la sénescence endothéliale est associée à une perte des jonctions intercellulaires, qui se traduit, *in vivo*, par une augmentation de la perméabilité(Krouwer *et al.*, 2012).

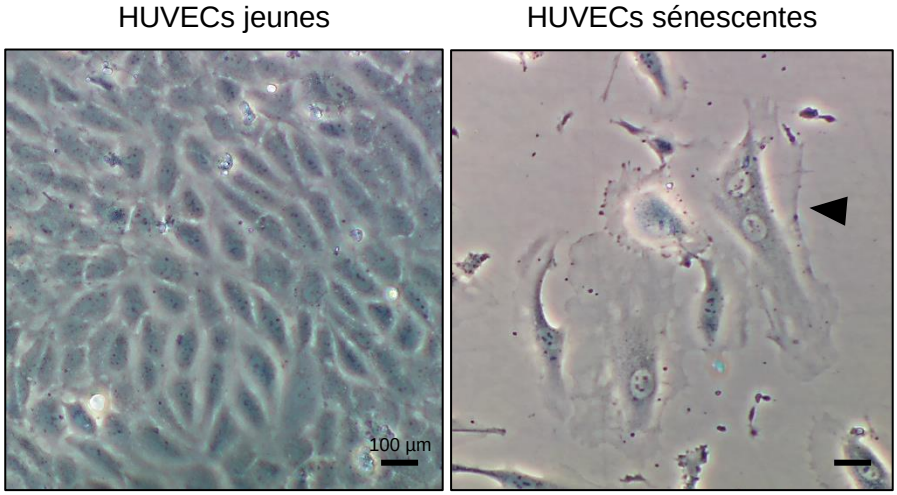


Figure 12. Modifications morphologiques des HUVECs sénescentes.
Après plusieurs passages successifs, les HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) sénescentes apparaissent plus grosses, étalées et présentant un très faible ratio noyau/cytoplasme par rapport aux cellules jeunes. Une cellule polynucléée est visible (flèche). Prises de vue réalisées au laboratoire, grossissement x10.

L'implication de pRB dans les modifications morphologiques a été historiquement observée sur des fibroblastes via l'utilisation de la protéine E7 de l'HPV (*Human Papillomavirus*). Le traitement de fibroblastes par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), agent pro-sénescent, induit une augmentation de la taille des cellules. Par contre, les fibroblastes exprimant la protéine E7, traités à l'H_2O_2, présentent une morphologie normale (Chen *et al.*, 2000).

Les modifications morphologiques acquises par les cellules sénescentes font intervenir les molécules du cytosquelette (Chen *et al.*, 2000). Par exemple, la cytokératine 7 est sous-exprimée dans les HUVECs sénescents. Cette dérégulation pourrait impacter la stabilisation du cytosquelette (Chang *et al.*, 2005). En utilisant des fibroblastes sénescents, *Nishio et al* ont montré que la surproduction de vimentine a pour conséquence une augmentation de l'étalement de ces cellules (Nishio *et al.*, 2001). Cette protéine est également surexprimée dans les HUVECs sénescentes (Kamino *et al.*, 2003). Par ailleurs, la surexpression d'actine et de vinculine a aussi été reportée (Chen *et al.*, 2000).

Le rôle de pRB ainsi que l'accumulation des protéines du cytosquelette suggèrent une synthèse protéique *de novo* (Chen *et al.*, 2000). La voie de signalisation mTOR (*mechanistic Target Of Rapamycin*) est impliquée dans la régulation de la synthèse protéique et semble être responsable du contrôle de la taille des cellules (Fingar, 2002). La protéine RB n'intervient

pas uniquement dans la morphologie de la cellule sénescente, elle agit principalement dans la régulation du cycle cellulaire.

b. Arrêt irréversible des divisions

Les cellules sénescentes sont caractérisées par un arrêt irréversible de leur cycle cellulaire, plus précisément, la majorité d'entre elles sont arrêtées en fin de phase G1. Le terme irréversible désigne la capacité que possèdent ces cellules à bloquer leur cycle même après stimulation mitogène.

Le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes qui constituent et délimitent la vie d'une cellule. Il est composé de deux étapes : une étape dans laquelle la cellule grossit et duplique son matériel génétique et une étape de division qui donnera deux cellules filles identiques. Les mécanismes de régulation du cycle cellulaire reposent sur deux structures protéiques complémentaires : les CDK (*Cyclin-Dependent Kinase*) et les cyclines. L'expression de complexes CDK-Cycline spécifiques est nécessaire pour progresser à travers les différentes phases du cycle (Figure 13).

Ces complexes sont eux-mêmes régulés par des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines, appelées CDKI (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors*). Les principales CDKI sont p21, aussi connue sous le nom de Cip1 ou Waf1, et $p16^{INK4A}$. Ces protéines empêchent la formation des complexes CDK-Cycline par liaison avec les CDK.

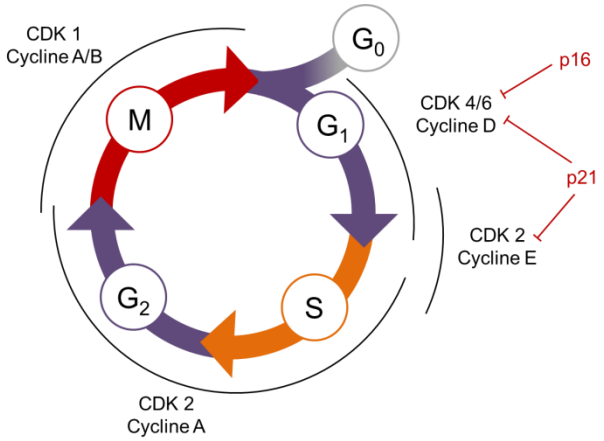


Figure 13. Le cycle cellulaire et ses régulateurs.
Le cycle cellulaire est composé de 4 phases : une phase de division ou mitose (M), une phase de réplication de l'ADN (S) et deux phases de transition (G1 et G2). La progression à travers les phases du cycle est régulée par des complexes cyclines-Cyclin Dependent Kinase (CDK). L'expression des complexes CDK4/6-cycline D est nécessaire au cours de la phase G1, le complexe CDK2-cycline E intervient dans la transition G1/S, le complexe CDK2-cycline A est exprimé au cours des phases S et G2. Enfin, le complexe CDK1-cycline A/B est spécifique de la mitose. Ces complexes sont régulés par des protéines activatrices ou inhibitrices. Ici, sont représentés les principaux inhibiteurs des CDK (CDKI), p21 et p16, agissant préférentiellement en phase G1 et en transition G1/S.

La protéine p21 est directement sous le contrôle de p53, elle a été associée à la sénescence pour la première fois par *Noda et al*, en 1994. Elle fut découverte via un criblage visant initialement à mettre évidence les inhibiteurs de la synthèse d'ADN dans des fibroblastes sénescents. Elle fut alors nommée SDI1 pour *Senescent cell-derived Inhibitor 1* (Noda *et al.*, 1994). Cette même étude a également montré que p21/SDI1 est surexprimée de manière permanente dans les cellules sénescentes, mais de manière transitoire dans les cellules quiescentes, illustrant ainsi le caractère d'arrêt irréversible des divisions du phénotype sénescent (Noda *et al.*, 1994). Enfin, p21 est l'inhibiteur majeur de la kinase CDK2 et peut, dans une moindre mesure, interagir et inhiber la kinase CDK4. Elle est donc l'inhibiteur spécifique de la transition G1/S (Figure 13), ceci peut expliquer la raison pour laquelle la majorité des cellules sénescentes sont retrouvées bloquées en phase G1. Si l'arrêt du cycle persiste, une autre CDKI intervient : la protéine p16.

Les mécanismes conduisant à l'activation de p16 au cours de la sénescence ne sont pas clairement élucidés. Cette CDKI est un inhibiteur des CDK4 et 6 et peut induire l'arrêt des divisions cellulaires en phase G1 (Serrano, Hannon and Beach, 1993; Lukas *et al.*, 1995). Contrairement à p21, p16 n'est pas sous le contrôle de p53, elle est principalement régulée par la voie des Map Kinase (MAPK) faisant intervenir les protéines Ras (*Rat Sarcoma*), Raf (*Rat Fibrosarcoma*), et MEK (*MAK/ERK Kinase*) (Mirzayans *et al.*, 2012). L'expression de la protéine p16 est régulée par les facteurs de transcription ETS1 et ETS2 (*Avian Erythroblastosis virus E26 homolog-1 -2*). Ces derniers sont eux-mêmes contrôlés par ID1 (*Inhibitor of DNA binding 1*). À l'aide de fibroblastes sénescents, *Ohtani et al* ont montré une diminution de l'expression d'ID1, associée à une augmentation d'ETS1 (Ohtani *et al.*, 2001; Chien and Ffrench, 2006). Dans les cellules normales, le locus codant pour p16 est réprimé par des protéines de la famille Polycomb, tel que BMI1 (*B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1 homolog*). La dérégulation de ces protéines est suffisante pour activer p16 et induire la sénescence (Jacobs *et al.*, 1999; Chien and Ffrench, 2006). Enfin, la régulation de p16 s'effectuerait également au niveau épigénétique mais les mécanismes impliqués ne sont pas clairement établis (Herranz and Gil, 2018).

L'ensemble de ces résultats peuvent expliquer l'accumulation de p16 dans les cellules sénescentes. L'inhibition des complexes CDK4/6-Cycline D par ces deux CDKI empêche l'avancée en phase S, via la stabilisation de pRB.

La protéine RB joue un rôle essentiel dans le blocage du cycle en phase G1. Celle-ci séquestre le facteur de transcription E2F qui induit l'expression des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN. En réponse à un signal mitogène, les complexes CDK-cycline

modifient, par phosphorylation, la conformation de pRB, empêchant sa liaison à E2F. Une fois libre, E2F exerce son activité transcriptionnelle. Lorsque p21 et/ou p16 sont exprimées, les CDK sont inhibées, pRB n'est pas phosphorylée et E2F reste dans un état inactif. La cellule ne pourra progresser en phase S et restera donc bloquée en phase G1.

L'importance des protéines p21 et p16 dans l'induction de la sénescence varie selon le type cellulaire et le stimulus inducteur, il est cependant admis que la surexpression de p16 est secondaire à celle de p21. L'axe p53-p21 joue un rôle essentiel dans l'arrêt de la prolifération, tandis que p16 est associée au maintien de cet arrêt et à l'acquisition du phénotype sénescent. L'activation de ces CDKI au cours de la sénescence est dépendante de la voie des DDR. Nous traiterons de ce mécanisme dans la partie *Les différents types de sénescence cellulaire*.
Bien qu'elles soient arrêtées en phase G1, les cellules sénescentes restent néanmoins viables et métaboliquement actives.

c. Atteinte nucléaire, modifications de la chromatine et dommages à l'ADN

Les lamines sont des protéines de type filaments intermédiaires, ce sont les briques élémentaires à la formation de la lamina nucléaire. On distingue deux familles de lamines : les lamines de type A (A et C) et les lamines de type B (B1, B2 et B3). Elles participent à la structure du noyau et aux liaisons chromatine-membrane nucléaire. La dérégulation de ces protéines est associée à des laminopathies dont la plus connue est la progeria. Au cours de la sénescence, on observe une perte de la lamine B1. Cette diminution d'expression résulte de la séquestration d'E2F par pRB car le gène codant pour la lamine B1 est une cible de ce facteur de transcription. La lamine B1 n'est pas uniquement un marqueur de la sénescence, puisque sa délétion est suffisante pour induire une sénescence précoce (Shimi *et al.*, 2011). La perte de la lamine B1 conduit à la déstabilisation de l'enveloppe nucléaire qui aboutit à la modification de la forme du noyau, la décompaction des territoires chromatiniens, des modifications d'histones associées à l'hétérochromatine, au raccourcissement des télomères et une prolongation en phase S (Camps, Erdos and Ried, 2015).

Outre son rôle de régulateur transcriptionnel, pRB modifie la structure chromatinienne. Cette réorganisation chromatinienne peut résulter d'une dysfonction télomérique ou de dommages à l'ADN. Au sein d'une cellule sénescente, la chromatine se réorganise en foyers appelés SAHF (*Senescence-Associated Heterochromatin Foci*). Les SAHF sont des marqueurs de sénescence qui peuvent être aisément détectés par : des agents liant la molécule d'ADN, tels que le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), des modifications d'histones (triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3, H3K9me3) ou des

protéines associées à l'hétérochromatine (Figure 14) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Aird and Zhang, 2013). Les SAHF sont des structures hautement organisées : composés d'un cœur d'hétérochromatine constitutif caractérisé par des H3K9me3, celui-ci est entouré de couches d'hétérochromatines facultatives présentant des H3K27me3. Contrairement à l'euchromatine active, cette structure exerce une action répressive sur la transcription de gènes (Salama *et al.*, 2014). La formation de ces structures est contrôlée par l'axe p53-pRB et nécessite la présence de corps nucléaires PML (*Promyelocytic leukemia*) qui assemblent les complexes protéiques responsables du remodelage chromatinien (Ye *et al.*, 2007).

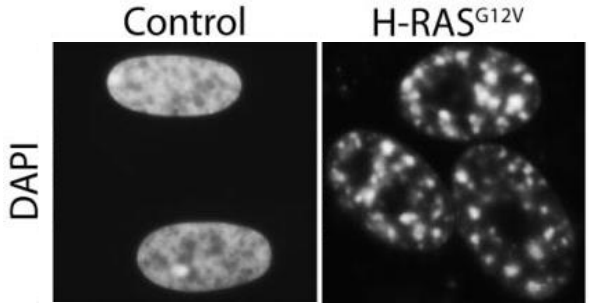


Figure 14. Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF).
Des noyaux de fibroblastes normaux (gauche) et sénescents induits par activation constitutive de Ras (droite) marqués au DAPI. Ce marquage permet de révéler l'état chromatinien des noyaux, le marquage est ponctué dans les cellules sénescentes correspondant aux SAHF.
D'après Aird et al. *Methods Mol Biol* (2013)

Enfin, les cellules sénescentes accumulent les dommages à l'ADN. Ces dommages sont associés à des marqueurs comme la phosphorylation de l'histone H2AX en sérine 139 (γH2AX) ou l'augmentation de l'expression de 53BP1 (*p53-Binding Protein 1*) (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003). *Collin et al* ont montré une réduction de l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation dans différents types cellulaires, soumis à différents types de stimuli inducteurs de sénescence (Collin *et al.*, 2018). Les auteurs montrent que l'inhibition, par ARN interférence, de différents acteurs impliqués dans la réparation de l'ADN est suffisante pour déclencher la sénescence des cellules transfectées. L'accumulation des dommages à l'ADN serait, en partie, due à une diminution des capacités de la machinerie de réparation dans les cellules sénescentes (Collin *et al.*, 2018).

d. Sénescence ou apoptose ?

Comme la sénescence, l'apoptose est un important mécanisme suppresseur de tumeurs, il s'agit d'une réponse cellulaire extrême face à un signal ou à un stress. Une fois sénescents, de nombreux types cellulaires acquièrent une résistance à l'apoptose.

La voie de l'apoptose est contrôlée, tout comme l'arrêt du cycle et la sénescence, par la protéine p53, suggérant une interconnexion entre ces voies de signalisation. Cette relation a longuement été étudiée et a abouti à de nombreuses controverses.

Les fibroblastes et kératinocytes sénescents sont résistants à l'apoptose induite par l'activation des céramides, par déplétion en facteurs de croissance ou encore, par le stress oxydatif. Cette résistance proviendrait de la surexpression de molécules anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*), telles que BCL-W (*BCL-2 like 2*) et BCL-XL (*BCL-2 related protein long isoform*) (Herranz and Gil, 2018). Dans certains cas, l'apoptose peut toutefois être déclenchée de manière extrinsèque par l'intervention des récepteurs de mort tels que TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) et FAS (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Mais, il a été démontré que les fibroblastes et les cellules stellaires hépatiques sénescents pouvaient surexprimer le récepteur-leurre DCR2 (*Decoy Receptor 2*), limitant ainsi l'induction de l'apoptose par voie extrinsèque (Sagiv *et al.*, 2013).

La résistance à l'apoptose n'est pas observée dans les cellules endothéliales sénescentes (Wagner *et al.*, 2001). Au contraire, une stimulation par des céramides exogènes provoquerait leur mort programmée. Cette sensibilité résulterait d'une augmentation de l'expression de BAX (*BCL-2 associated X apoptosis regulator*, molécule pro-apoptotique), de la diminution de l'expression de BCL-2, couplée à la diminution de l'activité de l'eNOS dans ces cellules (Erusalimsky and Kurz, 2006; Childs *et al.*, 2014). Cette baisse d'activité serait due à la dérégulation de la voie PTEN/PI3K/AKT (*Phosphatase and Tensin Homolog, Phosphoinositide 3-Kinase, AKR mouse Thymoma*) et/ou à l'augmentation des régulateurs négatifs de l'eNOS, tel que la cavéoline 1 (Childs *et al.*, 2014).

Bien que l'interconnexion entre les voies apoptotiques et sénescentes n'est plus à démontrer, la communauté scientifique a longuement cherché à comprendre la raison pour laquelle une cellule entrerait en apoptose plutôt qu'en sénescence, et inversement. Une étude réalisée sur des HUVECs identifia les rôles de p53, p21 et p16 dans les voies apoptotiques et sénescentes. L'axe p53/p21 est principalement impliqué dans la voie apoptotique, tandis que p16 est uniquement impliquée dans la sénescence (Chen *et al.*, 2006). L'activation de chacune des deux voies semble dépendre des niveaux d'expression de ces trois facteurs. Une autre étude a montré que des modifications post-traductionnelles de p53 orienterait son action apoptotique ou sénescente. Dans les cellules sénescentes, la protéine semble avoir un profil hyper-phosphorylé sur les sérines 15 et 18, et hypo-phosphorylé au niveau des sérines 37, 46 et 392. Ce profil semble être spécifique du recrutement de p53 au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans l'arrêt prolifératif, comme p21. Par contre, p53 est hyper-phosphorylée

sur l'ensemble de ces résidus lors d'un traitement pro-apoptotique, privilégiant son recrutement aux promoteurs de gènes apoptotiques (Jackson and Pereira-Smith, 2006).

Le « choix » que fait la cellule entre apoptose et sénescence semble donc se situer à différents niveaux de régulation, ajoutant une difficulté supplémentaire à la compréhension de ce mécanisme.

e. Phénotype sécrétoire

L'acquisition, par les cellules sénescentes, d'un phénotype sécrétoire est, sans aucun doute, la caractéristique la plus importante et ayant, d'un point de vue fonctionnel, le plus d'impact. Ce phénotype, communément appelé SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*), induit la sécrétion d'une pléthore de molécules dans le microenvironnement. L'existence d'un tel phénotype a été suggérée au cours d'études transcriptomiques réalisées sur différents types cellulaires sénescents, à savoir des fibroblastes, des cellules épithéliales et des cellules endothéliales (Shelton *et al.*, 1999).

Comme nous l'avions évoqué, il existe des différences phénotypiques entre les types cellulaires sénescents, le SASP ne fait pas exception. En effet, les molécules sécrétées diffèrent toujours selon le type cellulaire et le stimulus inducteur. On appelle SMS (*Senescence Messaging Secretome*), l'ensemble des molécules composant le SASP. Celui-ci est constitué de plusieurs facteurs qui peuvent être regroupés en différentes catégories : les facteurs solubles, incluant les interleukines, les chimiokines et les facteurs de croissance ; les protéases sécrétées ; les protéines et les composants de la matrice extracellulaires. Les principaux constituants du SASP de cellules endothéliales sénescentes sont regroupés dans le Tableau 3 (Coppé *et al.*, 2010; Donato *et al.*, 2015).

Il reste néanmoins difficile de déterminer la composition exacte du SMS, à titre d'exemple, des travaux réalisés sur des fibroblastes humains IMR-90 sénescents, induits par surexpression oncogénique, ont montré un sécrétome composé d'au moins 103 molécules différentes (Childs *et al.*, 2017). Celui-ci reste spécifique de ce type cellulaire et de la façon dont la sénescence a été induite.

L'acquisition du SASP par les cellules sénescentes se situe à différents niveau de régulation : transcriptionnel et épigénétique.

	Composants du SASP endothélial
Interleukines et chimiokines	IL-6, CXCL-8 (IL-8), IL-1α, IL-1β, GROα, MCP1
Facteurs de l'inflammation	TGFβ, TNFα, CSFs
Facteurs de croissance et régulateurs	VEGF, EGF, IGFBPs
Protéases et régulateurs	MMPs, PAI-1

Tableau 3. Les principaux composants du Senescence-Associated Secretory Phenotype endothélial.
IL-6 : Interleukine 6 ; IL-8 : Interleukine 8 ; IL-1α/β : Interleukine 1α/β ; GRO : Growth-Related Oncogene α ;MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1 ; TGFβ : Transforming Growth Factor β; TNFα : Tumor Necrosis Factor α ; CSFs : Colony Stimulating Factors ; VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor ; EGF : Epidermal Growth Factor ; IGFBPs : Insulin-like Growth Factor Binding Proteins ; MMPs : Matrix Metallopeptidases ; PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1.

Au niveau transcriptionnel, le SASP est régulé par deux facteurs majeurs : NF-κB et C/EBPβ (*CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta*) (Salminen, Kauppinen and Kaarniranta, 2012). La voie faisant intervenir NF-κB est la voie majeure dans l'induction du SASP et est, avant tout, une réponse aux dommages à l'ADN. La stabilisation de NF-κB est concomitante à l'activation du DDR (Figure 15). La protéine NF-κB est un homo-/hétérodimère formé à partir de cinq sous-unités : $p50^{NF\text{-}\kappa B1}$, $p52^{NF\text{-}\kappa B2}$, $p65^{RelA}$, RelB et c-Rel. Les sous-unités p65, RelB et c-Rel possèdent un domaine de transactivation, responsable des activités de régulation transcriptionnelle. L'hétérodimère p50-p65 est la forme la plus étudiée et permet la transcription de nombreux gènes impliqués dans le sécrétome sénescent. Hormis les dommages à l'ADN, il peut être activé par d'autres stimuli, les stress oncogéniques, le stress oxydatif, l'inflammation etc. (Salminen, Kauppinen and Kaarniranta, 2012). Dans ces cas-là, l'activation de NF-κB peut se faire via la voie des MAPK (Figure 15). Le rôle de NF-κB dans l'induction du SASP a été élucidé par différentes équipes. Sur des fibroblastes sénescents, les travaux d'*Acosta et al* ont montré que l'expression des facteurs composant le SMS mais également leurs récepteurs, est contrôlée par NF-κB (Acosta *et al.*, 2008). *Chien et al* ont observé une accumulation de la sous-unité p65 dans les noyaux SAHF-positifs de fibroblastes sénescents. Celle-ci présente d'ailleurs un profil de phosphorylation corrélé à l'augmentation de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires (Chien *et al.*, 2011). Puisque l'activation de NF-κB est directement liée à l'activation du DDR, il existe une relation étroite entre ce facteur de transcription et p53. La sous-expression de la sous-unité p65 est suffisante pour inhiber la sénescence de fibroblastes induite par oncogène et la répression de la voie p53 empêche la surexpression de cytokines pro-inflammatoires (Chien *et al.*, 2011; Rovillain *et al.*, 2011).

La voie faisant intervenir C/EBPβ est régulée par le récepteur NOTCH1. La protéine NOTCH1 joue un rôle primordial dans la régulation et la composition du SMS des cellules sénescentes (Liu *et al.*, 2012; Hoare *et al.*, 2016). Les récents travaux de *Hoare et al* ont montré, dans des fibroblastes sénescents, le rôle de NOTCH1 comme balance entre deux sécrétomes de composition différente. Leur action agirait à différents stades de la sénescence, mettant en évidence une certaine temporalité dans l'acquisition du SASP. Au début de la sénescence, l'activité de NOTCH1 est augmentée, permettant l'induction d'un SMS précoce, riche en TGFβ. La sécrétion de TGFβ participe et renforce l'arrêt prolifératif par action auto-/paracrine (Childs *et al.*, 2017). L'activation de NOTCH1 résulte du clivage de son domaine intracellulaire (N1ICD, *Notch1 Intracellular Domain*), capable de réguler de nombreux gènes, dont l'expression de p21 et la répression de C/EBPβ (Hoare *et al.*, 2016; Martínez-Zamudio *et al.*, 2017). Au cours de la sénescence, l'activation et l'expression de NOTCH1 diminue et est accompagnée d'une sécrétion transitoire d'IL-1α, appelée SMS de transition, qui semble être contrôlée par la voie mTOR (Orjalo *et al.*, 2009; Laberge *et al.*, 2015). L'action répressive de N1ICD sur C/EBPβ n'est plus maintenue, ce dernier va pouvoir exercer son activité transcriptionnelle et permettre l'expression des molécules composant le SMS tardif, en l'occurrence des facteurs pro-inflammatoires, des MMPs, des facteurs de croissance, etc. (Hoare *et al.*, 2016). Ces résultats sont toutefois en désaccord avec des études utilisant des cellules endothéliales issues de donneurs jeunes et âgés, dans lesquelles l'augmentation de l'activité de NOTCH1 induit leur entrée en sénescence qui serait accompagnée de la surexpression des facteurs pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 (Liu *et al.*, 2012). Cet exemple illustre, une fois de plus, la complexité du phénotype sénescent.

La sécrétion, par les cellules sénescentes, d'un SMS transitoire semble importante à l'acquisition du SMS tardif, pro-inflammatoire. En effet, l'expression d'IL-1α et de son récepteur IL1R1 (*Interleukin 1 Receptor type 1*), sont nécessaires à l'induction des interleukines 6 et 8, constituants majeurs du SMS tardif. Les facteurs NF-κB et C/EBPβ possèdent, tous deux, des éléments de réponse au niveau promoteur du gène codant pour IL-1α. Il a été démontré que l'extinction de cette cytokine diminue la liaison à l'ADN de ces deux facteurs (Orjalo *et al.*, 2009). Les travaux d'*Orjalo et al* ont cependant montré une très faible sécrétion d'IL-1α par les fibroblastes sénescents, ce facteurs est majoritairement lié à la membrane plasmique et exercerait son action de manière juxtacrine (Orjalo *et al.*, 2009). Quoiqu'il en soit, l'interleukine 1α permet, non seulement, l'acquisition du SASP pro-inflammatoire mais joue également un rôle clé dans l'intercommunication entre les voies NF-

κB et C/EBPβ. Cette cytokine agit telle une boucle de rétrocontrôle positif permettant à la cellule sénescente d'acquérir un phénotype sécrétoire fonctionnel.

Une autre voie intervient dans la mise en place du SASP. Celle-ci a été démontrée dans des cellules endothéliales sénescentes, il s'agit de la voie Janus Kinase (JAK). La particularité de cette voie est qu'elle contrôle spécifiquement le SASP. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de JAK empêche le développement du phénotype sécrétoire des HUVECs après exposition aux rayonnements ionisants. Les mécanismes moléculaires conduisant à la sécrétion de facteurs inflammatoires par activation de JAK ne sont, cependant, pas encore élucidés (Xu *et al.*, 2015).

Au niveau épigénétique, deux facteurs ont montré leur importance dans l'acquisition du SASP. L'inhibition de l'histone méthyltransférase MLL1 (*Mixed Lineage Leukemia gene 1*) semble réduire l'expression du SASP par inhibition de l'axe ATM - NF-κB, mais n'empêche pas l'acquisition du phénotype sénescent. L'inhibition de MLL1 n'affecte en effet pas l'expression des CDKI p21 et p16 (Capell *et al.*, 2016). Une équipe a également montré l'implication d'une autre histone méthyltransférase, G9A aussi connu sous le nom d'EHMT2 (*Euchromatic Histone-lysine N-Methyltransferase 2*). La protéine G9A réprime les promoteurs des gènes codant pour IL-6/8. La dégradation par le protéasome de cette enzyme au cours de la sénescence permet l'expression des interleukines et sa surexpression limiterait l'acquisition du SASP (Takahashi *et al.*, 2012).

Il a récemment été découvert une nouvelle voie de signalisation permettant la sécrétion de facteurs inflammatoires au cours de la sénescence. Les dommages à l'ADN associés à la déstabilisation de la lamina nucléaire, due à la perte de la lamine B1, conduisent à des transferts moléculaires entre le noyau et le cytoplasme. Parmi les molécules qui passent du noyau au cytoplasme, on retrouve des fragments d'ADN double-brin. Ces morceaux d'ADN cytosolique sont reconnus par la cGMP-AMP Synthase (cGAS) qui induit la production de cytokines inflammatoires par activation de la voie cGAS-STING. La liaison d'un morceau d'ADN double-brin à cGAS va induire la production de GMP et d'AMP cyclique. Ces molécules vont lier et activer STING (*Stimulator of Interferon Genes*). La protéine STING est capable de réguler la production d'interféron de type I et de cytokines inflammatoires par régulation d'IRF3 (*Interferon Regulatory Factor 3*) et de NF-κB, respectivement (Yang *et al.*, 2017). En utilisant des fibroblastes murins $cGAS^{-/-}$, *Yang et al* ont montré une diminution de

l'expression de différents facteurs composant le SASP, après traitement chimique ou irradiation (Yang *et al.*, 2017).

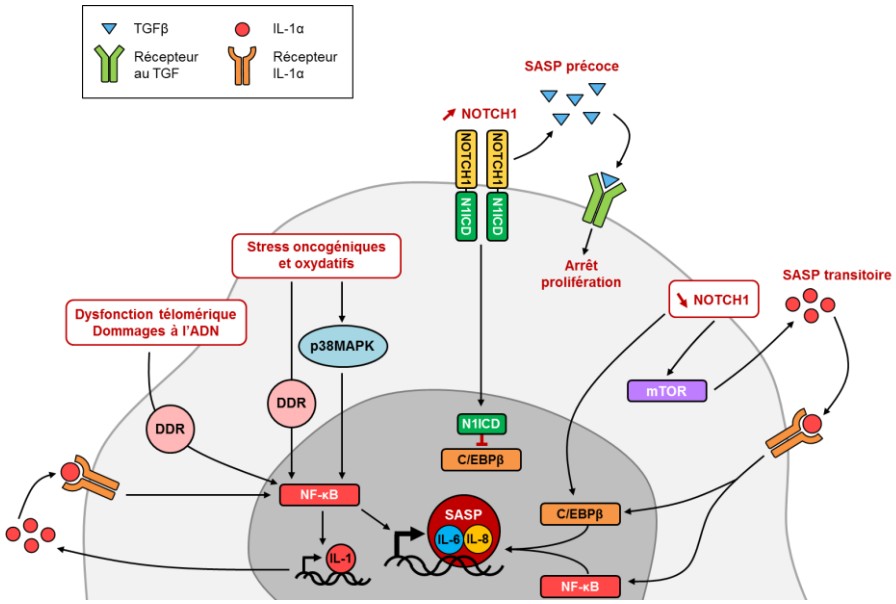


Figure 15. Les voies NF-κB et C/EBPβ : régulateurs du *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP).
L'acquisition du SASP par les cellules sénescentes fait majoritairement intervenir la voie NF-κB. Cette voie est directement liée au *DNA Damage Response*. Aux prémices de la sénescence, on observe une augmentation de l'activité de Notch1. Celle-ci va, d'une part, être responsable de la sécrétion de TGFβ, constituant le SASP précoce et de l'inhibition de C/EBPβ d'autre part. Le TGFβ va agir de manière auto/paracrine dans le microenvironnement immédiat et renforce l'arrêt prolifératif. Au cours de la sénescence, l'expression de Notch1 diminue, C/EBPβ n'étant plus réprimé, il exercera son activité transcriptionnelle. La diminution de Notch1 est accompagnée d'une sécrétion importante d'interleukine 1α, via la voie mTOR (SASP transitoire). Par action autocrine, IL-1α va renforcer l'activation des facteurs NF-κB et C/EBPβ.
DDR : DNA Damage Response ; NF-κB : Nuclear Factor Kappa B ; N1ICD : Notch1 Intracellular Domain ; C/EBPβ : CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta ; mTOR : mechanistic Target of Rapamycin.

Le phénotype sécrétoire était initialement utilisé comme un simple biomarqueur du processus sénescent, les récentes découvertes ont permis de montrer son implication dans bien des aspects de la sénescence. Au vue de la composition du sécrétome, il n'est pas étonnant que les cellules sénescentes soient capables de recruter et d'activer les cellules du système immunitaire, qu'elles proviennent de l'immunité innée ou adaptative. Le rôle physiologique de cette attraction immunitaire va être l'élimination des cellules sénescentes et/ou celles exprimant des oncogènes qui sont entrées en sénescence via l'*Oncogene-Induced Senescence* (Campisi, 2013). Parmi les cellules recrutées, on retrouve des lymphocytes *Natural Killer* (NK), monocytes/macrophages, lymphocytes B et T, cellules dendritiques et neutrophiles (Sagiv and Krizhanovsky, 2013). Cette élimination, appelée clairance immunitaire (*immune clairance*) sera discutée plus en détail dans la partie III-b.

Le recrutement des cellules immunitaire n'est pas la seule modalité d'action du SASP. Il a été mis en évidence que le SASP est nécessaire et suffisant pour établir et maintenir l'état sénescent, en particulier la protéine PAI-1 (Kortlever, Higgins and Bernards, 2006). Les molécules sécrétées coopèrent avec le processus de sénescence « intracellulaire » et participent, par boucle de rétrocontrôle, à l'atténuation des voies de prolifération cellulaire. Par exemple, PAI-1 est capable d'inhiber la voie faisant intervenir PI3K, les IGFBPs, les voies MAP Kinases.

Ainsi, le phénotype sécrétoire est l'acteur « extracellulaire » de la sénescence. Par action auto/paracrine, il est capable de maintenir l'état sénescent mais également d'induire la sénescence des cellules voisines. De manière physiologique, les cellules sénescentes alertent le système immunitaire et participent à leur propre élimination. De par sa composition, le SASP peut moduler le microenvironnement pouvant conduire à des modifications fonctionnelles du tissu. Sa nature extrêmement plastique fait du SASP le responsable des différentes fonctions que possèdent les cellules sénescentes, qu'elles soient physiologiques ou non. Cette signature moléculaire pro-inflammatoire, si elle est mal régulée, peut avoir de graves conséquences qui peuvent être délétères pour le tissu. Nous détaillerons ces phénomènes dans la partie *Aspects physiologiques et physiopathologiques de la sénescence*.

f. Stress oxydant : rôles des *Reactive Oxygen Species* et dysfonction mitochondriale

Comme nous l'avions indiqué plus haut, les ROS, qu'ils soient endogènes ou exogènes, sont capables d'induire la sénescence. À de faibles concentrations, les ROS jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus cellulaires, comme la prolifération. La principale source de ROS intracellulaire est issue de la chaîne de transport des électrons au niveau mitochondrial. Au fur et à mesure de leurs divisions, une augmentation de la concentration en ROS est observée dans les cellules en culture (Kuilman *et al.*, 2010). Le rôle des ROS dans la sénescence n'est pas clairement établi, mais une hypothèse a été émise stipulant que l'augmentation de la concentration en radicaux libres résulte de l'accumulation des altérations cellulaires au cours du temps. Cette augmentation serait induite par une dérégulation de la fonction mitochondriale, plus particulièrement de la chaîne respiratoire. Des études ont montré une dérégulation des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire au cours de la sénescence. Récemment, *Lafargue et al* ont montré que l'inactivation du complexe II participe à la production d'anions superoxyde au cours de la sénescence endothéliale radio-

induite (Lafargue *et al.*, 2017). L'augmentation des ROS intracellulaires participerait ainsi au maintien du phénotype sénescent en générant davantage de dommages cellulaires.

En 2012, *Lawless et al* propose une hypothèse alternative quant au rôle des ROS. Selon les auteurs, l'augmentation de la concentration en radicaux libres est un évènement stochastique, contrôlé et régulé par les voies de signalisations faisant intervenir Ras, p53, p21 et/ou p16 (Lawless *et al.*, 2012). Toujours selon *Lawless*, les ROS seraient dans ce cas non-génotoxiques, ils joueraient le rôle de médiateurs et seraient indispensables à l'acquisition et au maintien du phénotype sénescent (Lawless *et al.*, 2012).

Pendant longtemps, la communauté scientifique s'est interrogée sur l'aspect causal ou conséquentiel de la génération de ROS. Comme nous venons de l'évoquer, la surproduction de ROS provient essentiellement d'une dysfonction mitochondriale, considérée comme une marque essentielle de la sénescence cellulaire (Korolchuk *et al.*, 2017). Il est aujourd'hui bien connu que l'augmentation de la taille des cellules sénescentes est également accompagnée d'une augmentation de la masse des organites, dont celle des mitochondries. L'augmentation de la masse mitochondriale est corrélée à une diminution du potentiel de la membrane de celle-ci (Korolchuk *et al.*, 2017). Le potentiel de membrane mitochondrial joue un rôle critique dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Une diminution de ce potentiel électrique entraîne une baisse d'activité de la chaîne respiratoire, conduisant à une augmentation de la production en ROS et une baisse de la production d'ATP (Adénosine Triphosphate). Pour compenser, la consommation en dioxygène par la cellule est accrue et la production d'ATP est relayée au niveau de la glycolyse (Korolchuk *et al.*, 2017). Ainsi, la dysfonction mitochondriale induite par la sénescence altère en profondeur le métabolisme bioénergétique de la cellule.

Au-delà du simple marqueur de sénescence, la dysfonction mitochondriale peut engendrer l'acquisition du phénotype sénescent par la cellule (Wiley *et al.*, 2016). La sénescence induite par dysfonction mitochondriale a récemment été appelée par *Wiley et al* « MiDAS » (Mitochondrial Dysfonction-Associated Senescence) (Wiley *et al.*, 2016). Les auteurs ont montré, par déplétion de l'ADN mitochondrial (mtDNA) *in vitro*, que l'acquisition d'un phénotype sénescent diffère de celui acquis par stress génotoxique. La MiDAS se caractérise en effet par la perte de prolifération, l'acquisition d'un SASP qui ne dépend pas de la voie de l'IL-1, pauvre en IL-6 et 8 mais riche en IL-10, TNFα et CCL27. Enfin, de manière étonnante les capacités prolifératives des cellules peuvent être restituées en présence de pyruvate (Wiley *et al.*, 2016). D'un point de vue phénotypique ces cellules ne sont plus sénescentes, elles continuent néanmoins de produire un sécrétome, cette fois

dépendant de la voie de l'IL-1. Cette étude décrit pour la première fois un nouveau type de sénescence d'une remarquable plasticité et démontre le lien entre dysfonction mitochondriale et pathologies liées à l'âge.

g. Activité β-galactosidase associée à la sénescence

Enfin, les cellules sénescentes sont associées à une augmentation de l'activité de β-galactosidase (SA-β-gal, *Senescence-associated β-galactosidase*) (Dimri *et al.*, 1995). La β-gal est une enzyme lysosomale qui clive les β-galactosides en sucres simples. L'activité β-gal se manifeste par une augmentation du compartiment lysosomal des cellules sénescentes (vacuolisation) (Lee *et al.*, 2006). Les conséquences de ce phénomène ne sont pas encore élucidées et l'expression de l'enzyme ne semble pas être indispensable à l'induction de la sénescence. Néanmoins, la SA-β-gal reste le marqueur le plus utilisé pour étudier la sénescence cellulaire, du fait de sa détection aisée (Figure 16).

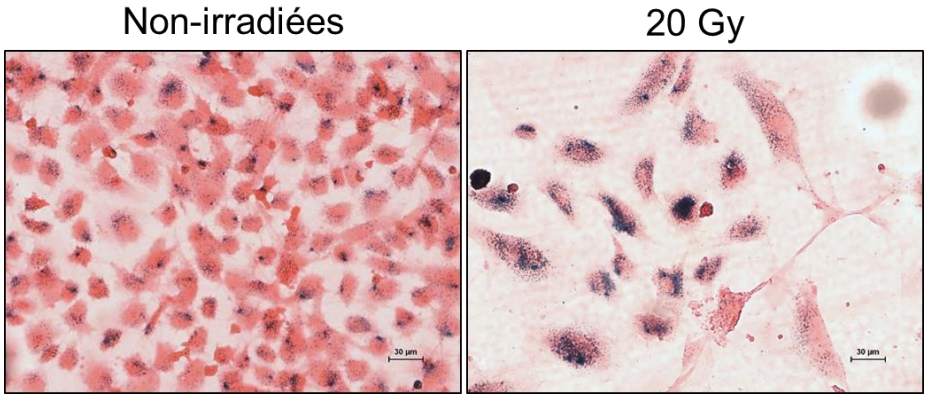


Figure 16. Marquage au X-gal de cellules endothéliales irradiées.
Des cellules endothéliales de veine ombilicale (HUVEC) ont été marquées au X-gal (substrat chromogène de la β-galactosidase), sept jours après, ou non, irradiation à 20 Gy (4 MV - 2,5 $Gy.min^{-1}$). La coloration par le X-gal révèle un marquage bleu ponctiforme caractéristique. Contre-coloration à l'éosine. Prises de vue réalisées au laboratoire, grossissement x10.

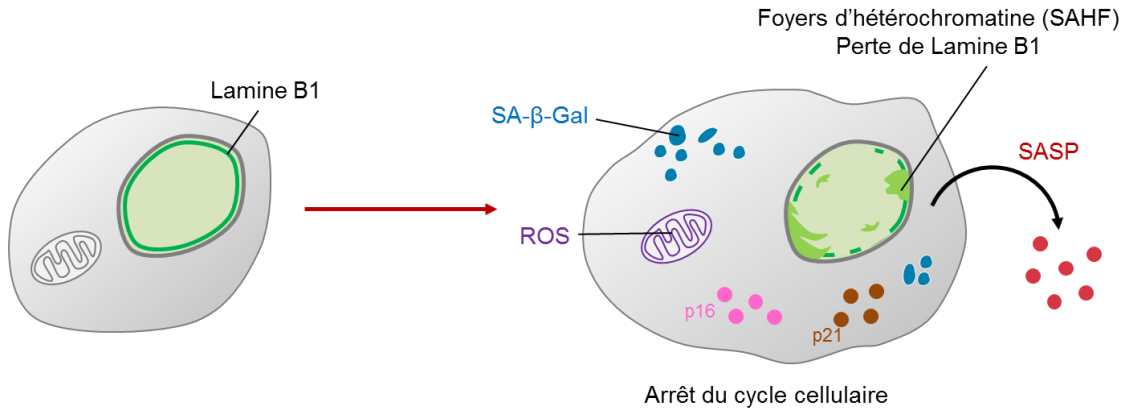


Figure 17. Principaux marqueurs de sénescence cellulaire.
D'après Baker et al, *The Journal of Clinical Investigation* (2018)

Pour résumer, les cellules sénescentes présentent une hypertrophie cellulaire, caractérisée par un faible ratio noyau/cytoplasme, une vacuolisation importante, cause directe de l'augmentation de l'activité β-galactosidase. Elles sont généralement arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire et surexpriment les CDKI p21 et p16. Ces protéines permettent l'hypophosphorylation de pRB qui altère le profil transcriptomique des cellules, responsable des modifications phénotypiques. Parmi elles, l'acquisition du SASP est la plus importante d'un point de vue fonctionnel. En altérant le microenvironnement, le phénotype sécrétoire conduit à des modifications tissulaires remarquables pouvant avoir de graves conséquences fonctionnelles.

II. Les différents types de sénescence cellulaire

De nombreux stimuli permettent l'entrée en sénescence : le raccourcissement ou la déstabilisation des télomères, les stress génotoxiques et oxydatifs, ou encore l'activation d'oncogènes. Ainsi, on distingue trois grandes catégories de sénescence cellulaire : la sénescence réplicative, la sénescence induite par oncogène et la sénescence prématurée induite par le stress.

a. La sénescence réplicative

- *Découverte*

La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois par Leonard Hayflick et Paul Moorhead en 1961. Ils observèrent une prolifération limitée de fibroblastes en culture qui présentaient, en moyenne, cinquante doublements de population avant de dégénérer (Hayflick and Moorhead, 1961). Le terme de sénescence réplicative est alors employé. Après plusieurs tests, ils en déduisent que le nombre limite de divisions cellulaires, appelé « limite de Hayflick », ne dépend ni de la lignée cellulaire, ni de signaux externes, tel que la congélation ou les modifications des conditions de culture (Hayflick, 1965). Cette découverte a permis l'avènement de l'hypothèse de « l'horloge mitotique » pour expliquer le vieillissement.

En 1971, le biologiste russe Alekseï Olovnikov proposa une théorie reliant la limite proliférative au raccourcissement des télomères. D'après Olovnikov, les cellules perdraient une partie de leur ADN télomérique après chaque cycle de réplication jusqu'à une taille critique qui déclencherait un signal d'arrêt de la prolifération cellulaire (Olovnikov, 1996). La prédiction d'Olovnikov s'est révélée exacte et sa théorie a été confirmée en 1985, via la découverte de la télomérase, par les américains, Elizabeth Blackburn, Carol Greider et Jack Szostak, qui leur valut le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2009 (Greider and Blackburn, 1985).

- *Télomères et télomérase*

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques localisés aux extrémités des chromosomes. Chez l'Homme adulte, la taille des télomères est comprise entre 3 et 15 kilobases (kb) et sont composés d'une séquence de six nucléotides répétés 5'-TTAGGG-3'. Les télomères forment une structure tridimensionnelle appelée boucle T (*Telomeric*) : la molécule d'ADN se replie sur elle-même et l'extrémité 3' télomérique simple-brin s'insère

dans une région double-brin. Les extrémités libres simple-brin sont alors masquées (Figure 18). Cette conformation est induite et stabilisée par un complexe protéique appelé *shelterin* ou télosome. Le télosome est composé de six sous-unités : TRF1 (*TTAGGG Repeats Factor 1*), TRF2 (*TTAGGG Repeats Factor 2*), TIN2 (*TRF1 Interacting Nuclear factor 2*), PTOP (*POT1 and TIN2 Organizing Protein*), POT1 (*Protection Of Telomeres 1*) et RAP1 (*transcription Repressor/Activator Protein 1*) (Dreesen, Li and Cross, 2007; Patel *et al.*, 2015).

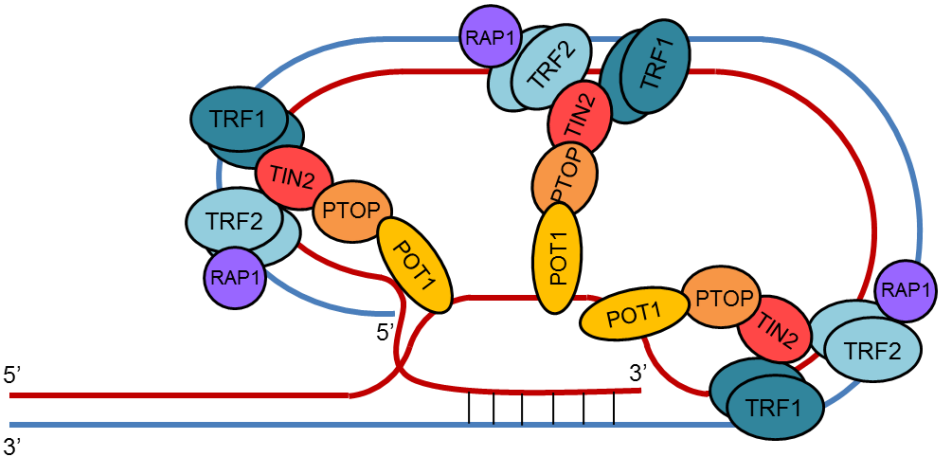


Figure 18. Le télosome.
Les protéines TRF1 et TRF2 reconnaissent les séquences répétées TTAGGG et se lient à l'ADN sous forme d'homodimères. TIN2 et PTOP se lient à TRF1-2 et créent un pont liant les deux homodimères. PTOP recrute la protéine POT1 qui se fixe à l'ADN télomérique simple brin. RAP1 interagit avec TRF2. D'après Dreesen O et al. *Nature Review Microbiology* (2007).

Le principal rôle des télomères est de protéger l'intégrité des chromosomes. Cette protection est liée à la formation de la boucle T qui empêche les fusions chromosomiques d'une part, et la reconnaissance par le DDR (*DNA Damage Response*) d'autre part.

Après chaque division, les télomères sont raccourcis de quelques paires de bases (Harley, Futcher and Greider, 1990). Au cours de la réplication, l'ADN polymérase a besoin d'une amorce ARN pour exercer son activité. En fin de réplication, l'amorce la plus distale est éliminée, laissant une lacune ne pouvant être comblée. Ce phénomène est appelé *End-replication Problem*. Lorsque les télomères sont trop courts, le télosome ne peut se former, l'extrémité simple-brin n'étant plus masquée, elle est reconnue par le DDR. La cellule perçoit ce signal comme une cassure double-brin. Cet évènement est la première étape déclenchant la sénescence réplicative (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003; IJpma, 2003). Il suffit d'un seul télomère trop court pour activer l'entrée en sénescence. À titre d'information, la taille des télomères de cellules sénescentes est d'environ 1,5 kb.

Ce phénomène peut, cependant, être contourné via l'expression de la télomérase. La télomérase est une enzyme qui permet, au cours de la réplication, de conserver la longueur des télomères. Cette enzyme est constituée de deux sous-unités :

- la sous-unité ARN ou Terc, composé d'un ARN de 451 nucléotides qui contient la séquence 3'-CAAUCCCAAUC-5' servant à la synthèse de la répétition télomérique ;
- la sous-unité protéique ou Tert, à activité transcriptase inverse, assure la synthèse de la séquence télomérique en utilisant la sous-unité ARN comme matrice.

Les cellules somatiques n'expriment pas, ou très peu la télomérase. Elle est néanmoins, très exprimée dans les cellules germinales et cancéreuses. L'expression ectopique de TERT réalisée dans des fibroblastes primaires empêche le raccourcissement des télomères et limite la sénescence réplicative (Bodnar *et al.*, 1998). Des observations similaires ont été faite par *Yang et al* sur des cellules endothéliales de gros vaisseaux mais aussi issus de la micro-circulation (Yang *et al.*, 1999). Pour autant, la télomérase ne prévient pas de la sénescence induite (Chen *et al.*, 2001).

- *Signal d'entrée en sénescence*

À ce jour, le mécanisme d'entrée en sénescence réplicative reste encore obscur, il est cependant admis les protéines télomériques, en particulier TRF2, ne peuvent se regrouper pour former le télosome lorsque les télomères sont trop courts. Ces observations ont été réalisées grâce à l'utilisation d'une forme mutée de TRF2, appelée TRF2$^{\Delta B\Delta M}$, privée de son domaine d'interaction avec l'ADN et de ses partenaires protéiques mais conservant son domaine d'homodimérisation (van Steensel, Smogorzewska and de Lange, 1998). Les auteurs ont observé un démasquage des télomères, conduisant à une rapide induction de la sénescence lorsque TRF2$^{\Delta B\Delta M}$ est exprimée (van Steensel, Smogorzewska and de Lange, 1998; Ben-Porath and Weinberg, 2004). TRF2$^{\Delta B\Delta M}$ entraîne également la formation de fusions télomériques qui est le reflet de l'activation des voies de réparation, notamment par recombinaison homologue et NHEJ (van Steensel, Smogorzewska and de Lange, 1998).

Lorsqu'ils ne sont plus protégés, des protéines de la voie DDR s'accumulent au niveau des télomères et colocalisent pour former des TIFs (*Telomeres dysfunction induced foci*) (Takai, Smogorzewska and de Lange, 2003).

- *Activation du DNA Damage Response, de p53 et arrêt du cycle*

La signalisation des dommages à l'ADN est composée de deux grandes voies : la voie ATM-CHK2 et ATR-CHK1 (Tableau 1). *Gire et al* démontrèrent *in vitro* que l'inhibition de CHK2 retarde l'entrée en sénescence réplicative de fibroblastes humains (Gire *et al.*, 2004). De plus, les travaux réalisés sur des fibroblastes sénescents ont montré que des micro-injections de plasmides ATM, ATR, CHK1 et CHK2 inactivés, restaurent la capacité de prolifération pour 17% des cellules (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003). Ces données indiquent que l'activation permanente du DDR est nécessaire pour le maintien des cellules en sénescence. *In fine*, l'activation du DDR va aboutir à la stabilisation et l'activation de la protéine p53, effecteur final de ces voies de signalisation (Figure 19).

La protéine p53, est un facteur de transcription régulant de multiples fonctions telles que, le cycle cellulaire et la sénescence, l'autophagie ou l'apoptose (Brady and Attardi, 2010). Dans le cas de la sénescence, l'implication de p53 a été établie par l'utilisation de fibroblastes infectés par les virus simien 40 (SV40) et le papillomavirus humain (HPV). L'antigène grand T du SV40 et la protéine E6 du papillomavirus inactivent les fonctions transactivatrices et/ou entraînent la dégradation de p53. Les fibroblastes infectés échappaient à la sénescence (Shay, Pereira-Smith and Wright, 1991).

La stabilisation de p53 et son activation, notamment par les kinases CHK permettra, entre autres, la surexpression d'inhibiteurs du cycle cellulaire (CDKI), en particulier celle de p21 (Figure 19) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

- *Remodelage chromatinien et maintien du phénotype sénescent*

Le maintien du phénotype sénescent nécessite la répression permanente d'E2F. Comme nous l'avions déjà évoqué, la séquestration d'E2F est réalisée par pRB. Pour maintenir une répression génique durable, pRB interagit avec les facteurs de remodelage chromatinien SWI/SNF qui empêchent, par formation d'hétérochromatine, l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'avancée dans le cycle. Il est intéressant de noter que ces marques de répression coïncident avec les foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) (Kilbey *et al.*, 2008).

Les SAHF jouent un rôle essentiel dans le maintien du phénotype sénescent. Leur déstabilisation, par délétion des protéines impliquées dans le remodelage chromatinien, comme ING1 (*Inhibitor of Growth 1*), empêche l'acquisition d'un phénotype totalement sénescent (Abad *et al.*, 2007; Kilbey *et al.*, 2008)

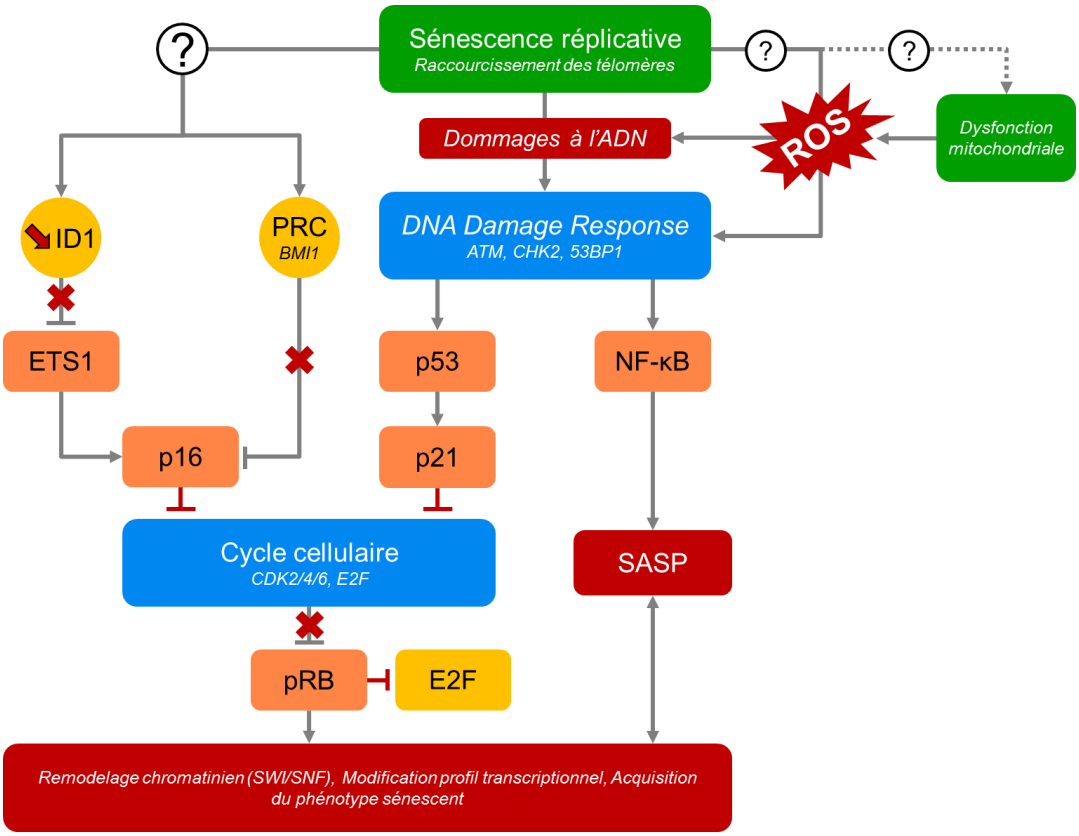


Figure 19. Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans la sénescence réplicative.
Le raccourcissement des télomères est perçu par la cellule comme des dommages au niveau de l'ADN. Ces évènements enclenchent la voie du *DNA Damage Response* (DDR) à travers l'activation d'ATM. Par une cascade de signalisation, p53 est ensuite activé et induit la transcription de p21, inhibiteur du cycle cellulaire. Les mécanismes impliqués dans l'activation de p16 au cours de la sénescence réplicative ne sont pas clairement établis mais il semblerait qu'une activation d'ID1 et de BMI1 soient nécessaire pour que celle-ci ait lieu. Une fois inhibées, les *Cyclin-Dependent Kinases* (CDK) ne peuvent plus maintenir pRb dans un état inactif. pRB séquestre E2F, empêchant ainsi l'expression de ses gènes-cibles, et induit la formation de *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*. En parallèle, l'activation du DDR induit l'acquisition du *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP) via la voie NF-κB. Le SASP renforce le phénotype sénescent et modifie le microenvironnement cellulaire. Une augmentation en ROS est observée dans la cellule sénescente. Ces radicaux libres participeraient à l'acquisition du phénotype sénescent en générant davantage de dommages et/ou en jouant le rôle de médiateurs. Bien que l'origine de ces ROS semble être connue (mitochondrie), les aspects moléculaires conduisant à leur synthèse est encore à déterminer.

La sénescence réplicative est un phénomène physiologique, c'est une réponse aux dommages à l'ADN, dépendante des télomères, faisant intervenir les différents acteurs du *DNA Damage Response* qui aboutissent à l'activation de la protéine p53. Cette dernière empêche l'avancée du cycle cellulaire via la protéine p21, signant l'acquisition d'un phénotype pré-sénescent. Le maintien de cet arrêt conduit à des modifications du programme transcriptionnel et à des remodelages chromatiniens, à travers la stabilisation de pRB, effecteur final dans l'acquisition du phénotype sénescent.

b. La sénescence induite par oncogène

La sénescence induite par oncogène (OIS) est un mécanisme suppresseur de tumeurs bloquant la prolifération cellulaire via l'activation constitutive d'oncogènes ou la perte de fonction de suppresseurs de tumeurs. L'OIS a été observée pour la première fois sur des fibroblastes humains exprimant la forme oncogénique de RAS (RAS^{G12V}) (Serrano *et al.*, 1997). Ce phénotype peut être induit par gain de fonction d'autres oncogènes comme $BRAF^{V600E}$, AKT, E2F1/3, cycline E, MOS (*Moloney murine Sarcoma viral oncogene homolog*) et CDC6 (*Cell Division Cycle 6*), mais également par perte de fonction de suppresseurs de tumeurs comme PTEN ou NF1 (*Neurofibromatosis type 1*) (Courtois-Cox, Jones and Cichowski, 2008).

L'OIS est l'un des premiers systèmes de défense qui empêche la tumorigenèse. Elle intervient dans les phases précoces du développement tumoral en empêchant la formation de lésions pré-malignes. Ces observations ont été faites *in vitro*, mais également *in vivo* dans lequel l'OIS limite le développement de sarcomes et de carcinomes hépatocellulaires (Xue *et al.*, 2007; Courtois-Cox, Jones and Cichowski, 2008).

Des études ont tenté d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de la sénescence induite par oncogènes. Aujourd'hui, il est démontré que l'induction de ce type de sénescence passe par différents mécanismes aboutissant à une même finalité : la stabilisation et l'activation de p53 et de pRb (Courtois-Cox, Jones and Cichowski, 2008). Les mécanismes impliqués ne sont pas exclusifs, certains d'entre eux peuvent coopérer, tandis que d'autres peuvent être spécifiques d'un type cellulaire donné.

- *Stress réplicatif et dommages à l'ADN*

Après une brève période d'hyper-prolifération, la dérégulation d'oncogènes, ou de suppresseurs de tumeurs, peut induire la sénescence. La majorité des cellules se retrouvent alors en phase S du cycle cellulaire. L'acquisition de ce phénotype dépend de différents paramètres, tels que le type cellulaire, le microenvironnement et l'intensité du signal de la protéine dérégulée. L'activation constitutive de Ras ou de la cycline E est connue pour être une source importante de stress réplicatif (Zeman and Cimprich, 2014). Le stress réplicatif est défini comme un ralentissement ou un blocage de la fourche de réplication en réponse à des stimuli internes et/ou externes. Ce blocage peut conduire à la déstabilisation de la fourche, à une mauvaise incorporation des nucléotides ou à une « collision » avec la machinerie transcriptionnelle. Ces phénomènes sont sources de dommages à l'ADN, notamment de cassures double-brin (Suram *et al.*, 2012). Ceux-ci conduisent à une activation, en phase S, du

DDR qui joue un rôle extrêmement important dans la mise en place de l'OIS. Les travaux de *Di Micco et al* ont permis d'identifier le stress réplicatif comme inducteur de l'OIS et d'élucider l'implication du DDR dans le maintien de ce phénotype. Les auteurs ont observé la formation de tumeurs après injection chez la souris de fibroblastes exprimant Ras activé mais invalidé pour CHK2 ($CHK2^{-/-}$ Ras). Par contre, les animaux injectés avec des fibroblastes exprimant CHK2 ($CHK2^{+/+}$ Ras) ne développent pas de tumeurs. Les fibroblastes $CHK2^{+/+}$ RAS sont plus enclins à entrer en sénescence lorsque le DDR est fonctionnel (Di Micco *et al.*, 2006).

Ainsi, l'activation d'oncogènes induit l'OIS via le DDR qui va aboutir à l'activation de p53 et la surexpression des CDKI, p21 et/ou p16. Ces derniers vont ensuite stabiliser la protéine pRB dans une forme hypophosphorylée active et permettre l'acquisition du phénotype sénescent.

Finalement, les mécanismes inducteurs de l'OIS sont assez similaires à ceux retrouvés dans la sénescence réplicative. Ces deux types de sénescence ont souvent été considérés comme similaires (Suram *et al.*, 2012). Cependant, d'autres paramètres entrent en jeu dans l'OIS, en effet, l'activation constitutive d'oncogènes dérégule la fonction de nombreuses protéines effectrices. On retrouve notamment des dérégulations au niveau de la production de ROS et des modifications du profil d'expression génique de la cellule.

- *Conséquences de l'activation de Ras*

Nous discuterons dans cette partie uniquement des modifications induites par l'expression de Ras^{G12V}. Étant la plus étudiée, elle a permis la compréhension de nombreux mécanismes moléculaires impliqués dans l'OIS. L'activation constitutive de Ras est accompagnée par l'activation de ses cibles. Parmi elles, on retrouve la protéine RAC1 (*RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1*). RAC1 est une RHO GTPase impliquée dans la modulation du cytosquelette, la régulation des ROS, du cycle cellulaire, et de la prolifération (Kilbey *et al.*, 2008; Ogrunc *et al.*, 2014). Cette protéine interagit avec Ras et son activité est directement liée à cette dernière. L'augmentation de la concentration en ROS intracellulaire, observée au cours de l'OIS, semble être dépendante de l'activation RAC1. En effet, l'inhibition de RAC1 empêche la génération de ROS et l'activation du DDR (Ogrunc *et al.*, 2014). Les travaux d'*Ogrunc et al* ont identifiés la famille NOX (*NADPH Oxidase*), comme enzymes impliquées dans la production des ROS au cours de l'OIS, en particulier le membre NOX4. Cette production de ROS pourrait, de manière directe, générer davantage de dommages à l'ADN et accélérer le processus sénescent. Pourtant l'étude menée par *Ogrunc*

suggère une action indirecte de ces radicaux libres, ils participeraient plutôt au phénomène d'hyper-prolifération (Ogrunc *et al.*, 2014). Ces données sont en accord avec l'hypothèse formulée précédemment par *Lawless*.

Du fait de la dérégulation de Ras, d'autres voies de signalisation vont être impactées, notamment les voies Raf/ERK/MEK, p38 MAPK et PI3K/AKT. La protéine Ras contrôle directement la voie Raf/ERK/MEK et les premières études sur l'OIS indiquaient que l'activation de cette voie conduit, de manière directe, à l'activation de p16. Aujourd'hui, il a été démontré qu'une autre voie, en aval de celle-ci, contrôle l'expression de p16 : la voie p38 MAPK (Figure 20) (Kilbey *et al.*, 2008). L'activation de la voie p38 MAPK est nécessaire à l'acquisition du phénotype sénescent. Cette voie est activée en réponse à un stress et était surtout connue pour son implication dans l'inflammation. Aujourd'hui, elle est considérée comme un acteur majeur de la sénescence.

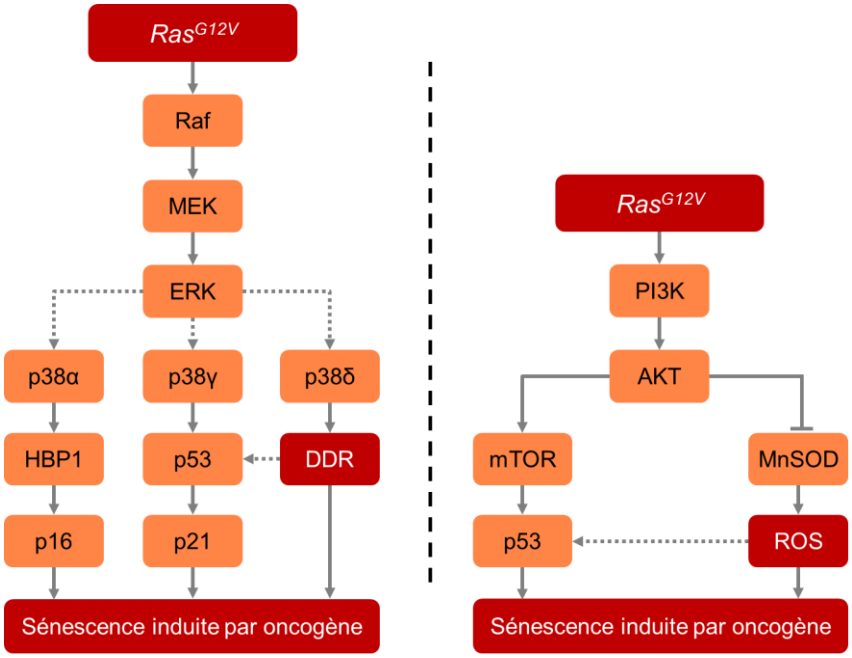


Figure 20. Principales voies de signalisation impliquées dans l'induction de la sénescence induite par oncogène.
L'expression de RasG12V conduit à l'activation de la voie Raf/MEK/ERK. Celle-ci contrôle la voie p38 MAPK qui active les effecteurs de la sénescence : p53, p21 et p16. L'iso-forme p38α contrôle, de manière indirecte, l'expression de p16 par activation de HBP1 (*HMG-Box transcription factor 1*). HBP1 est un répresseur transcriptionnel et jouerait le rôle d'inhibiteur d'E2F. Ras peut également activer la voie PI3K/AKT/mTOR qui aboutit à la stabilisation de p53. D'après Xu Y et al. *Trends in Biochemical Sciences* (2014)

Très schématiquement, la voie p38 MAPK est composé de trois effecteurs, iso-formes de p38 : p38α, p38γ et p38δ. Ces effecteurs jouent différents rôles dans l'OIS. L'iso-forme p38α induit la transcription de p16 par l'intermédiaire de HBP1 (*HMG-Box transcription factor 1*), l'iso-forme γ est capable d'activer p53 et p38δ participe à l'activation du DDR. À noter que

cette voie peut aussi bien être activée par les ROS (Xu *et al.*, 2014). L'induction des voies Raf et p38 MAPK est absolument primordiale dans l'induction de la sénescence.

Une autre voie de signalisation, particulièrement étudiée, est impliquée dans l'induction de l'OIS : la voie PI3K/AKT/mTOR (Figure 20). L'activation de cette voie par Ras conduit à la formation de ROS par inhibition de la *Manganese Superoxide Dismutase* (MnSOD) et à l'activation de p53 (Xu *et al.*, 2014).

Enfin, l'induction de Ras est également associée à l'induction d'un *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP) au cours de l'OIS. Le SASP va être induit par activation permanente du DDR, comme pour la sénescence réplicative. La voie p38 MAPK peut également permettre l'induction du SASP par activation de NF-κB (Figure 21). Les molécules généralement sécrétées sont les interleukines 6 et 8, les IGFBPs et PAI-1 (Dimauro and David, 2010).

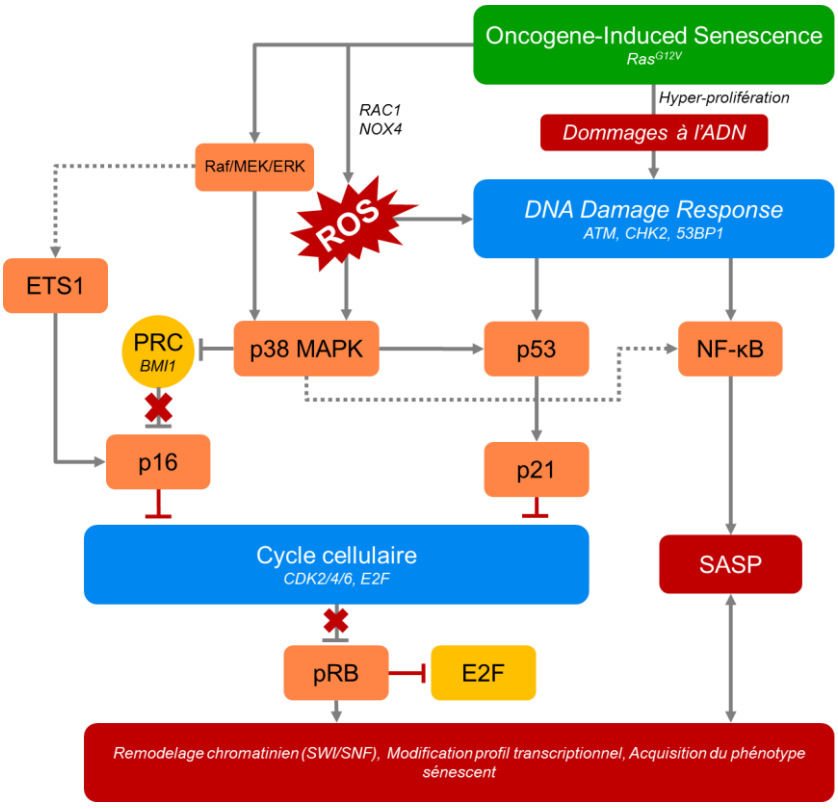


Figure 21. Représentation schématique des voies de signalisation impliquées dans *l'Oncogene-Induced Senescence* (OIS).
L'activation de Ras conduit à une brève période d'hyper-prolifération. La sollicitation permanente de la machinerie de réplication conduit à des dommages à l'ADN, dommages reconnus par le DNA Damage Response qui aboutit *in fine* à l'acquisition du phénotype sénescent. La dérégulation de Ras induit l'activation de la voie p38 MAPK par l'intermédiaire de la voie Raf. p38 est capable d'induire l'activation de p53, NF-κB et l'expression de p16. La voie Raf MAPK peut également agir sur le facteur de transcription ETS1 (*Avian Erythroblastosis virus E26 homolog-1*) L'augmentation des ROS (*Reactive Oxygen Species*) serait induite par la NADPH Oxydase NOX4, elle-même contrôlée par RAC1 (*Ras-related C3 botulinum tixon substrate 1*).

Différents acteurs sont impliqués dans l'induction de la sénescence induite par oncogènes : une hyper-prolifération conduisant à un stress réplicatif et activant le *DNA Damage Response* ; une activation de voies signalisations qui aboutissent à l'acquisition des marques de sénescence. Bien que ces phénomènes participent à l'activation d'effecteurs communs, ils restent néanmoins nécessaires et suffisants pour induire l'OIS.

c. La sénescence prématurée induite par le stress

L'exposition des cellules à des niveaux sub-létaux de stress, tels que les ultra-violets, le peroxyde d'hydrogène et autres stress oxydatifs, les chimiques ou les rayonnements ionisants, peut conduire à la sénescence cellulaire. Ce type de sénescence est appelé Sénescence Prématurée Induite par le Stress ou SIPS (*Stress-Induced Premature Senescence*). De nombreux types cellulaires entrent en sénescence en réponse à des stimuli externes (cellules épithéliales, endothéliales, fibroblastes, mélanocytes…). La grande différence entre la sénescence réplicative et la SIPS réside dans le fait que la sénescence réplicative intervient de manière programmée, elle est déclenchée à un instant précis, lorsque que les télomères sont trop courts, tandis que la SIPS est purement une réponse à un stress (Suzuki and Boothman, 2008).Dans cette partie, nous discuterons essentiellement de la sénescence radio-induite (RIS, *Radiation-Induced Senescence*) qui nous intéresse plus particulièrement dans ce travail de thèse.

Les rayonnements ionisants induisent l'acquisition du phénotype sénescent à travers l'activation du *DNA Damage Response*. L'activation de ces voies de signalisation peut directement résulter des dommages de la molécule d'ADN, générés par le passage des rayons, ou par l'action d'espèces réactives de l'oxygène issues de la radiolyse de l'eau et de la dysfonction mitochondriale radio-induite (Korolchuk *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018).

- *Dérivés Réactifs de l'Oxygène*

Suite à l'exposition aux rayonnements ionisants, le métabolisme mitochondrial se retrouve déséquilibré, les fonctions mitochondriales sont diminuées tandis que la production de ROS est augmentée. Cette augmentation de ROS peut induire la sénescence *in vitro* et *in vivo*. L'exposition de fibroblastes en culture à de fortes concentrations de ROS, notamment de H_2O_2, est un modèle bien connu d'induction de la sénescence. *In vivo*, l'irradiation corps entier de souris a montré que la sénescence des progéniteurs hématopoïétiques est attribuée à l'augmentation des ROS. Ce phénotype se retrouve atténué lorsque les animaux sont traités avec des antioxydants (Shao *et al.*, 2014). Au niveau signalisation, la production de ROS est capable d'altérer certaines voies de signalisation. Il a été montré que les ROS activent la voie AKT connue pour être impliquée dans l'acquisition du phénotype sénescent, notamment des cellules endothéliales (Yentrapalli *et al.*, 2013). La génération radio-induite des ROS entraîne la cellule dans un cercle vicieux en potentialisant le phénotype sénescent et en multipliant les dommages à l'ADN.

- *Dommages à l'ADN*

Au niveau de la molécule d'ADN de cellules irradiées, on retrouve la formation de foci visibles microscopiquement appelés IRIF (*Ionizing Radiation Induced Foci*). Ces foci sont caractérisés par la présence de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γH2AX) mais également des protéines impliqués dans la reconnaissance de ces dommages, tels que 53BP1 et ATM (Vaurijoux *et al.*, 2017). La plupart de ces foci sont transitoires et sont réparés dans les vingt-quatre heures qui suivent l'exposition (Li *et al.*, 2018). Certains d'entre eux peuvent être persistants et semblent être liés à des cassures double-brins irréparables (Vávrová and Rezáčová, 2011). Les foci persistants peuvent être utilisés comme marqueurs de sénescence radio-induite. Ces IRIF activent le DDR, la voie p53-p21 et initient l'acquisition du SASP (Figure 22) (Li *et al.*, 2018).

- *Atteintes du cycle cellulaire*

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les rayonnements ionisants induisent des cassures double-brin au niveau de l'ADN. La stabilisation et l'accumulation de p53, via le DDR, se font dans les trente premières minutes qui suivent l'irradiation (Suzuki and Boothman, 2008). Lors d'un dommage « classique » à l'ADN, les niveaux de p53 reviennent à leur état basal dans les six heures qui suivent le stimulus. Au cours de la sénescence radio-induite, l'activation, *in vitro*, de p53 peut durer plus de dix jours après exposition. L'expression de p16 est, quant à elle, observée après l'activation de p53, environ cinq jours après irradiation (Suzuki and Boothman, 2008).

Contrairement à la sénescence réplicative, où les cellules sont arrêtées en phase G1, les cellules irradiées par de fortes doses (6 – 20 Gy) peuvent entrer en sénescence via la phase G2 du cycle cellulaire (Li *et al.*, 2018). Initialement, l'idée que des cellules sénescentes pouvaient être arrêtées en G2 provenait du fait que la protéine p21 est capable de réguler le checkpoint G2/M. L'arrêt en phase G2 a été démontrée à l'aide de fibroblastes exposés à un inhibiteur de la topoisomérase II, l'ICRF-193. L'exposition prolongée de ces cellules à cet inhibiteur conduit à l'arrêt irréversible du cycle via la voie p53-p21 et l'accumulation de la forme hypophosphorylée de pRB (Gire and Dulic, 2015). D'après la baisse d'expression des cyclines A et B1, les auteurs ont conclu que les fibroblastes sont bien arrêtés en phase G2, puisque ces cyclines sont exprimées en phase G2/M (Gire and Dulic, 2015). Des résultats similaires ont été obtenus sur des cellules cancéreuses après exposition à des rayonnements γ ou des composés génotoxiques (Gire and Dulic, 2015). Les mécanismes sous-jacents sont

identiques à ceux observés lors de l'arrêt du cycle en phase G1 avec l'activation d'ATM, de CHK2 et de l'activation du DDR en aval (Gire and Dulic, 2015; Li *et al.*, 2018).

Les études menées par *Ye et al* montrent que des cellules 92-1, issus de mélanome uvéal, exposées à une irradiation forte dose (10 Gy) sont arrêtées en phase G2, accompagnée de la dérégulation des gènes impliqués dans la transition G2/M (Ye *et al.*, 2013). En mesurant, par expression de gènes et western blot, les acteurs impliqués dans le cycle cellulaire, les auteurs ont observé une progressive diminution d'expression des protéines de la phase G2 telles que la cycline B1 tandis qu'une augmentation d'expression de la cycline D1, impliqué dans la phase G1, a été observée cinq jours après irradiation. De ces observations, les auteurs en conclure que, bien qu'elles soient initialement arrêtées en phase G2, les cellules irradiées finissent par passer en phase G1 en contournant la phase M, puis entrer en sénescence. Les auteurs appellent ce mécanisme « *mitotic slippage* » (Ye *et al.*, 2013).

- *Le Senescence-Associated Secretory Phenotype*

Nous avons vu précédemment que l'acquisition du SASP nécessitait l'activation d'ATM et du DDR et de NF-κB. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de ce phénotype après irradiation sont sensiblement identiques aux types de sénescence précédemment évoqués. Très succinctement, le recrutement d'ATM au niveau des cassures double-brin active NF-κB qui permet l'expression de facteurs pro-inflammatoires IL-1α/β, IL-6, TGFβ, entre autres (Figure 22). Par contre, l'implication de la voie de l'IL-1 comme acteur clé dans la régulation du SASP n'a pas encore été démontrée après une irradiation.

- *Cas de la sénescence endothéliale radio-induite*

Nous résumerons dans cette sous-partie les récentes découvertes dans la caractérisation de la sénescence endothéliale radio-induite.

Igarashi et al ont caractérisé des cellules endothéliales de veine ombilicale humaines (HUVEC) soumises à une irradiation γ de 8 Gy. Les HUVEC irradiées présentent une absence d'incorporation de BrdU (Bromodésoxyuridine), elles présentent donc un arrêt de la prolifération. Les cellules irradiées surexpriment la β-galactosidase associée à la sénescence et perdent leur activité angiogénique (Igarashi *et al.*, 2007). La production de NO est diminuée tandis que la production de ROS et de facteurs inflammatoires est augmentée dans les cellules endothéliales sénescentes induites par l'irradiation (Wang, Boerma and Zhou, 2016). On retrouve également dans ces cellules, une surexpression des molécules d'adhésion ainsi que de la protéine PAI-1 (Wang, Boerma and Zhou, 2016).

La stabilisation de p53 induit l'arrêt dans le cycle, tandis que l'activation de la voie p16 maintient les cellules arrêtées et permet l'acquisition du phénotype sénescent. Bien que cela soit vrai pour la plupart des types cellulaires, en ce qui concerne les cellules endothéliales, l'axe p53-p21 semble jouer un rôle plus important que la voie p16. L'inhibition de la protéine p53 suffit à empêcher la sénescence mais pas l'inhibition de p16 (Wang, Boerma and Zhou, 2016). Dans les cellules endothéliales irradiées, d'autres voies semblent également impliquées dans l'acquisition de la RIS, notamment la voie PI3K/AKT/mTOR. L'activation de la voie PI3K se fait via activation du récepteur à l'IGF en réponse aux rayonnements ionisants et conduit à la stabilisation de p53. Le modèle décrit par *Yentrapalli et al* reprend des mécanismes moléculaires assez similaires quant à l'activation de la PI3K/AKT/mTOR lors d'une exposition chronique à de faibles doses d'irradiation (Yentrapalli *et al.,* 2013). Une autre voie de signalisation a également été identifiée comme jouant un rôle dans l'induction de la RIS, la voie p38 MAPK. Le modèle concernant son activation a été repris de l'OIS et fait intervenir les ROS comme médiateurs moléculaires (Park *et al.*, 2016; Wang, Boerma and Zhou, 2016). Très succinctement, l'exposition de cellules endothéliales à des rayonnements ionisants déstabilise l'équilibre redox de la cellule. L'augmentation de la quantité de ROS intracellulaire issus de la radiolyse de l'eau et/ou de la dysfonction mitochondriale, à travers la dérégulation des NOX, de la chaîne respiratoire et de l'eNOS, participe l'activation de la voie p38 MAPK et induit des dommages au niveau des macromolécules (Wang, Boerma and Zhou, 2016; Lafargue *et al.*, 2017).

Récemment, les travaux menés par *Lafargue et al* ont montré, d'une part, que l'apoptose et la sénescence endothéliale fait intervenir deux voies de signalisation distinctes. Des cellules endothéliales micro-vasculaires de poumons n'entrent pas en apoptose après irradiation lorsqu'elles sont prétraitées par S1P (Sphingosine-1-Phosphate) (Lafargue *et al.,* 2017). Cependant, cet agent n'empêche pas l'acquisition du phénotype sénescent des cellules irradiées. D'autres part, la dysfonction mitochondriale induite par l'irradiation, augmente la production de ROS et fait intervenir le complexe II de la chaîne respiratoire. Ce mécanisme est capable d'induire la sénescence, indépendamment de l'activation de p53 (Lafargue *et al.,* 2017).

Les modifications induites par la sénescence des cellules endothéliales après irradiation participent à la dysfonction endothéliale qui peut avoir des conséquences plus ou moins graves telles que la diminution de la vasculogenèse et de l'angiogenèse, une diminution

de la vasodilatation, une augmentation du risque de thrombose et une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation (Wang, Boerma and Zhou, 2016).

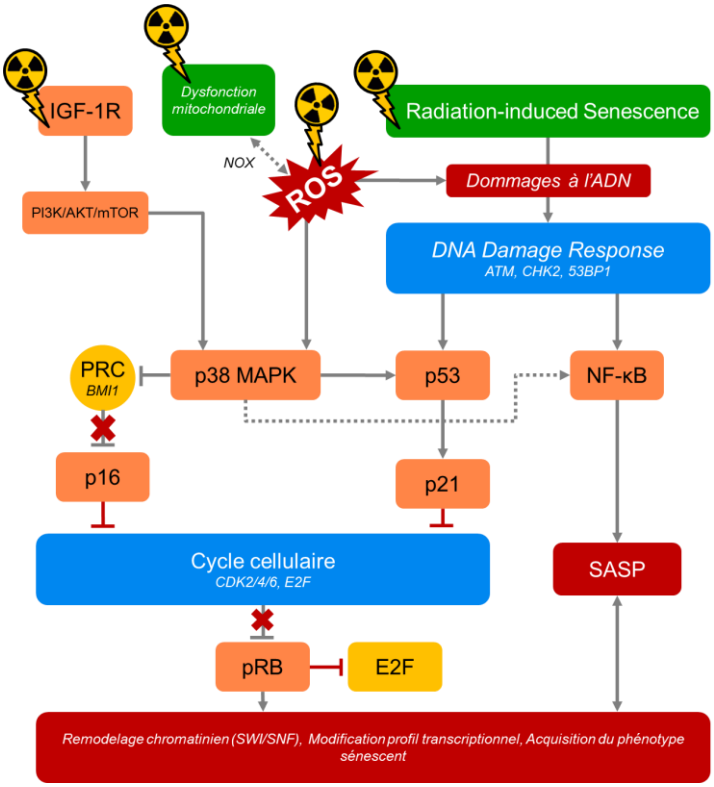


Figure 22. Représentation schématique des principales voies de signalisation impliquées dans la sénescence radio-induite.
Les rayonnements ionisants induisent la sénescence à travers différents mécanismes. Ils provoquent des dommages à l'ADN conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire via l'activation du DDR, la stabilisation de p53 et l'expression de p21. Les rayonnements ionisants génèrent des ROS par radiolyse de l'eau et affectent l'équilibre Redox de la cellule. Les ROS créent davantage de dommages au niveau des macromolécules et participent également à la signalisation cellulaire par activation de la voie p38 MAPK. Comme dans l'OIS, celle-ci aboutit à l'expression de p16 qui maintien les cellules arrêtées.

Finalement, la sénescence radio-induite partage des mécanismes moléculaires assez proches de l'OIS et de la sénescence réplicative (Figure 22). Pour autant, des différences sont notables entre ces trois phénotypes, notamment au niveau du profil transcriptomique des cellules sénescentes et au niveau de la composition de leur sécrétome.

III. Aspects physiologiques et physiopathologiques de la sénescence

Historiquement, la sénescence cellulaire a été considérée comme un artefact de culture *in vitro*. Aujourd'hui, de nombreuses études ont permis de montrer que la sénescence est importante pour le maintien de l'homéostasie tissulaire. La dérégulation de ce phénotype est liée à de nombreuses pathologies, tels que les cancers, le syndrome de Hutchinson-Gilford (progeria), les maladies cardio-vasculaires et toute autre affection liée à l'âge. D'un point de vue physiologique, la sénescence est impliquée dans le développement embryonnaire, le remodelage tissulaire notamment au cours de la cicatrisation et, comme nous l'avions déjà évoqué, il s'agit d'un mécanisme anti-cancer.

a. Rôle dans le développement

La sénescence a pendant longtemps été associée à une réponse aux stress. Il est démontré qu'elle joue un rôle important au niveau physiologique et cela dès les premières périodes de la vie.

L'analyse d'embryons murins a permis d'observer, de manière tout à fait étonnante, la sénescence au cours du développement. Ce phénotype a également été observé chez l'Homme, la caille et le poulet. On retrouve, par exemple, des cellules sénescentes au cours de la formation du tube neural, de la formation des espaces interdigitaux ou au cours de l'involution du mésonéphros (Figure 23) (Storer *et al.*, 2013; Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

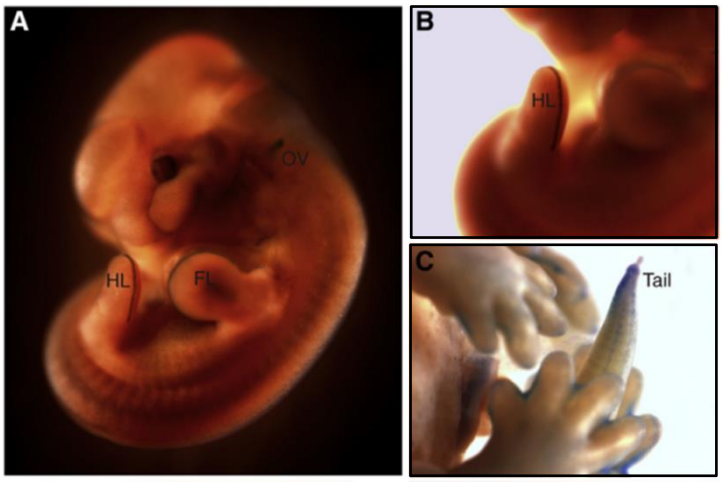


Figure 23. Expression de la Senescence-Associated β-galactosidase dans les tissus embryonnaires.
Embryon de souris marqué pour la β-galactosidase (bleu). A) Embryon de souris à 11,5 jours. B) Patte arrière d'un embryon de souris à 11,5 jours (HL). C) Pattes avant et pointe distale de la queue d'un embryon de souris à 14,5 jours.
OV : Otic Vesicle, HL : Hindlimb, FL : Forelimb. D'après Storer M et al, *Cell* (2013).

La sénescence impliquée dans le développement présente des caractéristiques similaires aux autres types de sénescence, telles que l'expression de la SA-β-Gal, l'absence de prolifération, des marques d'hétérochromatine et la surexpression des inhibiteurs du cycle p21 et p16. Il est intéressant de noter qu'elle n'est pas associée à des dommages à l'ADN et reste différente des types de sénescence décrits plus haut (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence au cours du développement révèlent le rôle essentiel de p21, au-delà de celui de p16 et de p53. On retrouve également au cours de développement du mésonéphros, l'implication des voies TGFβ, WNT, SHH (*Sonic Hedgehog*) ainsi qu'un phénotype sécrétoire similaire au SASP, riche en FGF4 et 8 (*Fibroblast Growth Factor*). Chez l'adulte, la sénescence est impliquée de manière physiologique dans la formation du placenta et la maturation des mégacaryocytes (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

b. Frein à la tumorigenèse

La suppression tumorale exercée par la sénescence résulte de la coopération d'acteurs intracellulaires et extracellulaires. Nous avons discuté en amont des mécanismes impliqués dans l'arrêt du cycle et l'acquisition du phénotype sécrétoire, nous discuterons dans cette partie d'une des fonctions du SASP : la clairance immunitaire (*immune clearance*).

Dans la partie I-e, nous avions évoqué les différents types cellulaires capables d'être recrutés par le SASP, nous nous intéresserons dans cette partie essentiellement à l'action des *Natural Killer* qui a fait l'objet d'une plus grande attention au sein de la communauté scientifique.

Les lymphocytes NK jouent un rôle important en tant qu'effecteurs et régulateurs de l'immunité innée. Deux sous-populations de NK sont retrouvées chez l'Homme, caractérisées par la densité des marqueurs CD56 et CD16 qu'elles expriment. Les NK $CD56^{bright}$ – $CD16^{dim/-}$ sont impliqués dans la sécrétion de cytokines tandis que les NK $CD56^{dim}$ – $CD16^{+}$ possèdent une action cytotoxique. Ces sous-populations se distinguent également par leurs niveaux d'expression des récepteurs de chimiokines, suggérant une différence de recrutement au site d'inflammation (Sagiv and Krizhanovsky, 2013). De nombreuses études ont montré que les cellules sénescentes sont spécifiquement reconnues et éliminées par les cellules NK. Les travaux de *Xue et al* ont été les premiers à décrire ce phénomène. Les auteurs ont observé que la réactivation de p53 d'hépatoblastes transformés induit, d'une part, leur entrée en sénescence et, d'autre part, leur élimination via les cellules NK (Xue *et al.*, 2007). Les

cellules NK sont recrutées par les cellules sénescentes à travers la sécrétion de CCL2 (*Chemokine (C-C) Ligand 2*) (Vicente *et al.*, 2016) et sont reconnus via le récepteur KLRK1, aussi connu sous le nom de NKG2D (*Killer Cell Lectin Like Receptor K1*), surexprimé par les cellules sénescentes. Le recrutement des NK peut être potentialisé par la sécrétion d'IL-15, composant du SASP, capable d'induire la surexpression de NKG2D (Sagiv and Krizhanovsky, 2013). La reconnaissance des cellules sénescentes par les NK s'effectue également à travers la liaison CD58-ICAM-1. L'élimination, par les NK, de leur cellule cible est régulée par deux mécanismes moléculaires distincts : l'exocytose de granules contenant perforine et granzyme ou l'activation de l'apoptose via les récepteurs de mort TRAIL et FAS. Certains types cellulaires sénescents sont connus pour être résistants à l'apoptose. Ainsi, *Sagiv et al* ont montré une surexpression du récepteur-leurre DCR2 (*Decoy Receptor 2*), limitant l'activation de l'apoptose à travers le récepteur TRAIL, dans les cellules fibroblastiques et stellaires hépatiques sénescents (Sagiv *et al.*, 2013). Ils ont déduit de leur étude que les NK privilégient la voie de l'exocytose pour l'élimination de ces types cellulaires sénescents.

Ainsi par la coopération de mécanismes intra- et extracellulaires, l'activation du DDR, l'arrêt du cycle cellulaire, la sécrétion et l'expression de facteurs facilitant le recrutement et la reconnaissance par les cellules immunitaires conduisant à leur élimination, les cellules sénescentes limitent les lésions néoplasiques. De fait, l'ensemble des mécanismes associés fait de ce phénotype un mécanisme suppresseur de tumeurs à part entière.

c. Réparation tissulaire

La sénescence est également capable de promouvoir la réparation tissulaire. Cette fonction a été observée dans deux modèles de blessure au niveau du foie et de la peau.
La cicatrisation est accompagnée d'une augmentation de la fibrose chez des animaux déficients pour p53, p21, p16 ou pRB. Dans un modèle d'induction de la fibrose hépatique chez la souris, l'équipe de *Krizhanovsky* a montré une augmentation de la sévérité des lésions lorsque la sénescence était bloquée. Les cellules stellaires hépatiques sénescentes semblent jouer un rôle bénéfique et protecteur vis-à-vis de la fibrose (Krizhanovsky *et al.*, 2008).

Au niveau de la peau, ce sont les fibroblastes résidents qui acquièrent le phénotype sénescent. Cette réponse va être induite par liaison de CYR61 (*Cystein-Rich, angiogenic inducer 61*), protéine de la matrice extracellulaire, à son récepteur. Cette liaison va engendrer une cascade de signalisation qui aboutit à l'arrêt de la prolifération et à l'expression de gènes

codant pour les protéines composant le SASP. Comme au niveau du foie, le blocage de la sénescence et/ou de CYR61 entraîne une fibrose bien plus importante lors de la guérison (Jun and Lau, 2010; Campisi, 2013). L'équipe de Muñoz-Espin et Serrano propose en 2014 un modèle unifié de la sénescence impliquée dans la réparation tissulaire (Figure 24).

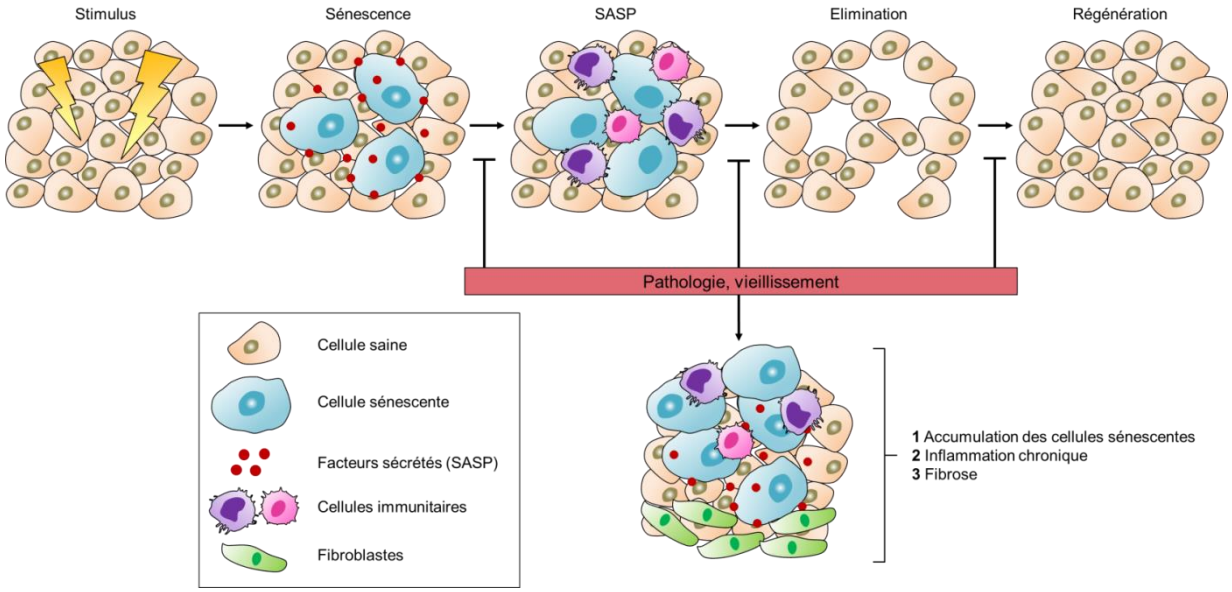


Figure 24. Modèle unifié de la sénescence proposé par Muñoz-Espín et Serrano.
Suite à un stimulus, les cellules sénescentes s'accumulent et recrutent les cellules immunitaires via le Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). Les cellules immunitaires éliminent les cellules sénescentes, puis les progéniteurs régénèrent le tissu. Cette séquence Recrutement – Elimination – Régénération est perturbée lorsque les dommages persistent ou au cours du vieillissement. Les cellules sénescentes ne sont pas efficacement éliminées. La résolution des dommages fait intervenir des processus fibrotiques.
D'après Muñoz-Espin D et Serrano M, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2014).

d. Sénescence, vieillissement et pathologies liées à l'âge

Nous venons de voir que l'induction de la sénescence peut avoir des effets bénéfiques et participe au développement de l'individu. Paradoxalement, l'accumulation et la persistance de cellules sénescentes dans les tissus (*long-term senescence*) peuvent participer au développement de pathologies liées à l'âge et potentialisent la tumorigenèse (Tableau 4).

Les multiples théories du vieillissement convergent vers une même notion : l'*inflammaging*. L'inflammaging est défini comme une inflammation systémique, stérile et chronique qui se développe avec l'âge et qui contribuerait au développement de cancers et de pathologies liées à l'âge (Hall *et al.*, 2016). L'origine exacte de l'inflammaging n'est cependant pas connue. Depuis ces dix dernières années, une hypothèse émerge, elle relie l'inflammaging à l'accumulation des cellules sénescentes. D'après cette théorie, les cellules

sénescentes « empoisonneraient » les tissus et organes de facteurs pro-inflammatoires issus de leur SASP. Des études ont tenté de vérifier cette hypothèse, notamment par l'utilisation d'un modèle murin de vieillissement accéléré (altération de Bub1b (*Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1 Beta*), gène codant pour la protéine BUBR1, impliquée dans les checkpoints mitotiques). Les animaux transgéniques présentent significativement plus de cellules p16 positives. Ils développent également sarcopénie, lipodystrophie et cataracte. Ces affections sont atténuées lorsque le gène Cdkn2a^{p16} est inactivé (Childs *et al.*, 2017). Un autre modèle murin, appelé INK-ATTAC, permettant d'induire l'apoptose des cellules exprimant p16 par activation de caspases, a montré que l'élimination spécifique des cellules p16 positives retarde le développement de pathologies gériatriques et prolonge la durée de vie des animaux (Figure 25) (Baker *et al.*, 2011; Baker, Childs, Durik, Wijers, Sieben, Zhong, Saltness, Jeganathan, Casaclang Verzosa, *et al.*, 2016).

Figure 25. Deux souris C57BL/6 INK-ATTAC âgées de 22 mois.
Les animaux INK-ATTAC expriment, sous le contrôle du promoteur de p16, la protéine de fusion FKBP-Casp8. Si p16 est exprimée, les cellules exprimeront également cette protéine de fusion. L'injection du produit de synthèse AP20187 induit la dimérisation de deux protéines FKBP-Casp 8. Cette dimérisation active la caspase 8 et déclenche de l'apoptose des cellules exprimant p16. À droite, la souris traitée par injection d'AP20187 semble être en meilleure forme que la souris de gauche non traitée. D'après Baker et al, *Nature* (2016).

Enfin, un dernier modèle murin permet d'observer l'accumulation de cellules p16 positive avec l'âge. Il s'agit du modèle p16^{LUC}, dans lequel un allèle de p16 est remplacé par la séquence codante pour la luciférase. L'enzyme est sous contrôle du promoteur, l'intensité de bioluminescence, après injection de son substrat, la luciférine, reflète l'expression de p16 (Burd *et al.*, 2013). L'utilisation de ce modèle permet de suivre, de façon non-invasive, l'évolution de la quantité de p16. Il permet également d'observer l'implication de la protéine p16 au cours de la cicatrisation ou au cours du développement de certains cas de cancers (Burd *et al.*, 2013).

Ces études ont permis de montrer une accumulation de cellules p16 positives avec l'âge. Leur élimination spécifique limite le développement de pathologies gériatriques, associé à l'augmentation de l'espérance de vie.

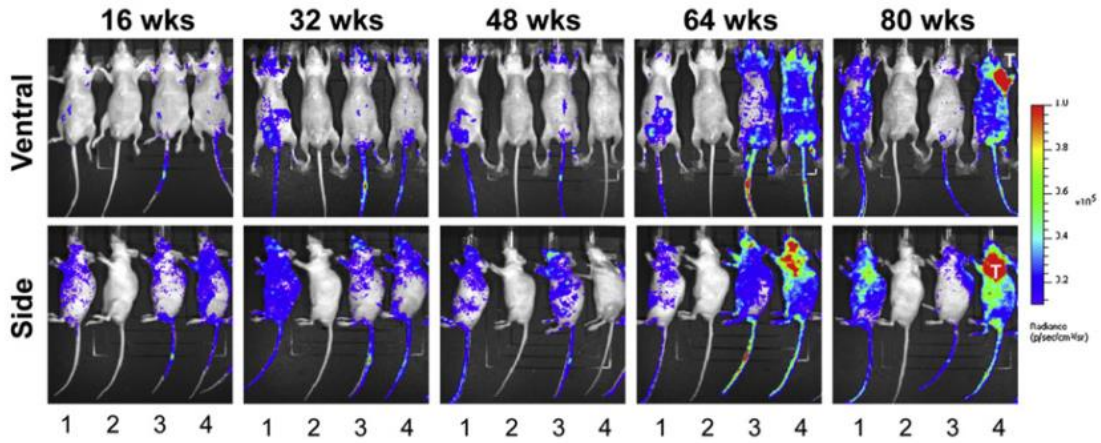


Figure 26. Augmentation de la bioluminescence en fonction de l'âge chez des animaux p16^{LUC}. Suivi longitudinal de quatre souris âgées de 16 semaines jusqu'à 80 semaines. Les mesures sont réalisées en prises de vue ventrales (haut) et latérales (bas). La souris 2 est de génotype p16$^{+/+}$ tandis que les autres sont toutes p16$^{+/LUC}$. D'après Burd et al, *Cell* (2013).

Avec l'âge, le risque de développer des pathologies, comme les maladies neurodégénératives, augmente significativement. Bien qu'aucun lien direct n'ait jamais été démontré, la sénescence de cellules du système nerveux central pourraient impacter les processus cognitifs et jouer un rôle dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (pathologies neurodégénératives les plus communes) (Baker and Petersen, 2018). En effet, les cellules cérébrales acquièrent des marques de sénescence *in vitro* et *in vivo* (Tableau 4). Par exemple, on retrouve dans les astrocytes, une augmentation de l'expression de p16 *in vivo* et une surexpression de p21, de p16 et de SA-β-Gal *in vitro* après stimulation par les ROS. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation de peptides β-amyloïde et la dégénérescence neurofibrillaire. La progression de ces deux types de lésion participe à une lésion plus globale du cerveau, générant une atrophie de certaines parties du cortex. On retrouve dans les astrocytes de patients atteints de cette maladie une surexpression de p16 ainsi qu'une surexpression des constituants du SASP (MMP1 et IL-6) par rapport à des individus sains d'âge équivalent. La protéine p16 est également surexprimée dans les neurones de patients atteints de démence. Des marques de sénescence existent, néanmoins les études faites à ce sujet restent extrêmement prudentes quant à l'implication réelle de la sénescence dans les maladies neurodégénératives, en partie due à l'absence de marqueurs spécifiques de ce phénotype (Baker and Petersen, 2018).

À l'inverse des phénotypes dégénératifs, l'accumulation de cellules sénescentes peut conduire à des pathologies hyperplasiques. Ce constat a été fait à l'aide d'études de xénogreffes, dans lesquelles les auteurs ont observé que les fibroblastes sénescents

potentialisent la prolifération de cellules épithéliales malignes, à travers leur phénotype sécrétoire (Campisi, 2013). Le SASP est non seulement capable d'agir sur la prolifération des cellules épithéliales, notamment dans les cancers mammaires et prostatiques, mais également sur la motilité cellulaire et la différentiation (Coppé *et al.*, 2010). Le SASP n'agit pas uniquement sur les cellules elles-mêmes, celui-ci perturbe leur microenvironnement, notamment par la sécrétion de MMP et de protéases qui dégradent la matrice extracellulaire. Le remodelage de la matrice extracellulaire joue un rôle important dans la différenciation, l'angiogenèse, la cicatrisation et la maintenance d'une niche souche. La destruction de ce compartiment peut donc compromettre localement l'intégrité fonctionnelle du tissu. La dégradation de la matrice extracellulaire facilite également l'invasion cellulaire et l'infiltration leucocytaire (Coppé *et al.*, 2010).

Au niveau vasculaire, les principales altérations liées au vieillissement sont la dégradation de la media et la dysfonction endothéliale (Childs, Li and van Deursen, 2018). La dégradation des fibres élastiques de la media induit une augmentation de la synthèse de collagène par les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) provoquant une rigidification du vaisseau, source d'hypertension artérielle. Cette dégradation augmente de plus le risque d'anévrisme (Childs, Li and van Deursen, 2018). La dysfonction endothéliale est associée à une diminution de l'activité de l'eNOS. La baisse de disponibilité en NO entraîne la prolifération des CMLV, la surproduction de fibres de collagènes et la vasoconstriction du vaisseau. La dysfonction endothéliale est enfin accompagnée d'une sécrétion du chimio-attractant MCP1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), de l'expression des molécules d'adhésion VCAM1 et ICAM1, et de la surexpression des NOX induisant la production de ROS. L'ensemble de ces phénomènes participe à l'induction de l'inflammation (Childs, Li and van Deursen, 2018).

Au cours de la vie, les cellules sénescentes s'accumulent au sein du système cardiovasculaire. Elles sont retrouvées au niveau cardiaque (cardiomyocytes) et vasculaire (principalement cellules endothéliales et CMLV). Les cellules sénescentes vasculaires participent au développement de pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose (Tableau 4) (Childs, Li and van Deursen, 2018). L'athérosclérose est la perte d'élasticité des artères due à la sclérose, elle-même provoquée par l'accumulation de corps gras au niveau de l'intima des artères. Ce dépôt constitue alors l'athérome qui peut aller de la simple plaque rétrécissant la lumière artérielle (sténose) jusqu'à l'oblitération du vaisseau (thrombose). L'athérosclérose touche les artères de gros et moyen calibre comme l'aorte, les carotides, les

artères rénales, les artères coronaires etc. L'athérome débute par une « strie lipidique », simple dépôt de graisse, linéaire, situé entre l'endothélium et la media et sans conséquence pour le flux. Ce dépôt lipidique, constitué de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées, induit l'invasion de monocytes dans l'espace sous-endothélial. Il s'agit de l'étape initiale du processus inflammatoire qui va aboutir la formation d'une plaque d'athérome. Dans l'espace sous-endothélial, les monocytes différenciés en macrophages internalisent les LDL oxydés, s'engorgent et deviennent des macrophages spumeux. Ces macrophages sécrètent des cytokines et chimiokines, telles que l'IL-1α, le TNFα et le MCP1, qui participent au recrutement des cellules immunitaires et à la formation de la plaque d'athérome. En plus des cellules sanguines, la plaque d'athérome est chargée en lipides, en fibrinogène, en plaquettes et en calcium. Les mécanismes pro-athérogènes semblent être activés dans les cellules endothéliales sénescentes. Par exemple, elles expriment les molécules d'adhésion VCAM1 et ICAM1. L'altération des jonctions intercellulaires observée *in vitro* peut se traduire par une augmentation de la rétention de LDL oxydées dans l'espace sous-endothélial *in vivo*. La sécrétion par ces cellules de molécules inflammatoires favorisent également un environnement pro-athérogène (Childs, Li and van Deursen, 2018). La lésion provoquée durant l'athérogenèse génère à des temps plus tardifs des cellules sénescentes « secondaires » qui entretiennent et étendent la lésion.

Ainsi avec l'âge, l'accumulation de cellules endothéliales sénescentes participe au développement de l'athérosclérose. L'élimination spécifique des cellules sénescentes présente des effets bénéfiques sur les lésions présentant une forte proportion de cellules sénescentes, à savoir les lésions intermédiaires à avancées. D'un point de vue mécanistique, la suppression des cellules sénescentes diminue l'inflammation mais surtout empêche la rupture de la plaque, principale cause de thrombose (Finn *et al.*, 2010).

Pour finir, le phénotype sénescent semble être impliqué dans les processus fibrotiques (Tableau 4). Le rôle exact de la sénescence dans la fibrose n'est pas clairement explicite. La sénescence peut limiter la fibrose, notamment au cours de la cicatrisation mais elle peut être impliquée dans son développement. Nous avons vu que l'induction de la sénescence des cellules stellaires et des fibroblastes limite le développement de fibroses au niveau du foie et de la peau, respectivement (Krizhanovsky *et al.*, 2008; Jun and Lau, 2010). Par contre, la sénescence des cellules épithéliales alvéolaires est associée au développement de fibroses pulmonaires, que ce soit dans un contexte d'irradiation ou d'induction par la bléomycine (Citrin *et al.*, 2013; Childs *et al.*, 2017). Trente semaines après irradiation en thorax entier,

Citrin et al ont observé la sénescence des cellules de l'épithélium alvéolaire, mais uniquement chez les animaux ayant reçu des doses capables d'induire la fibrose (17,5 Gy). Les auteurs observèrent une augmentation du marquage SA-β-Gal qui co-localise avec un marquage *Pro-surfactant protein C* (Pro-SFPC), marqueur des pneumocytes de type II. Ces cellules surexpriment également p21 et la *NADPH Oxidase* 4 (NOX4). D'ailleurs, un traitement par inhibiteur des NOX, le diphenylèneiodonium (DPI), réduit significativement l'accumulation de collagène dans le tissu (Citrin *et al.,* 2013). La même équipe a également démontré que l'élimination spécifique des cellules sénescentes réduit le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite (Pan *et al.*, 2017).

Comme nous venons de le voir, l'impact physiologique de la sénescence est complexe, ce phénotype conduit à la fois à des effets bénéfiques et délétères. Cette dichotomie serait associée à la persistance ou non des cellules sénescentes dans le tissu. Les cellules sénescentes offriraient des effets bénéfiques uniquement lorsqu'elles sont transitoires dans le tissu. Par contre leurs effets deviennent délétères si elles ne sont pas éliminées. Bien que ce constat reste à l'état hypothétique, il coïncide avec de nombreuses pathologies liées à l'âge faisant intervenir les cellules sénescentes. La non-élimination des cellules sénescentes résulterait de la diminution au cours du temps des capacités de reconnaissance et de clairance par les cellules du système immunitaire, mais également par l'aptitude des cellules sénescentes à échapper à la surveillance immunitaire, notamment par la surexpression de DCR2 (Childs *et al.*, 2017).

Les connaissances évoluant autour de la sénescence ne cessent de croître et les dernières découvertes semblent indiquer que ce phénotype serait une cible thérapeutique de choix dans le traitement et/ou la prévention des pathologies associées à l'âge.

Condition or disease	Pro-senescence stress	Location of SNCs	Markers used	Senescence intervention method	Effect of SNCs
Senescence markers only					
Alzheimer disease	Human disease state	Astrocytes	• Expression levels of $p16^{INK4A}$ and MMP1	NA	NA
Aneurysm	Kawasaki disease	Endothelial cells	• SA-β-Gal • Expression levels of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	NA	NA
Cystic fibrosis	Human disease state	Airway epithelial cells	• SA-β-Gal • Expression level of γH2AX •Phospho-CHK2 levels	NA	NA
Fibrosis in pancreatitis	Mouse disease model	Pancreatic stellate cells	• SA-β-Gal	NA	NA
Glaucoma	Human disease state	Outflow tract	• SA-β-Gal	NA	NA
Hypertension	Human disease state	Arterial wall	• Expression levels of p53 and p21 •Telomere uncapping	NA	NA
Idiopathic pulmonary fibrosis	Human disease state	Fibroblasts	• SA-β-Gal • Larger cell size	NA	NA
	Bleomycin-induced model	Alveolar epithelial cells	• SA-β-Gal • Larger cell size • Expression levels of p21, p38, MAPK, γH2AX and SASP factors	NA	NA
Inflammatory bowel disease	Human disease state	Crypt cells	Immunostaining for HP1γ and γH2AX	NA	NA
Intervertebral disc degeneration	Human disease state	Nucleus pulposus	• SA-β-Gal • Expression levels $p16^{INK4A}$ and SASP factors	NA	NA
Macular degeneration	Human disease state	RPE cells	• Expression levels p53 and p21 • Phospho-p38 MAPK levels	NA	NA
Osteoarthritis	Human disease state	Articular cartilage	• Reduced proliferation • SA-β-Gal • Telomere length	NA	NA
Type 2 diabetes mellitus in obesity	Human disease state	White adipose tissue	• Expression levels of HMGA2, $p14^{ARF}$ ($p19^{ARF}$) and p53 • SA-β-Gal	NA	NA
Senescence markers and intervention by senescence pathway inactivation					
Adipose atrophy	Progeria	Pre-adipocytes	• SA-β-Gal • Expression levels of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	$p16^{INK4A}$ deficiency	• Detrimental • Drives atrophy
Atherosclerosis	Dyslipidemia	Smooth muscle cells	None	*Tp53* knockout	• Beneficial • Blocks apoptosis
		Unclear	None	*Cdn1b* knockout	• Beneficial •Restricts proliferation
		Unclear	None	*Cdkn1a* knockout	• Beneficial • Restricts proliferation
		Smooth muscle cells	• SA-β-Gal • Expression levels of $p16^{INK4A}$ and $p19^{ARF}$	9p21 (*Cdkn2a* locus) deletion	• Beneficial • Restricts proliferation

Cataracts	Advanced age	Unclear	• Expression levels of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	$p16^{INK4A}$ deficiency or *Cdkn1a* knockout	• Detrimental
COPD	LPS-induced model	Clara cells	• SA-β-Gal	Clara cell-specific *Tp53* knockout	• Detrimental • Drives disease
Idiopathic pulmonary fibrosis	Bleomycin-induced model	Alveolar epithelial cells	• SA-β-Gal • Phospho-RB levels	*Cav1* knockout	• Detrimental • Drives fibrosis
Kidney transplant failure	Ischaemia	Tubular epithelial cells	• Proliferative arrest	$p16^{INK4A}$ deficiency	• Detrimental
Liver fibrosis	Carbon tetrachloride	Hepatic stellate cells	• SA-β-Gal • Expression levels of $p16^{INK4A}$ and p21 • Proliferation	*Tp53/Cdkn2a* double knockout	• Beneficial •Restricts fibrosis
Loss of bone mass	Advanced age	Mesenchymal stem cells	• $p16^{INK4A}$ expression	$p16^{INK4A}$ deficiency	• Detrimental • Drives bone ageing
Myocardial infarction	Infarct	Cardiac fibroblasts	• SA-β-Gal • Expression levels of CDKi and p53	*Tp53* knockout	• Beneficial • Restricts fibrosis
Sarcopenia	Advanced age	Satellite cells	• SA-β-Gal • Expression level of $p16^{INK4A}$	p38 MAPK inhibition	• Satellite cell dysfunction
	Progeria	Fibroadipogenic progenitors	• Expression levels of SASP factors	$p16^{INK4A}$ deficiency	• Detrimental • Drives sarcopenia
Type 2 diabetes mellitus	Mouse hypercaloric model	White adipose tissue	• SA-β-Gal • Expression levels of γH2AX and SASP factors	*Tp53* knockout	• Detrimental • Drives disease
Wound healing	CCN1 (also known as CYR61)	Wound fibroblasts	• SA-β-Gal • Expression level of $p16^{INK4A}$	*Cyr61* mutant	•Beneficial • Resricts fibrosis
Senescence markers and intervention by SNC clearance					
Adipose atrophy	Advanced age	Pre-adipocytes	• SA-β-Gal • Expression levels of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	INK-ATTAC model	• Detrimental
Allopecia	$p19^{ARF}$ overexpression	Skin	• Expression level of $p19^{ARF}$	ABT-737 treatment	• Detrimental
Atherosclerosis	Dyslipidemia	Intraplaque foam cells	• SA-β-Gal • Expression level of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	• INK-ATTAK model • INK-NTR model • p16-3MR model • Navitoclax treatment	• Detrimental
Cancer	Advanced age	Unclear	• None	INK-ATTAC model	• Detrimental
Cardiomyocyte hypertrophy	Advanced age	Pericardial epithelium	• SA-β-Gal • Expression level of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	INK-ATTAC model	• Detrimental
Cataracts	Progeria	Unclear	• Expression level of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	INK-ATTAC model	• Detrimental
Glomerulo-sclerosis	Advanced age	Kidney proximal tubules	• SA-β-Gal • Expression level of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	INK-ATTAC model	• Detrimental

Idiopathic pulmonary fibrosis	Bleomycin-induced model	Multiple	• Expression level of $p16^{INK4A}$, p21 and SASP factors	• INK-ATTAC model •Dasatinib plus quercetin treatment	• Detrimental
Osteroarthritis	• Joint trauma • Ageing	Joint articular surface	• SA-β-Gal • Expression level of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	• p16-3MR model •UBX-101 treatment	• Detrimental
Sarcopenia	Progeria	Fibroadipogenic progenitors	• Expression level of $p16^{INK4A}$ and SASP factors	INK-ATTAC model	• Detrimental
Wound healing	Dermal wound	• Myofibroblasts • Endothelium	• Expression level of $p16^{INK4A}$ and p21	• p16-3MR model • INK-ATTAC model	• Beneficial

Tableau 4. Liens entre sénescence et pathologies associées à l'âge.

MMP1 : Matrix Metalloproteinase 1 ; SA-β-Gal : Senescence-Associated β-galactosidase ; SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype ; HMGA2 : High-Mobility Group AT-hook 2 ; COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease ; LPS : Lipopolysaccharide.

D'après Childs et al, *Nature reviews. Drug discovery* (2017)

IV. La cellule sénescente, une cible thérapeutique ?

Ces dernières années ont vu l'émergence d'approches permettant de cibler et d'éliminer, de manière spécifique, les cellules exprimant des marqueurs de sénescence de l'organisme. Dans des modèles précliniques, la suppression de ces cellules est associée à une diminution de la sévérité des pathologies liées à l'âge. Suite à ces avancées, différentes stratégies et composés pharmacologiques ont été identifiés et développés. Ces molécules sont appelées « sénolytiques ». Les stratégies employées, ou sénothérapies, consistent en l'élimination pharmacologique des cellules sénescentes, leur élimination à travers les mécanismes immunitaires et/ou l'inhibition de leur phénotype sécrétoire.

a. Ciblage des spécificités de la cellule sénescente

L'une des caractéristiques remarquables des cellules sénescentes est leur résistance aux stimuli pro-apoptotiques, qu'ils soient intrinsèques ou extrinsèques. Le ciblage des voies de signalisation impliquées dans la survie pourrait conduire à l'élimination des cellules dans lesquelles elles sont actives. Ces voies de signalisation font intervenir les protéines de la famille BCL-2, la voie p53/p21, la voie PI3K/AKT, HIF-1α, HSP90 ainsi que des récepteurs à activité tyrosine kinase (Ovadya and Krizhanovsky, 2018). Actuellement, la plupart des drogues sénolytiques identifiées sont dirigés contre les membres de la famille BCL-2. Ces protéines sont surexprimées au cours de la sénescence et leur inhibition peut conduire à l'activation de l'apoptose (Herranz and Gil, 2018; Ovadya and Krizhanovsky, 2018). Ces inhibiteurs, comme l'ABT-263, aussi connu sous le nom de Navitoclax, ont montré leur efficacité dans l'élimination des cellules sénescentes *in vivo*, notamment dans l'athérosclérose où celui-ci empêche sa progression (Childs *et al.*, 2016). Par contre l'administration de ce composé est associée à des toxicités hématologiques sévères (neutropénie, thrombopénie). Ainsi des molécules comme l'A1331852 et A1155463, inhibiteur de BCL-XL, ont été développées dans le but de limiter la toxicité aux cellules non-sénescentes (Ovadya and Krizhanovsky, 2018).

Autre sénolytique capable d'éliminer les cellules sénescentes, l'alvespimycine ou 17-DMAG (Ovadya and Krizhanovsky, 2018). Le 17-DMAG est un inhibiteur spécifique de la protéine chaperonne HSP90. Cette protéine est impliquée dans la survie cellulaire lorsqu'elle interagit avec AKT ou ERK, connues pour être des voies surexprimées au cours de la sénescence, et la déstabilisation de ces interactions conduit à la mort cellulaire (Ovadya and

Krizhanovsky, 2018). L'administration de 17-DMAG aux souris souffrant de syndromes progéroïdes réduit les marques de vieillissement et allonge l'espérance de vie des animaux.

Pour éliminer les cellules sénescentes, le ciblage de la β-Galactosidase associée à la sénescence peut être réalisé. L'utilisation de nanoparticules enrobées de galacto-saccharides exploite cette caractéristique. Des expériences *in vitro* ont montré que ces nanoparticules ne sont pas digérées par les cellules non-sénescentes. Par contre l'augmentation de l'expression de la β-galactosidase au cours de la sénescence va permettre la digestion des nanoparticules et le relargage de leur contenu, qui peut être des molécules cytotoxiques ou sénolytiques. De plus, des anticorps spécifiquement dirigés contre des marqueurs membranaires de sénescence peuvent être « greffés » sur la surface de ces particules afin d'augmenter leur spécificité (Agostini *et al.*, 2012).

b. Potentialiser l'élimination par le système immunitaire

Les cellules sénescentes sont, par leur nature, immunogènes. Elles sont capables d'être reconnues puis éliminées par les cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles et Natural Killer). L'une des stratégies pouvant être employée serait l'administration d'immuno-stimulateurs comme le polyI:C (Acide polyinosinique-polycytidylique) qui a montré une meilleure élimination des cellules sénescentes par les NK ou les inhibiteurs de PD-1 (*Programmed cell Death protein 1*), utilisé dans le traitement des cancers et qui a montré une amélioration des processus cognitifs dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Ovadya and Krizhanovsky, 2018). Par contre, ces traitements conduisent à une activation chronique du système immunitaire et/ou à des réactions auto-immunes (Childs *et al.*, 2017; Ovadya and Krizhanovsky, 2018). Concernant les NK, nous avons vu que les cellules sénescentes expriment la protéine NKG2D à leur surface. Cette protéine n'est normalement pas exprimée par les cellules. Elle pourrait donc constituer une cible en matière d'immunothérapie (Childs *et al.*, 2017; Ovadya and Krizhanovsky, 2018). D'autre part, les cellules sénescentes surexpriment le récepteur-leurre DCR2, celui-ci orienterait leur élimination par les NK via la voie perforine-granzyme au détriment de l'activation de FAS et TRAIL. La sensibilité des cellules sénescentes aux mécanismes immunitaires serait accrue par l'inhibition de ce récepteur et pourrait également être une cible thérapeutique.

c. Inhibition du phénotype sécrétoire

La dernière stratégie que nous évoquerons dans cette partie va être la suppression du *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP). Pour rappel, le SASP est essentiellement composé de facteurs pro-inflammatoires, chimio-attractants et de protéines de remodelage matriciel. Ces molécules perturbent l'homéostasie tissulaire et sont fortement associées au développement de pathologies liées à l'âge. Ce phénotype est principalement contrôlé par les voies NF-κB et C/EBPβ. La voie NF-κB est activée par liaison d'IL-1 à son récepteur IL1R1. D'ailleurs, l'utilisation d'anticorps dirigés contre IL1 ou son récepteur est suffisante pour réduire l'activité transcriptionnelle de NF-κB (Orjalo *et al.*, 2009). Les inhibiteurs de mTOR, comme la rapamycine, sont également employés pour réduire l'expression d'IL1 (Laberge *et al.*, 2015). La metformine, commercialisée dans le traitement du diabète de type 2, est un inhibiteur de NF-κB (Ovadya and Krizhanovsky, 2018). Il existe également des stratégies ciblant C/EBPβ. Par exemple, la voie JAK/STAT contrôle l'activité transcriptionnelle de ce facteur (Xu *et al.*, 2015). Les inhibiteurs de JAK, comme le ruxolitinib, peuvent réduire l'inflammation (Ovadya and Krizhanovsky, 2018). Pour que ces traitements soient efficaces, un régime thérapeutique de longue durée est nécessaire. Par contre, elles seront la cause d'effets secondaires indésirables.

Nous avons parcouru tout au long de ce chapitre les caractéristiques de la cellule sénescente et son implication dans diverses pathologies. Les travaux du Laboratoire de Radiobiologie des expositions Médicales s'intéresse à la fibrose radio-induite dans un contexte de complication de la radiothérapie. Cette pathologie secondaire est l'une des plus étudiées et de récentes études ont montré l'implication du phénotype sénescent dans le développement de la fibrose, notamment au niveau pulmonaire. Nous discuterons dans le chapitre suivant de l'anatomie pulmonaire ainsi que des pneumopathies radio-induites et plus particulièrement de la fibrose radio-induite pulmonaire.

Chapitre IV : La fibrose radio-induite : cas des poumons

Le laboratoire de Radiobiologie des Expositions Médicales a développé, à l'aide de physiciens, un nouveau modèle préclinique d'irradiation pulmonaire en condition stéréotaxique, à la fois en dose unique mais également en dose fractionnée. Ces avancées ont pu être effectuées grâce à l'acquisition récente du *Small Animal Radiation Research Platform* (SARRP, Xstrahl). Nous avons pu, au cours de cette thèse, utiliser ce modèle inédit que nous développerons dans les pages qui suivent.

I. Anatomie pulmonaire

Le poumon est un organe pair, intra-thoracique, de l'appareil respiratoire. Il permet l'échange des gaz vitaux (oxygène et dioxyde de carbone). Les poumons jouent également un rôle de défense contre les substances nuisibles dans l'air, comme la fumée, la pollution, les bactéries et les virus. Ils produisent un mucus qui peut retenir et partiellement détruire ces substances, il participe à la stérilité intra-alvéolaire.

L'être humain possède deux poumons, un gauche et un droit, situés dans les cavités pleurales et séparés l'un de l'autre par le médiastin. Les poumons sont segmentés en différents lobes, le poumon droit est divisé en trois lobes (supérieur, moyen et inférieur) et le poumon gauche est divisé en deux lobes (supérieur et inférieur) (Figure 27).

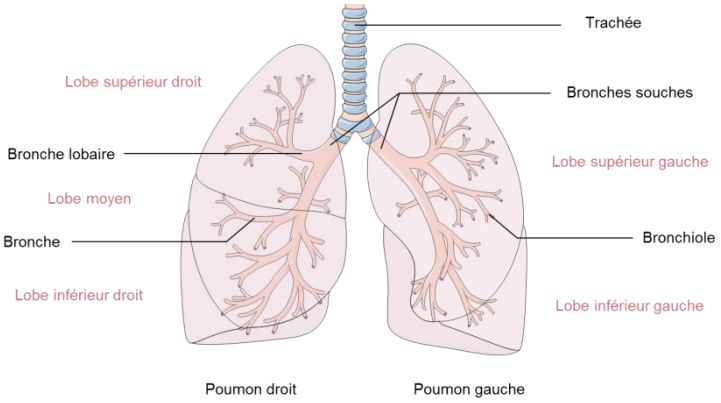


Figure 27. Les poumons et l'arbre trachéo-bronchique

Avant d'atteindre les poumons, l'air passe par les voies aérophores extra-pulmonaires composées des fosses nasales, du nasopharynx, du larynx, de la trachée et des premières parties des bronches souches. Les voies aérophores intra-pulmonaires commencent au niveau du hile pulmonaire, zone d'entrée des bronches souches dans les poumons et sont constituées de la seconde partie des bronches souches, qui se divisent en bronches lobaires, segmentaires, sus-lobulaires, puis en bronchioles intra-lobulaires et enfin en bronchioles terminales.

Le parenchyme respiratoire correspond à la composante fonctionnelle des poumons. Il est composé des bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires, des alvéoles et des capillaires sanguins (Figure 28). Les alvéoles, regroupées en sacs, sont des cavités poreuses séparées les unes des autres par une fine cloison, d'un épithélium alvéolaire et de capillaires sanguins, appelé septum alvéolaire. L'épithélium alvéolaire est continu et est composé de deux types cellulaires, les pneumocytes de type I et les pneumocytes de type II (Figure 28). Les pneumocytes de type I sont des cellules aplaties possédant un noyau ovalaire allongé et un cytoplasme très fin qui permet le passage des gaz dissous. Elles ne représentent que 40% des cellules des alvéoles mais couvrent 90% de leur surface. Les pneumocytes de type II sont de forme pyramidale avec un noyau central et arrondi. Ils représentent 60% des cellules mais seulement 10% de la surface alvéolaire. Les pneumocytes de type II sécrètent un composé tensioactif, le surfactant, indispensable à la respiration.

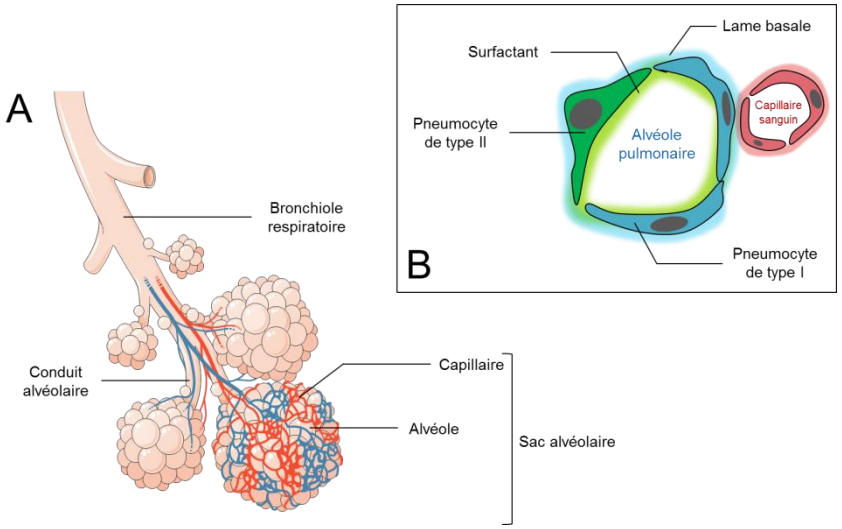


Figure 28. Le parenchyme respiratoire.
A) Les différentes structures composant le parenchyme respiratoire. B) Le compartiment alvéolo—capillaire Les pneumocytes de type II représentent 60% des cellules alvéolaires et sécrètent le surfactant. Les pneumocytes de type I assurent les échanges gazeux. Accolées aux cellules endothéliales, la fusion des lames basales de ces deux types cellulaires forme la barrière alvéolo-capillaire.

La fusion des membranes basales des pneumocytes de type I et des cellules endothéliales, ainsi que leur cytoplasme, forment la barrière alvéolo-capillaire (< 1µm d'épaisseur). C'est la zone à travers laquelle s'effectuent les échanges gazeux respiratoires par diffusion passive ou active.

II. Pathologies pulmonaires

Au vu du nombre de pathologies pulmonaires existantes, j'ai fait le choix de vous présenter, dans cette partie, les pathologies du poumon dans lesquelles la sénescence semble jouer un rôle, à savoir la bronchopneumopathie chronique obstructive, plus particulièrement l'emphysème et la fibrose pulmonaire idiopathique (Tableau 4). Nous aborderons également dans cette partie les cancers pulmonaires.

a. La bronchopneumopathie chronique obstructive

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou COPD (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) est une pathologie chronique systémique d'origine respiratoire. La principale cause de BPCO est le tabagisme. Cette pathologie se caractérise par une obstruction lente et progressive des poumons qui aboutit à la mort due à une insuffisance respiratoire, sauf si les patients décèdent de comorbidités, telles que les pathologies cardiovasculaires ou les cancers pulmonaires (Barnes, 2014). La BPCO se divise en deux phénotypes cliniques : la bronchite chronique (inflammation des bronches qui se traduit par une toux productive) et l'emphysème pulmonaire.

L'emphysème pulmonaire est défini par la destruction des parois alvéolaires causée par la libération de MMPs et d'élastase par les cellules immunitaires. L'implication de la sénescence cellulaire dans l'emphysème pulmonaire a été observée chez des patients atteints de cette pathologie. Une augmentation du nombre de cellules exprimant p21 et p16 est retrouvée dans les poumons chez des patients atteints par rapport à des fumeurs sans BPCO (Tsuji, Aoshiba and Nagai, 2006). Des études précliniques ont montré un lien causal entre sénescence et emphysème pulmonaire. Les souris déficientes en télomérase ($Tert^{-/-}$) développent un emphysème plus important en réponse à une exposition à la fumée de cigarette que les animaux témoins (Boyer *et al.*, 2014). Par contre, les animaux déficients pour p21 sont protégés de l'emphysème. De même, la surexpression de SIRT1, protéine « anti-sénescence », prévient le développement de l'emphysème (Boyer *et al.*, 2014). Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas clairement élucidés, par contre les travaux menés par *Houssaini et al* ont montré un lien entre l'activation de la voie mTOR au cours de la sénescence et le développement de lésions pulmonaires. Les auteurs ont observé une activation de cette voie dans les cellules pulmonaires (muscles lisses et endothéliales) issus de patients atteints de BPCO. Par l'utilisation d'un modèle préclinique d'activation constitutive ou conditionnelle de la voie mTOR, les auteurs ont montré que celle-ci est suffisante pour

induire la sénescence pulmonaire et qu'elle était accompagnée de lésions semblables à celles observées dans la BPCO (Houssaini *et al.*, 2018).

b. La fibrose pulmonaire idiopathique

La fibrose pulmonaire idiopathique est une pathologie chronique et mortelle, caractérisée par la dégradation progressive des fonctions pulmonaires. Elle est provoquée par un processus anormal de cicatrisation qui inclut un dépôt excessif de collagène dans l'interstitium pulmonaire. Des marqueurs de sénescence cellulaire sont observables dans les fibroblastes et cellules épithéliales de poumons de patients atteints de fibrose. Notamment, la surexpression de p21, p16 et de SA-β-gal (Schafer *et al.*, 2017). L'induction de la fibrose pulmonaire par exposition à la bléomycine a montré que les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales acquièrent un phénotype sénescent accompagné d'un sécrétome pro-fibrosant (Schafer *et al.*, 2017). L'élimination des cellules sénescentes par un cocktail pharmacologique Dasatinib-Quercetin améliore les capacités respiratoires des animaux exposés à la bléomycine (Schafer *et al.*, 2017).

c. Les cancers pulmonaires

Le développement de tumeurs malignes primitives pulmonaires est essentiellement dû à l'inhalation de substances carcinogènes contenues dans la fumée de cigarette, d'autres facteurs peuvent être impliqués comme les rayonnements ionisants, la pollution atmosphérique, l'amiante ainsi que d'autres minéraux comme le nickel ou le chrome. Le cancer du poumon se développe à partir de cellules des bronches. Il existe deux principaux types de cancers pulmonaires en fonction de l'origine des cellules des bronches dont ils sont issus, les cancers bronchiques non à petites cellules (NSCLC, *Non-Small Cell Lung Cancer*) et les cancers bronchiques à petites cellules (SCLC, *Small Cell Lung Cancer*).

Les cancers bronchiques non à petites cellules représentent près de 85% des cancers du poumon, dont les formes les plus fréquentes sont :

- l'adénocarcinome bronchique, qui prend souvent naissance en périphérie des poumons ;
- le carcinome épidermoïde, qui se développe habituellement dans les grosses bronches situées dans la partie centrale du poumon ;
- le carcinome à grandes cellules, qui peut siéger dans toutes les parties du poumon.

Les cancers à petites cellules représentent 15% des cancers du poumon. Ils regroupent les carcinomes neuroendocrines à petites cellules qui sont des tumeurs particulièrement agressives. Ils envahissent rapidement et largement la paroi bronchique et le parenchyme l'entourant.

Trois types de traitements sont utilisés en première intention pour traiter les cancers du poumon : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. La radiothérapie est proposée lorsque l'état général du patient, ou sa fonction respiratoire, ne permettent pas la chirurgie.

En radiothérapie, la technique de traitement la plus utilisée dans le cancer du poumon est la 3D-CRT. Cette méthode de traitement peut être asservie à la respiration, c'est-à-dire que les mouvements respiratoires sont pris en compte pendant l'irradiation du thorax. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées :

- le blocage de la respiration par le patient, quelques dizaines de secondes, afin d'appliquer les rayons ;
- une technique appelée « *gating* » dans laquelle les rayons sont délivrés uniquement lorsque la zone cible se trouve devant les faisceaux, en respiration normale ;
- toujours en respiration normale, les faisceaux d'irradiation suivent les mouvements de la tumeur, cette technique est appelée « *tracking* ».

Une autre technique de radiothérapie est utilisée dans le traitement des cancers pulmonaires. Il s'agit de la radiothérapie en conditions stéréotaxiques, qui peut aussi être asservie à la respiration. Cette technique est la méthode de choix dans le traitement des cancers pulmonaires non à petites cellules aux stades précoces pour les patients inopérables ou refusant la chirurgie (Tableau 5).

	Stades	Stéréotaxie	3D-CRT
Cancers bronchiques non à petites cellules	I (localisés) II (localisés)	Privilégiée pour les patients aux stades I et II non-opérable ou refusant la chirurgie	
	IIIA (localement avancés)		Patients stade IIIA opérable et résécable pour compléter la chirurgie/chimiothérapie *Radiothérapie sur sites ganglionnaires atteints par la tumeur au niveau du médiastin et/ou sur la paroi thoracique*
	IIIB (localement avancés)		Patients stade IIIA, IIIB et non-opérable *Radiochimiothérapie concomitante si elle le permet, sinon radiothérapie seule*
	IV (Métastatiques)	Ne font pas l'objet de radiothérapie	
Cancers bronchiques à petites cellules	I (localisés) II (localisés) III (localement avancés)		Stades I, II et III irradiable *Radiothérapie du thorax, concomitante ou séquentielle à la chimiothérapie*
	IV (Métastatiques)		Stades III non-irradiable et IV *Irradiation prophylactique si le traitement de référence (chimiothérapie) a été efficace*

Tableau 5. Indications des radiothérapies du cancer du poumon
Source : Institut National du Cancer

III. Radiopathologie pulmonaire

Les pathologies pulmonaires radio-induites ou RILD (*Radiation-Induced Lung Disease*) sont des complications fréquentes des radiothérapies thoraciques. Ces pathologies se développent chez les patients ayant subi une radiothérapie pour le traitement des cancers pulmonaires, du sein, de l'œsophage, de la tête et du cou. Le risque de développer la RILD dépend de plusieurs facteurs : la dose totale administrée (rare < 20 Gy, peut survenir à des doses > 40 Gy), le nombre de fractions ainsi que la dose par fraction, la chimiothérapie préalable ou non... La RILD se divise en deux phases, aiguë et tardive. La phase aiguë a lieu entre 4 et 12 semaines après la fin du traitement. La phase tardive se développe dans les 6 à 12 mois qui suivent la radiothérapie mais peut progresser jusqu'à 2 ans (Choi *et al.*, 2004). On retrouve fréquemment deux types de RILD : la pneumopathie aiguë radio-induite et la fibrose pulmonaire radio-induite.

a. La pneumopathie aiguë radio-induite

L'apparition d'une pneumopathie aiguë radio-induite concerne 50 à 80% des patients traités par radiothérapie. Elle se développe dans les 6 à 12 semaines qui suivent l'irradiation et n'est pas systématiquement symptomatique. Cette pathologie correspond à une inflammation des alvéoles induite par l'apoptose des pneumocytes de type I en réponse à l'irradiation. La perte de ces cellules conduit à une augmentation de la perméabilité vasculaire qui aboutit à un œdème interstitiel et alvéolaire ainsi qu'à l'infiltrat alvéolaire des cellules immunitaires. Lorsqu'elle est symptomatique, la pneumopathie aiguë se manifeste par de la toux, des difficultés respiratoires (dyspnées), de la fièvre et des douleurs thoraciques et/ou pleurales.

b. La fibrose pulmonaire radio-induite

La fibrose pulmonaire radio-induite est une manifestation tardive de la RILD. Nous avons déjà discuté de la fibrose radio-induite dans la partie I-d. Très succinctement, l'accumulation de la matrice extracellulaire en réponse à l'irradiation fait suite au recrutement massif de cellules immunitaires. Ces dernières produisent des molécules pro-inflammatoires et des facteurs de croissance.

- *Le TGFβ*

Parmi les molécules sécrétées, le TGFβ est l'acteur majeur impliqué dans le développement de la fibrose. Celui-ci maintient l'état inflammatoire et induit la migration, la prolifération et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, producteurs de

collagènes, fibronectine et protéoglycanes. Ces molécules sont responsables de l'épaississement et de la rigidification du tissu (Straub *et al.*, 2015). Le TGFβ induit la transdifférenciation des cellules épithéliales et/ou endothéliales en cellules mésenchymateuses, ajoutant une source de collagène de plus dans le tissu (Mintet *et al.*, 2015). Il est aussi un inhibiteur des MMPs (*Matrix Metalloproteinases*), il empêche donc la dégradation de la matrice extracellulaire excédentaire.

- *La protéine PAI-1*

Une autre molécule possédant un fort potentiel fibrosant est la protéine PAI-1 (Figure 29). Pour rappel, PAI-1 est l'inhibiteur des activateurs du plasminogène t-PA et u-PA. L'inhibition des activateurs du plasminogène empêche l'activation des MMP plasmine-dépendante. PAI-1 fait partie de la superfamille des serpines, dont la plupart des membres sont des inhibiteurs des sérine-protéases extracellulaires. La protéine PAI-1 est principalement exprimée par les cellules endothéliales vasculaires, les adipocytes, les macrophages, les cardiomyocytes et les fibroblastes (Ghosh and Vaughan, 2012). PAI-1 est codé par le gène *Serpine1* et son expression est étroitement régulée par des cytokines et facteurs de croissance : TGFβ, IL-1, EGF, l'insuline, le lipopolysaccharide et lipoprotéines.

Dans un contexte oxydant et inflammatoire propice à l'induction de la fibrose, le TGFβ induit la surexpression de PAI-1. Les ROS sont également capable d'induire l'expression de PAI-1 à travers l'activation des voies p38 MAPK et JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*) (Ghosh and Vaughan, 2012). L'utilisation du gluthation, un antioxydant cellulaire, inhibe l'expression de PAI-1, d'une part en bloquant les voies p38 MAPK et JNK, et d'autre part, en empêchant la liaison du complexe Sp1 (*Specificity protein 1*)-Smad sur le promoteur de PAI-1 (Ghosh and Vaughan, 2012). L'augmentation de PAI-1 est observée dans diverses pathologies, dont la fibrose. L'implication de PAI-1 dans la fibrose est largement due à l'inhibition du système t-PA/u-PA-plasmine et des MMP dépendantes de la plasmine. De nombreux groupes ont identifié PAI-1 comme jouant un rôle dans la fibrose cutanée, pulmonaire, rénale, hépatique et cardiaque.

Au niveau pulmonaire, des études ont montré que la déficience en PAI-1 protège l'organe de l'accumulation de fibrine, et donc de la fibrose, dans un modèle préclinique d'induction par la bléomycine. En réponse à cet antibiotique, les animaux déficients pour PAI-1 produisent plus de PGE2 (*Prostaglandin E2*), molécule anti-fibrotique, par rapport aux animaux sauvages. Cette production accrue de PGE2 semble provenir des cellules épithéliales alvéolaires et des fibroblastes (Ghosh and Vaughan, 2012). L'augmentation de PGE2 dans le

tissu semble être liée à l'activation du plasminogène. Toujours dans un modèle de fibrose induite par la bléomycine, *Senoo et al* ont montré que l'instillation intranasale de siRNA dirigé contre PAI-1 diminue les dépôts de collagènes et augmente la survie des animaux (Senoo *et al.*, 2010). Ces deux études montrent que l'inhibition ou la déficience en PAI-1 semble avoir un effet bénéfique et limite le développement de la fibrose pulmonaire.

Par contre, dans un modèle préclinique de fibrose radio-induite (17 Gy, thorax entier) chez des animaux déficients pour PAI-1, spécifiquement dans l'endothélium vasculaire, *Lavigne et al* n'ont observé aucun bénéfice vis-à-vis du développement de la fibrose pulmonaire. Au contraire, il semblerait la délétion spécifique de PAI-1 dans l'endothélium aggrave les lésions aiguës (Lavigne *et al.*, 2017). Les auteurs en conclurent que la seule délétion du *pool* endothélial de PAI-1 n'est pas suffisante pour restreindre le développement de la fibrose radio-induite et que celle-ci semble avoir des effets plutôt délétères, contrairement à sa déficience complète qui semble avoir un effet protecteur.

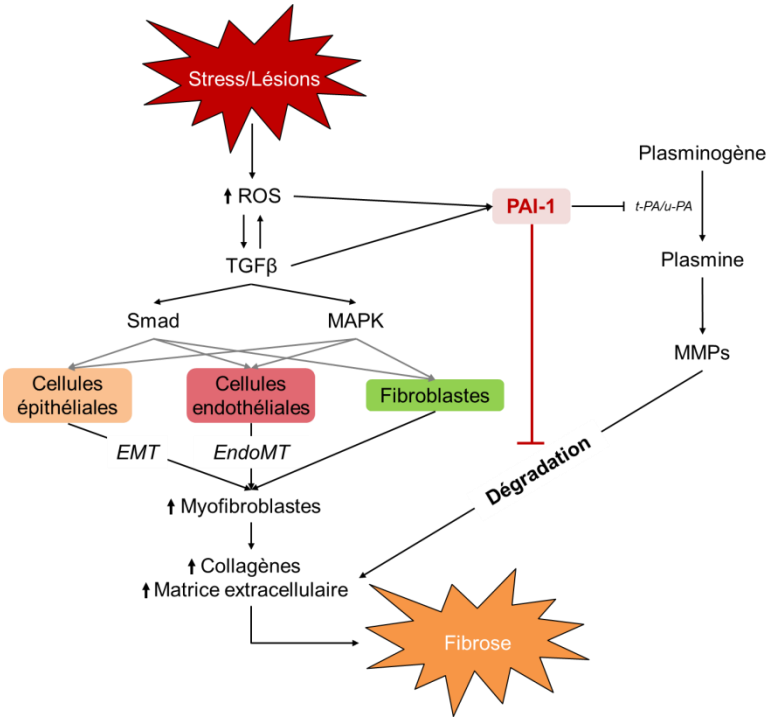


Figure 29. Rôle de PAI-1 dans le développement de la fibrose.
En réponse à un stress, le tissu génère des ROS. Ces derniers induisent la production de TGFβ et permettent conjointement l'expression de PAI-1. Le TGFβ active ses voies de signalisations qui aboutissent à la différenciation et à la prolifération de myofibroblastes, producteurs de matrice extracellulaire. PAI-1 étant surexprimé, il déséquilibre le système t-PA/u-PA-Plasmine et empêche la dégradation de la matrice excessive par les MMPs.
ROS : Reactive Oxygen Species, TGFβ : Transforming Growth Factor, MAPK : MAP Kinase, PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1, EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition, EndoMT : Endothelial-Mesenchymal Transition, MMPs : Matrix Metalloproteinase, t-PA : tissue Plasminogen Activator, u-PA : urokinase Plasminogen Activator. D'après Ghosh D et al, *Journal of cellular physiology* (2012).

En plus de son rôle dans la fibrose, nous nous sommes également intéressés à PAI-1 pour son implication dans la mise en place de la sénescence.

- *PAI-1 et sénescence*

La protéine PAI-1 fut initialement identifiée à partir de surnageants d'HUVECs par *Dosne et al* en 1978 puis par *Loskutoff et al* en 1983 (Dosne, Dupuy and Bodevin, 1978; Loskutoff *et al.*, 1983). L'existence d'un lien entre PAI-1 et sénescence provient du fait qu'il existe des corrélations assez fortes entre l'âge des patients et l'élévation du taux plasmatique de PAI-1, ou l'âge des patients et l'incidence des maladies cardiovasculaires, dont PAI-1 est un facteur de risque (Yamamoto *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2017).

L'identification de PAI-1 comme marqueur potentiel de la sénescence a été faite dès le début des années 90. *Murano et al* identifièrent des fibroblastes cutanés issus de patients atteints du syndrome de Werner (phénotype de vieillissement accéléré, perte de cheveux, diabète et ostéoporose) avec des taux élevés de PAI-1 (Vaughan *et al.*, 2017). *Goldstein et al* montrèrent des niveaux moins élevés de PAI-1 dans les fibroblastes issus de jeunes souriceaux par rapport à des individus plus âgés (Vaughan *et al.*, 2017). De la même manière, les niveaux d'expression de PAI-1 sont plus élevés dans les cellules endothéliales âgées et sénescentes comparés à des cellules endothéliales en passage précoce (Vaughan *et al.*, 2017). Toujours au niveau endothélial, l'exposition de ces cellules à l'homocystéine, acide aminé non protéinogène, connut pour réduire la taille des télomères, induit la sénescence et augmente de l'expression de PAI-1 (Vaughan *et al.*, 2017). D'autres études ont montré le lien entre PAI-1 et la sénescence endothéliale, par exemple, la culture d'HUVECs à des passages tardifs montre une augmentation de l'expression de PAI-1 par rapport aux cellules en passage précoce, celle-ci est associée à l'augmentation d'autres marqueurs de sénescence, comme p21 (Vaughan *et al.*, 2017). De plus, l'augmentation de PAI-1 corrèle significativement avec l'augmentation de la SA-β-gal, faisant de lui un excellent marqueur de la sénescence endothéliale. Il a également été démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de PAI-1, la sirtuine-1 (SIRT1), rétabli la production de NO via l'eNOS et empêche la sénescence endothéliale. La sirtuine-1 protège les cellules de la dysfonction endothéliale et de la sénescence (Vaughan *et al.*, 2017).

La protéine PAI-1 n'est pas seulement un marqueur, il s'agit d'un acteur important de la sénescence cellulaire. Ce constat a été fait pour la première fois par *Kortlever et al* dans leur étude dans laquelle ils montrèrent que la surexpression de PAI-1 dans des fibroblastes déficients pour p53 est suffisante pour induire leur sénescence *in vitro* (Kortlever, Higgins

and Bernards, 2006). La voie TGFβ est capable de contrôler l'expression de PAI-1 (Figure 29). En effet, il a été démontré que l'induction de PAI-1 par le TGFβ est capable d'inhiber la prolifération de kératinocytes. L'effet pro-sénescent du TGFβ est perdu lorsque PAI-1 est inhibée, ce qui suggère un contrôle de PAI-1 par le TGFβ (Vaughan *et al.*, 2017). L'utilisation d'un modèle murin d'induction de l'athérosclérose à l'aide d'un inhibiteur de la *Nitric Oxide Synthase* (NOS) a montré que l'inhibition de PAI-1 réduisait la sénescence endothéliale, accompagnée d'une diminution de l'expression de p16 (Vaughan *et al.*, 2017). Le traitement par inhibiteur de la NOS au niveau pulmonaire induit son vieillissement accéléré, caractérisé par un emphysème pulmonaire et des niveaux élevés de PAI-1, p21, p53 et p16. L'inhibition de PAI-1 limite le phénotype vieillissant (Vaughan *et al.*, 2017). Pour finir, une sous-population de la communauté Amish portant une mutation rare sur le gène *Serpine1* a été identifiée. Les individus sont porteurs d'un allèle nul pour la Serpine1 (*Serpine1*$^{+/-}$), donnant lieu à des plus faibles niveaux de PAI-1 comparé aux individus homozygote *Serpine1*$^{+/+}$. L'étude épidémiologique découlant de cette sous-population a montré que les individus hétérozygotes sont moins enclins à développer le diabète, à âge équivalent. Leurs télomères sont également plus longs par rapport aux individus non-porteurs de la mutation et possèdent une espérance de vie significativement rallongée (Khan *et al.*, 2017).

Les mécanismes moléculaires impliquant PAI-1 à la sénescence ont été proposés par *Elzi et al*. Leur étude montre que la sénescence de cellules MCF-7 est accompagnée d'une augmentation de la sécrétion en IGFBP-3 (Elzi *et al.*, 2012). Cette protéine étant connue pour être nécessaire et suffisante à l'induction de la sénescence, les auteurs montrèrent que la protéine PAI-1 empêche la protéolyse d'IGFBP-3 par le *tissue Plasminogen Activator* (Elzi *et al.*, 2012). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres équipes, dans lesquels ils montrèrent que PAI-1 jouait un rôle dans la régulation du phénotype sécrétoire des cellules sénescentes (Vaughan *et al.*, 2017).

Il en ressort de l'ensemble de ces travaux que PAI-1, en plus d'être un marqueur de la sénescence cellulaire, est également un acteur clé de ce mécanisme physiologique. Son implication dans l'évolution des lésions radio-induites, dans le processus fibrotique ainsi que dans la sénescence font de cette protéine une cible de choix pour ce travail de thèse.

IV. Modélisation de la fibrose pulmonaire radio-induite : utilisation du SARRP

Depuis environ un demi-siècle de nombreuses techniques ont été développées afin d'étudier les pathologies pulmonaires radio-induites. La plus utilisée d'entre elle consiste à exposer entièrement le thorax à une dose unique, comprise entre 10 et 20 Gy. En marge de cette technique, l'étude d'*Elisabeth Travis* a montré le développement d'une fibrose pulmonaire, chez des souris CBA mâles, 36 semaines après exposition à 14 et 13 Gy en thorax entier (Travis, 1980). Bien qu'accessible et facilement réalisable, cette technique présente deux inconvénients : 1) la dose maximale pouvant être délivrée est limitée par le volume important de poumon exposé, 2) la présence du cœur dans le champ d'irradiation peut induire un biais selon les mesures réalisées. Bien que celui-ci soit connu pour être moins radiosensible que les poumons, des affections cardiovasculaires radio-induites ayant un impact sur la fonction pulmonaire ne sont pas à exclure. Pour pallier à ce problème, des irradiations hémithoraciques, dans lesquelles un seul poumon est irradié, ont été développées. Via l'utilisation de plaques de plomb protégeant la partie du poumon désirée et le reste du corps, des irradiations de 28 Gy ont pu être réalisées sur le poumon droit chez des rats Fischer-344 avec un suivi jusqu'à 6 mois (Vujaskovic *et al.*, 2001). Enfin, une autre technique en plein essor est l'utilisation de la radiothérapie stéréotaxique en préclinique. L'institut a récemment acquis un système de micro-irradiation, le SARRP.

a. Présentation du SARRP

Le *Small Animal Radiation Research Platform* ou SARRP est un système d'irradiation guidé par l'image développé par Xstrahl, dont l'utilisation est dédiée à l'étude de l'irradiation ciblée du petit animal (Figure 30). Cet irradiateur utilise comme source un tube à rayons X, soumis à une tension de 220 kV et d'une intensité de 13 mA pour les irradiations (énergie moyenne de 69 keV) et une tension de 60 kV et une intensité de 0,8 mA pour l'acquisition des images. L'irradiation de très petits volumes est possible via l'utilisation de collimateurs adaptés permettant d'avoir des tailles de champ comprises entre 0,5 mm de diamètre à 10 x 10 mm^2. Les collimateurs sont positionnés à la sortie du tube à rayons X, lui-même monté sur un bras iso-centrique, permettant des irradiations à ±180° en faisceau unique, en multifaisceaux ainsi qu'en arc thérapie (faisceau continu). Des irradiations non-coplanaires sont également possibles grâce aux déplacements du lit en carbone.

Le SARRP dispose d'un système d'imagerie embarquée, reposant sur la technique CBCT (*Cone Beam Computed Tomography*). Cette technique nécessite une source de

rayonnements X conique, un détecteur plan et d'un système informatique permettant de traiter les images. Le détecteur et la source de rayonnements (à 90° par rapport à sa position d'origine, figure 30B) sont fixes et c'est grâce à la rotation de la table de traitement (360°) que l'acquisition des images va pouvoir s'effectuer. En effet, pendant toute la rotation de la table de traitement, les rayons X vont traverser le corps anatomique et vont être réceptionnés par le détecteur. La mesure de l'atténuation des rayonnements X suivant toutes les directions nous permettra de calculer la structure interne de l'objet imagé grâce à l'utilisation d'algorithmes sophistiqués. Le principal avantage de cette technique est de nous offrir la possibilité d'obtenir des coupes axiales, sagittales et coronales (reconstruction 3D de l'animal) et avec des doses beaucoup plus faibles que le scanner classique.

Le CBCT du SARRP permet donc de réaliser des images scanner à haute résolution (200µm) et de cibler au mieux la zone à irradier grâce au système de planification de traitement MURIPLAN (*Treatment Planning System*). Ce système, exclusivement développé pour le SARRP, va permettre la planification du traitement et de la dose, la reconstruction tridimensionnelle à partir des acquisitions CBCT, le calcul courbes iso-doses et des histogrammes doses-volumes (HDV), le tout avec un temps de calcul très rapide.

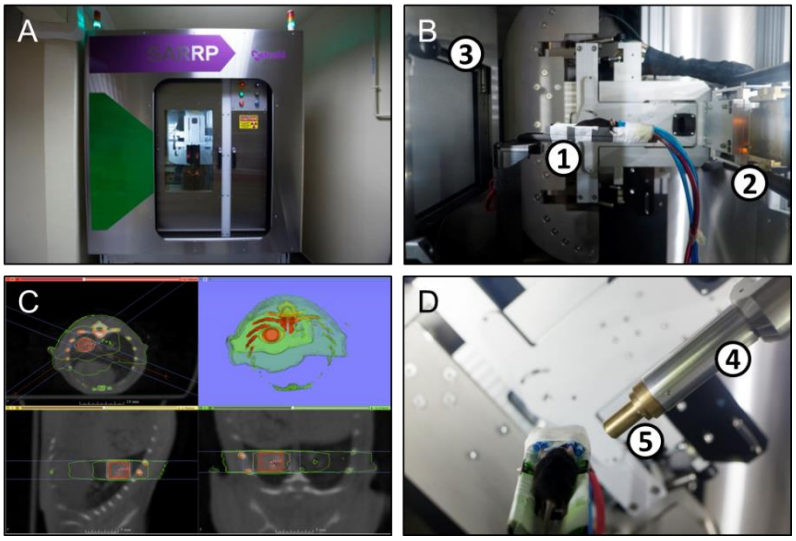


Figure 30. Le *Small Animal Radiation Research Platform* (SARRP)
Le SARRP permet l'irradiation localisée du petit animal (A). Celui-ci est posé sur un lit en carbone(B1) capable de bouger selon 4 degrés de liberté (x, y, z et θ). Avant le traitement, une image scanner est réalisée par *Cone Beam Computed Tomography* (CBCT). La tête de l'irradiateur (B2) génère un faisceau conique de rayonnements de faible énergie, les images sont acquises via le détecteur (B3). Grâce au système de planification de traitement (TPS), l'irradiation très précise d'une structure d'intérêt peut être réalisée. De même, celui-ci calcule la distribution de la dose reçue à travers les courbes iso-doses (C). Une fois le champ d'irradiation défini et les calculs de dose terminés, le collimateur (D4) va être positionné. La tête du collimateur peut être adaptée au volume d'irradiation (D5).

b. Modèle de fibrose pulmonaire radio-induite par le SARRP

Le volume est la limite majeure à l'escalade de dose. Grâce à cet outil, l'irradiation à très fortes doses sur de très petits volumes est possible. La précision du volume cible limite grandement l'impact sur les organes à risque se trouvant dans le champ d'irradiation. Ces caractéristiques nous permettent d'étudier l'impact des fortes doses sur le tissu, en particulier le parenchyme pulmonaire qui nous intéresse ici. Ce type d'étude est particulièrement intéressant lorsqu'on prend en compte que l'hypofractionnement (utilisation de fortes doses par fraction) se démocratise en clinique.

Le modèle mis en place par le laboratoire est un modèle d'irradiation pulmonaire à une dose de 90 Gy délivrée avec le collimateur de 3 x 3 mm^2 (débit de 2,2 $Gy.min^{-1}$ à 1 cm de profondeur en dose dans l'eau), en dose unique et en arc thérapie. Cette stratégie en arc thérapie a été choisie de manière à avoir un dépôt de dose très localisé à l'intérieur du poumon gauche (figure 30C) et limiter les dommages à la peau. La plupart des protocoles utilisés pour des irradiations en conditions stéréotaxiques proposent un schéma fractionné. Nous avons donc également développé un modèle fractionné : initialement, le laboratoire a mis en place un schéma de trois fois 20 Gy. Bien que celui-ci soit parmi les plus forts en clinique, il n'est pas suffisant pour induire la fibrose chez la souris. Nous avons donc augmenté la dose totale et réalisé un schéma cinq fois 20 Gy. Nous développerons plus en détails ces deux modèles au cours de la discussion.

Problématique et objectifs

La radiothérapie est un outil indispensable dans le traitement des patients atteints de cancers. Malgré de larges avancées techniques et technologiques en matière de précision et de balistique, la présence de tissus sains dans le champ d'irradiation reste inéluctable. Les rayonnements utilisés dans ce type de thérapie induisent des effets moléculaires, cellulaires et tissulaires complexes pouvant être persistants. Ces mécanismes sont à l'origine d'effets secondaires chroniques des radiothérapies, tels que la fibrose radio-induite.

Le Laboratoire de Radiobiologie des expositions Médicales (LRMed) a montré que les évènements vasculaires précoces, notamment au niveau endothélial, sont déterminants dans le devenir tissulaire et dans la dérégulation du système de cicatrisation après irradiation. L'activation endothéliale radio-induite participe, entre autre, à l'établissement d'un phénotype pro-coagulant et pro-inflammatoire. Ce phénotype favorise le recrutement chronique de cellules circulantes et est soupçonné d'être à l'origine des effets délétères. Outre l'activation de l'endothélium, l'établissement d'un microenvironnement pro-inflammatoire peut également être induit par l'acquisition d'un phénotype sénescent des cellules endothéliales. La présence de cellules sénescentes au sein de l'endothélium irradié a déjà été observée *in vivo*, mais leur implication dans le développement de pathologies radio-induites n'a, à ce jour, jamais été démontrée. Récemment, de nombreux travaux ont démontré que le phénotype sénescent participe au développement de la fibrose. Cependant, la contribution de chaque compartiment cellulaire demeure incertaine.

L'objectif de ce travail de thèse est d'identifier et de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la sénescence endothéliale radio-induite, d'élucider ses relations avec l'acquisition d'une dysfonction chronique pathologique et de démontrer son implication *in vivo* dans des modèles précliniques.

Résultats

Article : Stereotactic lung irradiation in mice promotes long term senescence and lung injury.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse sont soumis en tant que premier auteur dans European Respiratory Journal. Le manuscrit de l'article suit cette courte introduction et présente les résultats de l'étude.

Objectifs :

Parmi les techniques de radiothérapie dans le traitement du cancer, la radiothérapie en conditions stéréotaxiques (SBRT, *Stereotactic Body Radiation Therapy*) s'est peu à peu établie comme traitement de références pour les patients atteints de cancers pulmonaires non à petites cellules (NSCLC, *Non-Small Cells Lung Cancer*) inopérables et depuis peu, refusant la chirurgie. Ce type de traitement, caractérisée par l'utilisation de fortes doses par fraction grâce au ciblage, par imagerie, de très petits volumes, offre un excellent taux de contrôle tumoral. Cependant, elle n'est pas sans le développement d'effets secondaires indésirables comme les pneumopathies et la fibrose radio-induites. Dans ce travail, nous avons suivi la sénescence *in vivo* par l'utilisation du modèle murin $p16^{INK4}$-Luciferase et tenté d'élucider l'implication de ce phénotype dans le développement des lésions pulmonaires radio-induites. Nous avons également étudié en profondeur, à l'aide d'une approche multidisciplinaire alliant biologie, mathématiques et bio-informatique, la sénescence endothéliale radio-induite au niveau transcriptionnel.

Résultats :

À l'aide d'un modèle d'irradiation pulmonaire en arc thérapie développé au laboratoire, nous avons montré que l'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques à des doses ablatives induit l'expression de $p16^{INK4}$ de manière permanente, jusqu'à 21 mois. Les cellules présentant des marqueurs de sénescence (β-galactosidase, p21, p16) sont essentiellement retrouvées autour de la lésion fibreuse. Ces cellules comprennent des macrophages, des pneumocytes de type II et des cellules endothéliales. Parce que l'endothélium est un compartiment clé dans les lésions aux tissus sains et un point de contrôle de la réponse immunitaire, nous avons caractérisé la sénescence endothéliale radio-induite *in vitro*. Par analyse globale de 6 lignées endothéliales primaires humaines, nous montrons que les HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) sont un très bon modèle pour l'étude de ce phénotype. La sénescence radio-induite a été étudiée dans ces cellules primaires, à travers divers paramètres biologiques (détection de la β-galactosidase, marquages

immunocytochimiques, capacités prolifératives et de sécrétion). Pour établir le profil moléculaire dynamique de la sénescence des HUVECs, nous les avons irradié à 9 doses (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 et 20 Gy) et analysé à 7 pas de temps (1, 2, 3, 4, 7, 14 et 21 jours). Un total de 44 gènes impliqués dans la sénescence a été mesuré au niveau transcriptionnel. Par analyse mathématique et bio-informatique nous avons établi un réseau d'inférence propre à la sénescence radio-induite des HUVECs et à l'aide de celui-ci, avons identifié la voie de signalisation de l'IL-1 comme régulateur du phénotype sécrétoire de la sénescence (SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*). L'immunomarquage de l'IL1R1 *in vivo*, récepteur de l'IL-1, a montré sa surexpression au niveau de la lésion radiologique pulmonaire. La surexpression de l'IL-1α au niveau transcriptionnel est, de plus, retrouvée dans la lésion *in vivo*.

Conclusion :

Par ce travail, nous avons montré que l'irradiation pulmonaire à des doses ablatives induit la sénescence à court et long terme. Avec l'augmentation croissante du nombre de patients traités par SBRT, il devient aujourd'hui nécessaire de mieux comprendre les effets associés à la sénescence et, ses conséquences. Ces travaux soulignent à la fois la pertinence et les particularités de l'étude des lésions pulmonaires focales induites par la SBRT et le fait que les processus pathologiques sont différents dans ce contexte des modèles précliniques classiques étudiant la fibrose sur de grands volumes d'irradiation.

Stereotactic lung irradiation in mice promotes long-term senescence and lung injury

Frederic Soysouvanh *[1,2], Mohamed Amine Benadjaoud *[3], Morgane Dos Santos [4], Michele Mondini [5,6,7], Jeremy Lavigne [1, 2], Annaig Bertho[1, 2], Valérie Buard [1], Georges Tarlet [1], Serge Adnot [8], Eric Deutsch [5,6,7,9], Olivier Guipaud [1], Vincent Paget [1], Agnes François [1], Fabien Milliat [1,¶].

[1]IRSN, Radiobiology of medical Exposure Laboratory, Fontenay-aux-Roses, France
[2]Sorbonne University, Doctoral College, F-75005, Paris, France
[3]IRSN, Department of radiobiology and regenerative medicine, Fontenay-aux-Roses.
[4]Radiobiology of Accidental Exposure Laboratory (LRAcc), Fontenay-aux-Roses, France
[5]Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, SIRIC SOCRATE, F-94805, Villejuif, France
[6]INSERM, U1030, Labex LERMIT, F-94805, Villejuif, France
[7]Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, F-94270, Le Kremlin-Bicêtre, France
[8]INSERM U955, Créteil, France
[9]Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Département de Radiothérapie, DHU TORINO, F-94805, Villejuif, France

*Co-first authors
[¶]Corresponding author: Fabien Milliat. Email: fabien.milliat@irsn.fr

Grant support: This work was supported by the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (ROSIRIS program).

Author contributions: FS, MAB, MDS, OG, VB, VP, AF performed experiments, interpreted the results, and wrote the manuscript. MM, JL, AB, VB, GT performed experiments and interpreted the results. FS, MAB, MDS, MM, VP, OG, FM performed analyses. SA, ED provided material support and critically reviewed the manuscript. FS, MAB, MDS, OG, VP, AF, MM, JL, VB, GT, SA, ED edited the manuscript. FM conceived and designed the work, wrote the manuscript, and supervised the project.

Additional information: The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements: We thank the GSEA (Groupe de Soutien à l'Experimentation Animale) of the IRSN for their excellent technical assistance with the breeding of mice.

Abstract

Stereotactic lung irradiation can induce radiation pneumonitis and fibrosis in normal tissues. We investigated in vivo and in vitro the effects of ablative doses of ionising radiation on senescence-associated processes. $p16^{INK4}$-LUC knock-in mice were exposed to a millimetric single dose or fractionated radiation doses to the left lung using stereotactic body radiation therapy (SBRT). We show that ablative radiation induces acute and very long-term p16INK4 activation in the irradiated lung target volume associated with lung injury. Interestingly, we observed a panel of heterogeneous senescent cells including pneumocytes, macrophages and endothelial cells (ECs) that accumulated around the radiation-induced lung focal lesion. Because endothelium is known to play a key role in radiation-induced normal tissue injury and is a hub for immune cell infiltration, we focused on radiation-induced senescence in ECs. Using a systems biology approach, we deciphered the dynamic senescence-associated transcriptional programme triggered by irradiation and identified the IL1-signalling pathway as a key player of radiation-induced premature senescence of ECs. We provide crucial information on the long-term effects of ablative radiation doses in the lung and show for the first time that stress-induced senescence after SBRT needs to be explored in depth.

Introduction

Stereotactic body radiation therapy (SBRT) has become the treatment of choice for patients with early stage, inoperable non-small cell lung cancer (NSCLC) or for those who refuse surgical resection [1, 2]. SBRT allows the use of high dose-per-fraction sizes through the image-guided precise targeting of very small volumes and provides an excellent tumour control rate, albeit with persisting adverse effects such as radiation pneumonitis and radiation-induced lung fibrosis [3-6]. Efforts have to be made to understand the pathophysiological mechanisms responsible for the side effects of these new treatment modalities.

Senescence is a regulated response to stress characterized by a durable cell cycle arrest and a persistent pro-inflammatory phenotype called the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) [7-9]. Senescence is a variable process depending on both cell type but also the stressor and was shown to be involved in wound healing processes [10, 11]. The role of senescence in lung function has mainly been studied in age-related diseases. Senescent smooth muscle cells, fibroblasts or alveolar epithelial cells are involved in the progression of idiopathic pulmonary fibrosis, (IPF) emphysema and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [12-14]. However, the relative contribution of each cell type remains unclear. Recently, Schafer *et al*. demonstrated that bleomycin injury *in vivo* (an IPF pre-clinical model) induces a senescence phenotype in fibroblasts, epithelial and endothelial lung FACS-sorted cells [15]. DNA-damaging agents or genotoxic stress in general is able to induce senescence. Ionizing radiation promotes senescence in most cell types including endothelial cells (ECs) [16-19]. The participation of endothelium in radiation-induced normal tissue injury has been debated for many years mainly because of the existence or not of endothelial apoptosis [20-22]. Using mouse VE-CADcre or creER^{T2} transgenic mice models in which spatial and temporal gene control can be introduced to target the endothelium, we demonstrated recently that ECs contribute strongly to radiation-induced normal tissue injury and to the associated wound healing process [23-25]. However, the role of EC senescence in radiation injury remains unclear because it depends on dose, fractionation, the organ exposed and the temporality of the observation.

In the present work, we monitored *in vivo* senescence using the p16^{INK4a}-luciferase transgenic model in a relevant preclinical model of SBRT in mice and investigated in depth how ionizing radiation modifies the kinetics of the senescence transcription programme in ECs.

Methods

Experimental animal procedures, treatment planning and dose delivery

Irradiation was performed using a SARRP (Small Animal Radiation Research Platform, XSTRAHL Ltd., UK) which is a high precision micro-irradiation system guided by Cone Beam Computed Tomography images. 3D reconstruction images and dose planning were performed with the Muriplan® treatment planning system [26]. In stereotactic conditions, we irradiated the left lung of a luciferase knock-in mouse model ($p16^{INK4}$-LUC), which reports expression of $p16^{INK4a}$, a senescence biomarker.

The online supplementary material provides all details of mouse models and genotyping, animal experimental procedures, treatment planning and dose delivery, *in vivo* luciferase detection, µCT analysis, histology, IHC and mRNA FISH, cell culture and irradiation procedure, real-time PCR and Taqman low-density array, senescence/cell generation by flow cytometry, replicative senescence experiments, mathematical analyses of *in vitro* dynamic data, bioinformatics analysis, and RNA interference.

Results

Irradiation-induced $p16^{INK4a}$ **activation *in vivo* after lung stereotactic irradiation is associated with lung injury.**

In order to model SBRT, we developed a preclinical model that allows delivery of a high radiation dose in a small lung volume in mice. Mice were irradiated at 90 Gy to the left lung by arc-therapy, which allows long-term follow-up. Dose distribution and Dose Volume Histogram (DVH) showed that mean doses to the left lung, the right lung and the heart were about 17 Gy, 6 Gy and 4 Gy, respectively (fig. 1a). To monitor senescence *in vivo*, we used a luciferase knock-in mouse ($p16^{INK4}$-LUC) which reports expression of $p16^{INK4a}$, a senescence biomarker. Using bioluminescence *in vivo* imaging, which allows the monitoring of $p16^{INK4a}$ activation, we observed a time-dependent increase of p16 activation in the irradiated lung, up to 21 months after irradiation fig.1b-c and fig S2). We checked in mice using 3D reconstruction that the irradiated patch of left lung corresponded to the area of $p16^{INK4a}$ activation (fig.1d). Radiation injury was monitored by µCT analysis at each time point (fig. 2a). Using semi-automatic segmentation, the main bronchi in the left and right lungs (fig. 2b) were manually contoured to quantify the intensity, in Hounsfield units (HUs), in the desired volume. Intensity in the patch increased strongly compared to the ipsilateral lung and contralateral lung (fig.2c and d and fig. S3). Because in the clinic irradiation is fractionated, we also developed a preclinical model of fractionated SBRT with 5 fractions of 20 Gy (fig. 3a and b). Dose distribution and DVH showed that mean doses were very similar to those

observed for a 90 Gy single dose (fig. 3b). In this fractionated schedule, we also observed strong $p16^{INK4a}$ activation at 4, 8, 12 and 15 months post-irradiation (fig. 3c). However, for the fractionated schedule, µCT analyses showed reduced radiation injury compared with a single dose with an effect observed only for the last time point, *i.e.* 15 months (fig. 3d). Microscopic observations after HES, Masson trichrome staining and β-gal detection were performed at 4, 8, 12 and 16 months after 90 Gy irradiation (fig. 4 a and b and fig. S5 and S6). Semi-quantitative results at 4 months showed that β-gal-positive cells were present in the patch, the pleural area and mainly in the ring area near the patch (fig. S4). For later time points, β-gal-positive cells were mainly observed in the ring area around the fibrotic lesion in all mice (fig. 4a and b, fig. S5 and S6). For the fractionated schedule, delimitation between the patch and the ring around is less clear than for single-dose irradiation (fig. 4c and d). We distinguished the area with severe injury and the area with mild injury (*i.e.* corresponding to the "ring" around the lesion core). We observed that at 12 and 15 months post-irradiation β-gal-positive cells were more present in the mild injury area than in severe injury area (fig. 4c and d).

SBRT in mice induces a heterogeneous population of senescent cells.

In order to identify senescent cell types induced by SBRT, we performed several immunostaining and mRNA ISH in single-dose irradiated mice. We identified type II pneumocytes (SPC+), innate immune cells (*CD68*+ macrophages) and ECs (vWF+) as senescent cell types (fig.5). Moreover, double immunolabelling and p21 mRNA *in situ* hybridization revealed strong heterogeneity of senescent cells according to the marker followed, *i.e.* β-Gal, p16 or p21. We identified heterogeneous populations of *-1)* type II pneumocytes including p21-/SPC+/β-Gal-, p21+/SPC+/ β-Gal+, p21+/SPC+/ β-Gal- cells (fig. 5a) of *-2)* macrophages including p21-/CD68+/ β-Gal-, p21-/CD68+/ β-Gal+ cells (fig. 5b) of *-3)* ECs including mRNAp21-/vWF+/ β-Gal- mRNA p21+/vWf+/ β-Gal-cells as well as rare mRNAp21-/vWF+/ β-Gal+ cells, $p16^{INK4}$-/vWF+ and $p16^{INK4}$+/vWF+ cells (fig. 5c). The table shown in fig. 5d summarizes the results obtained for all time points.

Ablative dose of radiation induces a profound senescence phenotype of endothelial cells.

A large panel of senescent cells were identified after stereotactic single/fractionated irradiation of the lung. Because the endothelium is known to play a crucial role in radiation injury and is a hub for immune cell infiltration in the lung, we next investigated the transcriptional programme involved in radiation-induced EC senescence. The choice of the EC type is crucial and we first compared the response of 6 EC types after radiation exposure

using a custom TLDA (Taqman Low-density Array) allowing the simultaneous measurement of the expression level of 44 mRNAs involved in senescence (fig. S7). Each EC type displayed a specific mRNA signature and the “endothelial response” was different for mesenchymal cell types BSMC and NHLF (fig. 6a and fig. S8). We evaluate for each EC line the concordance between its transcriptional response and the first principal component (PC) scores of the five others. As the first PC represents the direction along which the data exhibit the largest variation, this procedure permits to show the capacity of an endothelial cell to summarize the major dispersion in the remaining line type response. The result strongly suggests that HUVECs are the best EC model for the study of endothelial senescence (fig. 6b). Therefore, we studied radiation–induced senescence in HUVECs and observed typical marks and characteristics, *i.e.* cellular hypertrophy, β-gal expression in lysosomes, p21 overexpression and laminB1 downregulation (fig. S9). Senescence quantification 7 days after 10 Gy by flow cytometry (FC) showed a 50% increase in senescent cells associated with hypertrophy (fig. S10 and 11). We jointly quantified senescence and proliferation by FC using C_{12}FDG and CellTrace^{TM} probes. Irradiation dose-dependently induced C_{12}FDG cleavage associated with cell size increase, which plateaued at 6 Gy in parallel with a decrease proliferation (fig. 6c-d and fig. S10 and S11). To confirm a robust signature of the transcriptional senescence-associated programme, we exposed HUVECs to 5, 10 or 20 Gy and FSC-gated biggest cells were FACS-sorted to compare the signature of the total cell layer with the hypertrophic population enriched in C_{12}FDG+ cells. Transcriptomic analysis showed that the radiation response was very similar between total and big cells with a senescent footprint (fig. S11). Moreover, since senescent cells acquire a SASP characterized by the secretion of multiple growth factors and cytokines, we characterized the senescence-messaging secretome (SMS) at 7 and 14 days after 2, 5, 10 and 20 Gy radiation exposure (fig. S12a). Secretion of CXCL1/GROα, IGFBP family, IL6, IL8, MMP7 and PAI-1 increased dose-dependently. Moreover, we explored the ability of this SMS to induce non-cell autonomous, *i.e.* paracrine, effects. The radiation-induced SMS led non-irradiated HUVECs to acquire strong hallmarks of senescence (fig. S12c and e).

Ablative radiation dose-dependent dynamic modification of senescence-associated transcription in ECs.

We next studied the dynamic molecular transcriptional programme associated with senescence in HUVECs after 9 irradiation doses and 7 time points after radiation exposure (fig. S13). The global gene expression profile showed the specific dynamic molecular programme for each gene according to radiation dose exposure (fig. S14). Interestingly, our replicative senescence experiments show that radiation-induced senescence shares a large panel of markers with 9 genes in common between “ageing” HUVECs and irradiated

HUVECs 21 days after 20 Gy (fig. S15). We developed mathematical methods adapted for dynamic processes to analyze in depth the bivariate (dose and time) variance-covariance data structure and to perform a dimension reduction prior to a clustering schema by highlighting all main modes of variability. More precisely, a smoothing bivariate process was first performed to smooth the time- and dose-dependent measurements for a bivariate functional object. An example is shown for 4 genes, *i.e.* CDKN1A, CDKN2A, IL6 and IL8 (fig. 7a) and the process was done for all genes (fig. S16 and 17). Next, a functional principal component analysis was performed to determine the variance structure of the functional data and showed that 4 harmonics explained 90% of the total variability (fig. S18). We then used Lin's concordance coefficient as a similarity measure to identify relevant gene clusters. We identified 4 clusters according to the shape of dynamic variation (fig. 7b) which can be summarized as "early downregulation" "late upregulation composed "downregulation", and "early upregulation" and four genes were not included in any cluster (fig. S19). Finally, we used text mining bioinformatics tools to infer molecular networks for each cluster (fig. 7b) and for all data (fig. 7c). Network inference of the senescence-associated dynamic transcriptional programme in our experiments identified the IL1-dependent signalling pathway as a putative molecular hub which controls molecular entities from clusters 2, 3 and 4 and a large panel of SASP-associated secretory proteins.

IL1-dependent signalling pathway is involved in the radiation-induced EC SASP and radiation-induced senescence.

A subnetwork related to the IL1 signalling pathway was inferred, identifying all molecular relationships with large representation of deregulated genes identified in irradiated HUVECs and highlighted in blue (fig. 8a). To validate our approach, we silenced IL1R1 in ECs prior to irradiation and analyzed the effects on senescence (fig. S20). ILR1 knock-down led to about 20% less senescence at 7 days after irradiation (fig. 8b). TLDA experiments showed that IL1R1 silencing led to a reduced senescence-associated molecular profile 3 and 7 days after irradiation (fig. 8c and d). Interestingly, in C56BL6/J mice exposed to SBRT 90 Gy single dose, we observed increased immunostaining of IL1R1 in the patch and around the patch (fig. 8e) as well as mRNA overexpression of IL1A in the patch (fig. 8f). Taken together, these data suggest that the IL1 pathway plays an important role in radiation-induced senescence, both *in vitro* and *in vivo*.

Discussion

Lung cancer will be treated more and more using SBRT. Therefore, preclinical research to model long-term toxicity of ablative doses of radiation is crucial [27, 28]. The main preclinical studies on radiation-induced lung injury were performed using whole or hemi-thorax irradiation [29]. In this work, we developed a powerful preclinical model to understand radiation-induced biological effects of a focal single dose and of fractionated ablative radiation doses to the lung. For the first time, we identify senescence as an important process in acute and long-term SBRT-induced lung toxicity. Recently, several studies have explored the effects of SBRT in mice using one fixed beam leading to severe skin injury and consequently not allowing long-term studies [3, 5, 6]. Using multi-beam arc therapy with a single dose and for the first time with a fractionated schedule, we show that SBRT exposure of $p16^{INK4}$-LUC mice induces long-term $p16^{INK4a}$ activation and that a ring around the radiation-induced focal lesion was the main spatial region showing heterogeneous senescent cell populations including macrophages, type II pneumocytes and ECs. After hemi-thorax irradiation in mice it was shown that effective senolytic drugs could act via action of senescent type II pneumocytes [30]. Interestingly, using either a senolytic cocktail composed of dasatinib plus quercetin or the INK-ATTAC “suicide” mouse model to induce apoptosis in p16Ink4a-expressing cells, Schafer *et al.* showed that senescent fibroblast clearance mitigates bleomycin-induced lung fibrosis. Moreover, chemotherapeutic genotoxic drugs induce the chronic presence of senescent cells in normal tissue, thus contributing to chemotherapy-induced adverse effects [31]. Specific clearance of senescent cells limits doxorubicin chemotoxicity and restores tissue homeostasis [32], even if the cell targeted remains unclear. We show in our work that many cell populations are senescent and we cannot exclude that senolytic drugs reducing radiation-induced fibrosis and chemotherapy-induced side effects also act by reducing the pools of immune or senescent ECs. Our work strongly suggests that many cell types could play a role and that the dynamics of as well as the dynamic interactions between each cell type compartments should be investigated in order to improve putative therapeutic strategies and their sequences of actions.

We chose to focus our attention on the endothelium, previously shown to be an orchestrator of radiation-induced normal tissue injury, and we developed a step-by-step approach to provide rational evidence that HUVECs are an excellent *in vitro* model for the study of stress-induced senescence. To our knowledge, our results are the first based on an unbiased systematic cell type origin comparison of stress-induced senescence. We demonstrate that irradiated HUVECs recapitulate the overall endothelium transcriptional programme and strongly suggest that radiation-induced premature senescence in HUVECs

can be used to explore endothelial senescence-associated dysfunctions in the pathological ageing process.

Using an interdisciplinary approach, we deciphered the dynamic transcriptional programme of radiation-induced EC senescence and showed non-cell autonomous effects strongly suggesting that *in vivo* endothelium can impact the senescence phenotype of other cell types by paracrine effects. Ritschka *et al*. recently reported that transient exposure to a SASP induces plasticity and provides regenerative signals, whereas prolonged exposure subsequently blocks growth-promoting signals, resulting in paracrine senescence responses and decreased regenerative capacity [33]. Moreover, it was shown that radiation-induced EC senescence promotes a pro–atherosclerotic phenotype and promotes monocyte adhesion by an epigenetic activation of CD44 expression, suggesting a capacity of senescent ECs to control inflammation. *In vivo* we observed heterogeneous senescent cell populations and further investigations are needed to know whether *in vivo* endothelium can promote the senescence of other cell types such macrophages, which recently were reported to play a crucial role in radiation fibrosis after whole-thorax irradiation [34].

Hernandez-Segura *et al*. recently reported the importance of dynamic variations in fibroblasts and in cell-specific heterogeneity of the senescence programme [35]. Our *in vitro* results confirm that time series measurements give crucial information and that biomathematical network-based clustering analyses reveal putative molecular hubs able to limit senescence progression. A panel of several molecular hubs has been extracted from our analysis, including the SIRT1, SP1, SMAD7 and IL1 signalling pathways. The rationale for targeting the IL1 signalling pathway was to find a putative molecular hub that controls a large panel of SASP-associated secretory proteins without affecting molecular entities associated with cell cycle progression. IL-1α and IL-1β-KO mice exhibit a prolonged ovarian lifespan by reducing the expression of inflammatory genes. Moreover, IL1R1 KO mice were protected from pulmonary hypertension by IL1R1-dependent inhibition of macrophage recruitment and activation [36]. *In vitro*, inhibition of the IL1 signalling pathway by different strategies reduced senescence-associated IL-6/IL-8 secretion in HCA2 primary foreskin fibroblasts [37]. Here, targeting IL1R1, we showed that the IL1 signalling pathway affects the SASP of ECs as well as the degree of senescence, showing that IL1 could be a good therapeutic target to limit senescence and non-cell autonomous paracrine effects in a context of ablative dose radiation exposure. Further studies will help to elucidate the role of the IL1 pathway *in vivo* in response to SBRT, e.g. evaluating the development of senescence in IL1R KO mice.

To conclude, we have demonstrated that ablative doses of radiation promote senescence. With a prolonged life of lung cancer survivors treated with SBRT alone or in combination with immunotherapy [38, 39], it will be crucial to understand better senescence–associated effects and putative long-term detrimental consequences. This work highlights both the relevance and the particularities of studying SBRT-induced focal lung injury and shows that pathological processes are different in this context from those in classical preclinical models using large-volume radiation-induced fibrosis.

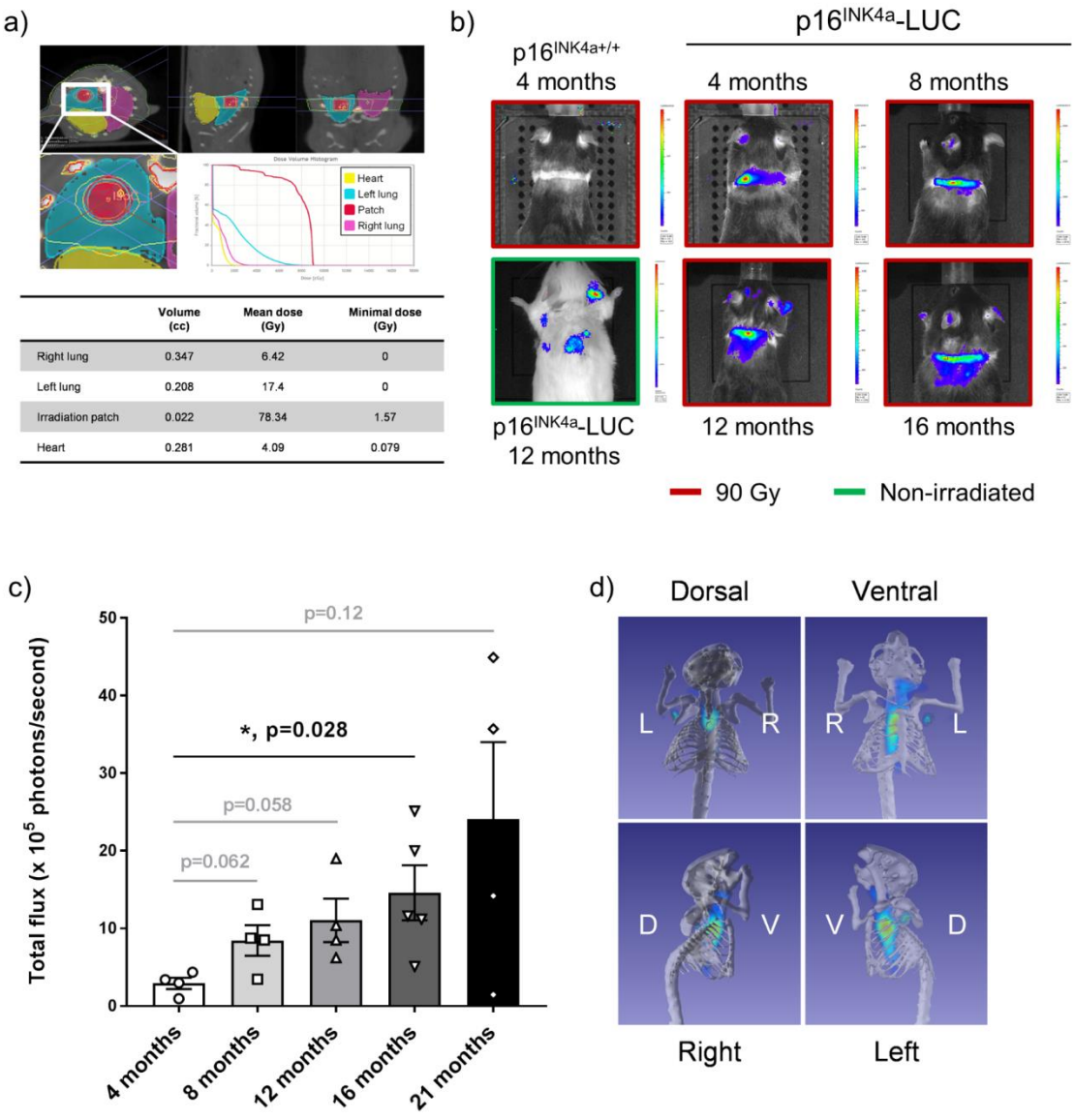


Figure 1: Single dose of stereotactic irradiation in mice induces focal activation of p16^{INK4}. Stereotactic 90 Gy single doses to the left lung of p16^{INK4}-LUC mice were delivered using a SARRP. a) Representative dose distribution, dose volume histogram and table of estimated doses for the target (*i.e*. the irradiation patch in red), the left lung (excluding the target patch in cyan), the right lung (pink) and the heart (yellow) after 90 Gy single doses using the Muriplan® treatment planning system. b) Example of 2D bioluminescence images obtained in irradiated p16^{INK4}-LUC mice at 4, 8, 12 and 16 months. Control p16^{INK4} +/+ mouse at 4 month and 1-year old p16^{INK4}-LUC non-irradiated mouse are shown. Irradiated mice are encased in red and non-irradiated in green. c) Bioluminescence quantification in irradiated p16^{INK4}-LUC mice at 4, 8, 12, 16 and 21 months after 90 Gy single doses (n=4 to 5 mice per group). Mean ± SEM are plotted. Unpaired t-test with Welch's correction; *, p-value < 0.05. d) Example of 3D bioluminescence reconstruction in p16^{INK4}-LUC mice irradiated at 1 year after a 90 Gy single dose showing p16^{INK4} activation specifically in the left lung at the site of irradiation.

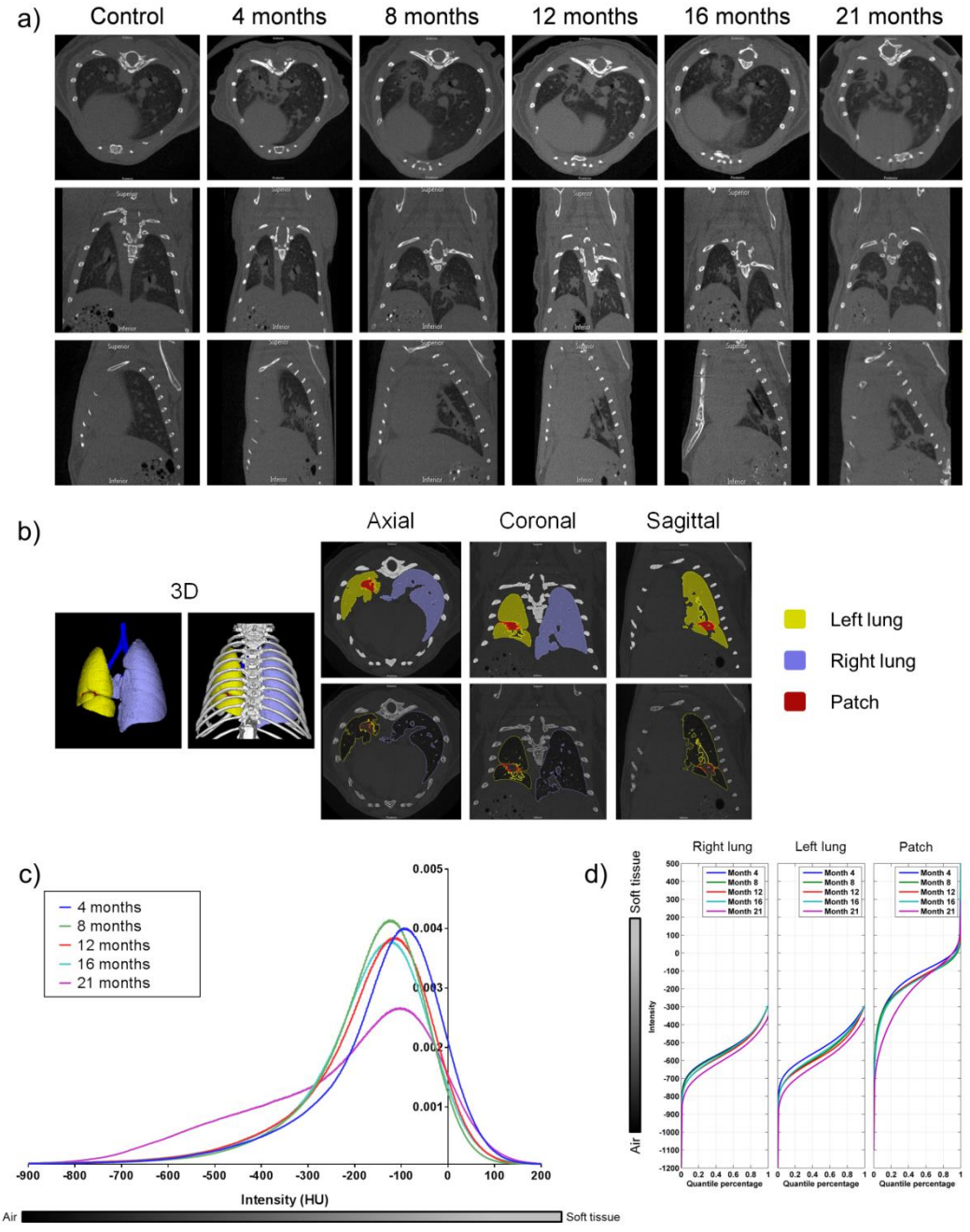


Figure 2: Single dose of stereotactic irradiation in mice induces acute and late focal lung injury. a) Microcomputed tomography longitudinal follow-up of p16^{INK4}-LUC mice at 4, 8, 12, 16 and 21 months after 90 Gy single doses (n=4 to 5 mice per group). b) Example of 3D image segmentation for quantification of lung injury in p16^{INK4}-LUC mice 1 year after radiation. c) Smoothed mean intensity, in Hounsfield units (HUs), representation in the patch from groups of mice at 4, 8, 12, 16 and 21 months after 90 Gy single doses. d) Graphical representation of quantile percentage of each means distribution according to intensity in HUs.

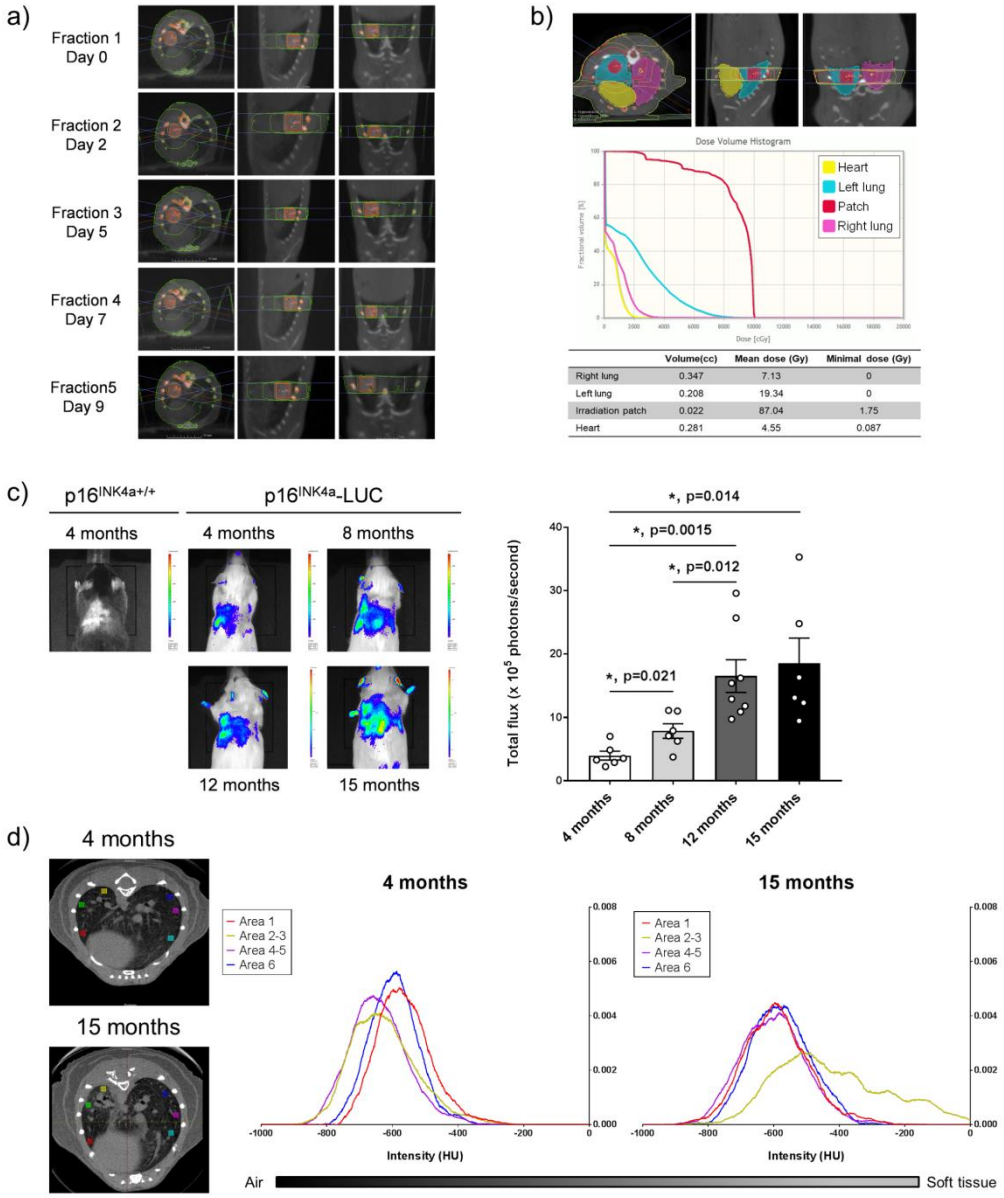
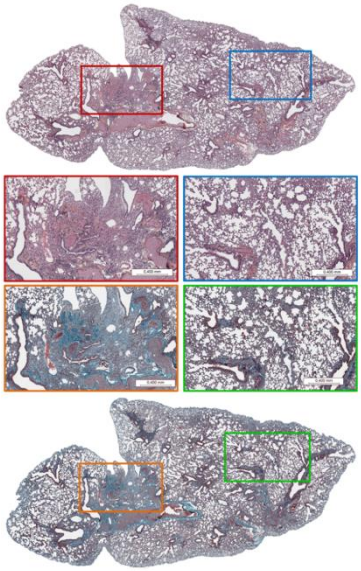
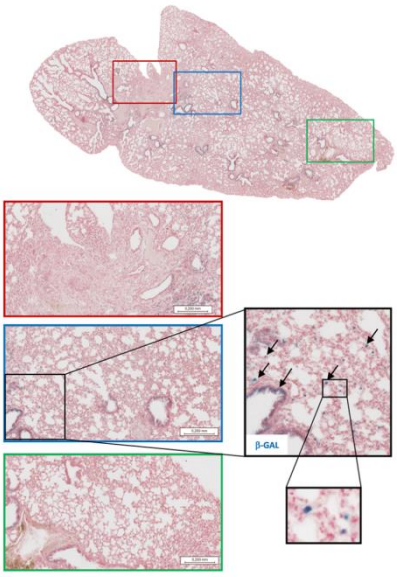


Figure 3: Stereotactic fractionated irradiation in mice induces focal activation of p16^{INK4}. Stereotactic fractionated doses of 5x20 Gy to the left lung of p16^{INK4}-LUC mice were performed using a SARRP. a) Representative dose distribution of each fraction performed at days 0, 2, 5, 7 and 9 with day 0 as the day of the first fraction. b) Representative dose distribution, DVH and table of estimated doses for the target (*i.e.* the irradiation patch in red), the left lung (excluding the target patch in cyan), the right lung (pink) and the heart (yellow) after 90 Gy single doses using the Muriplan® treatment planning system after 5X20 Gy. c) Example of 2D bioluminescence images in 5x20 Gy-irradiated p16^{INK4}-LUC mice at 4, 8, 12 and 15 months after the first fraction (left). Bioluminescence quantification in irradiated p16^{INK4}-LUC at 4, 8, 12 and 15 months after 5x20 Gy (n=6 to 8 mice per group). Means ± SEM are plotted. Unpaired t-test with Welch's correction; *, p-value < 0.05; ** p-value < 0.01 (right). d) Examples of micro-CT image and ROI (Region of Interest) for 2D quantification of lung injury and smoothed Hounsfield unit (HU) intensity distribution in ROI from groups of mice at 4, and 15 months after 5x20 Gy (n=4 mice per group).

a) 12 months
90 Gy



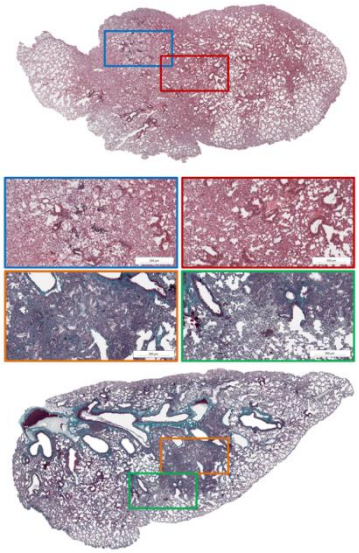
b)



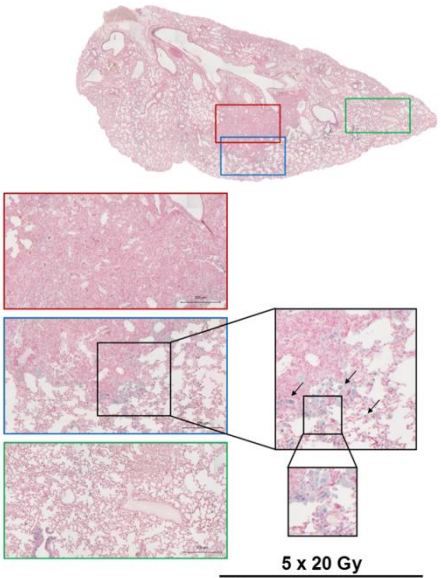
90 Gy

		4 months n=4	8 months n=4	12 months n=4	16 months n=6
β-gal	In the patch	+/-	-	-	-
	Near the patch	++	+	++	++
	Pleural area	+	+/-	+/-	-

c) 12 months
5 x 20 Gy



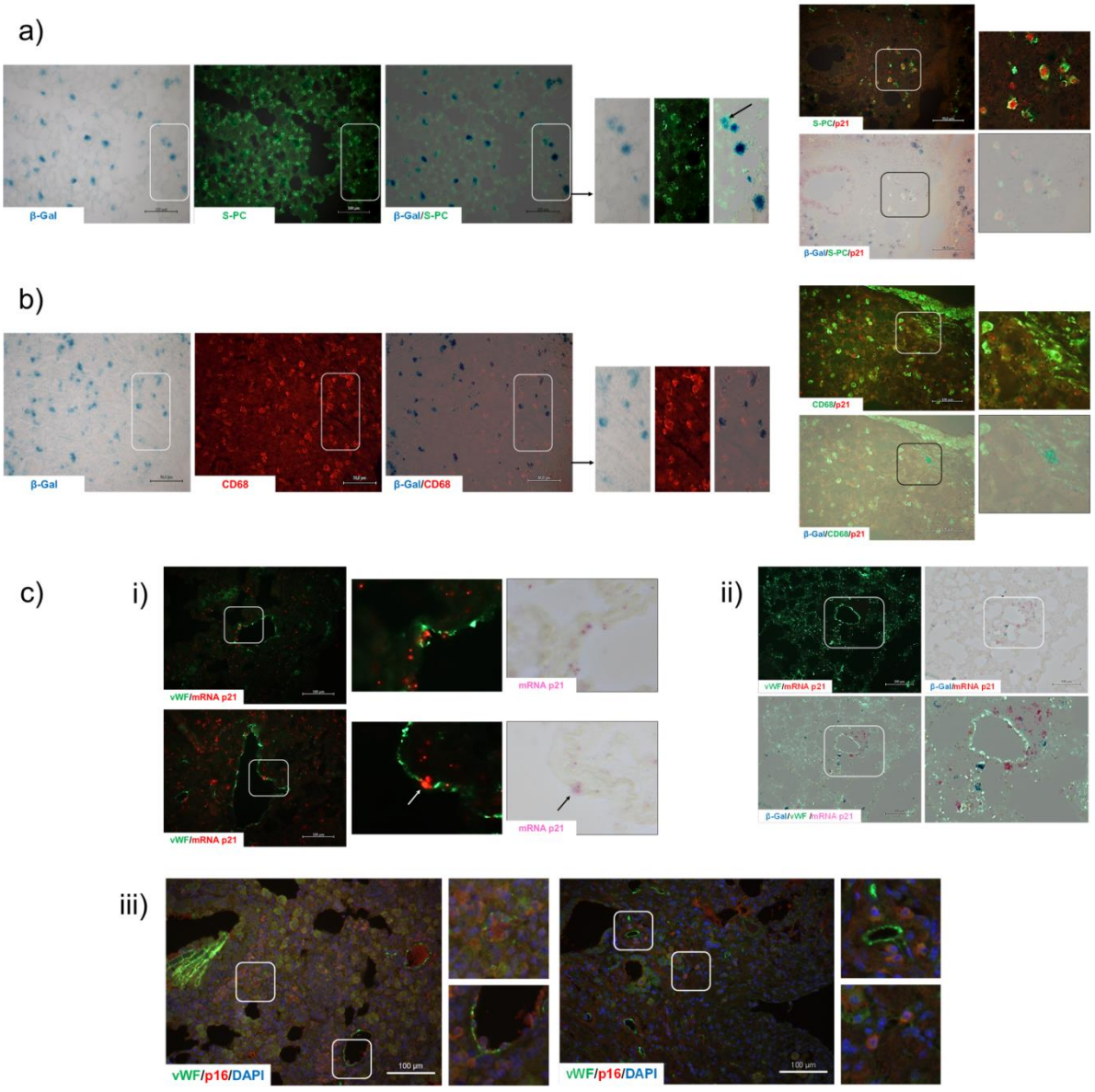
d)



5 x 20 Gy

		12 months n=3	15 months n=6
β-gal	Severe area	-	+
	Mild area	+	++
	Pleural area	+	+

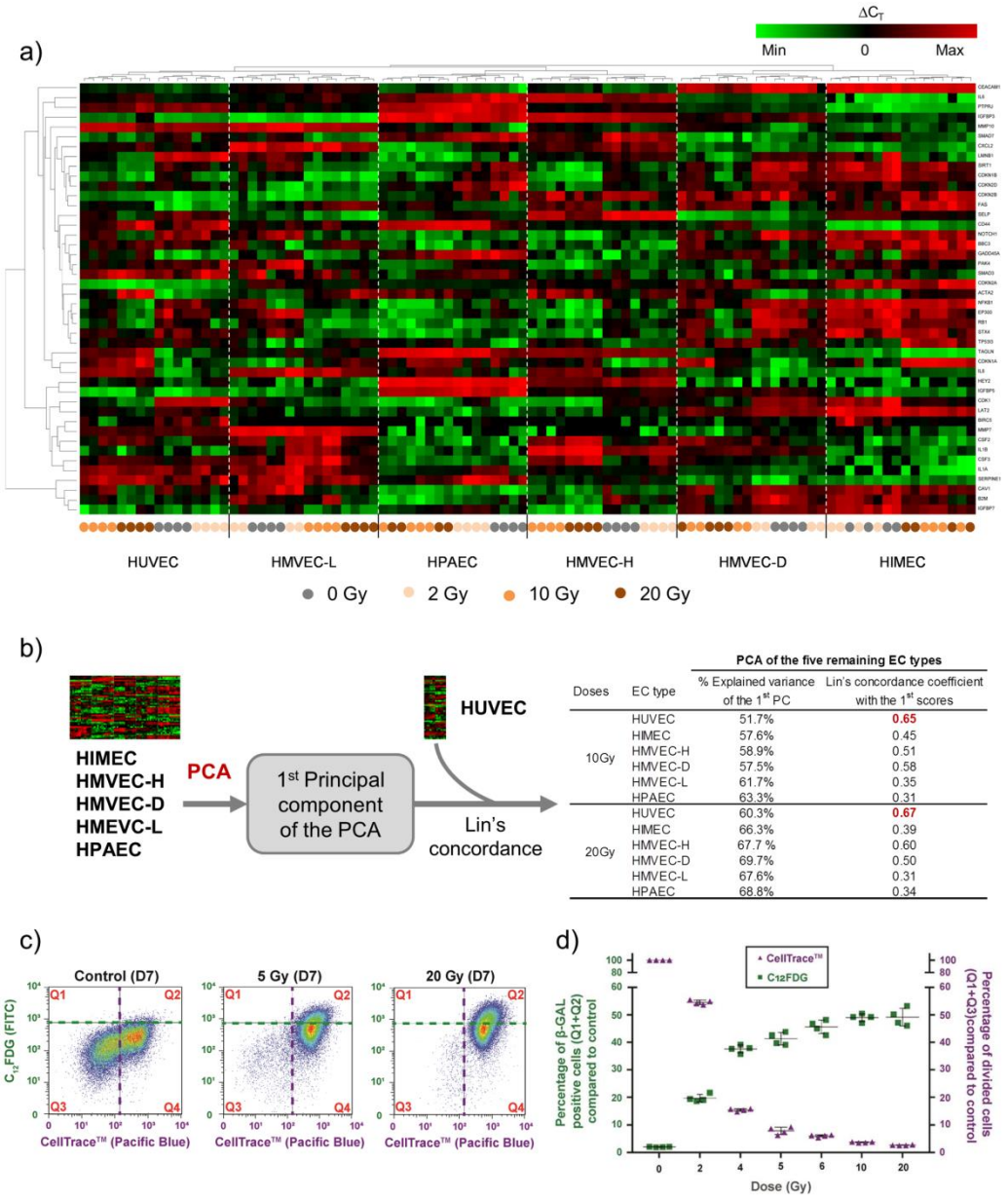
Figure 4: Stereotactic irradiation in mice induces focal radiation lung injury and β-gal-positive cells mainly around the radiation-induced damaged area. Example of microscopic whole-lung mapping obtained in $p16^{INK4}$-LUC mice 12 months after 90 Gy single dose irradiation. a) HES staining (up) with the red rectangle showing the irradiated patch and the blue rectangle showing a normal tissue area in the same lung, Masson trichrome staining (down) with the orange rectangle showing the irradiated patch and the green rectangle showing a normal area in the same lung. b) β-Gal staining/nuclear fast red staining with the red rectangle showing the irradiated patch, the blue rectangle showing a zone around the patch and the green rectangle a normal lung area in the same lung. Presence of β-gal-positive cells is mainly observed in the zone around the patch (n=4 to 6 mice/time). c) Example of microscopic whole-lung mapping obtained in $p16^{INK4}$-LUC mice 12 months after 5x20 Gy fractionated dose irradiation. HES staining (up) with the red rectangle showing the severe area *i.e.* irradiated patch and the blue rectangle showing a mild lesion, Masson trichrome staining (down) with the orange rectangle showing the severe injury area *i.e.* irradiated patch and the green rectangle showing a mild lesion d) β-Gal staining/nuclear fast red coloration with the red rectangle showing the irradiated patch, the blue rectangle showing a zone around the patch and the green rectangle a normal area in the same lung. β-Gal positive cells are mainly observed in the zone around the patch (n=3 to 6 mice).



d)

		90 Gy			
		4 months	8 months	12 months	16 months
Type II pneumocytes expressing senescence markers	In the patch	+	+/-	+/-	+/-
	Near the patch	+	+	+	++
	Pleural area	+	+/-	-	-
Macrophages expressing senescence markers	In the patch	+	+	+	+
	Near the patch	+	+	++	++
	Pleural area	+	+/-	-	-
Endothelial cells expressing senescence markers	In the patch	+/-	+/-	+/-	+/-
	Near the patch	+/-	+/-	+/-	+/-
	Pleural area	-	-	-	-

Figure 5: Heterogenic populations of pneumocytes, macrophages and endothelial senescent cells are present around the radiation-induced damage area after stereotactic irradiation in mice. Representative micrographs of lung tissue from mice irradiated at 90 Gy in single doses at 1 year post-irradiation**.** a) Pneumocytes staining: β-Gal staining and type II pneumocytes marker surfactant protein C (SPC). Arrow indicates a β-gal+/SPC+ cell. Double p21/SPC immunolabelling merged with β-gal staining identifies heterogeneous populations of type II pneumocytes including p21-/SPC+/β-gal- cells, p21+/SPC+/β-gal- cells, p21+/SPC+/β-gal+ cells, p21-/SPC+/β-gal+. b) Macrophages staining: β-gal staining and macrophage marker CD68. Double p21/CD68 immunolabelling merged with β-gal staining identifies heterogeneous populations of macrophages including p21-/CD68+/β-gal- cells, p21+/CD68+/β-gal– cells. c) Endothelial cells staining: i) FISH mRNA p21 (red in fluorescence and pink in visible light) and immune labelling of vWF an endothelial marker. ii) FISH mRNAp21/vWF immunolabelling merged with β-gal staining identifies heterogeneous populations of endothelial cells including mRNAp21-/vWF+/β-gal- cells, mRNA p21+/vWf+/β-gal- cells, as well as mRNA p21+/vWF+/β-gal+ cells. iii) Double $p16^{INK4}$/ vWF immunolabelling identifies heterogeneous populations of endothelial cells including $p16^{INK4}$-/vWF+ and $p16^{INK4}$+/vWF+ cells. No $p16^{INK4}$+/vWf+/β-gal+ cells were observed. d) Table summarizing senescent cell populations and their localization in the lung. It should be noted that we also observed at each time and even for the contralateral lung the presence of β-gal+ bronchial epithelial cells.



PCA of the five remaining EC types

Doses	EC type	% Explained variance of the 1st PC	Lin's concordance coefficient with the 1st scores
10Gy	HUVEC	51.7%	**0.65**
	HIMEC	57.6%	0.45
	HMVEC-H	58.9%	0.51
	HMVEC-D	57.5%	0.58
	HMVEC-L	61.7%	0.35
	HPAEC	63.3%	0.31
20Gy	HUVEC	60.3%	**0.67**
	HIMEC	66.3%	0.39
	HMVEC-H	67.7 %	0.60
	HMVEC-D	69.7%	0.50
	HMVEC-L	67.6%	0.31
	HPAEC	68.8%	0.34

Figure 6: ***In vitro*** **HUVECs recapitulate the radiation-induced transcriptional senescence programme of endothelial cells.** mRNA level of 44 genes involved in the associated senescence transcriptional programme was measured in 6 different human normal ECs by TLDA. Results presented are from two independent experiments performed in duplicate a) Heat map representation of results obtained in HUVECs, HMVEC-L, HPAEC, HMVEC-H, HMVEC-D and HIMEC in control (0 Gy) or irradiated at 2, 10 or 20 Gy. b) Lin's concordance coefficient between HUVECs and the 5 other EC types at 10 and 20 Gy. Transcriptional responses of all EC types, except HUVECs, are analyzed by PCA. Lin's concordance coefficient was calculated between HUVECs and the scores of the first components of the PCA. c) Senescence/proliferation rates of HUVECs were monitored using C_{12}-FDG cleavage detection and CellTrace™ violet by flow cytometry; representative flow cytometry dot plots obtained 7 days after 5 or 20 Gy. In control cells, CellTrace™ fluorescence decrease indicates cell division. Irradiated cells undergo a stable CellTrace™ violet fluorescent signal as well as an increase of C_{12}-FDG cleavage. d) Quantification of proliferation and senescence in HUVECs 7 days after 2, 4, 5, 6, 10 and 20 Gy radiation exposure. Results presented are from 4 independent experiments.

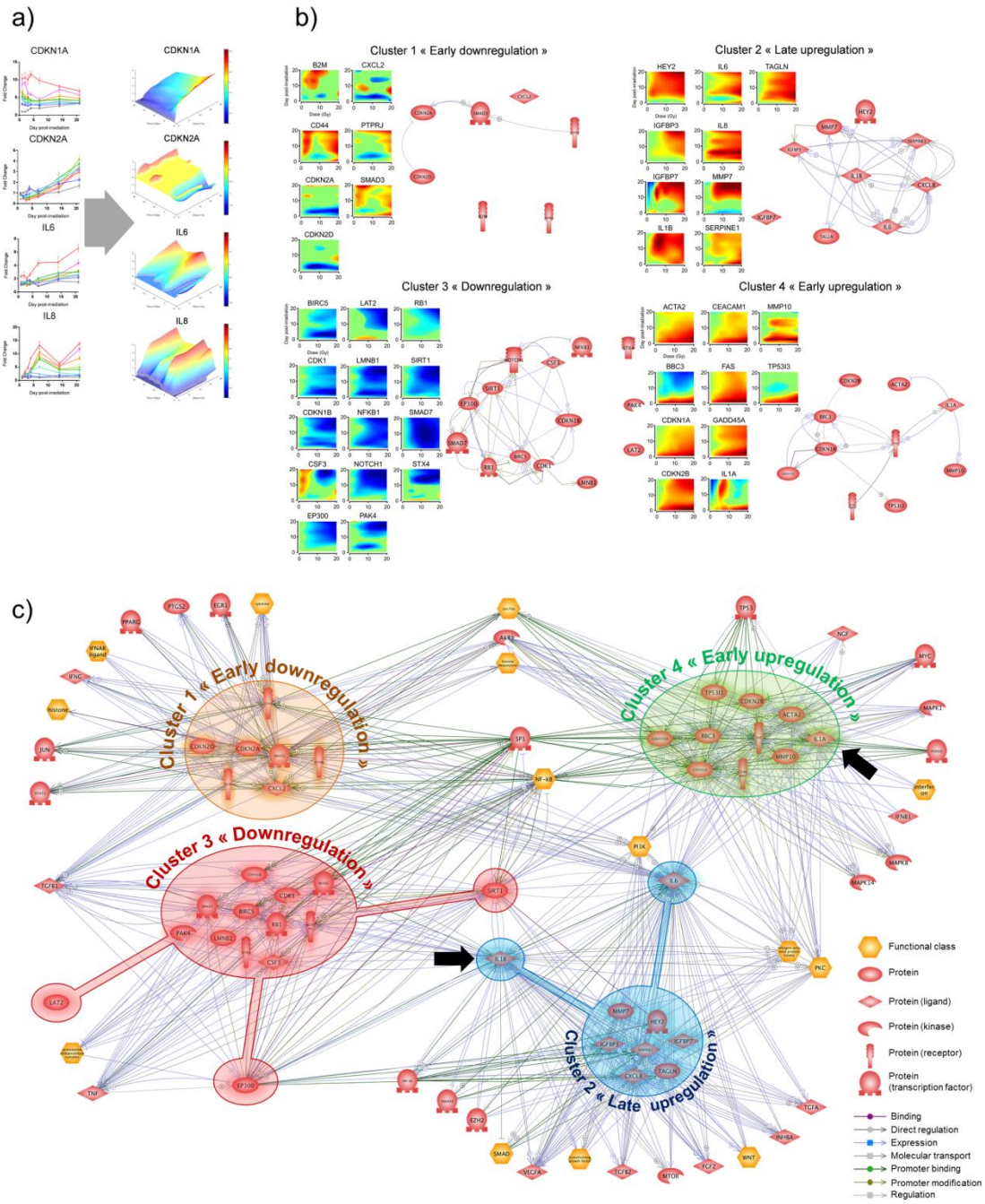
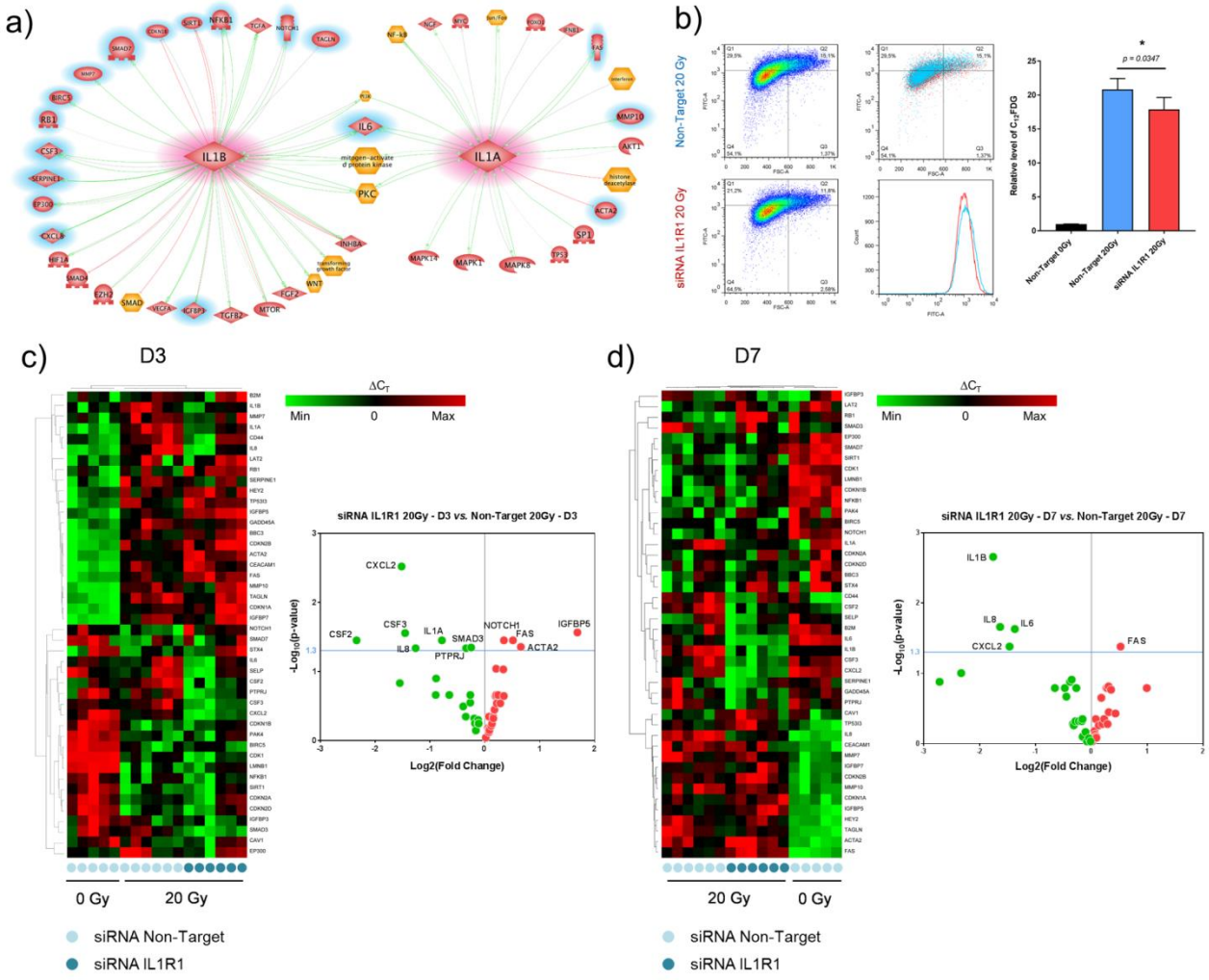


Figure 7: Irradiation dose-dependently induces a dynamic senescence-associated transcriptional programme in endothelial cells

HUVECs were irradiated at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 and 20 Gy and TLDA analyses were performed at different time points *i.e.* 1, 2, 3, 4, 7, 14 and 21 days post-radiation exposure. Results presented are from two independent experiments performed in duplicate. a) For each gene, a classical 2D to a smoothing 3D (surface) bivariate f(Dose, Time) process was constructed; examples for CDKN1A (p21) , CDKN2A (p16^{INK4}), IL6 and IL8 are shown. b) A similarity base distance method clustering revealed 4 main clusters (1 to 4) of mRNA expression variation and a network inference with text mining-based tool was constructed for each cluster. c) Global network inference of senescence-associated dynamic transcriptional programme in endothelial cells was inferred in order to identify putative key nodes.



		90 Gy	
		12 months	16 months
		n=4	n=4
IL1R1	In the patch	++	++
	Pleural area	+	+

Figure 8: IL1 signalling pathway impacts radiation-induced SASP and senescence in ECs *in vitro* and is upregulated after stereotactic irradiation *in vivo*. HUVECs were transfected with IL1R1 siRNA in order to limit the IL1-dependent signalling pathway in HUVECs. a) Data mining-based network inference showing relationship between molecular entities and Il1-dependent signalling as a hub to impact. Entities with a blue halo were measured in these experiments. b) Senescence rates of HUVECs transfected or not with IL1R1 siRNA were monitored using C_{12}-FDG cleavage detection by flow cytometry. c) Heat map of TLDA analysis obtained at 3 days and d) 7 days from control HUVECs and irradiated HUVECs transfected or not with IL1R1 siRNA. Volcano plots obtained at day 3 and day 7 from irradiated HUVECs transfected with NT targeting siRNA versus or not IL1R1 siRNA are shown. e) Example of microscopic IL1R1 immunostaining whole-lung mapping obtained in $p16^{INK4}$-LUC mice 12 months after 90 Gy single dose irradiation (n=4 to 6 mice per group) with the red rectangle showing the irradiated patch and the green rectangle showing a normal tissue area in the same lung. f) mRNA expression of IL1a, IL1b and IL1R1 in control C57BL6J WT mice (n=5, green bar) or in C57BL6J WT mice 1 year after a 90 Gy single dose irradiation (n=8). Measurements were performed in irradiated mice both in the patch (red bar) and in the ipsilateral lung near to the patch (orange bar). Means ± SEM are plotted. Unpaired t-test with Welch's correction; *: p-value < 0.05.

References

1. Verma, V., C.B. Simone, 2nd, and W. Zhen, *Stereotactic Radiotherapy for Stage I Small Cell Lung Cancer.* Oncologist, 2016. **21**(2): p. 131-3.
2. Chua, K.L.M., et al., *Stereotactic body radiotherapy for early stage lung cancer-historical developments and future strategies.* Chin Clin Oncol, 2017. **6**(Suppl 2): p. S20.
3. Cho, J., et al., *High dose-per-fraction irradiation of limited lung volumes using an image-guided, highly focused irradiator: simulating stereotactic body radiotherapy regimens in a small-animal model.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010. **77**(3): p. 895-902.
4. Hong, Z.Y., et al., *Development of a small animal model to simulate clinical stereotactic body radiotherapy-induced central and peripheral lung injuries.* J Radiat Res, 2014. **55**(4): p. 648-57.
5. Hong, Z.Y., et al., *A preclinical rodent model of acute radiation-induced lung injury after ablative focal irradiation reflecting clinical stereotactic body radiotherapy.* Radiat Res, 2014. **182**(1): p. 83-91.
6. Hong, Z.Y., et al., *Time, Dose, and Volume Responses in a Mouse Pulmonary Injury Model Following Ablative Irradiation.* Lung, 2016. **194**(1): p. 81-90.
7. Burton, D.G. and V. Krizhanovsky, *Physiological and pathological consequences of cellular senescence.* Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(22): p. 4373-86.
8. Kuilman, T. and D.S. Peeper, *Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(2): p. 81-94.
9. Herranz, N. and J. Gil, *Mechanisms and functions of cellular senescence.* J Clin Invest, 2018. **128**(4): p. 1238-1246.
10. Demaria, M., et al., *An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA.* Dev Cell, 2014. **31**(6): p. 722-33.
11. Ferreira-Gonzalez, S., et al., *Paracrine cellular senescence exacerbates biliary injury and impairs regeneration.* Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1020.
12. Alvarez, D., et al., *IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017. **313**(6): p. L1164-L1173.
13. Houssaini, A., et al., *mTOR pathway activation drives lung cell senescence and emphysema.* JCI Insight, 2018. **3**(3).
14. Barnes, P.J., *Senescence in COPD and Its Comorbidities.* Annu Rev Physiol, 2017. **79**: p. 517-539.
15. Schafer, M.J., et al., *Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease.* Nat Commun, 2017. **8**: p. 14532.
16. Erusalimsky, J.D., *Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology.* J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(1): p. 326-32.
17. Wang, Y., M. Boerma, and D. Zhou, *Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases.* Radiat Res, 2016. **186**(2): p. 153-61.
18. Lafargue, A., et al., *Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation.* Free Radic Biol Med, 2017. **108**: p. 750-759.
19. Lowe, D. and K. Raj, *Premature aging induced by radiation exhibits pro-atherosclerotic effects mediated by epigenetic activation of CD44 expression.* Aging Cell, 2014. **13**(5): p. 900-10.
20. Paris, F., et al., *Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice.* Science, 2001. **293**(5528): p. 293-7.
21. Abderrahmani, R., et al., *PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury.* PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35740.
22. Venkatesulu, B.P., et al., *Radiation-Induced Endothelial Vascular Injury: A Review of Possible Mechanisms.* JACC Basic Transl Sci, 2018. **3**(4): p. 563-572.
23. Rannou, E., et al., *In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 15738.

24. Mintet, E., et al., *Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis.* Am J Pathol, 2015. **185**(9): p. 2550-62.
25. Guipaud, O., et al., *The importance of the vascular endothelial barrier in the immune-inflammatory response induced by radiotherapy.* Br J Radiol, 2018. **91**(1089): p. 20170762.
26. Wong, J., et al., *High-resolution, small animal radiation research platform with x-ray tomographic guidance capabilities.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **71**(5): p. 1591-9.
27. Timmerman, R.D., J. Herman, and L.C. Cho, *Emergence of stereotactic body radiation therapy and its impact on current and future clinical practice.* J Clin Oncol, 2014. **32**(26): p. 2847-54.
28. Kang, K.H., et al., *Complications from Stereotactic Body Radiotherapy for Lung Cancer.* Cancers (Basel), 2015. **7**(2): p. 981-1004.
29. Beach, T.A., et al., *Modeling radiation-induced lung injury: lessons learned from whole thorax irradiation.* Int J Radiat Biol, 2018: p. 1-16.
30. Citrin, D.E., et al., *Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis.* J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(19): p. 1474-84.
31. Demaria, M., et al., *Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse.* Cancer Discov, 2017. **7**(2): p. 165-176.
32. Baar, M.P., et al., *Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging.* Cell, 2017. **169**(1): p. 132-147 e16.
33. Ritschka, B., et al., *The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration.* Genes Dev, 2017. **31**(2): p. 172-183.
34. Meziani, L., et al., *CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages.* Eur Respir J, 2018. **51**(3).
35. Hernandez-Segura, A., et al., *Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells.* Curr Biol, 2017. **27**(17): p. 2652-2660 e4.
36. Parpaleix, A., et al., *Role of interleukin-1 receptor 1/MyD88 signalling in the development and progression of pulmonary hypertension.* Eur Respir J, 2016. **48**(2): p. 470-83.
37. Orjalo, A.V., et al., *Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(40): p. 17031-6.
38. Luke, J.J., et al., *Safety and Clinical Activity of Pembrolizumab and Multisite Stereotactic Body Radiotherapy in Patients With Advanced Solid Tumors.* J Clin Oncol, 2018. **36**(16): p. 1611-1618.
39. Ngwa, W., et al., *Using immunotherapy to boost the abscopal effect.* Nat Rev Cancer, 2018. **18**(5): p. 313-322.

Supplementary Materials

Mouse models and genotyping

All animal experimental procedures were approved by the ethics committee of the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (protocol number P17-04). $p16^{INK4}$-LUC transgenic mice were described in detail by Burd *et al.* [1]. Genotyping of $p16^{INK4}$-LUC mice was performed by PCR on tail DNA. Primer sequences for genotyping were as follows: Primers 5'-CTATGGCGGGCTGTGGAG-3' (Forward), 5'-CACGGTAGGCTGCGAAATG-3' (Reverse) and 5'-TGGGACACTCCTTGCCTACC-3' (Reverse) and were used to detect a 543 bp product for the $p16^{INK4}$-LUC allele and a 312 bp product for the wild-type allele (online supplementary fig. S1).

Animal experimental procedures and treatment planning and dose delivery

For irradiation, mice were anaesthetized with 100 mg/Kg ketamine (Imalgene 1000, Merial, Lyon, France) and 10 mg/Kg xylazine (Rompun® 2%, Bayer Healthcare, Loos, France). For microCT imaging, mice were anaesthetized by 3% isoflurane inhalation and then 2% during acquisition.

Treatment planning and dose delivery

The SARRP, a high precision micro irradiation system guided by CBCT images, was used. CBCT images were obtained using an uncollimated beam (20x20 cm), a voltage of 60 kV, a current of 0.8 mA with inherent and additional filtrations of 0.8 and 1 mm of beryllium and aluminium, respectively, with continuous beam on and 360° (horizontal) stage rotation between the x-ray source and the digital flat panel detector. Then, the 3D reconstruction images and dose planning were performed with the Muriplan® treatment planning system. Irradiations were performed using our reference configuration for Muriplan® which is a voltage of 220 kV and a current of 13 mA with inherent and additional filtration of 0.8 and 0.15 mm of beryllium and copper, respectively. Two treatment plans were designed to perform irradiation of 90 Gy in a single dose or fractionated doses (5 x 20 Gy).

For single-dose irradiation, the isocentre was placed on the left lung and an arc therapy treatment was planned to deliver 90 Gy to the isocentre using the 3 x 3 mm^2 collimator with an immobile stage and 240° gantry rotation from -120 to 120° for heart sparing (fig. 1a). For the fractionated irradiation, 5 fractions of 20 Gy were delivered to the isocentre placed on the left lung, as for single-dose irradiation. An arc treatment using a 3x3 mm^2 collimator with immobile stage and 220° gantry rotation from -110 to 110° for heart sparing (figure 3a) was planned for each fraction. To be able to irradiate the same region on the left lung, a restraint system was designed and CBCT images of the first fraction were co-recorded and manually superimposed with CBCT images of the day (figure 3a). The different treatment plans are respectively illustrated in figures 1a and 3a, where isodose lines and Dose Volume Histograms (DVHs) are also reported. Contouring of right lung, left lung and irradiation patch allowed calculation of

volumes, which are respectively of 0.347, 0.204 and 0.022 cm^3. The irradiation patch represents roughly 4% of the total lung volume, a percentage comparable to what can be done in the clinic.

In vivo luciferase detection

To monitor p16-driven luciferase expression, bioluminescence imaging was performed using the Xenogen In Vivo Imaging System 50 (IVIS; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) as previously described [2]. Briefly, isoflurane anaesthetized mice were injected intraperitoneally with firefly luciferin and were placed in the prone position in the imaging chamber. Images were acquired 10 minutes after injection of luciferin while mice were under sedation via the continuous administration of isoflurane. The photographic images and bioluminescence colour images were superimposed, and signal quantification was performed using the Living Image software (Perkin Elmer).

Lung damage assessment by micro-CT images and analysis

Follow-up micro-CT images were performed at the “plateforme d’imagerie du vivant”, Université Paris Descartes, faculté de chirurgie dentaire” using a micro-CT scanner (Quantum FX, PerkinElmer) with respiratory gating. Images were acquired at 90 kV, 160 µA, no additional filtration and with a FOV (Field Of View) of about 20x20x20 mm for a resolution of 40 micrometres. The estimated shooting time was about 4 minutes and 30 seconds and 512 slices were acquired. The mean dose absorbed by mice is about 1653 mGy. For p16 mice, micro-CT images were acquired at 4, 8, 12, 16 and 21 months after irradiation for the single-dose irradiation group and at 4, 8, 12 and 15 months after irradiation for the fractionated group.

Resulting images were analyzed with AnalyzePro software, which allows semi-automatic segmentation of main bronchi of the left and right lungs. The same threshold range was used for all mice to be able to compare them. Lesions induced by irradiation*, i.e.* irradiation patch, were manually contoured by the same operator for all single dose irradiated mice. Right lung, left lung and irradiation patch volume were computed. Hounsfield Unit (HU) histograms were obtained for these contoured volumes using bins of 1-HU width. The mean value of the HU-histogram for the segmented volumes was used as a measure of lung injury/fibrosis progression.

However, for fractionated irradiation, the radiation-induced lesion was not clearly visible and very difficult to contour. Consequently, for 3D analysis, the irradiation patch was not contoured. The volume and the HU-histogram were only computed for the left and right lungs. Therefore, a complementary 2D analysis was performed on the irradiated region. The transversal section showing the irradiation patch was identified by anatomical landmarks and 6 regions were identified, 3 on the left lung (far, near and in the patch) and 3 on the right lung,

as illustrated in figure 3e. The mean value of the HU-histogram for each identified region was computed.

Histology and immunohistochemistry

At different times after radiation exposure, lungs were removed and whole-mount senescence-associated β-galactosidase staining was performed immediately. Briefly, whole lung was washed with 5 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 0.02% IGEPAL®, 0.01% sodium deoxycholate in 0.1 M phosphate buffer (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Fixation was performed with 20% formaldehyde, 2% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Lungs were incubated in X-gal staining solution (β-gal staining kit, Invitrogen) overnight at 37°C, 0% CO_2. Organs were embedded in paraffin and sections (5-14 µm) were stained with Nuclear Fast Red, Haematoxylin-Eosin-Saffron and Masson's trichrome for histological examination.

For p21, $p16^{ink4a}$, CD68, vWF, SPC immunostained tissue sections were heated in an EDTA buffer, pH 9 (Dako, Les Ulis, France) that unmasks antigens before immunostaining. For IL1R1 immunostaining, citrate buffer pH 6 was used to unmask antigens. Sections were permeabilized with a PBS-0.1% Triton-0.1% sodium citrate solution for 10 minutes and nonspecific sites were blocked in block solution (Dako). Sections were incubated with rat p21 antibody (1:100, Abcam), mouse $p16^{INK4A}$ antibody (1:100, Thermo Fisher), rabbit CD68 antibody (1:100, Abcam), rabbit vWF antibody (1:100, Dako) or rabbit IL1R1 antibody (1:1000, Abcam). Samples were then exposed to Alexa-Fluor-conjugated corresponding secondary antibodies (Life Technologies). For counterstaining procedures, 6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Thermofisher) and nuclear fast red (Sigma) were used according to the manufacturer's instructions. Sections were finally mounted in Vectashield mounting medium (Eurobio/Abcys).

Cell culture and irradiation procedure

Primary Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs, pooled donor), Human Lung Microvascular Endothelial Cells (HMVEC-L), Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HMVEC-D), Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells (HMVEC-C), Human Pulmonary Artery Endothelial Cells (HPAEC) were from Lonza (Verviers, Belgium). Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells (HIMECs) were isolated from surgically resected specimens of normal human colon as previously described [3]. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 in EGM-2MV medium (Lonza) for HUVECs, HMVEC-D, HMVEC-C, HPAEC and HIMECs or in EGM-2MV supplemented by 12 mg/mL Bovine Brain Extract without heparin for HMVEC-L (Lonza). HUVECs (3000 cells/cm²), HMVEC-L, HMVEC-D, HPAEC, HIMECs (5000 cells/cm²) and HMVEC-C (7000 cells/cm²) were seeded in 6-well culture plates or 25 cm² cell culture flasks, depending on the radiation dose.

Confluent cells were X-ray irradiated using a medical linear accelerator (Elekta Synergy Platform, Elekta SAS, Boulogne-Billancourt, France; 4 MV; dose rate 2.5 Gy per minute in air kerma free in air). Medium was changed before irradiation and every 7 days thereafter.

Cell immunostaining

Irradiated HUVECs were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton-X100 and immunostained with mouse p21 antibody (1:100, Dako), rabbit lamin B1 (1:100, Abcam), C_{12}FDG (Thermofisher) for senescence-associated β-galactosidase staining as previously described [4] or LysoTracker™ following the manufacturer's protocol (Thermofisher). Visualization was achieved using the appropriate Alexa Fluor-conjugated antibodies (See Immunochemistry section for counter staining).

Senescence (C12FDG)/Generation (CellTrace™) by Flow Cytometry

Before irradiation, confluent monolayers of HUVECs were rinsed twice with PBS 1X (with Ca^{2+} and Mg^{2+}), and then stained for 20 min with 7.5 µM final of CellTrace™ violet (Ref C34557, Thermo Fisher Scientific) in PBS 1X (with Ca^{2+} and Mg^{2+}). Then, staining solution was removed and monolayers were rinsed twice with fresh cell culture medium to neutralize excess CellTrace™ violet. Cells were then irradiated to 2, 4, 5, 6, 10 or 20 Gy + control (non-irradiated). Seven days after irradiation, senescence experiments were performed following the Debacq-Chainiaux *et al.* protocol [4] using 1-hour pre-treatment with bafilomycin A1 (100 nM final), followed by addition of C_{12}FDG (33 µM final) for 2 hours. Supernatant was removed, monolayers were rinsed twice with PBS 1X (without Ca^{2+} and Mg^{2+}), cells were trypsinized, centrifuged 5 min at 200 g and the pellet was resuspended in 1 mL of PBS. To increase the robustness of the results, a cell viability reporter To-Pro-3 was added to each sample before acquisition of the data on FACS Canto II (3-laser, 4-2-2 configuration) using FACS Diva software. Four independent experiments were performed for each condition. Data analysis was performed post acquisition using FlowJo 7.6.5 software (FlowJo LLC). A first analysis was done on size (FSC: Forward scatter)/granulometry (SSC: Side scatter) parameters, to collect cells (gate G1) and to remove fragmented cells and debris, Triton 0.06X final was instantly used as positive control to ensure the good detection of dead cells. This first step allowed us to assess cell viability (on APC channel (filters λ_{em}: 660/20 nm) after 633 nm HeNe solid state (17 mW output) laser excitation) and to determine the gate (G2) where at least 5 x 10^4 living cells per replica were recorded. Then, upon these gated events, the C_{12}FDG signal was collected on the FITC channel (filters λ_{em}: 530/30 nm), after air-cooled 488 nm solid state (20 mW output) laser excitation, while the CellTrace™ violet signal was collected on the Pacific Blue™ channel (filters λ_{em}: 450/50 nm) after 405 nm solid state (30 mW fibre power output) diode excitation. Combining CellTrace™ violet and C_{12}FDG

measurements, a bi-parametric representation was then possible distinguishing two kinds of populations: senescent cells called β-gal+ cells (Q1+Q2), where a cut-off was set at 2% in control cells, and “divided cells” called CellTrace™- cells where the cut-off was set between the two peaks in control cells. Strictly the same cuts-off were applied for each irradiated condition.

mRNA in situ hybridization

Sections (5 µm) of paraffin-embedded lung were thawed, baked (60°C) and deparaffinized. Hybridization was achieved by using the ViewRNA ISH Tissue 1-plex Assay (Thermofisher QVT0051). A heat pretreatment and a protease digestion were administered. Sections were incubated (40°C) with probes p21 cdKn1a (VB1-13042-06) or p16 cdKn2a (VB1-13052-06). The specificity of staining was checked by using a positive control (housekeeping gene) ACTB (VB1-10350-06) and a negative control (by omitting the target probe). After washes and amplifications, alkaline phosphatase-conjugated oligonucleotide probe was hybridized and revealed by fast red substrate. As we used the RNA type1 probe, the staining was detected by a red signal in brightfield and in fluorescence view.

Replicative senescence experiments

HUVECs were subjected to serial passage approximately every 4 to 5 days. Cells were passaged when they reached 80 – 90% confluency. Cumulative population doublings were calculated using the following equation:

$$cPDL = \frac{[\log(number\ of\ cells\ counted) - \log(number\ of\ cells\ plated)]}{\log 2}$$

Cells were considered replicative senescent when no proliferation was observed for a 3-week period following the final passage.

Total RNA isolation, reverse transcription, real-time PCR and Taqman low-density array

Total RNA was prepared with the mirVana miRNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific, France). After quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies, Rockland, DE), reverse transcription was performed with 1 µg RNA using the High-Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer’s instructions. Quantitative PCR was carried out on a 7900HT Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems) using pre-developed TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Genes were chosen as known to be implicated in the cellular senescence process. Relative mRNA expression levels were quantified using the $\Delta\Delta C_T$ method (DataAssist software, Life Technologies). mRNA expression of Il1a, Il1b and Il1r1

was measured by real-time PCR using the Mm00439620_m1, Mm00434228_m1 and Mm00434237_m1 assays, respectively.

Mathematical analyses of *in vitro* data

Smoothing bivariate gene profiles

The measured HUVEC transcriptional profiles can be viewed as a noisy discretization of a two-dimensional continuous process, denoted by f, depending on time and on dose:

$$-\Delta C_{T_{ij}} = f(\delta_i, t_j) + \varepsilon(t_j)$$

Where $-\Delta C_{T_{ij}}$ represents the opposite of the measured ΔC_T at the i^{th} dose δ_i $(1 \le i \le n)$ and thej^{th} time point t_j $(1 \le j \le m)$, f a smooth bivariate function and $\varepsilon(t)$ is an error function assumed to be drawn from a stochastic process with expectation zero at each t. By considering that the function f belongs to a finite dimensional space spanned by some basis of functions, the estimation problem is thereby reduced to estimating a finite dimension coefficient vector.

More precisely: In this work, we restrict the function f to the span of a tensor product cubic B-spline basis with marginal univariate B-spline basis,$b^{Dose}(\delta) = \left(b_1^{Dose}(\delta), \dots, b_N^{Dose}(\delta)\right)$ and $b^{Time}(\delta) = \left(b_1^{Time}(\delta), \dots, b_M^{Time}(\delta)\right)$ respectively defined on the dose and temporal range values: $B(\delta, t) = b_{Dose}(\delta) \otimes b_{Time}(t)$ where $\otimes$ designates the Kronecker products:

$$f(\delta_i, t_j) = \sum_{k=1}^{K} \sum_{l=1}^{L} \beta_{lk} \times b_k^{Dose}(\delta_i) \times b_l^{Time}(t_j)$$

Where $\beta = (\beta_{kl})_{1 \le k \le K, 1 \le l \le L}$ represents the coefficient vector of the expansion of f in the tensor B-spline basis.

Assuming a rich two-dimensional basis (a large K) in order to capture relevant time/dose details, a direct least square estimation of β will yield a functional estimation of f that is excessively wiggly. Instead, we minimize the penalized sum of squared errors criterion

$$\| Y - X\beta \|^2 + \beta^T P \beta \qquad (2)$$

Where $Y = \left(-\Delta C_{T_{ij}}\right)_{1 \le i \le n, 1 \le j \le m}$ is a $n \times m$ column vector and $X = \left(B_k(\delta_i, t_j)\right)_{1 \le i \le n, 1 \le j \le m, 1 \le k \le K}$ a $n \times m$ by $K \times L$ basis valued matrix. The positive semi-definite matrix P is the so-called roughness penalty which controls the amount of curvature of the estimated surface. Here, the tensor product of marginal second derivative penalties was used to penalize the roughness of the estimated surface:

$$P = \lambda_1 \times P^{Dose} \otimes I_L + \lambda_2 \times I_K \otimes P^{Time}$$

Where P^{Dose} and P^{Time} are the second derivative penalty matrix of the basis b^{Dose} and b^{Time}, respectively. The smoothing parameters λ_1 and λ_2 are chosen by generalized cross-validation [5].

Dimension reduction

Once the smooth expression surfaces were estimated for each gene two-dimensional profile, a functional principal component analysis (FPCA) [6] was carried out in order to summarize each gene's surfaces and to identify the characteristic features of the set of functions prior to the clustering algorithm.

Intuitively, the FPCA analysis determines the variance structure of the functional data and extracts the main modes of variation in presence. The well-known FPCA for the univariate functional data is easily extended to bivariate functions by introducing a variance-covariance operator $\mathbb{C}$ defined on the space of bivariate square integrable functions. More precisely, let be $X(\delta,t) = \left(f_1(\delta,t), \dots, f_n(\delta,t)\right)$ the centred bivariate smoothed gene profiles obtained as described above with expansion coefficient matrix noted by Γ in the tensor basis $B(\delta,t) = b_{Dose}(\delta) \otimes b_{Time}(t)$:

$$X(\delta,t) = \Gamma\, B(\delta,t)^T$$

The covariance operator is then defined as an integral operator $\mathbb{C}$ with kernel:

$$\mathbb{C}(\delta_1,t_1;\delta_2,t_2) = \frac{1}{n-1}\ B(\delta_1,t_1)\Gamma^T\Gamma B(\delta_2,t_2)^T$$

Hence, the covariance operator for a given bivariate square integrable function g is given by :

$$(\mathbb{C}g)(\delta_1,t_1) = \iint \mathbb{C}(\delta_1,t_1;\delta_2,t_2)g(\delta_2,t_2)\ d\delta_2 dt_2$$

The spectral analysis of C provides a countable set of positive eigenvalues $(\gamma_j)_{j\geq 1}$ associated with an orthonormal bivariate basis of eigenfunctions $(\phi_j)_{j\geq 1}$ called harmonics:

$$\mathbb{C}\phi_j = \gamma_j\phi_j\ , j \geq 1 \qquad (3)$$

Considering approximation into a finite basis of the gene profiles reduces the eigen-analysis problem above to one in a finite dimensional setting. Indeed, as each eigenfunction ϕ_j belongs in the linear space spanned by the elements of X and thus by $B(\delta,t)$, we can write $\phi_j(\delta,t) = B(\delta,t)\varphi_j$. By substituting in the left part of equation (3) we obtain:

$$\begin{aligned}
\left(\mathbb{C}\phi_j\right)(\delta_1,t_1) &= \iint \mathbb{C}(\delta_1,t_1;\delta_2,t_2)\phi_j(\delta_2,t_2)\ d\delta_2 dt_2 \\
&= \iint \frac{1}{n}\, B(\delta_1,t_1)\ \Gamma^T\Gamma\ B(\delta_2,t_2)^T B(\delta_2,t_2)\ \varphi_j\ d\delta_2 dt_2 \\
&= B(\delta_1,t_1)\frac{1}{n-1}\Gamma^T\Gamma\Omega\varphi_j
\end{aligned}$$

Where $\Omega = \iint B(\delta_2,t_2)\ B(\delta_2,t_2)^T\, d\delta_2 dt_2$ is the Gram matrix of the basis $B(\delta_2,t_2)$.

Thus, the spectral equation (3) becomes:

$$B(\delta_1, t_1)\frac{1}{n-1}\Gamma^T\Gamma\Omega\varphi_j = \gamma_j B(\delta_1, t_1)\varphi_j$$

Since the equation above is true for all (δ_1, t_1), the eigen analysis problem is reduced to a simple matrix problem:

$$\frac{1}{n-1}\Gamma^T\Gamma\Omega\varphi_j = \gamma_j\varphi_j$$

By defining $\upsilon_j = \Omega^{1/2}\varphi_j$ is approximated by the usual PCA of the matrix $\frac{1}{\sqrt{n-1}}\Gamma\Omega^{1/2}$:

$$\frac{1}{n-1}\Omega^{1/2^T}\Gamma^T\Gamma\Omega^{1/2}\upsilon_j = \gamma_j\upsilon_j$$

Finally, the coefficients of the j^{th} eigenfunction are obtained by $\varphi_j = \Omega^{-1/2}\upsilon_j$.

Using the FPCA eigenfunctions, it is now possible to represent each gene's surface profile in terms of the Karhunen-Loève decomposition [7].

$$f_i(\delta, t) = \bar{f}(\delta, t) + \sum_{j\geq 1}\xi_{ij} \times \phi_j(\delta, t) \approx \tilde{f}_i(\delta, t) = \bar{f}(\delta, t) + \sum_{j=1}^{J}\xi_{ij} \times \phi_j(\delta, t) \qquad (3)$$

where $\bar{f}(\delta, t) = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} f_i(\delta, t)$ is the common mean and (ξ_{ik}) are uncorrelated random effect variables (scores) with mean 0 and variances λ_k (eigenvalues) in descending order to be interpreted as the contribution of the k^{th} variation mode to the total explained variance. For a fixed j, ξ_{ij} is the i^{th} component of the j^{th} score vector $\xi_{j=}\ \Gamma\Omega\varphi_j$.

Concordance similarity distance and clustering

Prior to the clustering process, the estimated surfaces were projected on the space spanned by the leading eigenfunctions according to the percentage of explained variance (here 95%), which is a usual criterion in FPCA.

This second-dimension reduction after the B-spline basis projection ensures efficient capture of the most important leading component of the Dose-Time kinetic structure in the truncated summations $(\tilde{f}_i)$ in (3).

We used a hierarchical complete-linkage algorithm on a similarity measure based on a pairwise Lin's concordance coefficient of the values taken by the bivariate functions $(\tilde{f}_i)$ at the experimental conditions in dose and time. This approach, especially in a time-course context, was previously reported as more consistent for clustering than correlation coefficients or a usual Euclidian distance since it takes into account the changes of shape and sign of the fold change surfaces [8].

More precisely, the similarity measure between two surfaces $\tilde{f}_i$ and $\tilde{f}_j$ is calculated as:

$$d_{i,j} = 1 - \rho_{Lin}(\tilde{f}_i, \tilde{f}_j) = 1 - \frac{2 \times S_{ij}}{\bar{f}_i + \bar{f}_j + S_i^2 + S_j^2}$$

Where:

$$\bar{f}_i = \frac{1}{M \times L} \sum_{l=1}^{L} \sum_{m=1}^{M} \tilde{f}_i(\delta_l, t_m)$$

$$\bar{f}_j = \frac{1}{M \times L} \sum_{l=1}^{L} \sum_{m=1}^{M} \tilde{f}_j(\delta_l, t_m)$$

$$S_i^2 = \frac{1}{M \times L} \sum_{l=1}^{L} \sum_{m=1}^{M} \left(\tilde{f}_i(\delta_l, t_m) - \bar{f}_i\right)^2$$

$$S_j^2 = \frac{1}{M \times L} \sum_{l=1}^{L} \sum_{m=1}^{M} \left(\tilde{f}_j(\delta_l, t_m) - \bar{f}_j\right)^2$$

$$S_{ij} = \frac{1}{M \times L} \sum_{l=1}^{L} \sum_{m=1}^{M} \left(\tilde{f}_i(\delta_l, t_m) - \bar{f}_i\right) \times \left(\tilde{f}_j(\delta_l, t_m) - \bar{f}_i\right)$$

And $(\delta_l, t_m)_{1 \le l \le L, 1 \le m \le M}$ are the experimental measure points in dose and time, respectively.

Thus, two fold change surfaces having the same variations will show their distance close to zero. Furthermore, since $d_{i,j} \geq 0$, $d_{i,j} = 0$ if $i = j$ and $d_{i,j} = d_{j,i}$, any conventional distance-based clustering methods can be applied straightforwardly.

Pathway Studio® analysis

Pathway Studio® is an analytical and visualization tool developed by Elsevier based on text mining technology. With a knowledge base of biological relationships from millions of full-text articles it allows us to rapidly explore and identify molecular interactions and biological relationships associated with biological processes of interest.

Once our clusters were identified, we searched for relations between these entities. Relations are based on the literature and we set a threshold with the highest connections (overlap) and mentioned in at least 3 references. We then proceeded to enrichment of each cluster by adding common regulators (mentioned in at least 3 references). Finally, we merged all clusters in order to identify common targets able to impact the molecular profile of radiation-induced endothelial senescence.

***In vitro* RNA interference of IL1R1**

HUVECs at early passage were transfected as described previously. Briefly, cells were seeded into 6-well plates for 48 h to reach 50–70% confluence and were transfected with siRNA (100 nM) using Dharmafect according to the manufacturer's protocols. The antibiotic-free medium was replaced 72 h after transfection and cells were irradiated and processed 3 or 7 days post-irradiation for real-time PCR. Human siRNA and non-targeting negative control siRNA (ON-TARGETplus human IL1R1 SMARTpool L-005188-00, ON-TARGETplus Non-targeting Pool D-001810-10) were from Dharmacon (Chicago, IL, USA). Knockdown

efficiency was measured by real-time PCR using the Hs00991010_m1 assay and 18S as housekeeping gene.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7.02. Statistical analyses were performed by analysis of variance or with Student's t-test with a level of significance of $p<0.05$.

References

1. Burd, C.E., et al., *Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model.* Cell, 2013. **152**(1-2): p. 340-51.
2. Mondini, M., et al., *Synergy of Radiotherapy and a Cancer Vaccine for the Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer.* Mol Cancer Ther, 2015. **14**(6): p. 1336-45.
3. Mintet, E., et al., *Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis.* Am J Pathol, 2015. **185**(9): p. 2550-62.
4. Debacq-Chainiaux, F., et al., *Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-betagal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo.* Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1798-806.
5. Craven, P. and G. Wahba, *Smoothing noisy data with spline functions: Estimating the correct degree of smoothing by the method of generalized cross-validation.* Numerische Mathematik, 1979. **31**: p. 377-403.
6. Ramsay, J. and B. Silverman, *Functional Data Analysis.* Springer Science & Business Media, 2005.
7. Loève, M., *Probability theory. Graduate Texts in Mathematics.* Springer-Verlag, 1977.
8. Son, Y. and J. Baek, *A modified correlation coefficient based similarity measure for clustering time-course gene expression data.* Pattern Recognition Letters, 2008. **29**: p. 232-242.

Supplementary Figures

FIGURE S1

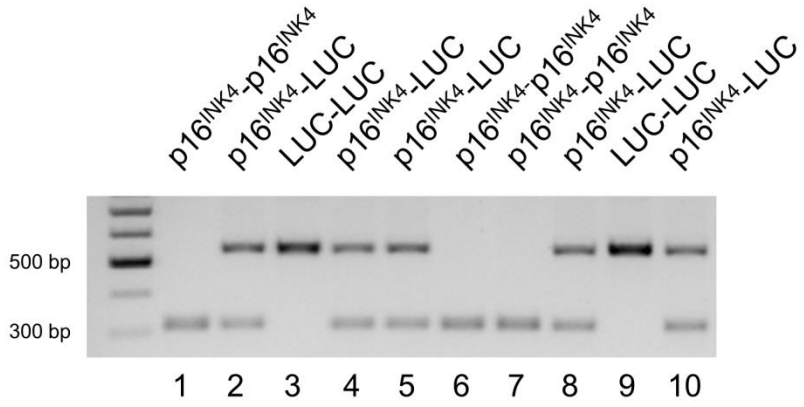


FIGURE S1 : Genotype identification from DNA tail by PCR to discriminate $p16^{INK4}$-LUC, $p16^{INK4}$+/+ or LUC-LUC mice.

FIGURE S2

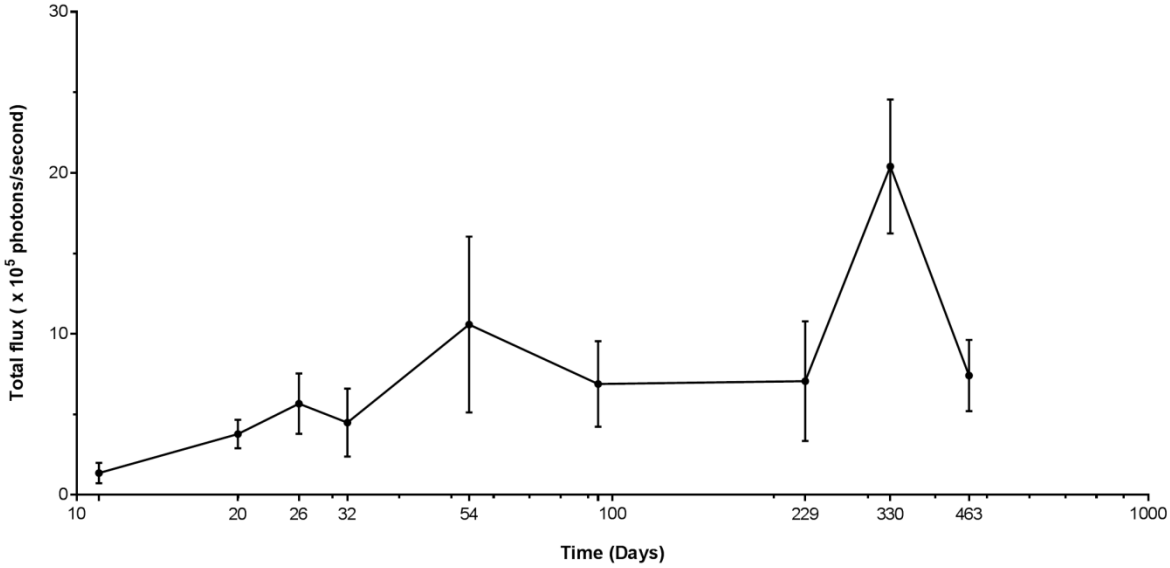


FIGURE S2 : Longitudinal follow up luciferase quantification in 4 p16INK4-LUC knockin mice irradiated at 90Gy in single dose.

FIGURE S3

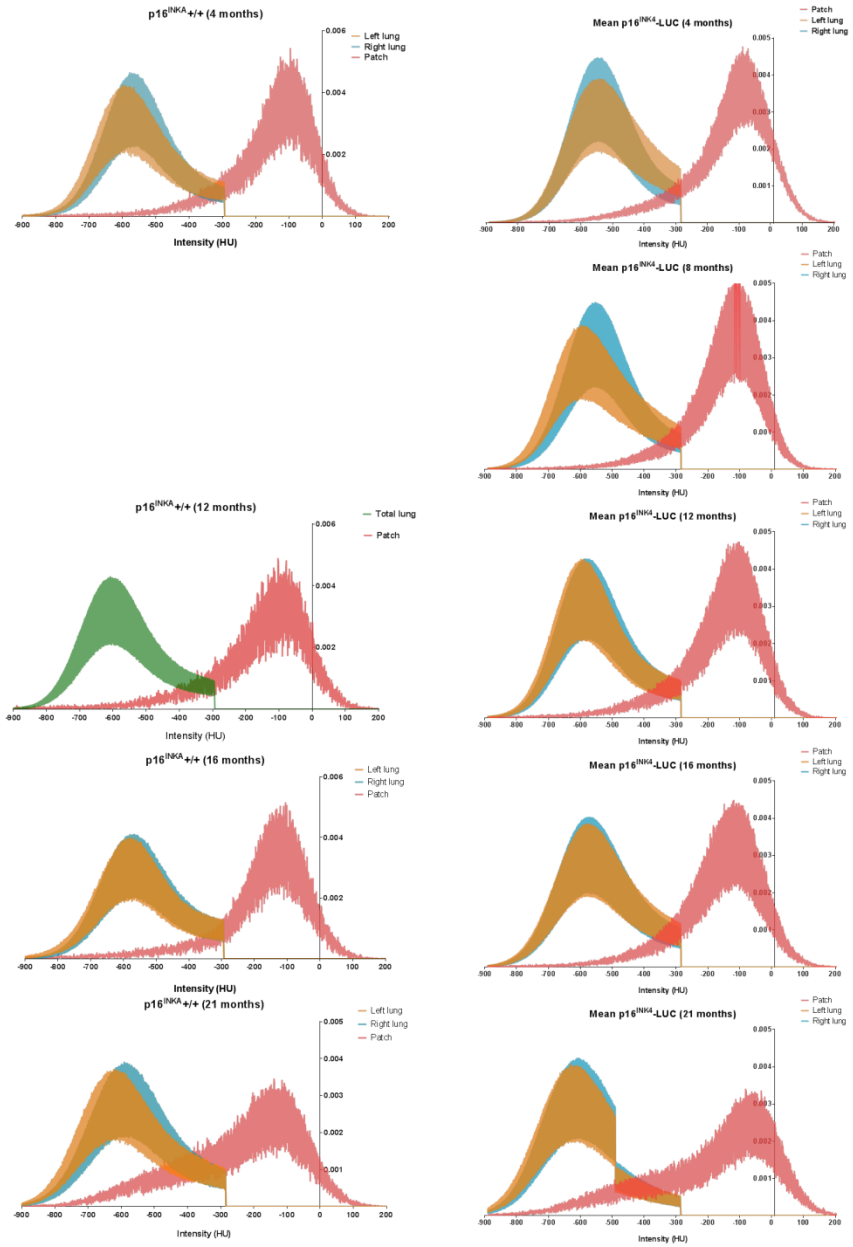


FIGURE S3 : Mean of Hounsfield Unit (HU) intensity distribution in the patch (red), the left lung (orange) and the right lung(blue) in groups of mice at 4, 8, 12, 16 and 21 months after 90Gy in single dose (n = 3 to 4 mice for $p16^{INK4}$-LUC group and 1 mouse for $p16^{INK4}$+/+). No intensity data for $p16^{INK4}$+/+ at 8 months. Green color represents total lung.

FIGURE S4

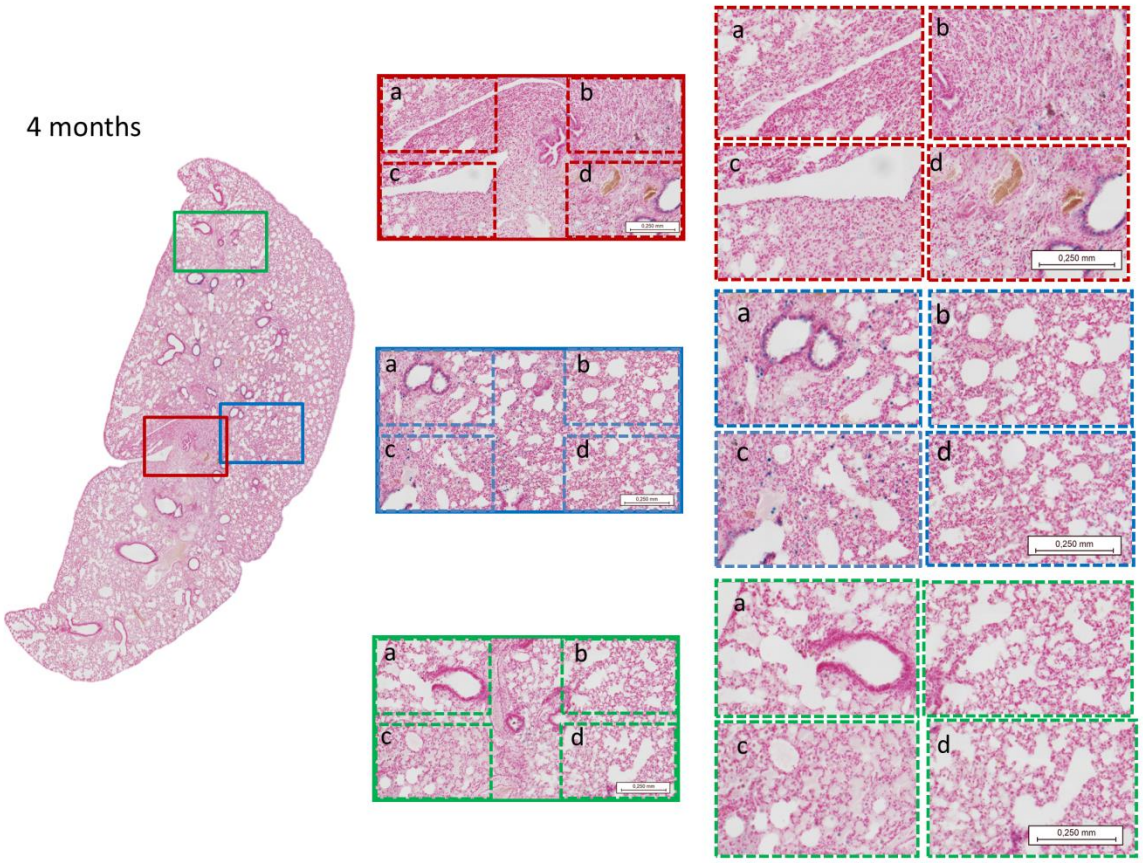


FIGURE S4 : Example of microscopic whole-lung mapping in p16INK4-LUC mice 4 months after 90 Gy single-dose irradiation. β-Gal staining/nuclear fast red staining with the red rectangle showing the irradiated patch, the blue rectangle a zone around the patch and the green rectangle, a normal lung area in the same lung. Presence of β-gal-positive cells is mainly observed in the zone around the patch (n=4 mice).

FIGURE S5

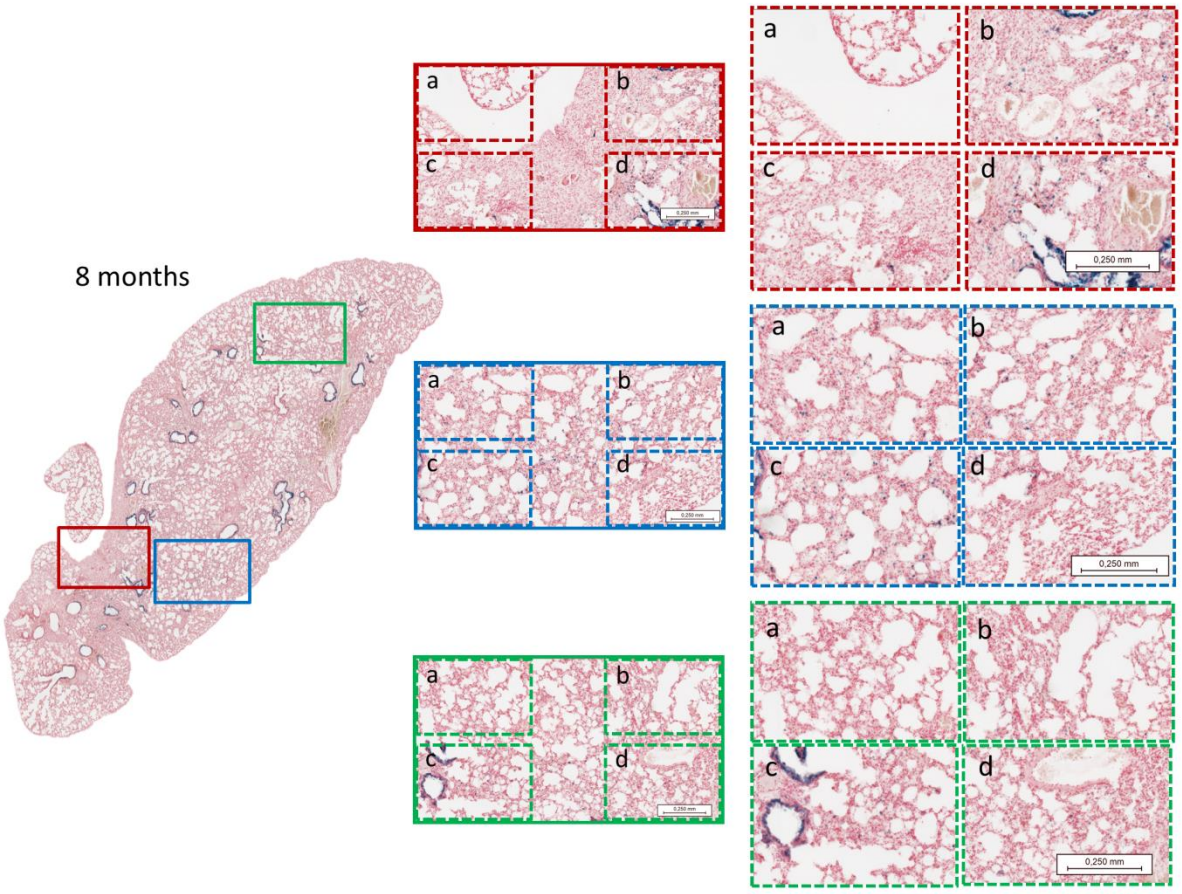


FIGURE S5 : Example of microscopic whole-lung mapping in p16INK4-LUC mice 8 months after 90 Gy single-dose irradiation. β-Gal staining/nuclear fast red staining with the red rectangle showing the irradiated patch, the blue rectangle a zone around the patch and the green rectangle, a normal lung area in the same lung. Presence of β-gal-positive cells is mainly observed in the zone around the patch (n=4 mice).

FIGURE S6

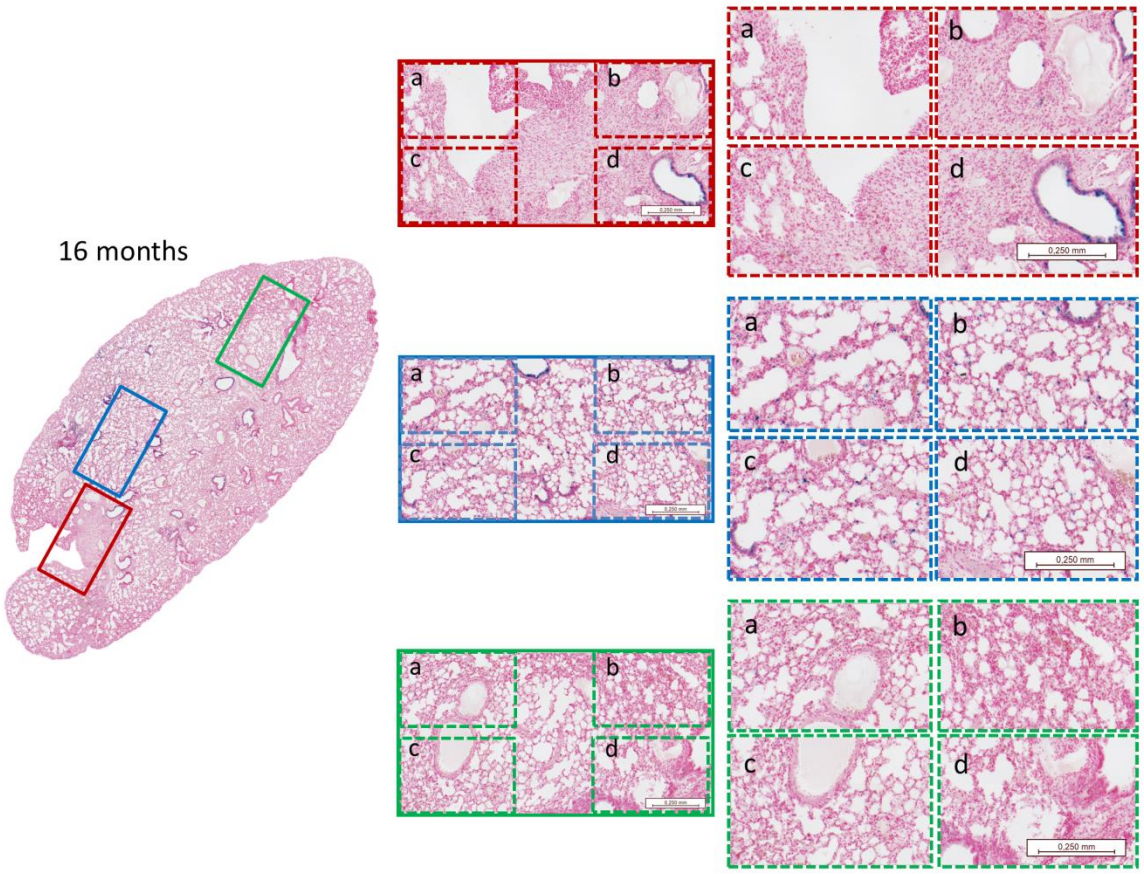


FIGURE S6 : Example of microscopic whole-lung mapping in p16INK4-LUC mice 16 months after 90 Gy single-dose irradiation. β-Gal staining/nuclear fast red staining with the red rectangle showing the irradiated patch, the blue rectangle a zone around the patch and the green rectangle a normal lung area in the same lung. Presence of β-gal-positive cells is mainly observed in the zone around the patch (n=4 mice).

FIGURE S7

18s rRNA	**Hs99999901_s1**	IGFBP7	Hs00266026_m1
ACTA2	Hs00909449_m1	IL1A	Hs00174092_m1
ACTB	**Hs99999903_m1**	IL1B	Hs01555410_m1
B2M	Hs00187842_m1	IL6	Hs00985639_m1
BBC3	Hs00248075_m1	IL8	Hs00174103_m1
BIRC5	Hs00978503_m1	LAT2	Hs00247916_m1
CAV1	Hs00971716_m1	LMNB1	Hs01059210_m1
CD44	Hs01075861_m1	**MAPK8**	**Hs00177083_m1**
CDK1	Hs00938777_m1	MMP10	Hs00233987_m1
CDKN1A	Hs00355782_m1	MMP7	Hs01042796_m1
CDKN1B	Hs01597588_m1	NFKB1	Hs00765730_m1
CDKN2A	Hs00923894_m1	NOTCH1	Hs01062014_m1
CDKN2B	Hs00793225_m1	PAK4	Hs01100061_m1
CDKN2D	Hs00176481_m1	**PGK1**	**Hs99999906_m1**
CEACAM1	Hs00989786_m1	PTPRJ	Hs01119326_m1
CSF2	Hs00929873_m1	RB1	Hs01078066_m1
CSF3	Hs99999083_m1	SELP	Hs00174583_m1
CXCL2	Hs00601975_m1	SERPINE1	Hs01126606_m1
EP300	Hs00914223_m1	SIRT1	Hs01009006_m1
FAS	Hs00236330_m1	SMAD3	Hs00232219_m1
GADD45A	Hs00169255_m1	SMAD7	Hs00998193_m1
HEY2	Hs00232622_m1	STX4	Hs00190266_m1
IGFBP3	Hs00426287_m1	TAGLN	Hs00162558_m1
IGFBP5	Hs00181213_m1	TP53I3	Hs00936520_m1

FIGURE S7 : List of gene expression assays used *in vitro* for TLDA experiments. The 4 genes in bold are used as housekeeping genes.

FIGURE S8

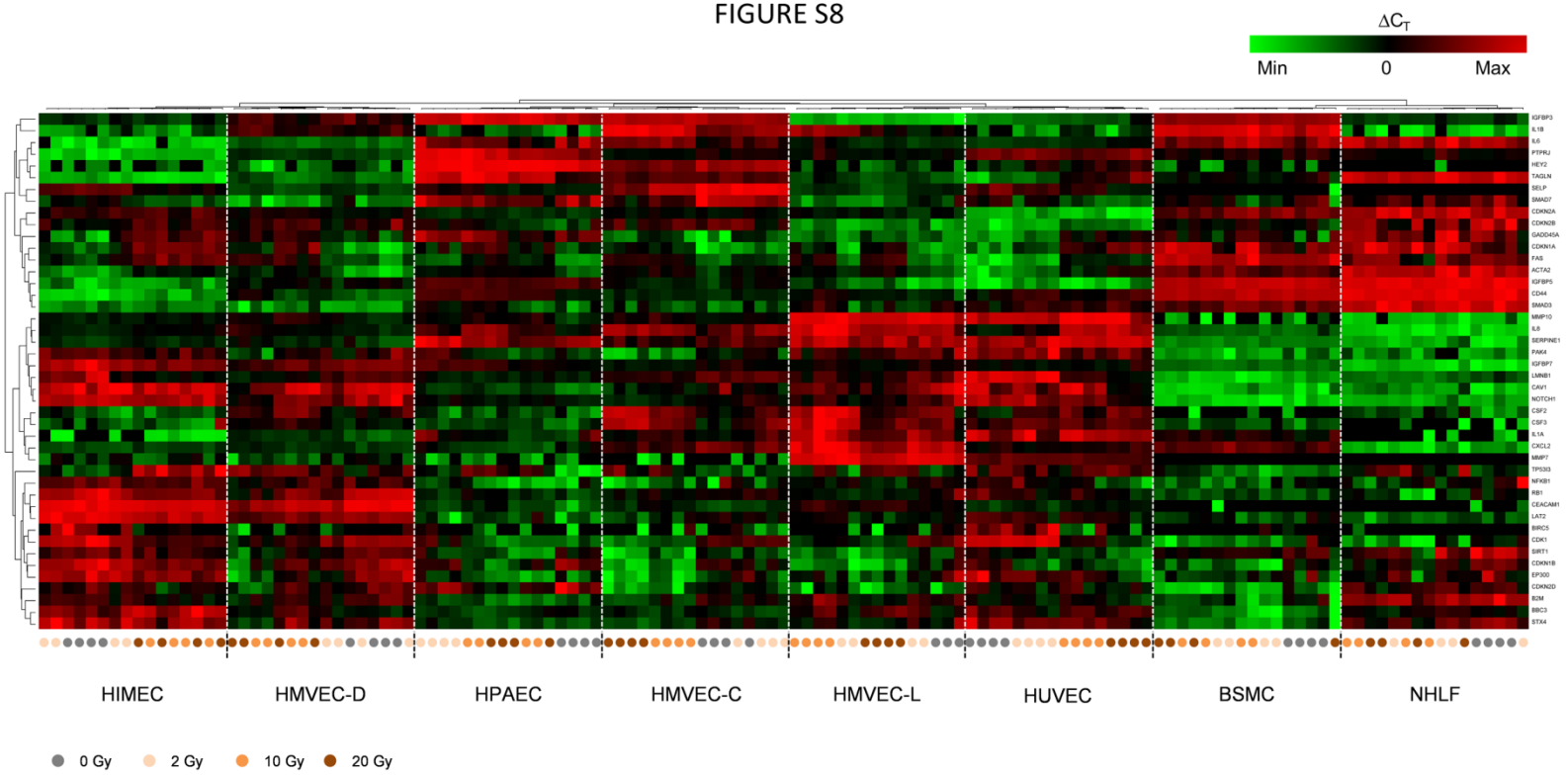


FIGURE S8 : Gene expression profile (heat map) of 44 genes involved in the associated senescence transcriptional programme measured by TLDA 7 days after irradiation at 2, 10 or 20 Gy in 6 different human normal endothelial cell types i.e. HUVECs, HMVEC-L, HPAEC, HMVEC-H, HMVEC-D, HIMEC and in 2 mesenchymal cell types i.e. BSMC and NHLF. Results presented are from two independent experiments performed in duplicate.

Stereotactic lung irradiation in mice promotes long term senescence and lung injury
Frederic Soysouvanh *et al.*

FIGURE S9

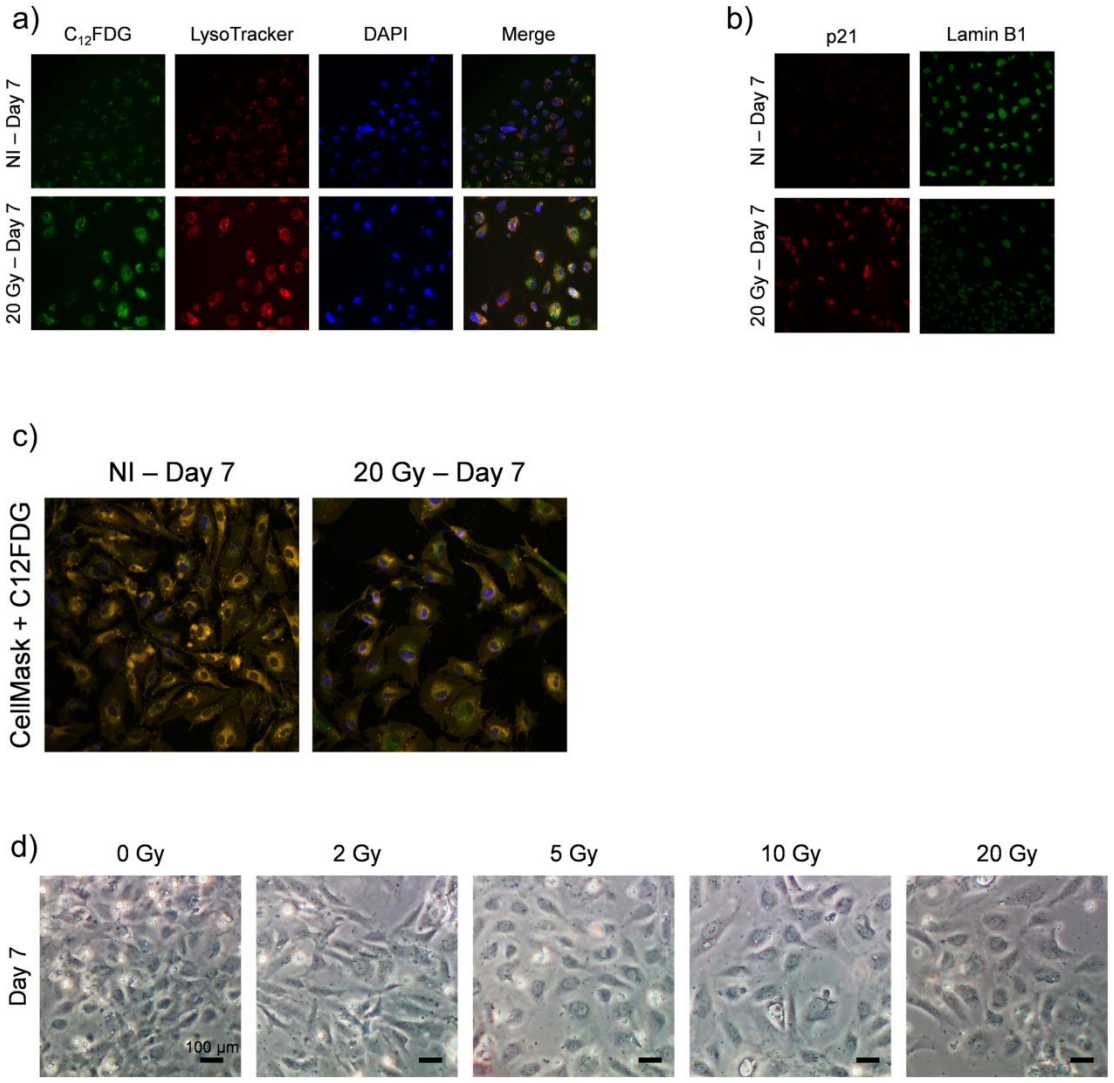


FIGURE S9 : a) a) Representative images from HUVECs, 7 days after 20 Gy. Beta-gal and lysosomes detection using C12FDG and LysotrackerTM counterstained with DAPI. b) LaminB1 representative immunostaining in HUVECs 7 days after 20 Gy. c) Representative images of HUVECs 7 days after 20 Gy irradiation. Beta-gal and hypertrophy detection using C12FDG and CellMaskTM counterstained with DAPI. d) Representative phase microscopy images of HUVECs 7 days after 2, 5, 10 and 20 Gy irradiation.

FIGURE S10

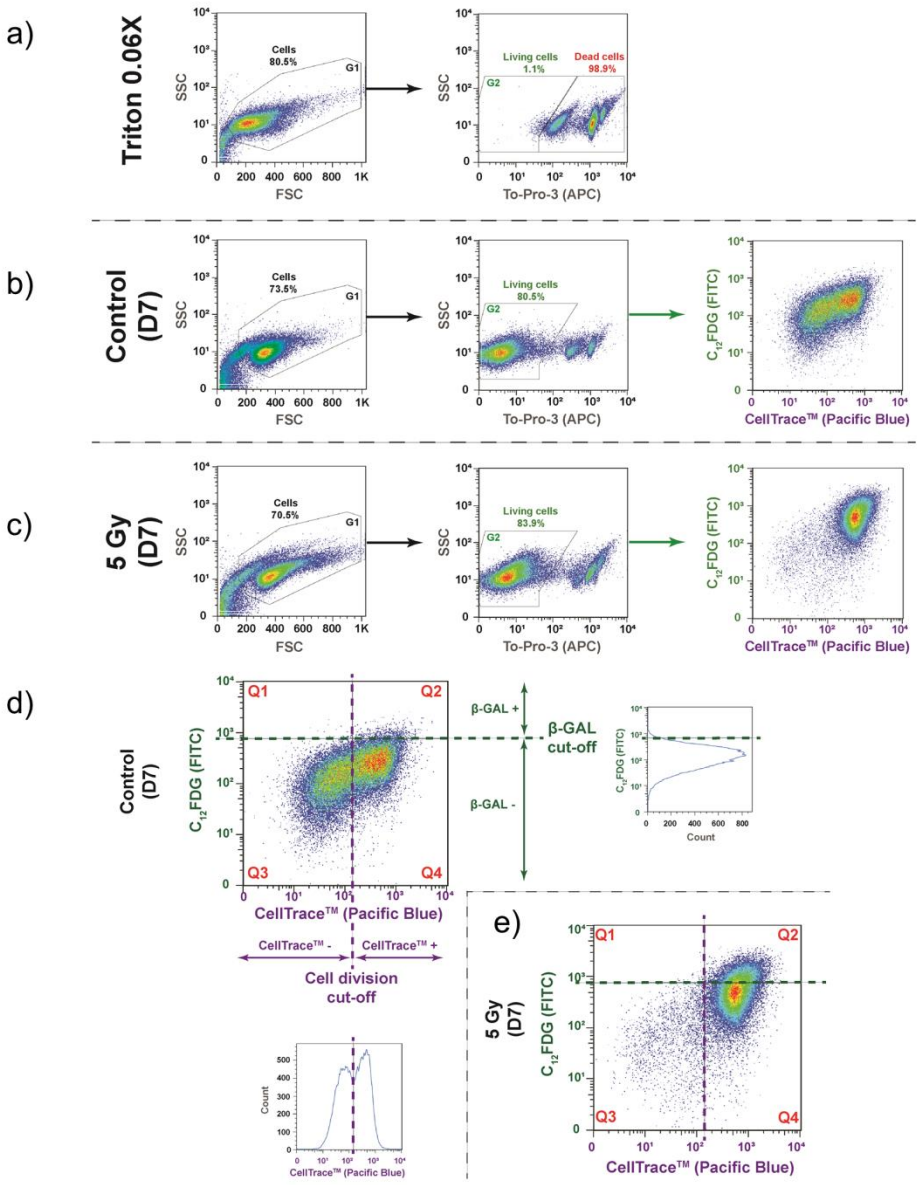


FIGURE S10 : Signal decomposition for C12FDG cleavage and CellTraceTM detection by flow cytometry. a) Gating set-up to remove debris (gate G1) and to assess the correct detection on APC channel of living (Gate G2) and dead cells by the use of positive control (Triton 0.06X). b) Biparametric representation of C12FDG/CellTraceTM at D7 post-irradiation for control conditions. c) Biparametric representation of C12FDG/CellTraceTM at D7 post-irradiation at 5 Gy. d) Cut-off settings set in control conditions for C12FDG and CellTraceTM. e) Cut-off settings (set in control conditions for C12FDG and CellTraceTM) applied to 5 Gy condition.

Stereotactic lung irradiation in mice promotes long term senescence and lung injury
Frederic Soysouvanh *et al.*

FIGURE S11

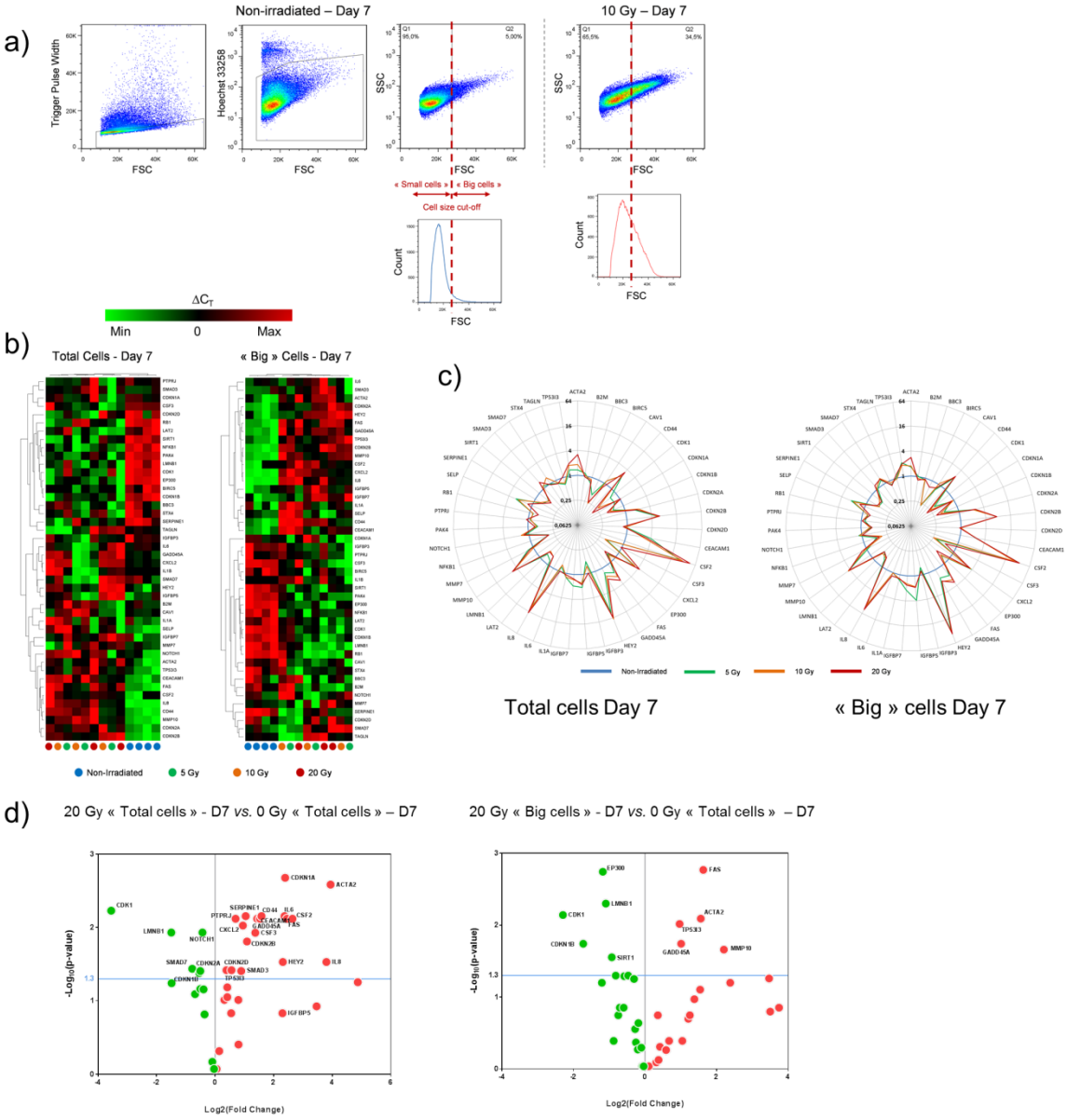


FIGURE S11: a) Details of gating strategy for FACS sorted “big cells”. Example of dot plot obtained 7 days after 10 Gy irradiation. b) Gene expression profile (heat map) of 44 genes involved in the senescence transcriptional programme or FACS-sorted “big cells” exposed to 5, 10 or 20 Gy and analyzed at day 7. c) Chart diagrams obtained from total or FACS-sorted “big cells” exposed to 5, 10 and 20 Gy and analyzed at day 7. d) Volcano plot showing differentially expressed genes 7 days after irradiation (corrected p-value < 0.05) in total non–irradiated versus 20 Gy total cells or total non–irradiated versus 20 Gy “Big cells” Results presented are from 3 independent experiments.

Stereotactic lung irradiation in mice promotes long term senescence and lung injury
Frederic Soysouvanh *et al.*

FIGURE S12

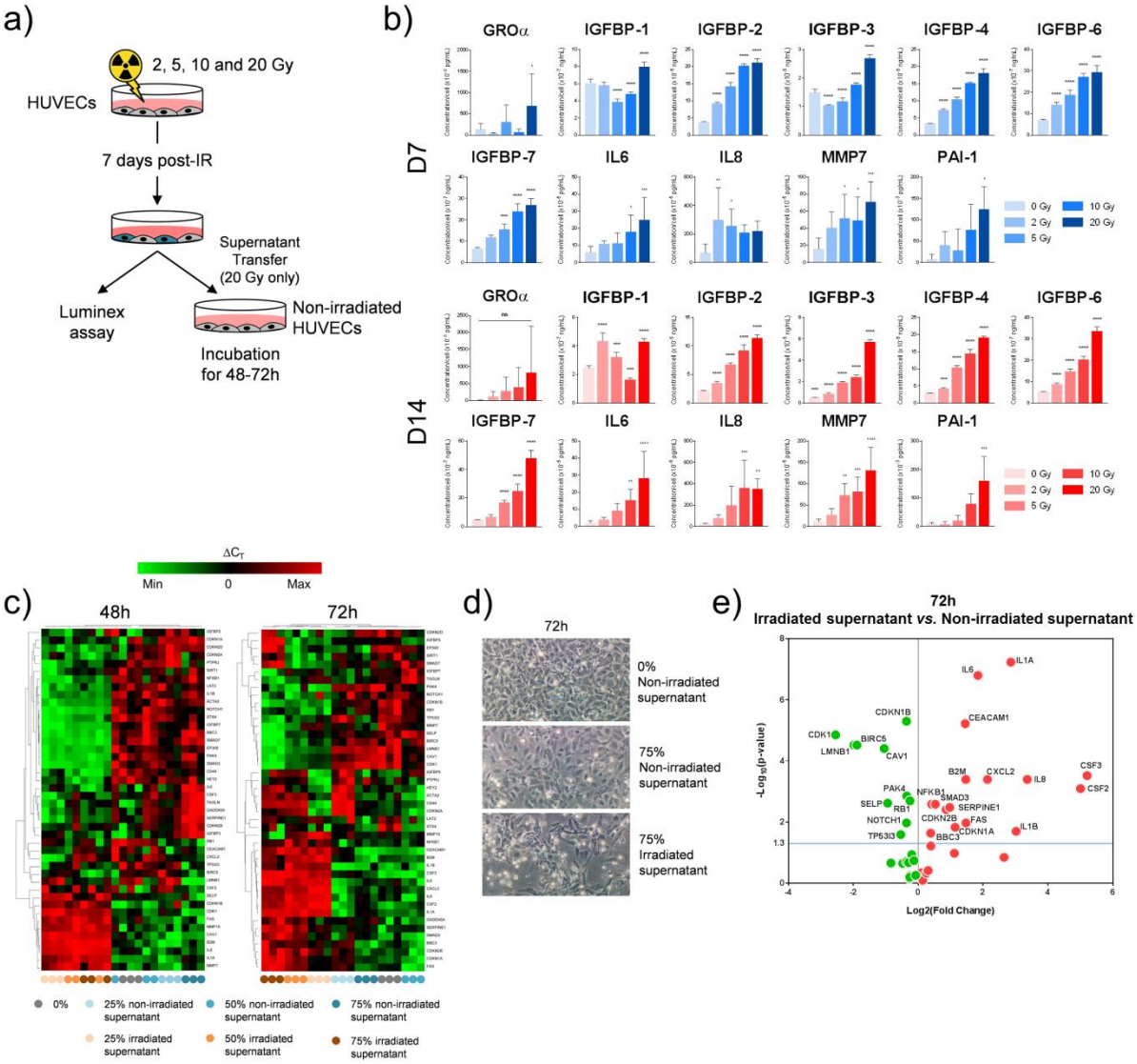


FIGURE S12 : Irradiation induces an SMS able to activate a senescence associated transcriptional programme of non-irradiated endothelial cells. a) Scheme of experiments: HUVECs were irradiated at 2, 5, 10, 20 Gy and cell supernatants were collected 7 or 14 days after irradiation (with a cell medium change at day 7). b) Dose-dependent secretion of a panel of cytokines was measured by multiplex assays (n = 4, mean ± SD are plotted, one-way ANOVA with *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). Gene expression profile (heat map) of 44 genes involved in the senescence-associated transcriptional programme in non-irradiated HUVECs exposed with control conditional medium (7 days secretion from non–irradiated HUVECs) or different percentage of cell supernatant collected from HUVECs 7 days after radiation exposure at 20 Gy. Transcriptional senescence programme was analyzed at 48h and 72h after conditional medium incubation in non-irradiated HUVECs. d) Representative phase microscopy images of non-irradiated HUVECs exposed with control conditional medium or exposed with 75% cell supernatant collected from HUVECs 7 days after radiation exposure at 20 Gy. e) Volcano plot (72 h after incubation) showing differentially expressed genes in non-irradiated HUVECs exposed with control conditional medium or exposed with conditional medium from irradiated cells (25%, 50% and 75% samples are pooled).

FIGURE S13

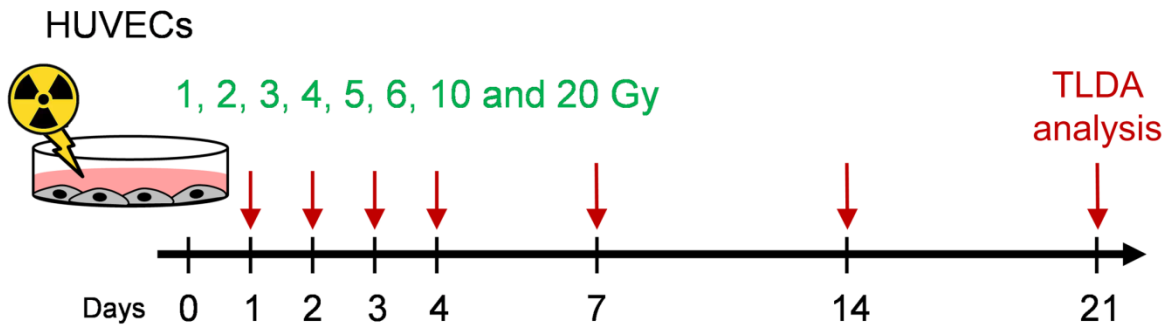


FIGURE S13 : Scheme of experiments for dynamic transcriptional program analysis in HUVECs cells exposed at different radiation dose.

FIGURE S14

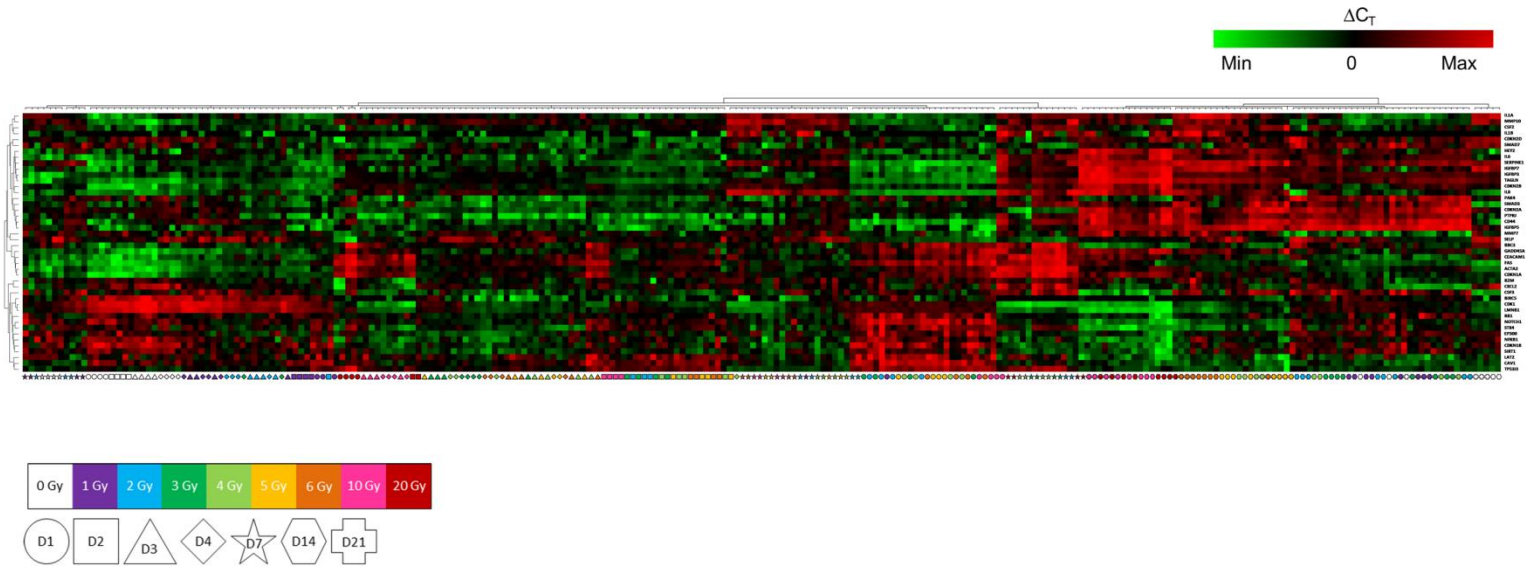
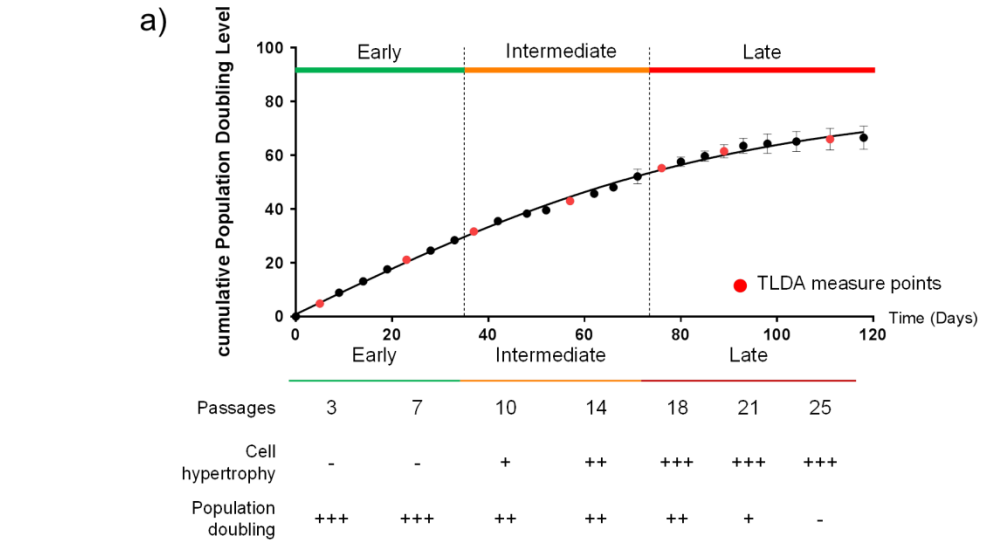
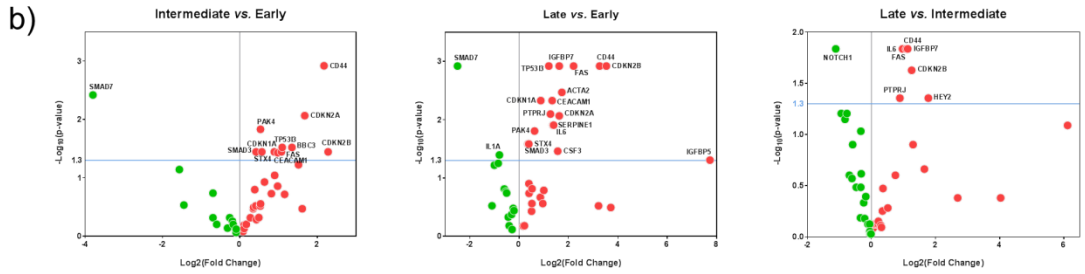


FIGURE S14 : Gene expression profile (heat map) of 44 genes involved in the associated transcriptional senescence programme in HUVECs exposed at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 and 20 Gy and analyzed at days 1, 2, 3, 4, 7, 14 and 21. Results presented are from two independent experiments performed in duplicate.

FIGURE S15





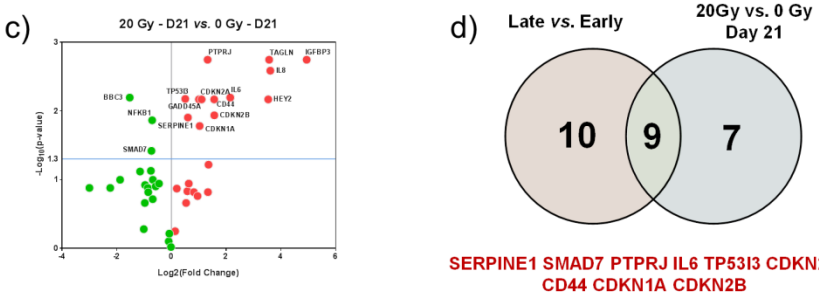


FIGURE S15 : a) Non-linear regression representation of replicative senescence experiments i.e. cumulative population doubling of HUVECs according to the time (in days). Red dots indicate time for measurements of transcriptional programme analysis performed by TLDA (n = 3 independent experiments, mean ± SD are plotted) b) Volcano plots showing differentially expressed genes (corrected p value <0.05) in "intermediate" versus "early", "late" versus "early", "late" versus "intermediate" as indicated in the previous graph. c) Volcano plot showing differentially expressed genes (corrected p value < 0.05) in non–irradiated (passage 3) versus 20 Gy exposed HUVECs (passage 3) 21 days after irradiation. d) Venn diagram showing that 9 genes are differentially expressed both in "ageing" versus "young" HUVECs (i.e. late versus early) and "young irradiated" versus "young" HUVECs (i.e. 20 Gy versus 0 Gy) at day 21 post irradiation.

Stereotactic lung irradiation in mice promotes long term senescence and lung injury
Frederic Soysouvanh *et al.*

FIGURE S16

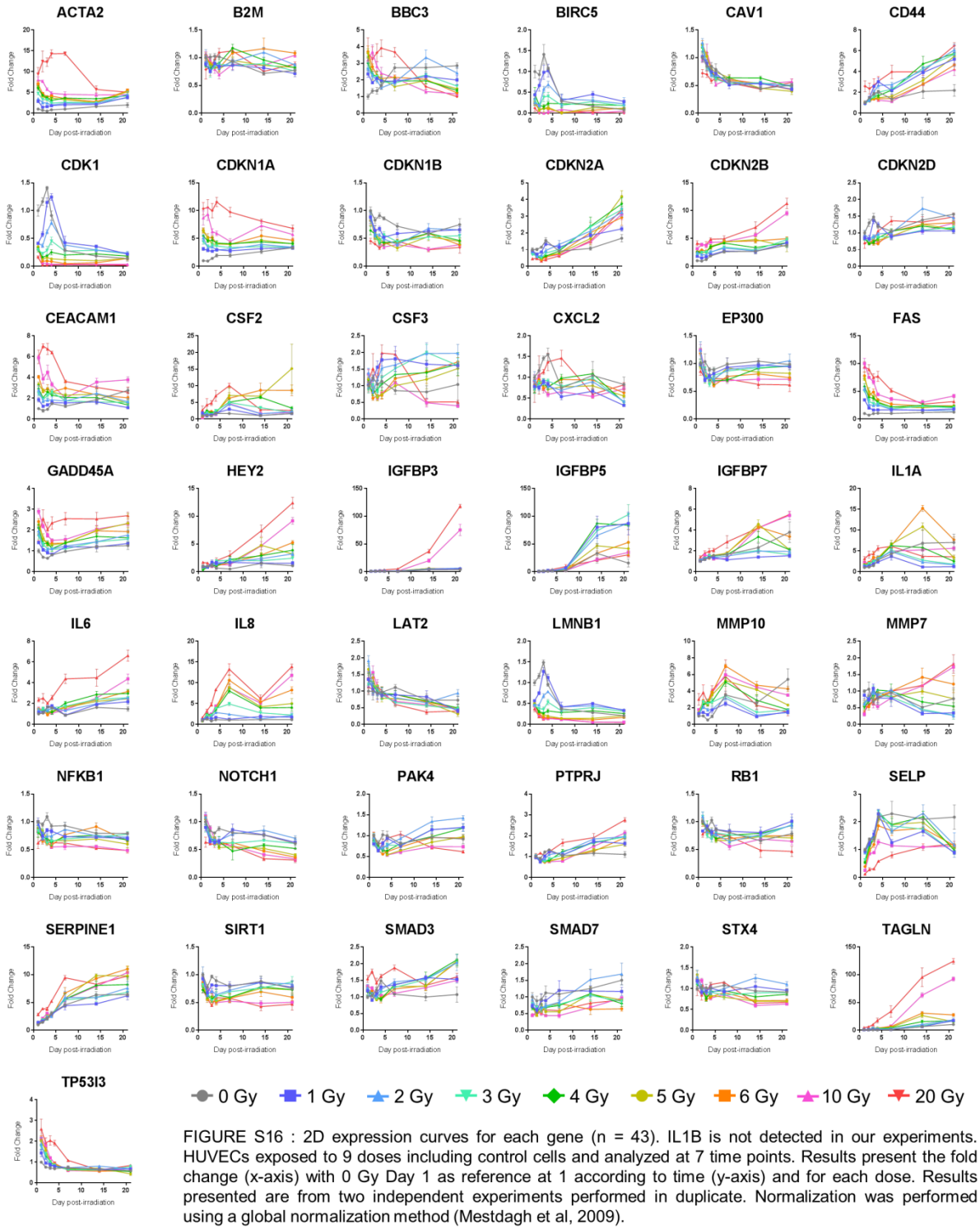


FIGURE S16 : 2D expression curves for each gene (n = 43). IL1B is not detected in our experiments. HUVECs exposed to 9 doses including control cells and analyzed at 7 time points. Results present the fold change (x-axis) with 0 Gy Day 1 as reference at 1 according to time (y-axis) and for each dose. Results presented are from two independent experiments performed in duplicate. Normalization was performed using a global normalization method (Mestdagh et al, 2009).

Stereotactic lung irradiation in mice promotes long term senescence and lung injury
Frederic Soysouvanh *et al.*

FIGURE S17

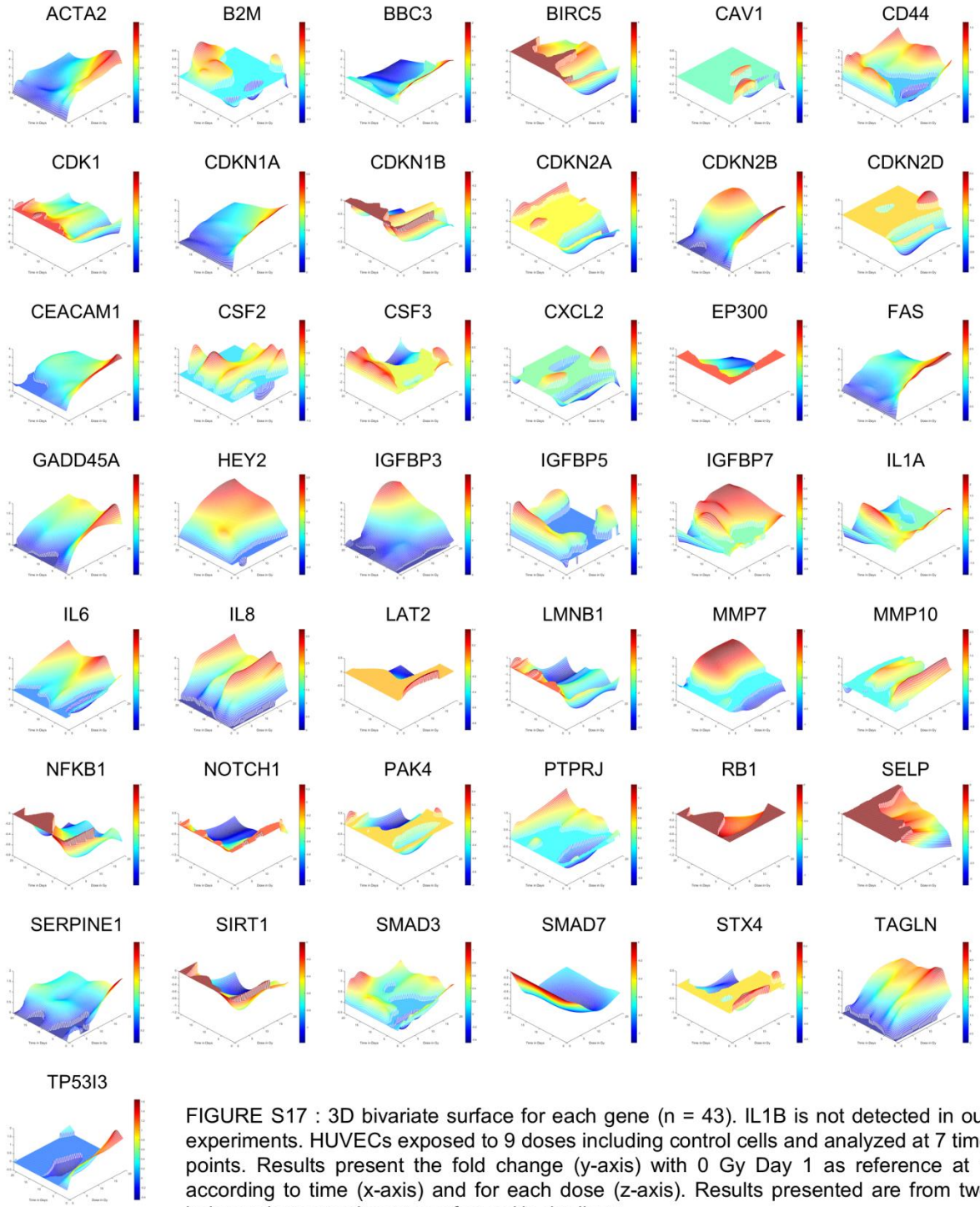


FIGURE S17 : 3D bivariate surface for each gene (n = 43). IL1B is not detected in our experiments. HUVECs exposed to 9 doses including control cells and analyzed at 7 time points. Results present the fold change (y-axis) with 0 Gy Day 1 as reference at 1 according to time (x-axis) and for each dose (z-axis). Results presented are from two independent experiments performed in duplicate.

FIGURE S18

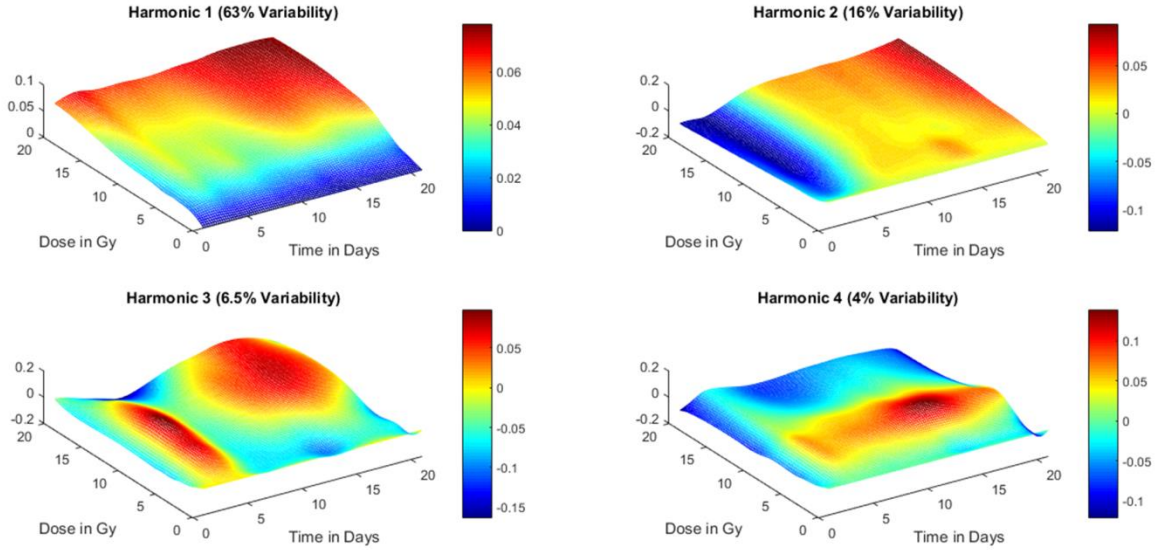


FIGURE S18 : Plots of the first four main functional components, describing the variability modes of the 3D dose-temporal gene kinetics. The proportions of explained variance are given between brackets.

FIGURE S19

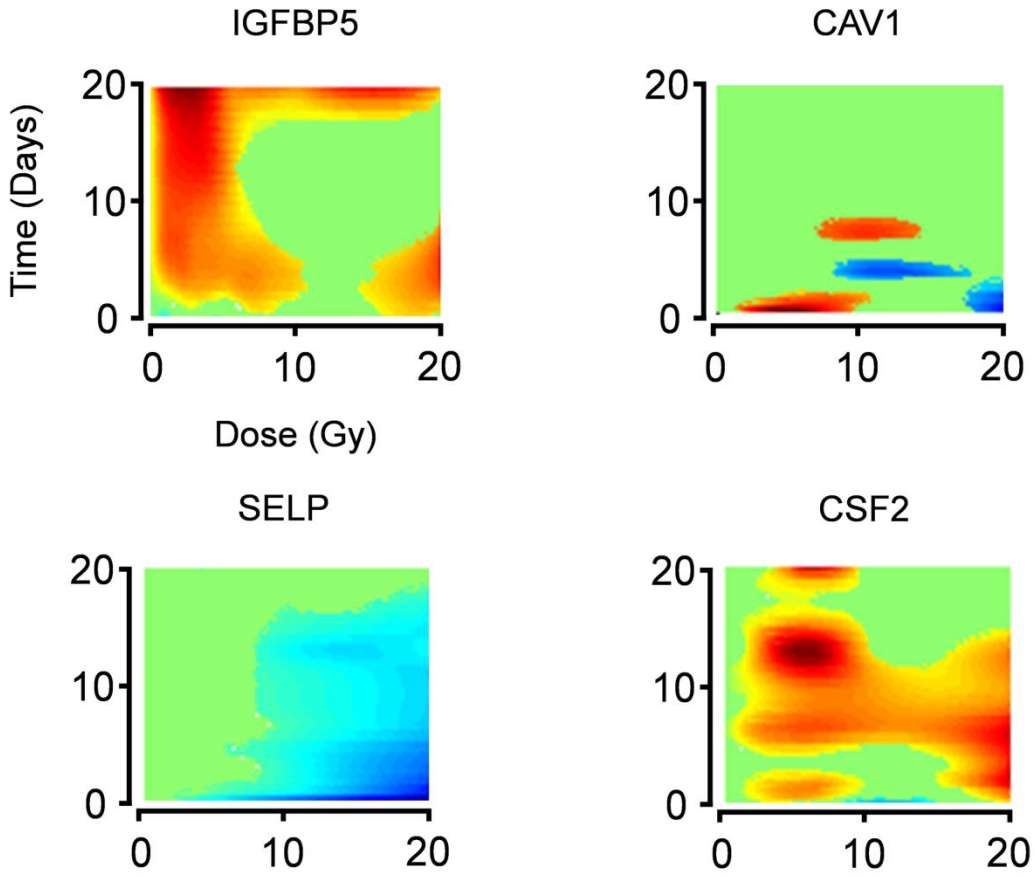


FIGURE S19 : Expression profile of the 4 genes that do not belong to any clusters.

FIGURE S20

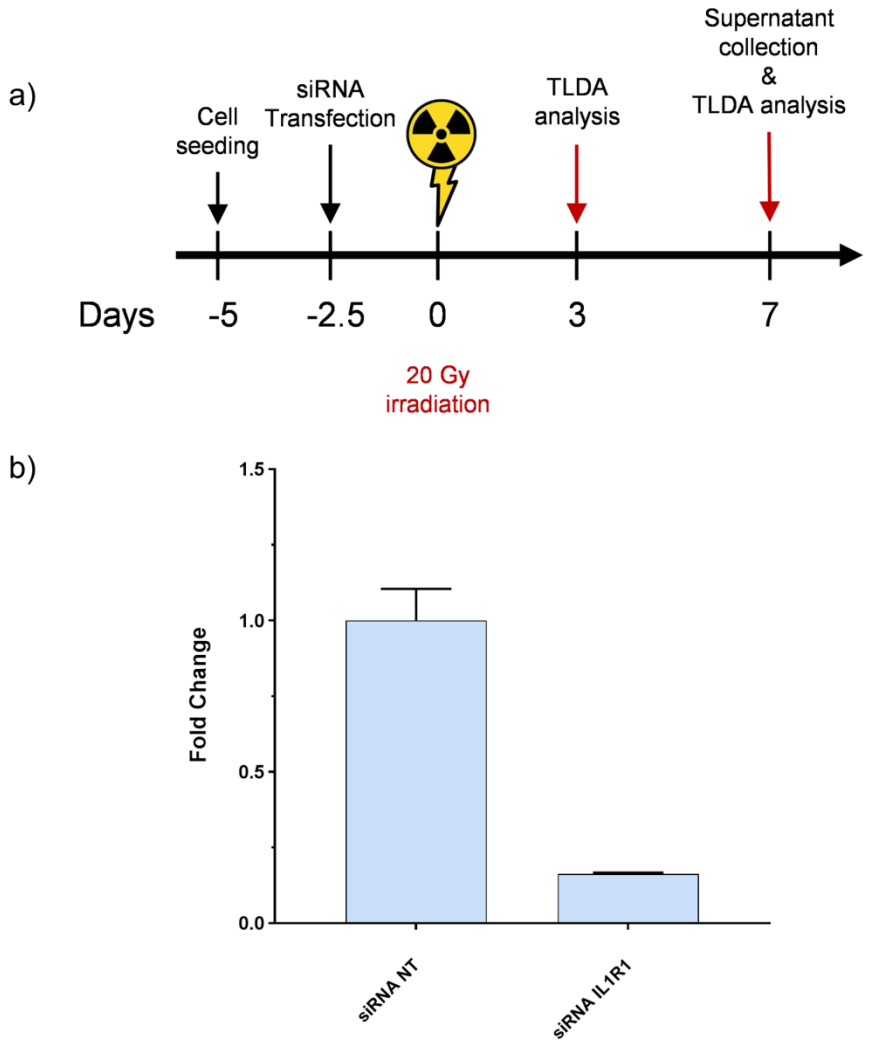


FIGURE S20 : a) Experimental scheme IL1R1 silencing b) Silencing efficiency determined by real-time PCR 3 days after siRNA transfection (Results are mean ± SD from 3 independent experiments).

Discussion & Perspectives

Au cours de ce travail de thèse nous avons observé la présence de différents types de cellules sénescentes *in vivo* après irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques. Ces cellules persistent plusieurs mois après l'exposition aux rayonnements ionisants, elles pourraient donc avoir un impact sur l'homéostasie tissulaire. Il serait alors intéressant d'étudier de manière plus approfondie le rôle de la sénescence dans le développement des lésions radio-induites. Ces travaux pourraient améliorer les connaissances en radiobiologie sur la réponse des tissus sains après irradiation à des doses ablatives. Grâce à ce travail, nous avons également montré l'implication de la voie de signalisation de l'IL-1 dans l'acquisition du phénotype sécrétoire ou *Senescence-Associated Secretory Phenotype* endothélial.

Nous discuterons dans les prochaines parties qui composent cette discussion de l'utilisation en clinique de l'irradiation en conditions stéréotaxiques (SBRT) dans le traitement des cancers pulmonaires, de la nécessité de développer de nouveaux outils pour une meilleure détection des cellules sénescentes *in vivo*, de l'hétérogénéité du phénotype sénescent qui constitue, aujourd'hui, l'un des plus gros obstacles. Enfin, nous discuterons de l'approche que nous avons utilisée pour ce travail ainsi que le ciblage des cellules sénescentes en clinique.

I. La Stereotactic Body Radiation Therapy pulmonaire en clinique

Le traitement de choix pour les patients atteints d'un NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) de stade I demeure la chirurgie (pneumonectomie ou lobectomie), qui permet d'obtenir un excellent taux de contrôle local (98.5% ± 1,5%) (Robinson *et al.*, 2013). Cependant, 20 % à 30 % des patients sont considérés comme médicalement inopérables. Une radiothérapie externe peut être proposée à ces patients, mais les taux de réponse complète se situent entre 33 et 61% (Ghaye, Wanet and El Hajjam, 2016). Depuis le début des années 2000, plusieurs études ont évalué la radiothérapie en conditions stéréotaxiques (SBRT) comme option de traitement pour les patients inopérables et les résultats ont été encourageants, de l'ordre de 90% en contrôle local à trois ans. Cela a mené à l'exploration de l'hypothèse que la SBRT pourrait constituer un traitement alternatif à la chirurgie pour les patients opérables ou ne désirant pas de chirurgie. La SBRT prend actuellement une part grandissante dans le traitement des tumeurs pulmonaires. Le principe de la SBRT diffère de la radiothérapie conformationnelle par la très grande précision qu'elle permet. En multipliant le nombre des faisceaux de traitement (jusque 150 dans certains plans de traitement), souvent non coplanaires et non-isocentriques, la conformalité du traitement est grandement améliorée. La SBRT tire son bénéfice de l'hypofractionnement sévère : la dose totale prescrite est en

général délivrée en 3 à 5 fractions, avec des doses par fraction allant de 5 à 20 Gy. Une BED_{10Gy}, supérieure à 100 Gy (α/β égal à 10), est ainsi délivrée en une à deux semaines. Par cette technique, le controle tumoral et le taux de survie à deux ans sont, respectivement, estimés à 80 – 100% et 56 – 80% (Ghaye, Wanet and El Hajjam, 2016). Ce traitement est réservé aux stades précoces, T1 ou T2, pour des tumeurs de moins de 6cm à limites nettes, sans métastases ganglionnaires ou à distance.

Les premiers travaux sur la SBRT ont été réalisés au Japon ainsi qu'aux Etats-Unis. Une fameuse étude menée par *Uematsu et al*, en 2001, sur 50 patients traités par SBRT pour des doses allant de 50 à 60 Gy en 5 à 10 fractions, a monté un contrôle local à long terme de 47 patients sur 50 ainsi qu'une survie globale à trois ans de 66%. Il est intéressant de noter que parmi les patients, 18 d'entre eux avaient déjà reçu un traitement par radiothérapie conventionnelle (40 à 60 Gy en 20 à 33 fractions) (Uematsu *et al.*, 2001). Suite à ces travaux, la communauté scientifique tenta d'identifier la dose par fraction maximale pouvant être tolérée (MTD, *Maximum Tolerated Dose*). Dans une étude d'escalade de dose, des patients atteints de NSCLC (T1 et T2) reçurent d'abord un traitement de trois fractions de 8 Gy, puis la dose est incrémentée de 2 Gy par fraction. Les auteurs ont montré une MTD de 24 Gy par fraction pour les patients en T2 (Timmerman *et al.*, 2003). De plus, cette étude a montré un excellent contrôle local avec seulement un seul échec lorsque la dose par fraction est supérieure à 16 Gy contre 9 échecs pour des doses par fraction inférieures à 16 Gy, faisant allusion à une relation dose-réponse (Timmerman *et al.*, 2003). Cette relation dose-réponse a été montrée par *Onishi et al* dans leur étude, dans laquelle ils démontrèrent qu'une BED_{10Gy} seuil de 100 Gy, prescrite à l'isocentre était nécessaire pour un meilleur contrôle local accompagné d'une meilleure survie globale (Onishi *et al.*, 2007). À titre de comparaison, en radiothérapie conventionnelle pour le traitement des NSCLC, la dose totale prescrite varie de 50 à 60 Gy, délivrée en fractions de plus ou moins 2 Gy. La BED_{10Gy} est alors égale à ± 66 Gy, bien inférieure aux BED_{10Gy} utilisées en SBRT, pouvant expliquer les faibles taux de réponse de cette technique. Bien que le seuil $BED10_{Gy}$ = 100 Gy fût largement accepté, des études ont montré un meilleur contrôle local ainsi qu'une meilleure survie globale à trois ans avec des $BED_{10} \geq 150$ Gy (Koshy *et al.*, 2015; Stephans *et al.*, 2018). Toutefois, aucune information concernant la distribution de la dose n'a été reportée, si elle englobe le *Planning Target Volume* (PTV) ou s'il s'agit de doses isocentriques. Une étude a suggéré que les doses isocentriques sont corrélées à une meilleure probabilité de contrôle tumoral. Sans connaissance des profils de doses il semble difficile d'en tirer des conclusions (Guckenberger

et al., 2013). Des études, telles que la JCOG 0702, ont aidé à orienter la pratique clinique afin d'obtenir une augmentation de la dose en toute sécurité. Dans celle-ci, le sous-ensemble de NSCLC T2 N0M0 périphérique (> 3 cm) a fait l'objet d'une étude spécifique basée sur des rapports antérieurs démontrant une amélioration du contrôle local lorsque la dose passe de 40 à 48 Gy en 4 fractions. Les auteurs conclurent que pour les PTV périphériques de moins de 100 cm^3, la MTD pourrait passer de 40 Gy en 4 fractions (BED_{10Gy} = 80 Gy) à 55 Gy en 4 fractions (BED_{10Gy} = 130,6 Gy) (Onimaru *et al.*, 2017). Cependant, la MTD des tumeurs périphériques ne peut être appliquée aux tumeurs centrales. En effet la SBRT induit un plus fort taux de toxicité sévère sur ces tumeurs (Timmerman *et al.*, 2006).

Le début des années 2000 a donc fait l'objet de diverses études sur la faisabilité de la SBRT dans le traitement des NSCLC tout en limitant au maximum les toxicités secondaires liées à l'exposition aux rayonnements ionisants. Suite à cela, la recherche clinique s'est orientée vers l'optimisation des schémas d'irradiation qui offriraient un véritable bénéfice pour le patient. Une première étude prospective (RTOG 0236) réalisée sur 55 patients inopérables atteints de cancer du poumon au stade précoce traité par SBRT dont la dose prescrite était de 54 Gy en 3 fractions, a montré un excellent contrôle tumoral (97,6% à trois ans), une meilleure survie globale (55,8% à trois ans) comparé à la radiothérapie conventionnelle (20 à 35% en survie globale à 3 ans). Cependant, le taux de toxicité de grade 3 était de 16,3% sans grade 5 observé (Timmerman *et al.*, 2010). Cette étude a servi de base pour l'identification des meilleurs protocoles dans le traitement des tumeurs pulmonaires centrales et périphériques (Timmerman *et al.*, 2010). Grâce à elle, le schéma trois fois 18 Gy est devenu un standard dans les protocoles fractionnés de SBRT (Guckenberger, 2015). Cependant, en pratique, dans le cas du traitement des NSCLC, les schémas varient d'une à plus de dix fractions d'environ 5 à 34 Gy, influençant les BED_{10Gy} de 200 à 300% (Guckenberger, 2015). Ainsi, dans un effort d'harmonisation, plusieurs équipes ont proposé des protocoles ayant une BED_{10Gy} seuil équivalente à 100-105 Gy, calculée à partir du modèle Linéaire-Quadratique. Cette valeur seuil a été mise en place car il a été démontré qu'une BED_{10Gy} inférieure à 100 Gy n'est pas suffisante pour le contrôle de la tumeur, tandis qu'une BED_{10Gy} supérieure semble augmenter les effets secondaires (Stephans *et al.*, 2018).

Suite à l'étude RTOG 0236, la 0915 a été développée afin d'étudier l'interaction entre morbidité et mortalité potentielles causées par la toxicité liée au traitement et par l'évolution tumorale à l'aide deux schémas de SBRT, différents de celui du RTOG 0236 (Videtic *et al.*, 2015). L'étude a été réalisée sur 84 patients inopérables atteints de NSCLC recevant une dose unique de 34 Gy (BED_{10Gy} = 149,6 Gy) ou une dose de 48 Gy en 4 fractions (BED_{10Gy} =

105,6 Gy) par SBRT en utilisant comme principal paramètre le taux de toxicité de grade 3 ou plus préétabli à un an, compte-tenu de la vulnérabilité de la population cible. Les résultats ont montré que le schéma dose unique présentait moins de toxicité de grade 3 à un an par rapport au schéma fractionné, 10,3% contre 13,3% respectivement. Les données en termes de survie globale à deux ans suggèrent une tendance en faveur du schéma fractionné mais de façon non-significative. Les auteurs précisent tout de même que les comparaisons sur la survie doivent être faites avec prudence car cette étude n'a pas été développée pour répondre à cette question (Videtic *et al.*, 2015). Les auteurs conclurent que la dose unique de 34 Gy est un schéma approprié pour un suivi et une étude plus approfondis, notamment de phase III impliquant une comparaison avec le schéma RTOG 0236 de 54 Gy en trois fractions et utilisant comme paramètre final la survie globale (Videtic *et al.*, 2015). Bien que cela ne soit son but premier, cette étude semble mettre en avant le caractère moins délétère du protocole en dose unique par rapport à celui en dose fractionnée. Pourtant, les toxicités tardives, telles que les plaxopathies brachiales ou la diminution des capacités pulmonaires, ne sont pas étudiées et pourraient être pertinentes sur le plan clinique.

Au vue de la disparité des résultats des études cliniques ayant été réalisées jusqu'à maintenant, une large méta-analyse regroupant 600 patients a récemment été publiée dans le but de déduire l'impact de la SBRT sur les cancers du poumon non à petites cellules au stade précoce (Stephans *et al.*, 2018). Cette analyse regroupe différents schémas d'irradiation séparés en différents groupes selon le nombre de fractions : 1 fraction ayant une dose moyenne de 30 Gy (BED_{10Gy} = 120 Gy), 3 fractions de 20 Gy (BED_{10Gy} = 180 Gy), 4-5 fractions de 10 Gy (BED_{10Gy} = 80 Gy et BED_{10Gy} = 100 Gy) et 8-10 fractions de 7,5 Gy en moyenne (BED_{10Gy} = 108 Gy ; BED_{10Gy} = 129 Gy et BED_{10Gy} = 150 Gy). Très succinctement, cette large étude montre qu'une augmentation de la BED_{10Gy} à plus de 150 Gy améliore le contrôle local à un an mais est associée à une augmentation de la toxicité liée au traitement (Stephans *et al.*, 2018). Malgré un meilleur contrôle local, aucune corrélation n'a été observée entre la dose en SBRT et la survie globale. Ainsi, les auteurs préconisent, en pratique, une approche adaptée aux risques, basée principalement sur la relation entre la tumeur et les tissus sains (taille, localisation et proximité avec les organes à risque), à l'aide des schémas communément acceptés ($BED_{10Gy} \geq 100$ Gy) (Stephans *et al.*, 2018). Les schémas avec une $BED_{10Gy} > 150$ Gy pourraient être bénéfiques à une sous-population de patients dans laquelle l'escalade de dose et les risques de toxicités associés seraient justifiés.

Initialement prescrite pour les patients inopérables atteints de NSCLC, une part grandissante de patients refuse la chirurgie. L'étude menée par *Onishi et al* a montré une

survie globale à 5 ans, pour les patients opérables traités par SBRT d'une BED_{10Gy} seuil égale à 100 Gy, de 72,3% pour les stages IA et 65,9% pour les stages IB (Onishi *et al.*, 2007). Ces résultats ont montré une alternative raisonnable aux patients médicalement opérables. En particulier, pour les patients âgés qui présentent de petites lésions périphériques, une fonction pulmonaire limite et/ou des comorbidités médicales pour lesquelles la chirurgie et l'anesthésie générale ne sont pas sans risques. Deux études visant à comparer la chirurgie avec la SBRT (BED_{10Gy} minimal de 100 Gy) ont été regroupées et analysées par *Chang et al*. À trois ans, les auteurs ont observé des résultats équivalents entre la chirurgie et la SBRT (Chang *et al.*, 2015). De plus, la qualité de vie déclarée par les patients semble être égale sinon meilleure que celle obtenue après chirurgie (Lagerwaard *et al.*, 2012).

Les toxicités liées aux traitements par SBRT sont relativement rares et tolérées mais, l'hypofractionnement sévère peut mettre la vie des patients en danger (Kang *et al.*, 2015; Chua *et al.*, 2017). Parmi elles, nous retrouvons les toxicités des voies respiratoires centrales, telles que la sténose bronchique entraînant une atélectasie (affaissement des alvéoles pulmonaires), nécrose bronchique ou une hémoptysie (rejet de sang à l'occasion d'effort de toux). On retrouve également une toxicité œsophagienne, avec des sténoses, perforations ou fistules trachéo-œsophagiennes, une toxicité aortique telles que l'hémoptysie secondaire à une lésion aortique ou à une rupture aortique, à un anévrisme aortique ou à une dissection aortique, ainsi que de graves toxicités cutanées, des douleurs thoraciques, y compris des fractures des côtes, des pneumopathies radio-induites et plexopathies brachiales. Les complications plus rares comprennent les lésions du nerf vagal et les pneumothorax spontanés. Une diminution de la fonction pulmonaire peut également être observée mais n'est généralement pas cliniquement pertinente (Chua *et al.*, 2017). Les toxicités associées à l'irradiation des tumeurs centrales sont plus sévères par rapport aux lésions périphériques (Timmerman *et al.*, 2006). L'irradiation des tumeurs centrales peut entraîner le rétrécissement complet ou partiel des bronches et porter atteinte aux structures vasculaires, telles l'aorte (Milano *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2009; Oshiro *et al.*, 2010). L'irradiation répétée ou par de fortes doses de l'aorte peut conduire à une hémoptysie pouvant être fatale (Milano *et al.*, 2009; Oshiro *et al.*, 2010). La pneumopathie radique (PR) est l'une des complications majeures qui limite l'escalade de dose pouvant être délivrée aux tumeurs thoraciques. Dans les cas les plus graves, une atteinte pulmonaire et respiratoire de type fibrose survient et nécessite une ventilation assistée. Les taux de pneumopathie radique nécessitant une intervention varient entre 0 et 29% et la survenue d'une PR grave est généralement peu commune, même chez les patients présentant une fonction pulmonaire altérée (Kang *et al.*,

2015). Ceci est probablement dû à la petite taille des cibles et aux marges de planification de la SBRT qui minimisent le volume de tissu sain pulmonaire exposé.

Au cours de ces vingt dernières années, grâce à des études cliniques et aux progrès technologiques de la radiothérapie, la *Stereotactic Body Radiation Therapy* s'est imposée comme traitement de référence dans la prise en charge des cancers pulmonaires non à petites cellules aux stades précoces. L'ère de la médecine de précision a permis une meilleure caractérisation biologique de cette maladie mais a également mis en évidence les différences interindividuelles dans les réponses aux lésions radiologiques. Une meilleure compréhension des facteurs de risque propres aux patients jouera un rôle plus important dans l'évaluation des candidats à la SBRT ainsi qu'à l'identification de ceux pouvant tolérer une escalade de dose. Il devient aujourd'hui impératif de mieux comprendre la radiobiologie de la SBRT sur les tissus sains et tumoraux, de reconnaître les limites de toxicité actuelle de cette technique et de traiter les patients en conséquence. Dans cette optique, le manque de modèles précliniques se fait cruellement ressentir. Nous détaillerons dans la seconde partie de cette discussion le développement des lésions pulmonaires radio-induites ainsi que les travaux du laboratoire sur le développement de modèles précliniques d'irradiation en conditions stéréotaxiques.

II. Développement des lésions pulmonaires radio-induites après irradiation en conditions stéréotaxiques

En radiothérapie conventionnelle, les pneumopathies induites sont habituellement décrites comme des réactions précoces ou tardives. Les réactions précoces se produisent entre un et six mois après traitement. Les complications tardives se traduisent par une fibrose radio-induite définitive observable après six mois et se stabilisent dans les douze à vingt-quatre mois après irradiation (Linda, Trovo and Bradley, 2011). Ces manifestations sont, dans la plupart des cas, asymptomatiques et ne nécessitent pas de traitement spécifique. En clinique, les lésions radiques sont généralement suivies par imagerie via l'identification de modifications scanographiques. Ces modifications touchent le champ de traitement et ne respectent pas forcément les limites anatomiques. Des condensations et les opacités « en verre dépoli », un infiltrat dans la zone traitée avec ou sans effacement des contours vasculaires ou bronchiques, caractérisent la phase initiale. Elle peut également se manifester par des nodules ou des condensations focales. Un épanchement pleural peut éventuellement être retrouvé (Linda, Trovo and Bradley, 2011). Ces images peuvent régresser progressivement ou mener à une fibrose pulmonaire dans les cas les plus sévères. La fibrose pulmonaire se manifeste alors par une zone bien définie de perte de volume, de cicatrice linéaire, d'épaississement septal, d'opacités et de bronchectasies réalisant un tableau de pneumopathie interstitielle. Une déviation du médiastin peut également être retrouvée.

En radiothérapie en conditions stéréotaxiques, les manifestations cliniques sont elles aussi divisées en phases précoce et tardive. Par contre, la multiplication des incidences des faisceaux convergents vers la cible, créant ainsi un fort gradient de dose, induit des changements radiographiques uniques. Les changements précoces induits par la SBRT sont classés en cinq catégories :

- condensation diffuse (Figure 31A) : augmentation diffuse et homogène de l'atténuation du parenchyme pulmonaire qui masque les vaisseaux et les parois bronchiques et remplit totalement le champ d'irradiation
- opacité en verre dépoli diffuse (Figure 31B) : augmentation de la densité parenchymateuse, préservant les contours vasculaires et bronchiques
- condensation hétérogène en patch et opacité en verre dépoli (Figure 31C) : zone hétérogène en mosaïque d'augmentation de la densité qui ne remplit plus totalement la zone traitée

- opacité en verre dépoli en mosaïque (Figure 31D) : zone en patch d'augmentation de l'atténuation et densité tissulaire normale retrouvée autour de la tumeur
- absence de réaction (Figure 31E)

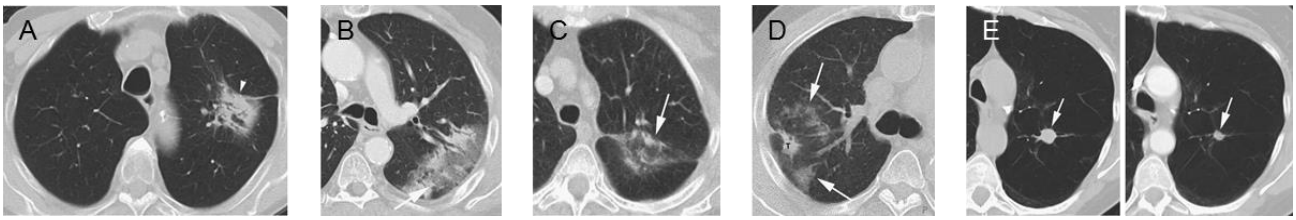


Figure 31. Modifications scanographiques précoces après radiothérapie en conditions stéréotaxiques pour le traitement de NSCLC (T1 N0).
A) Condensation diffuse observée sur CT scan obtenu 5 mois après radiothérapie en conditions stéréotaxiques d'un homme de 83 ans. B) Opacification en verre dépoli chez un homme de 80 ans, 5 mois après SBRT. C) Condensation en patch et opacité en verre dépoli chez une femme de 55 ans atteinte de NSCLC qui ne remplit pas toute la région ayant reçu les plus fortes doses (Flèche). D) Opacité en verre dépoli en patch ou en mosaïque d'une patiente de 55 ans. E) Pas de réaction chez une patiente de 51 ans, avant traitement (gauche) et 4 mois après SBRT (droite), avec diminution de la taille de la masse (Flèches).
D'après Linda et al, *European Journal of Radiology (*2009)

Les modifications scanographiques de type fibrose tardive sont classées en quatre catégories :

- aspects conventionnels modifiés (Figure 32A) : condensation, perte de volume, bronchectasies similaires mais moins étendues que la fibrose après radiothérapie conformationnelle conventionnelle
- fibrose de type masse (Figure 32B) : condensation focale, limitée autour de la tumeur
- fibrose de type cicatricielle (Figure 32C) : opacité linéaire située dans la région de la tumeur, associée à une perte de volume pulmonaire
- absence de traduction radiologique (Figure 32D)

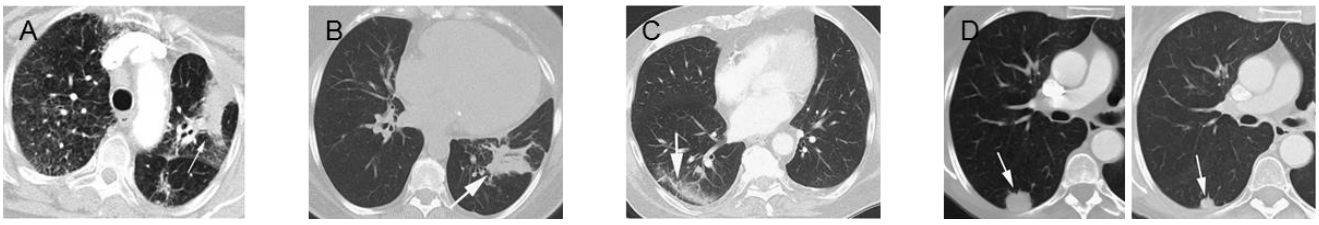


Figure 32. Modifications scanographiques tardives après radiothérapie en conditions stéréotaxiques pour le traitement de NSCLC (T1 N0).
A) Fibrose conventionnelle modifiée d'une patiente de 79 ans atteinte de NSCLC (T1 N0), 21 mois après la fin du traitement. B) Fibrose de type masse retrouvée chez un patient atteint de NSCLC (T1 N0) 11 mois après SBRT. C) Fibrose de type cicatricielle apparue 10 mois après SBRT. D) Pas de réaction chez une patiente, avant traitement (gauche) et 22 mois après traitement (droite).
D'après Linda et al, *European Journal of Radiology* (2009).

La distribution de dose qui caractérise la SBRT est radicalement différente de celle que l'on retrouve dans un traitement par radiothérapie conformationnelle standard. Par conséquent, les pneumopathies induites par la SBRT n'ont pas les mêmes modes de présentation : la forme linéaire des pneumopathies créées par la radiothérapie conformationnelle, bien délimitée entre le tissu irradié et non irradié, n'est pas retrouvée. Dans le cadre d'une SBRT, les régions exposées à de faibles doses sont plus étendues et irrégulières, puisque les faisceaux de traitement et leurs angles sont plus nombreux. À l'inverse, la zone de forte dose est uniforme et de taille plus petite. Ainsi, la forme des lésions induites par la SBRT se conforme plus précisément au *Planning Target Volume* (PTV) initial et n'a pas de forme linéaire. On retrouve le plus souvent une forme sphérique, qui peut être expliquée par la grande conformalité et homogénéité de la dose. De plus, la chronologie d'apparition des anomalies est différente : la plupart des changements apparaissent à plus de trois mois après le traitement (Linda, Trovo and Bradley, 2011). Cette période de latence n'est pas retrouvée lorsqu'une radiothérapie conformationnelle est réalisée puisque la majorité des modifications se produisent dans les premières semaines après le traitement (Ghaye, Wanet and El Hajjam, 2016). Cette différence pourrait s'expliquer par la radiobiologie des fortes doses par fraction.

Les changements radiologiques induits par la SBRT pulmonaire sont donc spécifiques à cette technique et diffèrent des aspects connus pour une radiothérapie conformationnelle, sur le plan topographique et chronologique. L'évaluation de la réponse repose donc sur des critères qui doivent être connus des radiologues et radiothérapeutes. La distribution de dose est un élément essentiel, qui aide à la compréhension des phénomènes biologiques induits par le traitement et doit donc être utilisée pour l'interprétation des résultats.

Irradiation en dose unique

Pour améliorer les connaissances en radiobiologie des tissus sains et/ou tumoraux après irradiation à des doses ablatives, cinq appareils permettant l'irradiation du petit animal en conditions stéréotaxiques ont récemment été acquis en France, dont un à l'IRSN. Le laboratoire de Radiobiologie des expositions Médicales est cependant le premier à s'intéresser à l'utilisation d'un modèle préclinique d'irradiation pulmonaire en arc thérapie.

Les précédents travaux du laboratoire, notamment ceux portés par le Dr. Lavigne ont permis la caractérisation des lésions pulmonaires, de deux à vingt semaines, après exposition à 90 Gy, en arc thérapie au poumon droit, à l'aide d'un collimateur 3 x 3 mm² (Lavigne *et al.*, 2018). La dose de 90 Gy a été reprise des travaux de *Hong et al* afin de mimer les effets d'une

irradiation en conditions stéréotaxiques en clinique. Ces conditions d'irradiation sont propices au développement de pneumopathies radiques aiguës et de la fibrose pulmonaire (Cho *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2014, 2016). La configuration utilisée par *Hong et al* est une irradiation à l'aide d'un faisceau unique et fixe, à l'aide d'un collimateur de 3 mm de diamètre. Pour limiter les lésions à la peau, le laboratoire a choisi de développer le même type d'irradiation mais en arc thérapie. L'évolution des lésions radiques pulmonaires est suivie par *Cone Beam Computed Tomography* (CBCT). Dès deux semaines après irradiation, une opacification, sous forme de patch, est observée au niveau du volume cible. Celui-ci a pu être quantifié et son volume est environ égal à 70 mm^3. Une diminution du volume lésionnel est observable dès quatre semaines post-irradiation (± 40 mm^3) et continue de décroître au cours du temps jusqu'à atteindre une taille minimale d'environ 25 mm^3 à seize semaines après irradiation. À deux semaines après irradiation, les analyses anatomopathologiques montrent une lésion focale sévère avec un important infiltrat inflammatoire, une destruction totale de l'architecture alvéolaire. Dans le parenchyme pulmonaire, des dépôts hyalins accompagnés d'alvéolites fibrino-leucocytaires sont observés. Après irradiation la grande majorité du poumon est engagée puisque dans les zones hors-champ, éloignées du point focal, un large œdème pulmonaire est retrouvé. Après huit semaines, le patch inflammatoire persiste. Dans les zones proches du patch, la présence de macrophages dans les bronchioles signe une bronchiolite respiratoire. Les macrophages retrouvés sont majoritairement de deux types : spumeux et sidérophages, indiquant une altération de l'endothélium micro-vasculaire pulmonaire et la présence de foyers hémorragiques. En effet, les macrophages spumeux sont retrouvés lorsque la couche endothéliale laisse passer les lipoprotéines. Celles-ci sont internalisées par les macrophages qui s'engorgent et deviennent alors des cellules spumeuses. Les macrophages qui phagocytent les hématies et hémoglobines sont appelés sidérophages et sont essentiellement retrouvés en situation pathologique, dans les foyers hémorragiques. La résorption totale de l'œdème pulmonaire laisse à penser que celui-ci ne fut pas d'origine cardiogénique mais plutôt lésionnelle. À vingt semaines post-irradiation, la lésion focale est consolidée par l'accumulation de fibres de collagènes et une diminution de la densité en cellules inflammatoires. Aux abords du patch d'irradiation, la bronchiolite respiratoire perdure avec, toujours, la présence de macrophages spumeux et sidérophages (Lavigne *et al.*, 2018).

Au cours de cette thèse, nous avons irradié des animaux en conditions stéréotaxiques dont les analyses histologiques s'étendent de quatre à vingt-et-un mois post-irradiation. Le modèle animal utilisé pour les expérimentations *in vivo* est une lignée murine dans laquelle le

gène codant pour la luciférase a été placé sous le contrôle du promoteur de CDKN2A (p16) (Burd *et al.*, 2013). Ces animaux hétérozygotes $p16^{INK4}$-LUC, possèdent donc un allèle p16 ne s'exprimant pas. Ce modèle permet de suivre par imagerie bioluminescente l'expression de p16. Contrairement aux travaux antérieurs du laboratoire, nous avons irradié au cours de cette thèse le poumon gauche, à 90 Gy, en arc thérapie. L'architecture pulmonaire des souris diffère de celle de l'Homme. Le poumon droit des souris est divisé en quatre lobes tandis que le poumon gauche n'est constitué que d'un seul lobe. Initialement prévue pour limiter la dose au cœur, l'irradiation en conditions stéréotaxiques du poumon droit induit une lésion focale au niveau des scissions interlobaires, rendant sa caractérisation histopathologique plus difficile. Une irradiation au poumon gauche induit une lésion dont les marges sont bien délimitées et facilement identifiable. Le point focal a été placé de manière à limiter au maximum la dose reçue au cœur, celui-ci reçoit une dose moyenne de 4,1 Gy. À l'aide du micro-CT de la plate-forme d'imagerie de la faculté dentaire de l'université Paris Descartes, nous avons suivi l'évolution de la lésion radio-induite. Le volume ainsi que la densité du patch ont ainsi été quantifiés. Le volume du patch observé est d'environ 8,51 mm^3 en moyenne à quatre mois. De manière étonnante, le volume lésionnel est plus réduit que celui retrouvé lors d'une irradiation sur le poumon droit. Cette différence pourrait s'expliquer par différentes raisons : lors de l'irradiation du poumon droit, il s'avérait que le patch se situait entre les différents lobes de celui-ci, rendant son contourage plus difficile, de plus, l'irradiation au SARRP n'est pas asservie à la respiration, au cours du traitement, le poumon droit peut se dilater augmentant le flou autour du patch, enfin la précision des images acquises pour suivre l'évolution de la lésion n'est pas la même, les acquisitions du poumon droit ont été réalisées à l'aide du CBCT embarqué du SARRP disposant d'une moins bonne précision comparé à un système d'imagerie micro-CT. La densité de la lésion peut être quantifiée en mesurant l'intensité des voxels présents dans le volume considéré. Puisque les images scanners sont en niveaux de gris, l'intensité d'un voxel va donc être proportionnelle à sa densité (les os apparaissent en blanc et les tissus mous en gris). Pour les scanners à rayons X, la radiodensité se mesure en Unité Hounsfield (UH) (Tableau 6).

Comme nous pouvons le voir ci-après, le poumon possède une densité de -500 UH. À quatre mois après irradiation, la densité du patch d'irradiation est égale à environ -145 UH. Une densification est donc observée au niveau du point focal ayant reçu les plus fortes doses.

Matière	UH
Air	-1000
Poumons	**-500**
Graisses	-100 à -50
Eau	0
Liquide cérébro-spinal	15
Foie	40 à 60
Tissus mous	100 à 300
Os	700 (os spongieux) à 3000 (os denses)

Tableau 6. Echelle de Hounsfield

Au niveau histologique, les observations faites à quatre mois après irradiation sont sensiblement identiques aux analyses du Dr Lavigne, avec une consolidation de la lésion par l'accumulation de fibres de collagène, la diminution de la densité cellulaire, bronchiolites et alvéolites macrophagiques persistantes autour de la lésion fibreuse ainsi que des traces d'œdème dans les zones plus éloignées. La détection de la β-gal indique la présence de quelques cellules positives au sein de la lésion mais la majorité d'entre elles se situe aux abords. Des observations similaires ont été faites par immunohistochimie via la détection de cellules p21 ou p16 positives. Ces cellules sont en forte majorité des pneumocytes de type II ainsi que des macrophages. Après huit mois, les analyses des images scanners indiquent que le volume de la lésion focale ainsi que sa densité restent inchangés par rapport au temps quatre mois post-irradiation (8,43 mm^3). La quantification de la bioluminescence indique une augmentation de l'expression de p16 au niveau pulmonaire par rapport à quatre mois post-irradiation. Au niveau histologique, le parenchyme pulmonaire reste altéré, la présence de foyers macrophagiques ainsi que de nombreuses bulles sont observées, même dans les zones pleurales ayant reçu de faibles doses d'irradiation. La détection de marques de sénescence révèle, de manière étonnante, l'absence complète de cellules β-gal positives au cœur de la lésion, celle-ci sont retrouvées tout autour, formant un anneau composé principalement de cellules de l'immunité innée (macrophages). Enfin, quelques cellules β-gal positives peuvent être retrouvées en zone pleurale. Aux temps plus tardifs, douze et seize mois, nous observons une nette diminution de la taille de la lésion par rapport au temps huit mois, 4,6 mm^3 en moyenne. Cette baisse du volume lésionnel est accompagnée de la formation d'une pliure dans le poumon gauche. Le patch d'irradiation est caractérisé par une forte densité tissulaire qui conduit à sa rigidification, sa rétraction et à la formation de ce pli. Hormis les zones très proches de la lésion fibreuse, nous observons un parenchyme pulmonaire quasi-normal indiquant l'implication des mécanismes de réparation tissulaire. Les œdèmes alvéolaires et

foyers macrophagiques ont été résorbés. Aucune cellule positive pour les marques de sénescence n'est retrouvée en zone pleurale, par contre celles-ci sont toujours retrouvées dans la zone circulaire entourant la lésion radique. De rares cellules marquées au von Willebrand Factor, marqueur endothélial, sont également positives pour p16 et surexpriment l'ARNm codant pour 21, détectable par hybridation *in situ*. Nous observons une augmentation constante de la bioluminescence après irradiation signant une activation continue du promoteur de p16. De plus, l'intensité du patch semble diminuer à ces temps plus tardifs. Enfin, à vingt-et-un mois après irradiation, l'état pathologique des poumons rend l'identification des marges de la lésion plus difficile, il en résulte un artefact sur le volume et l'intensité du patch d'irradiation.

Pour résumer, l'irradiation en conditions stéréotaxiques du poumon induit la présence de cellules sénescentes au niveau de la lésion. Celles-ci semblent être transitoires puisqu'elles ne sont observées qu'à quatre mois après irradiation. Au-delà, elles sont majoritairement présentes autour de la lésion. Les marques de sénescence que nous avons testées (β-gal, p21 et p16) sont majoritairement portées par les macrophages et les pneumocytes de type II. De rares cellules endothéliales expriment les marqueurs p21 et p16 mais la co-détection avec la bêta-galactosidase n'a jamais été observée. Le fait que les cellules sénescentes ne soient plus présentes au sein de la lésion laisse possiblement suggérer une élimination par le système immunitaire. Il a récemment été décrit dans la littérature que les cellules de l'immunité innée sont capables d'acquérir des marques de sénescence tout en restant totalement fonctionnelles (Hall *et al.*, 2016). Ainsi, les macrophages, porteurs des marques de sénescence, forment une écharpe autour de la lésion, sont potentiellement actifs, entretiennent la lésion et peuvent participer au processus pathologique (Hall *et al.*, 2016; Groves *et al.*, 2018; Meziani, Deutsch and Mondini, 2018). La quantification de la bioluminescence montre également une augmentation de celle-ci au cours du temps qui pourrait être le reflet de ces cellules.

Ce type d'irradiation conduit à la formation d'un patch d'irradiation fibreux. La densité de cette lésion est quatre fois supérieure au tissu d'un poumon sain. Cette densification tissulaire entraîne rétraction du lobe pulmonaire qui peut être observée par imagerie scanner mais également au niveau macroscopique par la formation d'un pli. Cette rigidification induit sensiblement une baisse du volume lobaire qui peut entraîner une réduction des capacités respiratoires (Lederer and Martinez, 2018).

De manière étonnante, l'intensité du patch d'irradiation, mesurée par tomodensitométrie, diminue au cours du temps. Cette diminution de l'intensité peut

potentiellement être expliquée par la baisse de la cellularité observée au sein de la lésion radio-induite.

Irradiation en dose fractionnée

Étant donné que de plus en plus de protocoles fractionnés sont aujourd'hui utilisés en SBRT, nous avons également développé un modèle fractionné. Un premier protocole fractionné de trois fois 20 Gy a été étudié au laboratoire en parallèle des premières expérimentations à 90 Gy dose unique. Bien que ce protocole soit l'un des plus sévères parmi ceux utilisés en clinique, celui-ci provoque certes de l'inflammation chez la souris mais n'est pas suffisant pour induire l'apparition d'une fibrose radique pulmonaire. Nous avons donc décidé d'augmenter le nombre de fractions de trois à cinq, pour une dose totale de 100 Gy. Les animaux ont été suivis longitudinalement jusqu'à quinze mois post-irradiation. Tout comme les animaux irradiés en dose unique, divers paramètres ont été recueillis : la quantification de la bioluminescence, la tomodensitométrie et l'histologie.

Jusqu'au point final, aucune marque lésionnelle n'est observée par tomodensitométrie, par contre de manière étonnante la bioluminescence montre des valeurs proches de celles acquises en dose unique 90 Gy et ce, à tous les temps. En tardif, une légère opacification en verre dépoli est observable sur le poumon gauche. L'opacification en verre dépoli peut être le signe clinique d'un comblement alvéolaire signant une inflammation ou œdème, d'un épaississement des septa alvéolaires ou à des structures fibreuses. Par son caractère diffus, le contourage de la lésion n'a pu être réalisé. De plus, aucune différence d'intensité entre le poumon gauche et le poumon droit n'a significativement été observée lorsque la quantification est faite sur les poumons entiers. Pour pallier à cela, nous avons fait le choix de quantifier l'intensité sur une seule coupe 2D au niveau du point focal ayant reçu la plus forte dose. Nous avons ensuite quantifié l'intensité de différentes zones de la coupe, réparties en 6 régions d'intérêt (ROI, *Region of Interest*). Les résultats ont montré une augmentation de la densité pulmonaire dans les ROI proches du point focal mais pas dans les ROI plus éloignées, celles ayant reçu les plus faibles doses. Il est intéressant de noter que cette densification pulmonaire n'est retrouvée qu'au temps quinze mois post-irradiation. Comparé au protocole en dose unique, la lésion semble moins sévère d'un point de vue histologique. Celle-ci est beaucoup plus diffuse avec des marges moins nettes. La lésion peut être caractérisée en zones distinctes, une première zone dans laquelle elle paraît plus sévère, avec perte des structures alvéolaires et présence d'un tissu plus dense. La seconde zone est caractérisée par un épaississement des septa alvéolaires et la présence de nombreuses cellules immunitaires. C'est

d'ailleurs dans cette zone que l'on retrouve l'expression des marques de sénescence, elle pourrait être associée à l'aire présente autour du patch après 90 Gy. La coloration au trichrome de Masson révèle des dépôts des collagènes observés à douze et quinze mois indiquant l'installation d'une fibrose pulmonaire.

L'irradiation fractionnée en conditions stéréotaxiques à une dose de 100 Gy en 5 fractions semble induire une lésion pulmonaire de nature différente de celle observée avec une dose unique. En effet, nous avons observé le développement d'une lésion moins sévère, plus diffuse avec une cinétique d'apparition sensiblement différente du protocole « 90 Gy dose unique ». Là où une densification du tissu reflétant une fibrose pulmonaire est détectée par tomodensitométrie dès 4 mois après 90 Gy, cette densification n'est observée qu'après 15 mois dans le protocole 5 fois 20 Gy. De plus, les modifications scanographiques indiquent une fibrose de type masse pour les animaux ayant reçu la dose 90 Gy tandis qu'une opacification en verre dépoli est observée chez ceux ayant reçu 5 fois 20 Gy. Chez les patients atteints de NSCLC et traités par SBRT, la fibrose de type masse est une modification scanographique tardive après traitement, tandis que l'opacification en verre dépoli est observée dans les temps plus précoces. Après une dose unique de 90 Gy la fibrose pulmonaire radio-induite semble donc se développer à un rythme plus soutenu. Ce type de résultat est plutôt attendu au vue de la différence de BED_{3Gy} (α/β = 3 Gy) : 2790 Gy pour le protocole dose unique contre 767 Gy pour le protocole fractionné. Bien que ces valeurs doivent être prises avec précaution, étant donné que la BED_{3Gy}, calculée à partir du modèle Linéaire-Quadratique et ne peut s'appliquer aux fortes doses par fraction (Kirkpatrick, Meyer and Marks, 2008), nous pouvons tout de même en déduire qu'une SBRT en fractionné de 5 fois 20 Gy est capable d'induire le développement d'une fibrose radio-induite mais dans des délais plutôt tardifs. Il serait alors intéressant de développer un modèle d'irradiation fractionnée chez la souris en faisant varier la BED de manière à observer une lésion dans les temps plus précoces afin de la caractériser et de suivre son évolution. C'est d'ailleurs l'un des objectifs d'une thèse en cours au laboratoire. Au vue de la démocratisation de la SBRT, ces données permettront d'alimenter les connaissances sur la compréhension des effets des fortes doses par fraction sur les tissus sains, qui sont aujourd'hui très mal connus.

Grâce à l'utilisation du *Small Animal Radiation Research Platform* (SARRP), nous sommes en mesure de réaliser des irradiations pulmonaires en conditions stéréotaxiques. Nous avons montré que ce type d'irradiation est capable d'induire une lésion sévère avec induction du phénotype sénescent au sein de divers types cellulaires. Ces cellules sont détectées de

manière précoce et restent présentes jusqu'à des temps très tardifs après irradiation. Ces observations nous permettent de conclure que notre modèle est pertinent pour l'étude de l'‘implication de la sénescence dans le développement de la fibrose radio-induite. Dans notre étude, l'observation de la sénescence s'est principalement basée sur la détection de la β-galactosidase. Bien que cette technique reste la plus employée par la communauté scientifique, utilisée seule, celle-ci souffre de nombreuses limites.

III. Détection des cellules sénescentes *in vivo*

La sénescence est un phénomène à multiples facettes, jouant aussi bien un rôle dans la suppression tumorale, la cicatrisation, le développement embryonnaire, que dans le vieillissement, l'inflammation chronique et le développement de nombreuses pathologies (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). La sénescence cellulaire survient tout au long de la vie d'un individu. Elle est décrite comme un arrêt stable et irréversible de la prolifération. Les cellules sénescentes sont altérées et sont caractérisées par la présence permanente de dommages à l'ADN induits par divers stimuli (raccourcissement des télomères, activation d'oncogènes, stress oxydatif…). Ce phénotype est souvent considéré comme une épée à double-tranchant, pouvant à la fois être bénéfique et délétère. Ces effets vont dépendre de la présence transitoire ou persistante des cellules sénescentes dans le tissu (Tchkonia *et al.*, 2013).

Ces dernières années les études menées sur la sénescence cellulaire ont permis d'élucider ses nombreux rôles physiologiques et pathologiques, notamment son implication dans le vieillissement et les pathologies liées à l'âge, via la génération du modèle murin INK-ATTAC (Baker, Childs, Durik, Wijers, Sieben, Zhong, Saltness, Jeganathan, Verzosa, *et al.*, 2016). Ce modèle exprime une protéine de fusion appelée FKBP-Caspase8 sous le contrôle du promoteur de $p16^{INK4}$. L'injection d'un produit de synthèse, l'AP20187, induit la dimérisation de deux protéines FKBP-Caspase8 et l'activation de la caspase 8. Ainsi, si $p16^{INK4}$ est exprimée et après injection de l'AP20187, toutes les cellules exprimant p16 entrent en apoptose (Figure 25) (Baker, Childs, Durik, Wijers, Sieben, Zhong, Saltness, Jeganathan, Verzosa, *et al.*, 2016). Bien que les dernières avancées aient permis une meilleure compréhension de ce phénotype, la nécessité d'identifier des marqueurs moléculaires spécifiques permettant la détection de cellules sénescentes *in vivo* est aujourd'hui l'un des plus grands challenges dans ce domaine d'étude. À ce jour, la méthode la plus utilisée, *in vitro* et *in vivo*, est sans aucun doute la détection de la β-galactosidase associée à la sénescence (SA-β-Gal) établie par *Dimri et al* en 1995 (Dimri *et al.*, 1995). Cependant, cette méthode, utilisée seule, n'est pas suffisante pour conclure à la présence ou non de cellules sénescentes. En effet, la β-galactosidase peut être exprimée par des cellules confluentes *in vitro* ainsi que dans certaines lignées immortalisées. La déplétion en sérum peut également induire sa surexpression (Evangelou *et al.*, 2017). La progressive prise de conscience que la sénescence est un évènement multifactoriel a permis l'adoption d'une stratégie utilisant de multiples marqueurs par la communauté scientifique (Sharpless and Sherr, 2015). La détection de la β-

galactosidase est alors souvent combinée à des marqueurs de dommages à l'ADN (γH2AX, SAHF), la perte de lamine B1, l'arrêt du cycle cellulaire (surexpression des CDKI p21, $p16^{INK4}$), l'absence de marques de prolifération (Ki67, absence d'incorporation du BrdU) ou l'expression de facteurs composant le SASP (Sharpless and Sherr, 2015).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons adopté cette stratégie *in vivo*. Les poumons des animaux irradiés en conditions stéréotaxiques ont été prélevés et l'organe entier est incubé dans une solution de X-gal, substrat chromogénique de la-β-galactosidase. La détection de la β-galactosidase a été combinée à des marquages immunohistochimiques reconnaissant le marqueur d'arrêt du cycle, p21. La détection par hybridation *in situ* a également été réalisée. De plus, afin d'identifier des cellules endothéliales sénescentes après irradiation, la détection de SA-β-Gal et p21/p16 est associée à celle des marqueurs endothéliaux comme le CD31 ou le vWF. Fort heureusement, ces différentes techniques se sont révélées être compatibles entre elles sur la même coupe histologique, ce qui n'est pas toujours le cas (Biran *et al.*, 2017). Combinées entre-elles, ces méthodes de détection sont lourdes, coûteuses et chronophages. La plupart de ces marqueurs ne sont pas exclusifs de la sénescence et ne sont pas retrouvés dans tous les types cellulaires (Salmonowicz and Passos, 2017). De plus une étude a récemment montré que les cellules exprimant des marqueurs de sénescence ne le sont pas forcément (Hall *et al.*, 2016). Dans un modèle de transplantation permanente de fibroblastes sénescents, les auteurs montrent que les cellules immunitaires recrutées arborent des marques de sénescence, comme l'expression de la β-galactosidase à pH 6 et l'expression de p16. Ces cellules immunitaires, principalement des macrophages (SAM, *Senescence-Associated Macrophages*), sont parfaitement fonctionnels et sont capables de phagocytose (Hall *et al.*, 2016). Des observations similaires ont été faites dans notre étude *in vivo*.

À l'inverse des recommandations de *Sharpless*, certains groupes de recherche s'attachent à identifier des marqueurs spécifiques de la sénescence, cependant pour des raisons biologiques et méthodologiques, la tâche n'est pas si aisée. D'abord, la sénescence cellulaire est caractérisée par de nombreux changements, par exemple au niveau de l'expression de gènes, dont très peu sont exclusifs au phénotype sénescent. De plus, ces changements suivent une certaine cinétique, fait sur lequel nous avons travaillé au cours de cette thèse, il devient alors difficile d'identifier le timing au cours duquel le marquage d'intérêt doit être réalisé. Ensuite, la plasticité du phénotype sénescent rend difficile la découverte d'un marqueur spécifique, étant donné que la sénescence peut différer selon les stimuli inducteurs et le type cellulaire. Enfin, au fur et à mesure des connaissances acquises sur le phénotype sénescent, celui-ci s'avère d'une remarquable hétérogénéité aussi bien *in*

vitro qu'*in vivo*. Nous reviendrons plus en détail sur cette caractéristique ultérieurement. La complexité de la sénescence cellulaire est donc un frein important dans la recherche de marqueurs spécifiques de ce phénotype.

De récentes études ont tout de même identifié de nouveaux marqueurs pouvant potentiellement être utilisés dans la détection spécifique des cellules sénescentes, notamment les travaux menés par *Frescas et al*. Les auteurs ont immunisé des souris BALB/c par injection intrapéritonéale de fibroblastes pulmonaires murins sénescents (Frescas *et al.*, 2017). Les auteurs identifièrent un IgM, le clone 9H4, particulièrement affin aux fibroblastes sénescents. Enfin, une analyse par spectrométrie de masse leur a permis d'identifier l'épitope de cet anticorps. Le clone 9H4 reconnaîtrait une forme oxydée de la vimentine présente à la membrane cellulaire. Ainsi, les auteurs ont montré, d'une part, que des modifications post-traductionnelles, de type oxydation, ont lieu au cours de la sénescence et proposent d'autre part, la vimentine oxydée comme nouveau marqueur de sénescence cellulaire (Frescas *et al.*, 2017).

La lipofuscine est un agrégat, composé de débris moléculaires, qui s'accumulent avec l'âge dans de nombreux tissus (cerveau, cœur, muscle squelettique, peau) (Evangelou *et al.*, 2017). Étant composé de lipides, la lipofuscine peut être détectée par des méthodes histochimiques comme le Noir Soudan B. Partant de ce constat, *Evangelou et al* ont synthétisé un composé proche du Noir Soudan B couplé à la biotine, appelé GL13 (Evangelou *et al.*, 2017). Les auteurs ont testé leur nouveau composé sur différents types cellulaires soumis à différents stimuli inducteurs de sénescence ainsi que chez la souris et sur des tissus humains (Figure 33). Les résultats ont montré une excellente concordance entre les détections de SA-β-gal classique et lipofuscine (Noir Soudan B seule et GL13). De plus, ce marquage est négativement corrélé à l'incorporation de BrdU (Evangelou *et al.*, 2017). Enfin, détecter la lipofuscine présente certains avantages comparé à la SA-β-Gal, la seule utilisation du GL13 est compatible avec la combinaison d'autres anticorps pour des analyses en immunohistochimie ou en cytométrie en flux et le marquage au GL13 ne présente pas de faux positifs lorsque les cellules sont à confluence ou déplétées en sérum (Evangelou *et al.*, 2017). Par l'utilisation de leur composé nouvellement synthétisé, les auteurs proposent donc la lipofuscine comme marqueur universel de la sénescence *in vitro* et in *vivo*.

Tandis que certains s'attèlent à rechercher un marqueur universel de la sénescence, d'autres proposent l'utilisation d'une signature moléculaire pour identifier les cellules sénescentes (Hernandez-Segura *et al.*, 2017). C'est le cas notamment des travaux *d'Hernandez-Segura et al*, dans lesquels les auteurs identifièrent une signature transcriptomique globale de la

sénescence, composée de 55 gènes. Les auteurs testèrent cette signature moléculaire sur différents types cellulaires soumis à de multiples stimuli inducteurs de sénescence. Ils comparèrent également cette signature sur des données RNA-seq issus de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, pathologie connue pour arborer des marques de sénescence. De cette étude, les auteurs en conclurent que leur signature moléculaire est un bon outil pour l'identification de cellules sénescentes, même *in vivo*. Cependant, la combinaison des gènes utilisés doit être améliorée car ces derniers ne sont pas régulés de la même manière ni dans le même timing. Les auteurs mettent cette disparité d'expression sur le compte de l'hétérogénéité de la sénescence.

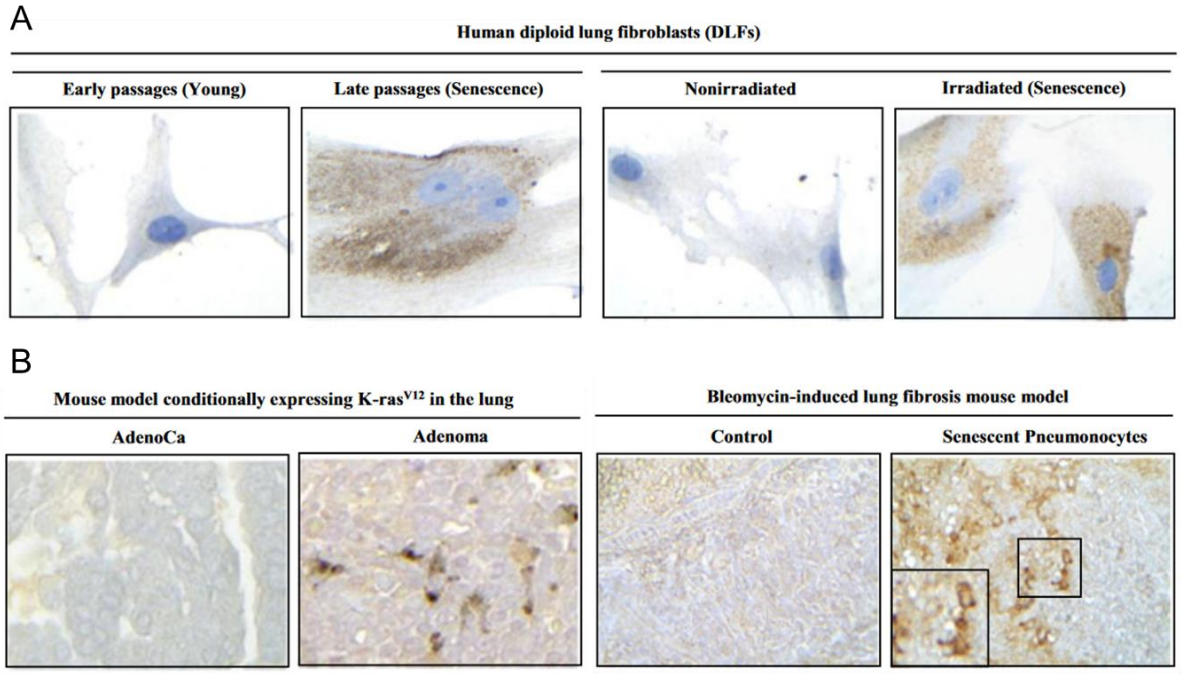


Figure 33. Détection des cellules sénescentes in vitro et in vivo par marquage au GL13.
A) Marquage in vitro au GL13 sur des fibroblastes pulmonaires humains cultivés de manière à atteindre des passages tardifs ou soumis à une irradiation. B) Détection des cellules accumulant la lipofuscine in vivo. À gauche, un modèle murin exprimant la forme mutée de K-ras. À droite, des pneumocytes exprimant la lipofuscine après induction de la fibrose par exposition à la bléomycine. D'après Evangelou et al*, Aging Cell* (2017)

De nouvelles méthodes dans la détection des cellules sénescentes émergent peu à peu. Bien que les nouveaux marqueurs « universels » possèdent un fort potentiel, ces derniers ne sont pas encore mûrs et nous ne disposons pas encore du recul nécessaire pour leur utilisation en routine. Pour l'heure, l'utilisation de multiples marqueurs semble être la seule option valable pour l'identification des cellules sénescentes *in vivo*. Les travaux réalisés au cours de cette thèse se trouvent donc dans de bonnes configurations pour la détection de la sénescence. Les études utilisant des stratégies transcriptomiques pour l'identification des cellules sénescentes sont robustes mais souffrent du caractère hétérogène des cellules sénescentes.

IV. Hétérogénéité des cellules sénescentes

Au fur et à mesure des avancées en matière de compréhension du phénotype sénescent, les études se heurtent peu à peu à une difficulté : l'hétérogénéité des cellules sénescentes. En effet, il est difficile de décrypter ce phénotype lorsque les cellules sénescentes arborent des caractéristiques différentes entre elles. Cette hétérogénéité a d'ailleurs été prédite par *Sharpless* qui prône l'utilisation de multiples marqueurs pour leur détection (Sharpless and Sherr, 2015).

L'hétérogénéité du phénotype sénescent peut être définie à deux niveaux de complexité. Le premier niveau se situe à l'échelle tissulaire. Sous l'effet d'un stimulus, différents types cellulaires vont répondre. Ces nombreux types cellulaires vont composer une première population de cellules sénescentes hétérogène. Nous avons pu observer, dans les poumons des animaux irradiés en conditions stéréotaxiques, cette hétérogénéité. Par immunohistochimie, nous avons identifié l'expression de marqueurs de sénescence, SA-β-Gal et p21, par des pneumocytes de type II, des macrophages et des cellules endothéliales. De manière intéressante, cette hétérogénéité au sein du tissu dispose d'un autre degré de complexité. En effet, avons pu, par exemple, observer l'expression par les macrophages de SA-β-Gal mais l'expression de p21 n'est pas retrouvée. À l'inverse, des cellules négatives pour la SA-β-gal, sont positives pour l'expression de p21, c'est le cas notamment des cellules endothéliales.

Les travaux de *Schafer et al* mettent en évidence l'hétérogénéité de la sénescence. Les auteurs ont montré l'implication de divers types cellulaire sénescents dans le développement de la fibrose idiopathique pulmonaire (IPF, *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*). Dans un modèle de fibrose induite par instillation intratrachéale de bléomycine chez la souris, les auteurs ont criblé par FACS (*Fluorescent-Activated Cell Sorting*) les cellules des poumons pathologiques. Ils ont ainsi observé des marques de sénescence dans au moins trois types cellulaires : les fibroblastes pulmonaires, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Schafer *et al.*, 2017). Basé sur la surexpression des facteurs composant le *Senescence-Associated Secretory Phenotype*, concomitante à la surexpression de collagènes par ces trois types cellulaires, les auteurs concluent que la sénescence participe au développement de la fibrose pulmonaire (Schafer *et al.*, 2017). Ces travaux montrent l'implication d'une population de cellules sénescentes hétérogène dans le développement de l'IPF. Déterminer l'implication réelle de chacun de ces types cellulaires dans le développement de pathologies, comme la fibrose, constitue le prochain défi.

Le second niveau de complexité réside dans le fait qu'au sein d'une population de cellules sénescentes, constituée d'uniquement d'un seul type cellulaire, nous allons retrouver des différences d'expression de certains marqueurs. Par exemple, dans notre étude, nous avons irradié des HUVECs à différentes doses (2, 5, 10 et 20 Gy). La sénescence cellulaire est, entre autres, caractérisée par l'augmentation de la taille des cellules et la surexpression de SA-β-Gal sept jours après irradiation, les cellules endothéliales sont triées en fonction de leur taille, les « grosses » cellules sont ainsi séparées puis analysées au niveau transcriptionnel. Les résultats ont montré des différences d'expression sur certains gènes en fonction de la taille des cellules. De la même manière, toujours à sept jours après irradiation, les HUVECs sont marquées au C_{12}FDG, substrat de la β-galactosidase émettant de la fluorescence lorsqu'il est clivé par l'enzyme, et sont analysées par cytométrie en flux. Les résultats ont montré, pour chaque dose, une augmentation de la taille des cellules après irradiation et l'augmentation de fluorescence du C_{12}FDG. De manière étonnante, certaines « grosses » cellules n'expriment pas de SA-β-Gal et, à l'inverse, des cellules de taille plus modeste surexpriment celle-ci. L'interprétation de ces deux uniques marqueurs n'est, bien sûr, pas suffisante pour conclure à ce phénomène mais elle peut être utilisée comme preuve de concept afin d'illustrer l'hétérogénéité de la sénescence endothéliale. Basée sur l'analyse transcriptomique en cellule unique, l'équipe de *Campisi* a mis en évidence cette hétérogénéité *in vitro* chez les fibroblastes (Wiley *et al.*, 2017). La sénescence de fibroblastes humains IMR-90 a été induite par exposition à la bléomycine. La mesure d'expression de gènes par PCR quantitative sur cellule unique a révélé un profil d'expression hautement hétérogène d'une cellule à l'autre. Parmi les gènes présentant les plus fortes variabilités, nous retrouvons la perte de lamine B1 et des facteurs composant le SASP tels que l'IL-8 et l'IL-1A (Wiley *et al.*, 2017). Bien que l'hétérogénéité ait été établie *in vitro*, les auteurs suspectent qu'elle pourrait l'être d'autant plus *in vivo*. Cette variabilité au sein d'une même population cellulaire suggère que l'utilisation d'un unique marqueur universel de la sénescence semble peu robuste et difficile à mettre en œuvre, surtout *in vivo* où la proportion de cellules sénescentes est très faible, même dans les tissus âgés (Wiley *et al.*, 2017). Pour limiter ces effets, *Wiley et al* recommandent donc, comme *Sharpless*, l'utilisation de multiples marqueurs pour la détection des cellules sénescentes, avec au moins la SA-β-Gal, la délocalisation de HMGB1, p21, p16 et des facteurs sécrétés (Wiley *et al.*, 2017).Par cette étude, les auteurs ont montré une preuve de principe que l'analyse en cellule unique possède également le potentiel pour l'identification des cellules sénescentes *in vivo* (Wiley *et al.*, 2017).

L'hétérogénéité des cellules sénescentes constitue aujourd'hui un réel obstacle dans leur caractérisation et leur potentiel impact sur le tissu. Bien que les techniques d'analyse en cellule unique soient récentes, elles permettront d'explorer l'hétérogénéité des populations cellulaires et d'améliorer les connaissances en termes de réseaux moléculaires, qui permettront à la communauté scientifique de découvrir de nouvelles façons de diagnostiquer et traiter les pathologies (Hodzic, 2016). Une analyse d'expression de gènes en cellule unique pourrait constituer un atout majeur dans notre étude. La caractérisation transcriptionnelle par analyse sur cellule unique de cellules pulmonaires après irradiation en conditions stéréotaxiques permettrait d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement des lésions radio-induites.

Comme nous l'avions déjà évoqué au cours de cette discussion, nous avons observé différents types cellulaires exprimant des marques de sénescence. Chacun d'entre eux peuvent participer à l'évolution de la lésion radiologique. Au cours de cette thèse, nous nous sommes exclusivement centrés sur les cellules endothéliales. Malgré la faible proportion de cellules endothéliales exprimant des marques de sénescence (p21 et $p16^{INK4}$) après irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques, nous avons choisi d'étudier ce type cellulaire car leur implication dans le développement des lésions radio-induites a été démontrée à de maintes reprises. L'irradiation des cellules endothéliales peut conduire à leur mort par apoptose, leur activation, leur différentiation par transition endothélium-mésenchyme et/ou à l'induction de la sénescence (Paris, 2001; Gaugler *et al.*, 2004; Mintet *et al.*, 2015; Wang, Boerma and Zhou, 2016). Ces changements phénotypiques peuvent conduire à une perturbation de l'homéostasie vasculaire avec la surexpression des molécules d'adhésion, la sécrétion exacerbée d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines qui conduisent au maintien d'un état pathologique.

V. Caractérisation de la dynamique transcriptionnelle de la sénescence endothéliale radio-induite

De nombreuses études ont montré que les cellules endothéliales peuvent entrer en sénescence après exposition aux rayonnements ionisants (Chen *et al.*, 2006; Yentrapalli *et al.*, 2013; Lowe and Raj, 2014; Dong *et al.*, 2015; Wang, Boerma and Zhou, 2016). De plus, plusieurs auteurs ont récemment montré l'implication de ce phénotype dans le développement de pathologies pulmonaires (Barnes, 2014; Campisi, 2016; Houssaini *et al.*, 2018). Les travaux de *Citrin et al* ont montré l'implication des pneumocytes de type II sénescents dans le développement des lésions radiologiques après irradiation hémi-thoracique (Citrin *et al.*, 2013) Plus récemment, *Schafer et al* ont montré l'implication d'au moins trois types cellulaires dans le développement de la fibrose pulmonaire idiopathique (Schafer *et al.*, 2017). Parmi elles, les cellules endothéliales présentent de fortes marques de sénescence. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à ces dernières et avons développé une approche nouvelle en utilisant les HUVEC comme modèle *in vitro* pour l'étude transcriptionnelle de la sénescence radio-induite.

Dynamique transcriptionnelle de la sénescence endothéliale radio-induite

En biologie, les systèmes étudiés ne sont pas statiques, ils sont dynamiques et évoluent au cours du temps. Par exemple, la sénescence cellulaire est un processus multifactoriel présentant des modifications qui suivent une cinétique donnée. Etant données les caractéristiques dynamiques des systèmes biologiques, une étude avec un point temporel défini influencera fortement les résultats obtenus. Il est donc essentiel d'étudier ces cinétiques pour mieux comprendre le système dans son ensemble (Cavill, Kleinjans and Briedé, 2013). Bien que l'acquisition de données temporelles soit aujourd'hui indispensable, leur interprétation n'est pas toujours aisée surtout lorsque les jeux de données combinent plusieurs variables, dans ce cas, l'utilisation d'outils mathématiques appliqués à la biologie devient une nécessité (Liang and Kelemen, 2017). Nous avons développé une méthode d'analyse d'expression de gènes combinant biologie, mathématiques et bio-informatique, avec la collaboration du Dr. Benadjaoud, mathématicien à l'IRSN. À l'aide de ses compétences, nous sommes en mesure de caractériser, au niveau transcriptionnel, les séquences d'évènements qui suivent l'irradiation de cellules endothéliales *in vitro* et d'établir le profil moléculaire de la sénescence endothéliale qui nous a permis d'identifier des cibles pouvant impacter ce phénotype, grâce à la construction d'un réseau d'inférences.

Dans le but d'établir le profil transcriptionnel dynamique de la sénescence endothéliale radio-induite, nous avons soumis des HUVECs à une gamme de 8 doses d'irradiation (1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 et 20 Gy) associée à une cinétique de 7 points de mesure (1, 2, 3, 4, 7, 14 et 21 jours post-irradiation). Pour chaque dose et à chaque temps, un total de 48 gènes a été mesuré, dont 44 impliqués dans la sénescence et 4 utilisés en tant que gènes de ménage (*18S*, *ACTB*, *MAPK8* et *PGK1*). Le choix des gènes cibles a été basé sur les travaux antérieurs du laboratoire ainsi que sur la bibliographie. Les 44 gènes peuvent être regroupés en fonction de leur rôle dans le cycle cellulaire, la mort cellulaire, le remodelage matriciel, l'inflammation, la transition endothélium-mésenchyme, la structure du cytosquelette et du noyau et dans diverses voies de signalisation cellulaire. Les travaux d'*Hernandez-Segura et al* n'étaient pas encore publiés au commencement de cette thèse, il aurait été intéressant d'y inclure les gènes que les auteurs ont identifiés.

Nous pouvons très succinctement décrire de manière chronologique les phénomènes moléculaires qui suivent l'irradiation : dans les premières heures après exposition, pour les plus fortes doses ($\geq$ 5 Gy), nous observons la perte complète des capacités prolifératives des HUVECs reflétée par la perte d'expression de *CDK1*, *LMNB1*, *BIRC5* et l'augmentation de l'expression de p21 (*CDKN1A*). La perte d'expression des acteurs impliqués dans la prolifération est concomitante à la surexpression de gènes impliqués dans la mort cellulaire (*BBC3* et *FAS*) suggérant que celle-ci interviendrait de manière précoce. À partir de sept jours post-irradiation, les surexpressions de p16 (*CDKN2A*), acteur majeur de la sénescence, et p15 (*CDKN2B*) sont observées et ce, quelque soit la dose. Cela suggère que le cycle cellulaire est profondément arrêté et qu'une sous-population de cellules sénescentes devient alors détectable à partir de 7 jours après irradiation. Le point J7 constitue donc une étape charnière entre arrêt du cycle/mort cellulaire et apparition de la sénescence endothéliale *in vitro*. Pour appuyer ce constat, la surexpression des transcrits des gènes impliqués dans le phénotype sécrétoire, tels que l'*IGFBP3*, l'*IGFBP5*, l'*IL-6*, l'*IL-8* ou *SERPINE1* n'est observée qu'à partir de J7.

Sans transformation de nos données bidimensionnelles en fonctions tridimensionnelles, leur manipulation constitue un réel obstacle vers notre objectif : construire un réseau d'inférences propre à la sénescence endothéliale radio-induite. Ce réseau moléculaire est basé sur une approche par *clustering* de gènes présentant des profils d'expression similaires. Ces clusters sont générés à l'aide d'une réduction dimensionnelle exercée sur les 44 gènes, qui permet de décomposer l'ensemble des fonctions en quatre

harmoniques représentant 90% de la variabilité observée. Le réseau moléculaire ainsi créé nous permet d'identifier les relations existantes entre nos différentes entités ainsi que leurs régulateurs communs. Nous avons identifié au moins 4 nœuds moléculaires qui seraient pertinents à étudier : SP1, SMAD7, SIRT1 et la voie de l'IL-1. Malheureusement, au cours de cette thèse nous n'avons eu le temps d'en étudier qu'un seul. Pour valider cette approche, nous avons choisi de cibler le phénotype sécrétoire de la sénescence et plus particulièrement, la voie de signalisation de l'IL-1, qui a montré, d'une part, de nombreuses relations avec des facteurs impliqués dans le phénotype sécrétoire. Les travaux menés par *Uekawa et al* sont les premiers à mettre en relation les protéines de la famille de l'IL-1 avec la sénescence cellulaire à travers l'activation de la voie p38 MAPK (Uekawa *et al.*, 2004). Les interleukines 1α et 1β sont, d'autre part, connues pour être sécrétées par les cellules sénescentes. L'IL-1α a déjà été identifiée, chez les fibroblastes sénescents, en tant que régulatrice du SASP (Orjalo *et al.*, 2009) mais, son implication dans le SASP endothélial dans un contexte d'irradiation n'a pas encore été démontrée. Enfin, dans notre modèle, l'expression d'IL-1α suit une cinétique particulière, sa surexpression est observée précocement, dès J1, elle est maintenue jusqu'à J7 et revient à son état basal. Cela montre une expression transitoire de cette protéine, cohérente avec des travaux déjà publiés (Orjalo *et al.*, 2009). Pour toutes ces raisons, cibler la voie de l'IL-1 semble être une bonne option pour impacter le SASP endothélial.

En réponse à la liaison des interleukines 1α ou 1β sur leur récepteur, IL1R1, une séquence complexe d'évènements de phosphorylation et d'ubiquitination entraîne l'activation de la signalisation de NF-κB et des voies JNK et p38 MAPK. La coopération de ces différentes voies induit l'expression de gènes cibles tels que l'IL-6, l'IL-8, MCP-1, etc. (Weber, Wasiliew and Kracht, 2010). Pour impacter au mieux cette voie de signalisation, nous nous sommes tournés vers le ciblage du récepteur à l'IL-1, IL1R1. L'inhibition de l'expression, par siRNA, du récepteur IL1R1, induit des modifications remarquables au niveau transcriptionnel des HUVECs irradiées. Son inhibition induit en effet une réduction significative de l'expression de certains composants du *Senescence Messaging Secretome* dont l'IL-6 et l'IL-8. Le blocage de la voie de signalisation de l'IL-1 est, de plus, capable d'influer sur le nombre de cellules endothéliales surexprimant la β-galactosidase après irradiation (-15%). Enfin, *in vivo*, nous avons observé d'une part, au niveau transcriptionnel la surexpression d'IL-1α au niveau du patch d'irradiation mais pas d'IL1R1. En revanche, l'expression protéique d'IL1R1 par les cellules au sein de la lésion radio-induite a été observée chez la souris. L'ensemble de ces données suggère donc l'implication de la voie de

signalisation de l'IL-1 au cours de l'acquisition du SASP endothélial après irradiation et permet de valider notre approche mêlant biologie, mathématiques et bio-informatique.

Comme nous venons de le décrire avec la sénescence radio-induite, les études sur les données dynamiques sont devenues d'importants outils pour la recherche, particulièrement pour la biologie des systèmes. Ces dernières années, les avancées technologiques ont permis l'avènement des techniques haut-débit et la génération de données « omiques » qui sont la base de ce récent domaine de recherche. La biologie des systèmes ou biologie intégrative étudie les organismes vivants comme les systèmes qu'ils sont en réalité, par opposition aux approches classiques qui tendent à décomposer l'étude à plusieurs niveaux (biochimie, biologie, physiologie…). La biologie des systèmes cherche à intégrer tous les niveaux d'information, en étudiant les relations et les interactions de différentes parties du système biologique, pour former un modèle complet de fonctionnement. Pour cela, elle nécessite au moins deux types d'observation, le profile transcriptomique et protéomique (Haider and Pal, 2013). Par approche transcriptomique, ces méthodes permettent, entre autres, d'identifier les profils d'expression de gènes au cours du temps, les relations entre les entités étudiées et de mettre en évidence les séquences complexes d'évènements biologiques. Aujourd'hui, l'introduction de données dynamiques permet d'avoir une vision globale du comportement d'un système et d'identifier la meilleure cible et le meilleur timing pour l'influencer (Straube, Huang and Cao, 2017). Les précédents travaux du laboratoire ont d'ailleurs eu recours à des méthodes similaires dans la caractérisation transcriptionnelle des HUVECs après irradiation (Heinonen *et al.*, 2015, 2018). Dans notre modèle faisant varier deux paramètres simultanément : la dose et le temps, la composante temporelle représente à elle seule plus de 16% de la variabilité. Nous avons utilisé ces méthodes pour étudier la sénescence et avons montré grâce à elles, la forte implication de la voie IL-1 dans l'acquisition du SASP endothélial.

Caractéristiques de la sénescence endothéliale radio-induite

La sénescence endothéliale est observée à partir de sept jours après irradiation, quelque soit la dose. Par contre, pour les très fortes doses, supérieures ou égales à 10 Gy, les premières marques de sénescence apparaissent dès le quatrième jour qui suit l'irradiation, mais celles-ci ne sont pas associées à la surexpression de p16.

Nous avons choisi de caractériser la sénescence endothéliale radio-induite sept jours après irradiation à 20 Gy, dose à laquelle les effets observés sont les plus forts. Ainsi, après exposition, la taille des HUVECs augmente, leur morphologie change, elles apparaissent plus

étalées. La surexpression de *CDKN1A* (p21) aux niveaux transcriptionnel et protéique suggère l'arrêt de la prolifération, comme le montre le marquage au CellTrace™, suivi par cytométrie en flux. Nous observons également la perte de la lamine B1 (*LMNB1*), une augmentation du compartiment lysosomal reflétée par la coloration au LysoTracker™ et par l'augmentation de l'expression de la β-galactosidase.

La surexpression des inhibiteurs du cycle cellulaire p21, p16 (*CDKN2A*) et p15 (*CDKN2B*) par les HUVECs suggère que la plupart des cellules sont arrêtées en phase G1. En effet, ces trois protéines sont des inhibiteurs des complexes CDK4/6-Cycline D et CDK2-Cycline E, impliqués dans la phase G1 et la transition G1/S. De manière étonnante, l'expression de p27 (*CDKN1B*) est diminuée, à toutes les doses, après irradiation. Cet inhibiteur du cycle exerce son activité inhibitrice lorsque le complexe CDK2-Cycline 2 est actif, celui-ci semble être déjà inhibé par p21, la baisse d'expression de p27 pourrait être expliquée par ce phénomène (Lee and Kim, 2009).

Nous nous sommes également intéressés à une caractéristique majeure de la sénescence : le phénotype sécrétoire. Nos données transcriptomiques montrent la surexpression de molécules composant le SASP après irradiation (*CSF3*, *IGFBP3*, *IGFBP5*, *IGFBP7*, *IL-1A*, *IL-6*, *IL-8*, *MMP7*, *MMP10* et *SERPINE1*). Il est décrit dans la littérature que ce phénotype sécrétoire est capable, de manière paracrine, d'induire et maintenir le phénotype sénescent des cellules avoisinantes (Kuilman and Peeper, 2009). Nous avons montré par culture en milieu conditionné que le surnageant d'HUVECs irradiées est capable de modifier, à lui seul, le profil transcriptomique de cellules saines vers un profil sénescent. En testant une quinzaine de molécules solubles, nous avons cherché à identifier la composition du surnageant d'HUVECs irradiées. Parmi les molécules testées, onze d'entre elles ont été détectées : GROα, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, IGFBP-7, IL-6, IL-8, MMP7, PAI-1. Nous avons décelé l'augmentation des concentrations en IGFBPs 3, 4, 7 et de PAI-1 après irradiation. Ces molécules sont connues pour jouer un rôle important dans l'induction de la sénescence (Severino *et al.*, 2013; Vaughan *et al.*, 2017; Hong and Kim, 2018). Parmi les IGFBPs, l'IGFBP-5 qui joue un rôle central dans l'acquisition de ce phénotype n'a malheureusement pas été détectée (Sanada *et al.*, 2018).

Parmi les gènes que nous avons étudiés, nous avons mesuré l'expression de marqueurs mésenchymateux : *ACTA2* et *TAGLN*. Les précédents travaux du laboratoire ont montré que l'irradiation de cellules endothéliales induit leur différentiation vers un profil mésenchymateux (Mintet *et al.*, 2017). Ce phénomène, appelé transition endothélium-mésenchyme (endoMT), induit la perte de marqueurs endothéliaux au profit de marqueurs

mésenchymateux, dont l' α-SMA (*ACTA2*) et la SM22-α (*TAGLN*). Les travaux du Dr Mintet ont également mis en évidence l'implication de la protéine HEY2 dans ce processus (Mintet *et al.*, 2017). Au cours de ce travail de thèse, nous avons observé la surexpression de ces trois molécules après irradiation. Leur expression augmente de manière continue jusqu'à 21 jours post-irradiation. Ces observations laissent à penser que la sénescence et l'endoMT pourrait être des phénomènes très proches d'un point de vue moléculaire et phénotypique. Ce constat soulève également des interrogations concernant l'hétérogénéité des cellules après irradiation, fait que nous avons discuté dans la partie IV.

Pour finir avec cette partie, nous discuterons au cours de ces prochaines lignes sur les limites de notre modèle. Le fait que celui-ci soit uniquement basé sur des données transcriptomiques constitue sa principale limite. En effet, nous avons discuté en amont que la biologie intégrative nécessite au moins deux niveaux d'observation, ce modèle peut donc être amélioré en combinant des niveaux de régulation protéomique. Le laboratoire a précédemment acquis des données sur les HUVECs après irradiation aux niveaux métabolomique et protéomique. Il serait alors intéressant de confronter nos données transcriptomiques à celles-ci. La combinaison de données dynamiques issues de différents niveaux améliorerait l'analyse comportementale d'une molécule et la précision des mesures en réduisant le risque de faux-positifs (Straube, Huang and Cao, 2017). L'ajout d'autres processus cellulaires impliqués dans la sénescence, qui n'ont pas été mesurés dans cette étude, comme la dysfonction mitochondriale, pourrait également améliorer la précision du modèle. Les données transcriptomiques recueillies *in vitro* sont issues d'une population cellulaire hétérogène, cela signifie que les profils d'expression obtenus reflètent la moyenne de l'expression du tapis cellulaire de cette population. Cette approche moyenne masque la forte disparité que l'on peut retrouver entre deux cellules et ne prend pas en compte la présence de cellules non-sénescentes au sein du tapis. Enfin, ces données ont été recueillies sur des expériences réalisées *in vitro*. Il serait donc intéressant d'identifier les profils transcriptomiques des cellules endothéliales *in vivo* après irradiation. Deux approches existent pour évaluer le profil transcriptomique *in vivo*. La première consiste à lyser toutes les cellules à partir d'un tissu et d'identifier les niveaux d'expression des gènes d'intérêts. Mais celle-ci mesure uniquement l'expression de tous les types cellulaires présents dans l'échantillon. Une autre technique, plus résolutive, consiste à caractériser le transcriptome par approches *single cell* après digestion et tri cellulaire. La laboratoire va acquérir très prochainement la technologie d'incorporation des cellules et pourra développer ce type d'approche.

VI. Le phénotype sécrétoire des cellules sénescentes : une cible thérapeutique ?

Depuis la mise en évidence de l'implication de la sénescence cellulaire dans le vieillissement ainsi que dans différentes pathologies, la communauté scientifique a imaginé plusieurs stratégies afin de les cibler et de les éliminer. Ces méthodes consistent à employer des sénolytiques qui vont induire la mort de ces cellules, potentialiser le système immunitaire pour accentuer leur élimination ou neutraliser leur phénotype sécrétoire (Childs *et al.*, 2017).

Les deux premières méthodes impliquent l'élimination complète des cellules sénescentes. Les premiers sénolytiques découverts ciblent les voies de signalisation anti-apoptotiques des cellules sénescentes ou SCAPs *(Senescent Cell Anti-apoptotic Pathways*). Par approche transcriptomique, *Zhu et al* ont montré que la combinaison de Dasatinib + Quercetin (D+Q) induit spécifiquement l'apoptose des cellules sénescentes (Zhu *et al.*, 2015). Le Dasatinib est un inhibiteur de multiples tyrosine-kinases, utilisé dans le traitement du cancer et la Quercetin est un inhibiteur de la PI3K et des serpines. Par la suite, d'autres sénolytiques ont été découverts, des inhibiteurs de la famille BCL-2, l'ABT-263 (Navitoclax) et ABT-737, ciblant également les SCAPs, favorisant donc l'apoptose. Le Navitoclax est actuellement testé dans différents essais cliniques pour le traitement de nombreux cancers (Childs *et al.*, 2017). Récemment, *Muñoz-Espín et al* ont développé une approche impliquant l'utilisation de billes de silice contenant des sénolytiques (doxorubicine ou Navitoclax) et recouvertes 6-mer galacto-oligosaccharide. Ces billes peuvent être endocytées par les cellules mais celles surexprimant la β-galactosidase la digèreront, libérant le sénolytique qui induira la mort cellulaire (Muñoz-Espín *et al.*, 2018). Dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, les auteurs ont montré l'implication des cellules sénescentes dans le développement de cette pathologie et validé leur approche. Ils proposent également l'utilisation de ces billes dans la détection des cellules β-galactosidase positives (Muñoz-Espín *et al.*, 2018).

D'autres sénolytiques, comme la Piperlongumine, ont montré leur potentiel *in vitro* ou en préclinique, mais les mécanismes d'action de ces nouvelles molécules doivent encore être étudiés. Il est aujourd'hui nécessaire d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action des sénolytiques en cours de développement. Ce constat a été soulevé par l'étude de *Hall et al*, dans laquelle les auteurs montrèrent que des cellules, en l'occurrence des macrophages, acquièrent des marqueurs de sénescence mais restent fonctionnels et participent à l'élimination des cellules sénescentes (Hall *et al.*, 2016). Ces observations peuvent constituer un obstacle aux stratégies « pan-anti-sénescence » qui induirait l'élimination de cellules par

exemple, p16 positives mais non-sénescentes. De plus, ces thérapies peuvent être sources d'effets secondaires, un essai clinique de phase II dans le traitement du cancer pulmonaire à petites cellules par le Navitoclax a montré que les patients développaient neutropénie et thrombopénie (Watanabe *et al.*, 2017). Enfin, les cellules sénescentes possèdent des effets bénéfiques sur le tissu, notamment dans la cicatrisation, la régénération tissulaire et la suppression tumorale. L'élimination complète des cellules sénescentes ne peut donc être systématique et les conséquences doivent être finement étudiées (Tchkonia *et al.*, 2013; Childs *et al.*, 2017).

Une alternative aux stratégies « pan anti-sénescence » consiste à cibler une autre spécificité de la sénescence, son phénotype sécrétoire. Le SASP est principalement composé de cytokines inflammatoires, facteurs de croissance, protéases matricielles. Le SASP est contrôlé par les voie NF-κB et C/EBPβ et est capable d'induire l'arrêt de prolifération des cellules cancéreuses et contribue à la suppression tumorale. Toutefois, ce phénotype est capable de perturber l'homéostasie tissulaire et est fortement impliqué dans le développement de pathologies liées à l'âge (Ovadya and Krizhanovsky, 2018). Par exemple, les récents travaux de *Ferreira-Gonzalez et al* démontrent l'implication des cellules sénescentes dans le développement des lésions biliaires et plus particulièrement, leur SASP. Les auteurs montrent que la sénescence des cholangiocytes empêche la régénération tissulaire et que l'inhibition du TGFβ bloque partiellement les effets paracrines des cellules sénescentes, induit la prolifération cellulaire et améliore les fonctions biliaires et hépatiques (Ferreira-Gonzalez *et al.*, 2018). Le phénotype sécrétoire sénescent joue donc un rôle dans le développement des lésions tissulaires et son inhibition semble donc avoir des effets bénéfiques. D'ailleurs de nombreuses études ont recensé que le SASP est capable de modifier le comportement cellulaire, *in vitro* et *in vivo*, en agissant sur la prolifération, la motilité et la différentiation (Coppé *et al.*, 2010). L'action auto/paracrine des IL-6 et 8 joue un rôle important dans la maintenance du statut sénescent. D'autres facteurs sécrétés comme le VEGF augmentent les processus angiogéniques, ou agissent comme immunosuppresseur (TGF-β). Cibler le SASP ou contrôler son induction semble donc une approche intéressante afin de prévenir les effets négatifs de la sénescence.

Il est intéressant de noter qu'à ce jour, différentes stratégies thérapeutiques dirigées contre ce processus sont en cours de développement ou sont approuvées dans le traitement de certaines pathologies. C'est le cas, notamment du ciblage, à l'aide de petites molécules, des régulateurs transcriptionnels du SASP, NF-κB et mTOR. Initialement utilisée en clinique dans le traitement de certains cancers, la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, possède un fort

potentiel dans le ciblage des cellules sénescentes *in vivo* (Watanabe *et al.*, 2017). Celle-ci réduit la production de cytokines inflammatoires par les cellules sénescentes et semble augmenter la durée de vie médiane et maximale de modèles murins CB6F1 et C3D2F1 (Harrison *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2017). La metformine, utilisée dans le traitement du diabète de type 2, pourrait également être un bon candidat en ciblant la voie NF-κB (Childs *et al.*, 2017). Le blocage spécifique de certains acteurs clés de l'inflammation, tels que l'IL-6 ou l'IL-8, a déjà été développé, leur inhibition atténue la réponse inflammatoire associée à la sénescence chez la souris (Acosta *et al.*, 2008). Des inhibiteurs de la voie de signalisation de l'IL-6, tels que le tocilizumab et le sirukumab, sont utilisés dans le traitement de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Watanabe *et al.*, 2017). L'anakinra, inhibiteur spécifique du récepteur à l'IL-1, est également utilisé dans la prise en charge de polyarthrites rhumatoïdes (Childs *et al.*, 2017). Bien qu'elles ne soient pas utilisées pour cibler la sénescence, des stratégies existent et ont montré leurs bénéfices (Childs *et al.*, 2017). Cependant, leurs effets directs sur l'accumulation des cellules sénescentes doit encore être testé *in vivo*.

À l'aide de nos données *in vitro*, nous avons suggéré la forte implication de la voie de signalisation de l'IL-1 dans l'acquisition du SASP endothélial, comme l'ont montré *Orjalo et al* dans les fibroblastes. Ce choix s'est basé sur le réseau d'inférences dans lequel celui-ci montre que les interleukines 1α et 1β sont capables de réguler l'expression de nombreux facteurs sécrétés. D'après la littérature, la famille de l'IL-1 est également connue pour être l'une des principales régulatrices de l'inflammation stérile (Lukens, Gross and Kanneganti, 2012). De plus, il a été démontré que le récepteur à l'IL-1, IL1R1, jouait un rôle dans le développement et la progression de l'hypertension pulmonaire (Parpaleix *et al.*, 2016). Les récents travaux de *Groves et al* ont montré, par l'utilisation d'un modèle murin n'exprimant pas IL1R1 par le tissu pulmonaire, l'implication de ce récepteur dans le développement de la fibrose radio-induite. En effet, la déplétion en IL1R1 semble protéger le tissu (Groves *et al.*, 2018). Pour vérifier notre hypothèse, nous avons choisi d'inhiber l'expression du récepteur IL1R1. Nous avons montré que cette approche est en effet capable de réduire l'expression de cytokines pro-inflammatoires après exposition aux rayonnements ionisants chez les HUVECs et d'impacter le phénotype sénescent. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'envisager une autre stratégie afin de cibler la voie de signalisation de l'IL-1. Nous pouvons, par exemple, utiliser l'anakinra afin de vérifier si ce traitement est capable de modifier le profil d'expression des HUVECs sénescents après irradiation comme le font les siRNA et également envisager son utilisation *in vivo* dans un modèle d'irradiation du petit animal. Concernant

l'approche *in vivo,* l'utilisation d'un modèle murin invalidé pour le récepteur à l'IL-1 (*IL-1R*$^{-/-}$) semble envisageable. Ces animaux ont été caractérisés par *Glaccum et al* et présentent une absence complète de l'activité d'IL-1R manifestent une réponse immunitaire altérée (Glaccum *et al.*, 1997). Ce modèle murin pourrait être utilisé dans le cadre d'irradiations au niveau pulmonaire en conditions stéréotaxiques, identiques à celles utilisées au cours de ce travail de thèse, afin de vérifier si l'invalidation d'IL1R1 est suffisante pour impacter 1) la sénescence *in vivo,* 2) le développement des lésions pulmonaires radio-induites. En effet, plusieurs travaux ont montré l'importante implication du récepteur à l'IL-1 dans le développement de pathologies pulmonaires telles que le mésothéliome pulmonaire, les pathologies obstructives chroniques ou la fibrose (Lukens, Gross and Kanneganti, 2012). Les travaux de *Groves et al* ont montré la protection du tissu pulmonaire de la fibrose radio-induite lorsque qu'IL1R1 y est déplété. Le modèle d'irradiation utilisé dans leurs travaux est une irradiation thoracique de 12,5 Gy au ^{137}Cs (rayonnements γ) (Groves *et al.*, 2018). Il serait alors intéressant de vérifier si l'on obtiendrait des résultats similaires dans un modèle d'irradiation en conditions stéréotaxiques utilisant des rayonnements X. Par instillation nasale de bléomycine chez des animaux KO pour l'IL1R1, *Gasse et al* ont montré une diminution du recrutement des cellules immunitaires, de la production de facteurs pro-inflammatoires, comme l'IL-6, et de la fibrose par rapport aux animaux contrôles (Gasse *et al.*, 2007). Hormis la réponse au niveau pulmonaire, il a été démontré chez la souris qu'une irradiation de 20 Gy au niveau cardiaque réduisait les capacités contractiles de l'organe. Par contre, les capacités contractiles sont préservées après irradiation chez les animaux *IL1R1*$^{-/-}$ (Mezzaroma *et al.*, 2015). Par l'utilisation d'animaux knockdown pour IL1R1 spécifiquement dans l'endothélium, les travaux de *Wohleb et al* ont monté une diminution de l'inflammation induite par le stress au niveau cérébral (Wohleb *et al.*, 2014). Plus récemment, l'équipe de *Robson et al* a généré un modèle murin dont les exons 3 et 4 du gène codant l'IL1R1 sont flanqués de séquences LoxP (*IL1R1*$^{loxP/loxP}$) (Robson *et al.*, 2016). Ces animaux ne présentent pas d'anomalies phénotypiques ou comportementales. L'expression et l'activité d'IL1R1 sont normales chez ces animaux (Robson *et al.*, 2016). Le croisement des souris *IL1R1*$^{loxP/loxP}$ avec des animaux exprimant la recombinase Cre est possible, sur le même modèle des animaux *VE-CadCre*$^{+/-}$ *PAI-1*$^{flx/flx}$, générés au laboratoire. Bien que les précédents travaux du laboratoire n'aient montré aucun bénéfice de l'invalidation de PAI-1, acteur majeur du SASP, au niveau endothélial dans le développement de lésions pulmonaires radio-induites après exposition en thorax entier, il serait tout de même intéressant d'étudier l'impact de

l'invalidation d'un régulateur du SASP dans l'évolution de la sénescence radio-induite ainsi que dans développement de lésions radiques (Lavigne *et al.*, 2017).

Comme pour les stratégies « pan-anti-sénescence », le ciblage du SASP semble être une stratégie intéressante mais celui-ci dispose également d'effets bénéfiques, comme la surveillance immunitaire ou l'induction de l'état sénescent. Nous pouvons donc imaginer que son inhibition peut promouvoir la tumorigenèse. De plus, la plupart des facteurs sécrétés possèdent des rôles indépendants du SASP, il est possible que l'inhibition de celui-ci ait des effets secondaires inattendus. Les mécanismes moléculaires doivent donc être finement étudiés avant d'établir des applications cliniques des molécules anti-SASP.

Malgré toutes ces avancées et découvertes, il est aujourd'hui difficile d'imaginer l'utilisation des sénothérapies comme traitement dans un futur proche. La plupart des études menées restent au stade préclinique voire *in vitro*. De plus, l'efficacité des sénothérapies est testée dans des modèles murins encore trop éloignés des pathologies humaines. Enfin, les stratégies utilisées ciblent une population de cellules sénescentes « générale », or comme nous l'avons évoqué, les cellules sénescentes forment un groupe d'une grande hétérogénéité. Le type cellulaire, le type de stimulus ou le contexte physiologique contribuent à de fortes différences intercellulaires. Ainsi, certains traitements pourraient être efficaces sur une sous-population spécifique et non sur la population générale de cellules sénescentes.

VII. Implication de la protéine PAI-1 dans l'acquisition du phénotype sénescent après irradiation ?

Le laboratoire travaille depuis plusieurs années sur l'implication de la protéine PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) dans l'évolution des lésions radio-induites. Dans un modèle d'irradiation d'anse intestinale extériorisée utilisant un modèle murin invalidé pour PAI-1 spécifiquement dans l'endothélium (*VE-CadCre*$^{+/-}$ *PAI-1*$^{flx/flx}$), le laboratoire a montré le rôle de PAI-1 endothélial dans l'initiation de ces lésions intestinales (Rannou *et al.*, 2015). Après l'identification du *pool* endothélial de PAI-1 comme cible potentielle pour limiter le développement des lésions radiologiques au niveau intestinal, le laboratoire a cherché à savoir si ces effets pourraient être observés dans un modèle dont l'organisation tissulaire est complètement différente. Ainsi, les animaux *VE-CadCre*$^{+/-}$ *PAI-1*$^{flx/flx}$ ont été irradiés en thorax entier, mais la délétion du *pool* endothélial de PAI-1 ne semble pas affecter les mécanismes pathologiques au niveau pulmonaire (Lavigne *et al.*, 2017). De nombreux travaux ont montré le lien existant entre PAI-1 et sénescence (Yamamoto *et al.*, 2005; Kortlever, Higgins and Bernards, 2006; Eren *et al.*, 2014). Aujourd'hui, la protéine PAI-1 est considérée comme un acteur majeur dans l'acquisition du phénotype sénescent et sa participation dans le vieillissement *in vivo* (Vaughan *et al.*, 2017). Au cours de cette thèse, en parallèle des travaux précliniques réalisés sur le modèle p16^{INK4}-LUC, nous avons irradié des animaux *VE-CadCre*$^{+/-}$ *PAI-1*$^{flx/flx}$ à l'aide du SARRP, en dose unique 90 Gy et en fractionné 5 fois 20 Gy et avons acquis les données d'imagerie micro-CT et histologique. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps nécessaire pour l'analyse de l'ensemble des données. Il serait néanmoins intéressant d'observer s'il existe des différences en termes de proportion de cellules sénescentes et si celles-ci peuvent impacter le développement des lésions radio-induites.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse ont montré que l'irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques à des doses ablatives est capable d'induire la sénescence cellulaire à court et à long terme. Parmi les cellules présentant des marques de sénescence, nous avons identifié des macrophages, des pneumocytes de type II et des cellules endothéliales. Bien que le rôle de la sénescence cellulaire n'ait pas été déterminé dans cette étude, l'observation du nombre important de cellules exprimant des marqueurs de sénescence formant un anneau autour de la lésion radiologique laisse suggérer que ces dernières participeraient à son maintien.

Par une approche multidisciplinaire intégrant biologie, mathématiques et bio-informatique, nous avons déchiffré une signature moléculaire dynamique de la sénescence endothéliale radio-induite. La démarche par *clustering*, nous a permis d'identifier des nœuds moléculaires capables d'influencer le phénotype sénescent radio-induit. Parmi eux, la dérégulation de la voie de signalisation de l'IL-1 est susceptible d'impacter la sénescence *in vitro*. Le ciblage de cette voie pourrait constituer une cible pour limiter le nombre de cellules sénescentes et donc leurs effets délétères.

Concernant les futurs travaux sur les modèles d'irradiation en conditions stéréotaxiques, il serait d'une part intéressant d'identifier le ou les schémas d'irradiation permettant le développement d'une fibrose pulmonaire radio-induite en dose fractionnée, dans des temps plus précoces. La BED_{3Gy} devrait alors excéder 767 Gy. Ces données apporteraient des connaissances supplémentaires dans la réponse des tissus sains à des doses ablatives. D'autre part, la totalité des travaux *in vivo* au cours de cette thèse a été réalisée dans un contexte d'exposition du tissu sain. Il serait alors intéressant d'étendre ces travaux dans un contexte tumoral, dans un modèle de tumeur pulmonaire chez la souris suffisamment volumineux et, si possible, ne présentant qu'un seul foyer.

Il serait également intéressant de caractériser *in vivo* les cellules endothéliales pulmonaires après irradiation en conditions stéréotaxiques. L'analyse en cellule unique permettrait ce type d'approche après digestion du tissu et séparation des cellules. De plus, les travaux sur les voies de signalisation l'IL-1 et la potentielle implication de PAI-1 dans le développement des lésions radiologiques doivent être poursuivis. Ces deux entités pourraient constituer des cibles séduisantes.

Bibliographie

Abad, M. *et al.* (2007) 'Ing1 mediates p53 accumulation and chromatin modification in response to oncogenic stress.', *The Journal of biological chemistry*, 282(42), pp. 31060–7. doi: 10.1074/jbc.M701639200.

Acosta, J. C. *et al.* (2008) 'Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence.', *Cell*, 133(6), pp. 1006–18. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.038.

Agostini, A. *et al.* (2012) 'Targeted cargo delivery in senescent cells using capped mesoporous silica nanoparticles.', *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 51(42), pp. 10556–60. doi: 10.1002/anie.201204663.

Aird, K. M. and Zhang, R. (2013) 'Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF).', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 965(4), pp. 185–96. doi: 10.1007/978-1-62703-239-1_12.

Baker, D. J. *et al.* (2011) 'Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders.', *Nature*, 479(7372), pp. 232–6. doi: 10.1038/nature10600.

Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., Saltness, R. A., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., *et al.* (2016) 'Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan.', *Nature*, 530(7589), pp. 184–9. doi: 10.1038/nature16932.

Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., Saltness, R. A., Jeganathan, K. B., Casaclang Verzosa, G., *et al.* (2016) 'Naturally occurring p16 Ink4a -positive cells shorten healthy lifespan', *Nature*, 530(7589). doi: 10.1038/nature16932.

Baker, D. J. and Petersen, R. C. (2018) 'Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives.', *The Journal of clinical investigation*, 128(4), pp. 1208–1216. doi: 10.1172/JCI95145.

Barnes, P. J. (2014) 'Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease.', *Clinics in chest medicine*. Elsevier Inc, 35(1), pp. 71–86. doi: 10.1016/j.ccm.2013.10.004.

Barnett, G. C. *et al.* (2009) 'Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype', *Nature Reviews Cancer*, 9(2), pp. 134–142. doi: 10.1038/nrc2587.

Ben-Porath, I. and Weinberg, R. A. (2004) 'When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence.', *The Journal of clinical investigation*, 113(1), pp. 8–13. doi: 10.1172/JCI20663.

Bentzen, S. M. (2006) 'Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology.', *Nature reviews. Cancer*, 6(9), pp. 702–13. doi: 10.1038/nrc1950.

Biran, A. *et al.* (2017) 'Quantitative identification of senescent cells in aging and disease.', *Aging cell*, 16(4), pp. 661–671. doi: 10.1111/acel.12592.

Bodnar, A. G. *et al.* (1998) 'Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.', *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), pp. 349–52. doi: 10.1126/science.279.5349.349.

Boerma, M. *et al.* (2004) 'Increased deposition of von Willebrand factor in the rat heart after local ionizing irradiation.', *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]*, 180(2), pp. 109–16. doi: 10.1007/s00066-004-1138-0.

Bogatkevich, G. S. *et al.* (2001) 'Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway.', *The Journal of biological chemistry*, 276(48), pp. 45184–92. doi: 10.1074/jbc.M106441200.

Boyer, L. *et al.* (2014) '[Cellular senescence and pulmonary disease: COPD as an example].', *Revue des maladies respiratoires*. Elsevier Masson SAS, 31(10), pp. 893–902. doi: 10.1016/j.rmr.2014.07.015.

Brady, C. A. and Attardi, L. D. (2010) 'p53 at a glance', *Journal of Cell Science*, 123(15), pp. 2527–2532. doi: 10.1242/jcs.064501.

Burd, C. E. *et al.* (2013) 'Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16 INK4a-luciferase model', *Cell*. Elsevier Inc., 152(1–2), pp. 340–351. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.010.

Campisi, J. (2013) ‘Aging, cellular senescence, and cancer.’, *Annual review of physiology*, 75(10), pp. 685–705. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653.

Campisi, J. (2016) ‘Cellular Senescence and Lung Function during Aging. Yin and Yang.’, *Annals of the American Thoracic Society*, 13 Suppl 5(December), pp. S402–S406. doi: 10.1513/AnnalsATS.201609-703AW.

Campisi, J. and d’Adda di Fagagna, F. (2007) ‘Cellular senescence: when bad things happen to good cells.’, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), pp. 729–740. doi: 10.1038/nrm2233.

Camps, J., Erdos, M. R. and Ried, T. (2015) ‘The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function.’, *Nucleus (Austin, Tex.)*, 6(1), pp. 8–14. doi: 10.1080/19491034.2014.1003510.

Capell, B. C. *et al.* (2016) ‘MLL1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype.’, *Genes & development*, 30(3), pp. 321–36. doi: 10.1101/gad.271882.115.

Capila, I. and Linhardt, R. J. (2002) ‘Heparin-protein interactions.’, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 41(3), pp. 391–412. doi: 10.1002/1521-3773(20020201)41:3<390::AID-ANIE390>3.0.CO;2-B.

Cavill, R., Kleinjans, J. and Briedé, J.-J. (2013) ‘DTW4Omics: comparing patterns in biological time series.’, *PloS one*, 8(8), p. e71823. doi: 10.1371/journal.pone.0071823.

Chang, J. Y. *et al.* (2015) ‘Stereotactic ablative radiotherapy versus lobectomy for operable stage I non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised trials.’, *The Lancet. Oncology*, 16(6), pp. 630–7. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70168-3.

Chang, M. W.-F. *et al.* (2005) ‘Comparison of early passage, senescent and hTERT immortalized endothelial cells.’, *Experimental cell research*, 309(1), pp. 121–36. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.05.002.

Chen, J. *et al.* (2006) ‘Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53.’, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 290(4), pp. H1575-86. doi: 10.1152/ajpheart.00364.2005.

Chen, Q. M. *et al.* (2000) ‘Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide.’, *Journal of cell science*, 113 (Pt 2, pp. 4087–97. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058095.

Chen, Q. M. *et al.* (2001) ‘Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts.’, *Experimental cell research*, 265(2), pp. 294–303. doi: 10.1006/excr.2001.5182.

Chiang, C.-S. *et al.* (2005) ‘Compartmental responses after thoracic irradiation of mice: strain differences.’, *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 62(3), pp. 862–71. doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.02.037.

Chiang, C. S. *et al.* (1997) ‘Delayed molecular responses to brain irradiation.’, *International journal of radiation biology*, 72(1), pp. 45–53. doi: 10.1080/095530097143527.

Chien, W. W. and Ffrench, M. (2006) ‘Régulation de p16, sénescence et oncogenèse’, *Medecine Sciences*, 22(10), pp. 865–871. Available at: https://www.erudit.org/fr/revues/ms/2006-v22-n10-ms1424/013821ar/.

Chien, Y. *et al.* (2011) ‘Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-κB promotes senescence and enhances chemosensitivity.’, *Genes & development*, 25(20), pp. 2125–36. doi: 10.1101/gad.17276711.

Childs, B. G. *et al.* (2014) ‘Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?’, *EMBO reports*, 15(11), pp. 1139–53. doi: 10.15252/embr.201439245.

Childs, B. G. *et al.* (2016) ‘Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis.’, *Science (New York, N.Y.)*, 354(6311), pp. 472–477. doi: 10.1126/science.aaf6659.

Childs, B. G. *et al.* (2017) ‘Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing.’, *Nature reviews. Drug discovery*. Nature Publishing Group, 16(10), pp. 718–735. doi: 10.1038/nrd.2017.116.

Childs, B. G., Li, H. and van Deursen, J. M. (2018) 'Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease.', *The Journal of clinical investigation*, 128(4), pp. 1217–1228. doi: 10.1172/JCI95146.

Cho, J. *et al.* (2010) 'High dose-per-fraction irradiation of limited lung volumes using an image-guided, highly focused irradiator: simulating stereotactic body radiotherapy regimens in a small-animal model.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 77(3), pp. 895–902. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.12.074.

Choi, Y. W. *et al.* (2004) 'Effects of radiation therapy on the lung: radiologic appearances and differential diagnosis.', *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 24(4), p. 985–97; discussion 998. doi: 10.1148/rg.244035160.

Chua, K. L. M. *et al.* (2017) 'Stereotactic body radiotherapy for early stage lung cancer—historical developments and future strategies', *Chinese Clinical Oncology*, 6(S2), pp. S20–S20. doi: 10.21037/cco.2017.08.02.

Citrin, D. E. *et al.* (2013) 'Role of type II pneumocyte senescence in radiation-induced lung fibrosis', *Journal of the National Cancer Institute*, 105(19), pp. 1474–1484. doi: 10.1093/jnci/djt212.

Collin, G. *et al.* (2018) 'Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence.', *Cell death & disease*. Springer US, 9(3), p. 259. doi: 10.1038/s41419-018-0300-z.

Coppé, J.-P. *et al.* (2010) 'The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression.', *Annual review of pathology*, 5, pp. 99–118. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144.

Courtois-Cox, S., Jones, S. L. and Cichowski, K. (2008) 'Many roads lead to oncogene-induced senescence.', *Oncogene*, 27(20), pp. 2801–9. doi: 10.1038/sj.onc.1210950.

d'Adda di Fagagna, F. *et al.* (2003) 'A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.', *Nature*, 426(6963), pp. 194–8. doi: 10.1038/nature02118.

Daigle, J. L. *et al.* (2001) 'The role of tumor necrosis factor signaling pathways in the response of murine brain to irradiation.', *Cancer research*, 61(24), pp. 8859–65. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751409.

Danckwardt, S., Hentze, M. W. and Kulozik, A. E. (2013) 'Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond.', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 91(11), pp. 1257–71. doi: 10.1007/s00109-013-1074-5.

Delaney, G. *et al.* (2005) 'The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines.', *Cancer*, 104(6), pp. 1129–37. doi: 10.1002/cncr.21324.

Denham, J. W. and Hauer-Jensen, M. (2002) 'The radiotherapeutic injury - A complex "wound"', *Radiotherapy and Oncology*, 63(2), pp. 129–145. doi: 10.1016/S0167-8140(02)00060-9.

Dimauro, T. and David, G. (2010) 'Ras-induced senescence and its physiological relevance in cancer.', *Current cancer drug targets*, 10(8), pp. 869–76. doi: EPub-Abstract-CCDT-69 [pii].

Dimri, G. P. *et al.* (1995) 'A Biomarker That Identifies Senescent Human-Cells in Culture and in Aging Skin in-Vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), pp. 9363–9367. doi: DOI 10.1073/pnas.92.20.9363.

Donato, A. J. *et al.* (2015) 'Cellular and molecular biology of aging endothelial cells.', *Journal of molecular and cellular cardiology*, 89(Pt B), pp. 122–35. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.01.021.

Dong, X. *et al.* (2015) 'NEMO modulates radiation-induced endothelial senescence of human umbilical veins through NF-κB signal pathway.', *Radiation research*, 183(1), pp. 82–93. doi: 10.1667/RR13682.1.

Dosne, A. M., Dupuy, E. and Bodevin, E. (1978) 'Production of a fibrinolytic inhibitor by cultured endothelial cells derived from human umbilical vein.', *Thrombosis research*, 12(3), pp. 377–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/653632.

Dreesen, O., Li, B. and Cross, G. A. M. (2007) 'Telomere structure and function in trypanosomes: a proposal.', *Nature reviews. Microbiology*, 5(1), pp. 70–5. doi: 10.1038/nrmicro1577.

Elzi, D. J. *et al.* (2012) 'Plasminogen activator inhibitor 1--insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(30), pp. 12052–7. doi: 10.1073/pnas.1120437109.

Eren, M. *et al.* (2014) 'PAI-1-regulated extracellular proteolysis governs senescence and survival in Klotho mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pp. 1–7. doi: 10.1073/pnas.1321942111.

Erusalimsky, J. D. and Kurz, D. J. (2006) 'Endothelial cell senescence.', *Handbook of experimental pharmacology*, 1(176 Pt 2), pp. 213–48. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17001772.

Evangelou, K. *et al.* (2017) 'Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens.', *Aging cell*, 16(1), pp. 192–197. doi: 10.1111/acel.12545.

Fajardo, L. F. (2005) 'The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns.', *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 44(1), pp. 13–22. doi: 10.1080/02841860510007440.

Ferreira-Gonzalez, S. *et al.* (2018) 'Paracrine cellular senescence exacerbates biliary injury and impairs regeneration.', *Nature communications*, 9(1), p. 1020. doi: 10.1038/s41467-018-03299-5.

Fingar, D. C. (2002) 'Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E', *Genes & Development*, 16(12), pp. 1472–1487. doi: 10.1101/gad.995802.

Finn, A. V. *et al.* (2010) 'Concept of vulnerable/unstable plaque', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(7), pp. 1282–1292. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179739.

François, A. *et al.* (2013) 'Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa', *BioMed Research International*, 2013. doi: 10.1155/2013/123241.

Frescas, D. *et al.* (2017) 'Senescent cells expose and secrete an oxidized form of membrane-bound vimentin as revealed by a natural polyreactive antibody', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), pp. E1668–E1677. doi: 10.1073/pnas.1614661114.

Gasse, P. *et al.* (2007) 'IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice.', *The Journal of clinical investigation*, 117(12), pp. 3786–99. doi: 10.1172/JCI32285.

Gaugler, M. H. *et al.* (2004) 'PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(11), pp. 2020–2026. doi: 10.1111/j.1538-7836.2004.00951.x.

Ghaye, B., Wanet, M. and El Hajjam, M. (2016) 'Imaging after radiation therapy of thoracic tumors.', *Diagnostic and interventional imaging*. Elsevier Masson SAS, 97(10), pp. 1037–1052. doi: 10.1016/j.diii.2016.06.019.

Ghosh, A. K. and Vaughan, D. E. (2012) 'PAI-1 in tissue fibrosis.', *Journal of cellular physiology*, 227(2), pp. 493–507. doi: 10.1002/jcp.22783.

Giglia-Mari, G., Zotter, A. and Vermeulen, W. (2011) 'DNA damage response.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), p. a000745. doi: 10.1101/cshperspect.a000745.

Gire, V. *et al.* (2004) 'DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence.', *The EMBO journal*, 23(13), pp. 2554–63. doi: 10.1038/sj.emboj.7600259.

Gire, V. and Dulic, V. (2015) 'Senescence from G2 arrest, revisited.', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 14(3), pp. 297–304. doi: 10.1080/15384101.2014.1000134.

Glaccum, M. B. *et al.* (1997) 'Phenotypic and functional characterization of mice that lack the type I receptor for IL-1.', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159(7), pp. 3364–71. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9317135.

Goldin-Lang, P. *et al.* (2007) 'Ionizing radiation induces upregulation of cellular procoagulability and tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells.', *Thrombosis research*, 120(6), pp. 857–64. doi: 10.1016/j.thromres.2007.01.008.

Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1985) 'Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts.', *Cell*, 43(2 Pt 1), pp. 405–13. doi: 10.1016/0092-8674(85)90170-9.

Groves, A. M. *et al.* (2018) 'Role of Infiltrating Monocytes in the Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis.', *Radiation research*, 189(3), pp. 300–311. doi: 10.1667/RR14874.1.

Guckenberger, M. *et al.* (2013) 'Applicability of the linear-quadratic formalism for modeling local tumor control probability in high dose per fraction stereotactic body radiotherapy for early stage non-small cell lung cancer', *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 109(1), pp. 13–20. doi: 10.1016/j.radonc.2013.09.005.

Guckenberger, M. (2015) 'Dose and Fractionation in Stereotactic Body Radiation Therapy for Stage I Non-Small Cell Lung Cancer: Lessons Learned and Where Do We Go Next?', *International journal of radiation oncology, biology, physics*. Elsevier Inc., 93(4), pp. 765–8. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.08.025.

Haider, S. and Pal, R. (2013) 'Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data.', *Current genomics*, 14(2), pp. 91–110. doi: 10.2174/1389202911314020003.

Haimovitz-Friedman, A. (1994) 'Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis', *Journal of Experimental Medicine*, 180(2), pp. 525–535. doi: 10.1084/jem.180.2.525.

Hall, B. M. *et al.* (2016) 'Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β-galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells.', *Aging*, 8(7), pp. 1294–315. doi: 10.18632/aging.100991.

Hallahan, D. E. and Virudachalam, S. (1997) 'Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp. 6432–7. doi: 10.1073/pnas.94.12.6432.

Halle, M. *et al.* (2010) 'Sustained inflammation due to nuclear factor-kappa B activation in irradiated human arteries.', *Journal of the American College of Cardiology*, 55(12), pp. 1227–36. doi: 10.1016/j.jacc.2009.10.047.

Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W. (1990) 'Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.', *Nature*, 345(6274), pp. 458–60. doi: 10.1038/345458a0.

Harrison, D. E. *et al.* (2009) 'Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice.', *Nature*. Nature Publishing Group, 460(7253), pp. 392–5. doi: 10.1038/nature08221.

Hauer-Jensen, M., Wang, J. and Denham, J. W. (2003) 'Bowel injury: current and evolving management strategies.', *Seminars in radiation oncology*, 13(3), pp. 357–71. doi: 10.1016/S1053-4296(03)00032-8.

Hayflick, L. (1965) 'The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains', *Experimental Cell Research*, 37(3), pp. 614–636. doi: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.

Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961) 'The serial cultivation of human diploid cell strains', *Experimental Cell Research*, 25(3), pp. 585–621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

Heinonen, M. *et al.* (2015) 'Detecting time periods of differential gene expression using Gaussian processes: an application to endothelial cells exposed to radiotherapy dose fraction.', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(5), pp. 728–35. doi: 10.1093/bioinformatics/btu699.

Heinonen, M. *et al.* (2018) 'Temporal clustering analysis of endothelial cell gene expression following exposure to a conventional radiotherapy dose fraction using Gaussian process clustering.', *PloS one*, 13(10), p. e0204960. doi: 10.1371/journal.pone.0204960.

Hennequin, C. and Dubray, B. (2013) 'Le rapport alpha/bêta revisité à l'heure de l'hypofractionnement', *Cancer/Radiotherapie*. Elsevier Masson SAS, 17(5–6), pp. 344–348. doi: 10.1016/j.canrad.2013.06.035.

Hernandez-Segura, A. *et al.* (2017) 'Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells.', *Current biology : CB*. Elsevier Ltd., 27(17), p. 2652–2660.e4. doi: 10.1016/j.cub.2017.07.033.

Herranz, N. and Gil, J. (2018) ‘Mechanisms and functions of cellular senescence.’, *The Journal of clinical investigation*, 128(4), pp. 1238–1246. doi: 10.1172/JCI95148.

Herskind, C. *et al.* (2017) ‘Biology of high single doses of IORT: RBE, 5 R’s, and other biological aspects’, *Radiation Oncology*. Radiation Oncology, 12(1), p. 24. doi: 10.1186/s13014-016-0750-3.

Hoare, M. *et al.* (2016) ‘NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence.’, *Nature cell biology*, 18(9), pp. 979–92. doi: 10.1038/ncb3397.

Hodzic, E. (2016) ‘Single-cell analysis: Advances and future perspectives.’, *Bosnian journal of basic medical sciences*, 16(4), pp. 313–314. doi: 10.17305/bjbms.2016.1371.

Hong, S. and Kim, M.-M. (2018) ‘IGFBP-3 plays an important role in senescence as an aging marker.’, *Environmental toxicology and pharmacology*. Elsevier, 59(March), pp. 138–145. doi: 10.1016/j.etap.2018.03.014.

Hong, Z.-Y. *et al.* (2014) ‘Development of a small animal model to simulate clinical stereotactic body radiotherapy-induced central and peripheral lung injuries.’, *Journal of radiation research*, 55(4), pp. 648–57. doi: 10.1093/jrr/rrt234.

Hong, Z.-Y. *et al.* (2016) ‘Time, Dose, and Volume Responses in a Mouse Pulmonary Injury Model Following Ablative Irradiation.’, *Lung*. Springer US, 194(1), pp. 81–90. doi: 10.1007/s00408-015-9825-4.

Houssaini, A. *et al.* (2018) ‘mTOR pathway activation drives lung cell senescence and emphysema.’, *JCI insight*, 3(3), pp. 1–20. doi: 10.1172/jci.insight.93203.

Hu, X. *et al.* (2016) ‘Is IMRT superior or inferior to 3DCRT in radiotherapy for NSCLC? A meta-analysis’, *PLoS ONE*, 11(4), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0151988.

Igarashi, K. *et al.* (2007) ‘Radiation-induced senescence-like phenotype in proliferating and plateau-phase vascular endothelial cells.’, *Experimental cell research*, 313(15), pp. 3326–36. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.06.001.

IJpma, A. S. (2003) ‘Short Telomeres Induce a DNA Damage Response in Saccharomyces cerevisiae’, *Molecular Biology of the Cell*, 14(3), pp. 987–1001. doi: 10.1091/mbc.02-04-0057.

Iliakis, G. *et al.* (2003) ‘DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation.’, *Oncogene*, 22(37), pp. 5834–47. doi: 10.1038/sj.onc.1206682.

Institut National du Cancer (2013) ‘Rapport d’enquête de l’Observatoire national de la radiothérapie’.

Institut National du Cancer (2015) ‘Les cancers en France en 2015 - L’essentiel des faits et chiffres’, 2015.

Jackson, J. G. and Pereira-Smith, O. M. (2006) ‘p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts.’, *Cancer research*, 66(17), pp. 8356–60. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1752.

Jacobs, J. J. *et al.* (1999) ‘The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus.’, *Nature*, 397(6715), pp. 164–8. doi: 10.1038/16476.

Jaillet, C. *et al.* (2017) ‘Radiation-induced changes in the glycome of endothelial cells with functional consequences’, *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-017-05563-y.

Jun, J.-I. and Lau, L. F. (2010) ‘The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing.’, *Nature cell biology*, 12(7), pp. 676–85. doi: 10.1038/ncb2070.

Kamino, H. *et al.* (2003) ‘Searching for genes involved in arteriosclerosis: proteomic analysis of cultured human umbilical vein endothelial cells undergoing replicative senescence.’, *Cell structure and function*, 28(6), pp. 495–503. doi: 10.1247/csf.28.495.

Kang, K. H. *et al.* (2015) ‘Complications from Stereotactic Body Radiotherapy for Lung Cancer.’, *Cancers*, 7(2), pp. 981–1004. doi: 10.3390/cancers7020820.

Kelley, K. D. *et al.* (2015) 'Medically inoperable peripheral lung cancer treated with stereotactic body radiation therapy.', *Radiation oncology (London, England)*, 10(1), p. 120. doi: 10.1186/s13014-015-0423-7.

Khan, S. S. *et al.* (2017) 'A null mutation in SERPINE1 protects against biological aging in humans.', *Science advances*, 3(11), p. eaao1617. doi: 10.1126/sciadv.aao1617.

Kilbey, A. *et al.* (2008) 'Oncogene-induced senescence: an essential role for Runx.', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(15), pp. 2333–40. doi: 10.4161/cc.6368.

Kim, J. H., Jenrow, K. A. and Brown, S. L. (2014) 'Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials.', *Radiation oncology journal*, 32(3), pp. 103–15. doi: 10.3857/roj.2014.32.3.103.

Kirkpatrick, J. P., Meyer, J. J. and Marks, L. B. (2008) 'The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery.', *Seminars in radiation oncology*, 18(4), pp. 240–3. doi: 10.1016/j.semradonc.2008.04.005.

Ko, W. *et al.* (2012) 'Thrombin induced connective tissue growth factor expression in rat vascular smooth muscle cells via the PAR-1/JNK/AP-1 pathway.', *Acta pharmacologica Sinica*. Nature Publishing Group, 33(1), pp. 49–56. doi: 10.1038/aps.2011.178.

Kolesnick, R. and Fuks, Z. (2003) 'Radiation and ceramide-induced apoptosis', *Oncogene*, 22(37), pp. 5897–5906. doi: 10.1038/sj.onc.1206702.

Korolchuk, V. I. *et al.* (2017) 'Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link?', *EBioMedicine*. The Author(s), 21, pp. 7–13. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.03.020.

Kortlever, R. M., Higgins, P. J. and Bernards, R. (2006) 'Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence.', *Nature cell biology*, 8(8), pp. 877–84. doi: 10.1038/ncb1448.

Koshy, M. *et al.* (2015) 'Increasing radiation therapy dose is associated with improved survival in patients undergoing stereotactic body radiation therapy for stage I non-small-cell lung cancer.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*. Elsevier Inc., 91(2), pp. 344–50. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.10.002.

Krizhanovsky, V. *et al.* (2008) 'Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis', *Cell*, 134(4), pp. 657–667. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.049.

Krouwer, V. J. D. *et al.* (2012) 'Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability.', *Vascular cell*, 4(1), p. 12. doi: 10.1186/2045-824X-4-12.

Kuilman, T. *et al.* (2010) 'The essence of senescence', *Genes and Development*, 24(22), pp. 2463–2479. doi: 10.1101/gad.1971610.

Kuilman, T. and Peeper, D. S. (2009) 'Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress', *Nature Reviews Cancer*, 9(2), pp. 81–94. doi: 10.1038/nrc2560.

Laberge, R.-M. *et al.* (2015) 'MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation.', *Nature cell biology*, 17(8), pp. 1049–1061. doi: 10.1038/ncb3195.

Lafargue, A. *et al.* (2017) 'Ionizing radiation induces long-term senescence in endothelial cells through mitochondrial respiratory complex II dysfunction and superoxide generation.', *Free radical biology & medicine*. Elsevier B.V., 108(2), pp. 750–759. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.019.

Lagerwaard, F. J. *et al.* (2012) 'Patient-reported quality of life after stereotactic ablative radiotherapy for early-stage lung cancer.', *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. International Association for the Study of Lung Cancer, 7(7), pp. 1148–54. doi: 10.1097/JTO.0b013e318252cfef.

LaVerne, J. a (2000) 'OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water.', *Radiation research*, 153(2), pp. 196–200. doi: 10.1667/0033-7587(2000)153[0196:ORAOPI]2.0.CO;2.

Lavigne, J. *et al.* (2017) 'Conditional Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Deletion in the Endothelial Compartment Has No Beneficial Effect on Radiation-Induced Whole-Lung Damage in Mice.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 99(4), pp. 972–982. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.07.007.

Lavigne, J. *et al.* (2018) 'Lung stereotactic arc therapy in mice : development of radiation pneumopathy', *Soumis*.

Lawless, C. *et al.* (2012) 'A stochastic step model of replicative senescence explains ROS production rate in ageing cell populations.', *PloS one*, 7(2), p. e32117. doi: 10.1371/journal.pone.0032117.

Lederer, D. J. and Martinez, F. J. (2018) 'Idiopathic Pulmonary Fibrosis.', *The New England journal of medicine*, 379(8), pp. 797–798. doi: 10.1056/NEJMc1807508.

Lee, B. Y. *et al.* (2006) 'Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase.', *Aging cell*, 5(2), pp. 187–95. doi: 10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.

Lee, J. and Kim, S. S. (2009) 'The function of p27 KIP1 during tumor development.', *Experimental & molecular medicine*, 41(11), pp. 765–71. doi: 10.3858/emm.2009.41.11.102.

Li, M. *et al.* (2018) 'Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review.', *Frontiers in pharmacology*, 9(May), p. 522. doi: 10.3389/fphar.2018.00522.

Liang, Y. and Kelemen, A. (2017) 'Computational dynamic approaches for temporal omics data with applications to systems medicine.', *BioData mining*, 10(1), p. 20. doi: 10.1186/s13040-017-0140-x.

Liauw, S. L., Connell, P. P. and Weichselbaum, R. R. (2013) 'New paradigms and future challenges in radiation oncology: an update of biological targets and technology.', *Science translational medicine*, 5(173), p. 173sr2. doi: 10.1126/scitranslmed.3005148.

Linda, A., Trovo, M. and Bradley, J. D. (2011) 'Radiation injury of the lung after stereotactic body radiation therapy (SBRT) for lung cancer: a timeline and pattern of CT changes.', *European journal of radiology*, 79(1), pp. 147–54. doi: 10.1016/j.ejrad.2009.10.029.

Liu, Z. *et al.* (2012) 'Notch activation induces endothelial cell senescence and pro-inflammatory response: implication of Notch signaling in atherosclerosis.', *Atherosclerosis*, 225(2), pp. 296–303. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.04.010.

López, M. and Martín, M. (2011) 'Medical management of the acute radiation syndrome.', *Reports of practical oncology and radiotherapy : journal of Greatpoland Cancer Center in Poznań and Polish Society of Radiation Oncology*, 16(4), pp. 138–46. doi: 10.1016/j.rpor.2011.05.001.

Loskutoff, D. J. *et al.* (1983) 'Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(10), pp. 2956–60. doi: 10.1111/acel.12580.

Lowe, D. and Raj, K. (2014) 'Premature aging induced by radiation exhibits pro-atherosclerotic effects mediated by epigenetic activation of CD44 expression', *Aging Cell*, 13(5), pp. 900–910. doi: 10.1111/acel.12253.

Lukas, J. *et al.* (1995) 'Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16.', *Nature*, 375(6531), pp. 503–6. doi: 10.1038/375503a0.

Lukens, J. R., Gross, J. M. and Kanneganti, T.-D. (2012) 'IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease.', *Frontiers in immunology*, 3(OCT), p. 315. doi: 10.3389/fimmu.2012.00315.

Marathe, S. *et al.* (1998) 'Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling.', *The Journal of biological chemistry*, 273(7), pp. 4081–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461601.

Martin, M. *et al.* (1997) 'Coactivation of AP-1 activity and TGF-beta1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation.', *Oncogene*, 15(8), pp. 981–9. doi: 10.1038/sj.onc.1201433.

Martínez-Zamudio, R. I. *et al.* (2017) 'SnapShot: Cellular Senescence Pathways', *Cell*. Elsevier, 170(4), p. 816–816.e1. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.049.

Van der Meeren, A. *et al.* (2003) 'Inflammatory reaction and changes in expression of coagulation proteins on lung endothelial cells after total-body irradiation in mice.', *Radiation research*, 160(6), pp. 637–46. doi: 10.1667/RR3087.

Meeren, A. Van Der *et al.* (1997) 'Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells', *Mediators of Inflammation*, 6(3), pp. 185–193. doi: 10.1080/09629359791677.

Meziani, L., Deutsch, E. and Mondini, M. (2018) 'Macrophages in radiation injury: a new therapeutic target.', *Oncoimmunology*. Taylor & Francis, 7(10), p. e1494488. doi: 10.1080/2162402X.2018.1494488.

Mezzaroma, E. *et al.* (2015) 'Role of Interleukin-1 in Radiation-Induced Cardiomyopathy.', *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 21(1), pp. 210–8. doi: 10.2119/molmed.2014.00243.

Di Micco, R. *et al.* (2006) 'Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication.', *Nature*, 444(7119), pp. 638–642. doi: 10.1038/nature05327.

Michel, C. C. and Curry, F. E. (1999) 'Microvascular permeability.', *Physiological reviews*, 79(3), pp. 703–61. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10390517.

Milano, M. T. *et al.* (2009) 'Central thoracic lesions treated with hypofractionated stereotactic body radiotherapy', *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 91(3), pp. 301–306. doi: 10.1016/j.radonc.2009.03.005.

Milliat, F. *et al.* (2008) 'Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy.', *The American journal of pathology*, 172(3), pp. 691–701. doi: 10.2353/ajpath.2008.070930.

Milliat, F. (2008) 'Rôle de l ' endothélium dans les dommages radio-induits aux tissus sains Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages', *Radiation Physics and Chemistry*, 57(0), pp. 139–148. doi: 10.1016/j.ancard.2008.02.015.

Mintet, E. *et al.* (2015) 'Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 185(9), pp. 2550–2562. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.04.028.

Mintet, E. *et al.* (2017) 'Endothelial Hey2 deletion reduces endothelial-to-mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice.', *Scientific reports*, 7(1), p. 4933. doi: 10.1038/s41598-017-05389-8.

Mirzayans, R. *et al.* (2012) 'Role of p16(INK4A) in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells.', *Biochemistry research international*, 2012, p. 951574. doi: 10.1155/2012/951574.

Mollà, M. *et al.* (2003) 'Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 57(1), pp. 264–273. doi: 10.1016/S0360-3016(03)00523-6.

Muñoz-Espín, D. *et al.* (2018) 'A versatile drug delivery system targeting senescent cells.', *EMBO molecular medicine*, 10(9), p. e9355. doi: 10.15252/emmm.201809355.

Muñoz-Espín, D. and Serrano, M. (2014) 'Cellular senescence: from physiology to pathology.', *Nature reviews. Molecular cell biology*. Nature Publishing Group, 15(7), pp. 482–96. doi: 10.1038/nrm3823.

Nahum, A. E. (2015) 'The radiobiology of hypofractionation.', *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. Elsevier Ltd, 27(5), pp. 260–9. doi: 10.1016/j.clon.2015.02.001.

Naldini, A. and Carraro, F. (2005) 'Role of inflammatory mediators in angiogenesis.', *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 4(1), pp. 3–8. doi: http://dx.doi.org/10.2174/1568010053622830.

Nikjoo, H. *et al.* (2002) 'Modelling of DNA damage induced by energetic electrons (100 eV to 100 keV).', *Radiation protection dosimetry*, 99(1–4), pp. 77–80. doi: 10.1093/oxfordjournals.rpd.a006843.

Nishio, K. *et al.* (2001) 'Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts.', *Histochemistry and cell biology*, 116(4), pp. 321–7. doi: 10.1007/s004180100325.

Noda, A. *et al.* (1994) 'Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen.', *Experimental cell research*, 211(1), pp. 90–8. doi: 10.1006/excr.1994.1063.

Ogrunc, M. *et al.* (2014) 'Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation.', *Cell death and differentiation*, 21(6), pp. 998–1012. doi: 10.1038/cdd.2014.16.

Oh, E.-T. *et al.* (2014) 'Radiation-induced angiogenic signaling pathway in endothelial cells obtained from normal and cancer tissue of human breast.', *Oncogene*, 33(10), pp. 1229–38. doi: 10.1038/onc.2013.70.

Ohtani, N. *et al.* (2001) 'Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence.', *Nature*, 409(6823), pp. 1067–1070. doi: 10.1038/35059131.

Oktaria, S. *et al.* (2017) 'In vitro investigation of the dose-rate effect on the biological effectiveness of megavoltage X-ray radiation doses', *Applied Radiation and Isotopes*, 128(May), pp. 114–119. doi: 10.1016/j.apradiso.2017.07.008.

Olovnikov, A. M. (1996) 'Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory.', *Experimental gerontology*, 31(4), pp. 443–8. doi: 10.1016/0531-5565(96)00005-8.

Onimaru, R. *et al.* (2017) 'Phase I study of stereotactic body radiation therapy for peripheral T2N0M0 non-small cell lung cancer (JCOG0702): Results for the group with PTV ⩾ 100 cc', *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 122(2), pp. 281–285. doi: 10.1016/j.radonc.2016.11.022.

Onishi, H. *et al.* (2007) 'Hypofractionated stereotactic radiotherapy (HypoFXSRT) for stage I non-small cell lung cancer: updated results of 257 patients in a Japanese multi-institutional study.', *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. International Association for the Study of Lung Cancer, 2(7 Suppl 3), pp. S94-100. doi: 10.1097/JTO.0b013e318074de34.

Onishi, H. *et al.* (2011) 'Stereotactic body radiotherapy (SBRT) for operable stage I non-small-cell lung cancer: can SBRT be comparable to surgery?', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 81(5), pp. 1352–8. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.07.1751.

Orjalo, A. V. *et al.* (2009) 'Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(40), pp. 17031–6. doi: 10.1073/pnas.0905299106.

Oshiro, Y. *et al.* (2010) 'Stereotactic body radiotherapy for lung tumors at the pulmonary hilum', *Strahlentherapie und Onkologie*, 186(5), pp. 274–279. doi: 10.1007/s00066-010-2072-y.

Ovadya, Y. and Krizhanovsky, V. (2018) 'Strategies targeting cellular senescence.', *The Journal of clinical investigation*, 128(4), pp. 1247–1254. doi: 10.1172/JCI95149.

Pan, J. *et al.* (2017) 'Inhibition of Bcl-2/xl With ABT-263 Selectively Kills Senescent Type II Pneumocytes and Reverses Persistent Pulmonary Fibrosis Induced by Ionizing Radiation in Mice', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. Elsevier Inc., 99(2), pp. 353–361. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.02.216.

Paris, F. (2001) 'Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice', *Science*, 293(5528), pp. 293–297. doi: 10.1126/science.1060191.

Park, H. *et al.* (2016) 'GDF15 contributes to radiation-induced senescence through the ROS-mediated p16 pathway in human endothelial cells.', *Oncotarget*, 7(9), pp. 9634–44. doi: 10.18632/oncotarget.7457.

Parpaleix, A. *et al.* (2016) 'Role of interleukin-1 receptor 1/MyD88 signalling in the development and progression of pulmonary hypertension.', *The European respiratory journal*, 48(2), pp. 470–83. doi: 10.1183/13993003.01448-2015.

Patel, T. N. *et al.* (2015) 'Shelterin proteins and cancer.', *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 16(8), pp. 3085–90. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.8.3085.

Peña, L. A., Fuks, Z. and Kolesnick, R. N. (2000) 'Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency.', *Cancer research*, 60(2), pp. 321–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10667583.

Piera-Velazquez, S., Li, Z. and Jimenez, S. A. (2011) 'Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders', *American Journal of Pathology*, 179(3), pp. 1074–1080. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.06.001.

Price, G. C., Thompson, S. A. and Kam, P. C. (2004) 'Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor.', *Anaesthesia*, 59(5), pp. 483–492. doi: 10.1111/j.1365-2044.2004.03679.x.

Prise, K. *et al.* (2005) 'New insights on cell death from radiation exposure.', *The Lancet Oncology*, 6(7), pp. 520–528. doi: 10.1016/S1470-2045(05)70246-1.

Puck, T. T. and Marcus, P. I. (1956) 'Action of x-rays on mammalian cells.', *The Journal of experimental medicine*, 103(5), pp. 653–66. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13319584.

Quarmby, S. *et al.* (1999) 'Irradiation induces upregulation of CD31 in human endothelial cells', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(3), pp. 588–597. doi: 10.1161/01.ATV.19.3.588.

Rahbar, E. *et al.* (2015) 'Endothelial glycocalyx shedding and vascular permeability in severely injured trauma patients.', *Journal of translational medicine*, 13(1), p. 117. doi: 10.1186/s12967-015-0481-5.

Rannou, E. *et al.* (2015) 'In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury.', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 5(April), p. 15738. doi: 10.1038/srep15738.

Reisz, J. a *et al.* (2014) 'Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection', *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(2), pp. 260–292. doi: 10.1089/ars.2013.5489.

Richter, K. K. *et al.* (1997) 'Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy?', *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 44(1), pp. 65–71. doi: 10.1016/S0167-8140(97)00063-7.

Riquier, H. *et al.* (2013) 'Comparison of X-ray and alpha particle effects on a human cancer and endothelial cells: survival curves and gene expression profiles.', *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 106(3), pp. 397–403. doi: 10.1016/j.radonc.2013.02.017.

Robinson, C. G. *et al.* (2013) 'Patterns of failure after stereotactic body radiation therapy or lobar resection for clinical stage I non-small-cell lung cancer.', *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. International Association for the Study of Lung Cancer, 8(2), pp. 192–201. doi: 10.1097/JTO.0b013e31827ce361.

Robson, M. J. *et al.* (2016) 'Generation and Characterization of Mice Expressing a Conditional Allele of the Interleukin-1 Receptor Type 1.', *PloS one*, 11(3), p. e0150068. doi: 10.1371/journal.pone.0150068.

Rovillain, E. *et al.* (2011) 'Activation of nuclear factor-kappa B signalling promotes cellular senescence.', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 30(20), pp. 2356–66. doi: 10.1038/onc.2010.611.

Sagiv, A. *et al.* (2013) 'Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells.', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 32(15), pp. 1971–7. doi: 10.1038/onc.2012.206.

Sagiv, A. and Krizhanovsky, V. (2013) 'Immunosurveillance of senescent cells: The bright side of the senescence program', *Biogerontology*, 14(6), pp. 617–628. doi: 10.1007/s10522-013-9473-0.

Salama, R. *et al.* (2014) 'Cellular senescence and its effector programs.', *Genes & development*, 28(2), pp. 99–114. doi: 10.1101/gad.235184.113.

Salminen, A., Kauppinen, A. and Kaarniranta, K. (2012) 'Emerging role of NF-κB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP)', *Cellular Signalling*. Elsevier Inc., 24(4), pp. 835–845. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.006.

Salmonowicz, H. and Passos, J. F. (2017) 'Detecting senescence: a new method for an old pigment', *Aging Cell*, 16(3), pp. 432–434. doi: 10.1111/acel.12580.

Sanada, F. *et al.* (2018) 'IGF Binding Protein-5 Induces Cell Senescence.', *Frontiers in endocrinology*, 9(FEB), p. 53. doi: 10.3389/fendo.2018.00053.

Santana, P. *et al.* (1996) 'Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis', *Cell*, 86(2), pp. 189–199. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80091-4.

Satoh, T. *et al.* (1998) 'Multinucleated variant endothelial cells (MVECs) of human aorta: expression of tumor suppressor gene p53 and relationship to atherosclerosis and aging.', *Endothelium : journal of endothelial cell research*, 6(2), pp. 123–32. doi: 10.3109/10623329809072199.

Schafer, M. J. *et al.* (2017) 'Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease.', *Nature communications*, 8, p. 14532. doi: 10.1038/ncomms14532.

Schaue, D. *et al.* (2015) 'Radiation and inflammation.', *Seminars in radiation oncology*, 25(1), pp. 4–10. doi: 10.1016/j.semradonc.2014.07.007.

Schaue, D., Kachikwu, E. L. and McBride, W. H. (2012) 'Cytokines in radiobiological responses: a review.', *Radiation research*, 178(6), pp. 505–23. doi: 10.1667/RR3031.1.

Schött, U. *et al.* (2016) 'The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review', *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine, 24(1), p. 48. doi: 10.1186/s13049-016-0239-y.

Schuller, B. W. *et al.* (2006) 'Selective irradiation of the vascular endothelium has no effect on the survival of murine intestinal crypt stem cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), pp. 3787–3792. doi: 10.1073/pnas.0600133103.

Senoo, T. *et al.* (2010) 'Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis.', *Thorax*, 65(4), pp. 334–40. doi: 10.1136/thx.2009.119974.

Serrano, M. *et al.* (1997) 'Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.', *Cell*, 88(5), pp. 593–602. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054499.

Serrano, M., Hannon, G. J. and Beach, D. (1993) 'A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.', *Nature*, 366(6456), pp. 704–7. doi: 10.1038/366704a0.

Severino, V. *et al.* (2013) 'Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 7 released by senescent cells promote premature senescence in mesenchymal stem cells.', *Cell death & disease*. Nature Publishing Group, 4(11), p. e911. doi: 10.1038/cddis.2013.445.

Shao, L. *et al.* (2014) 'Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an Ink4a- and Arf-independent manner.', *Blood*, 123(20), pp. 3105–15. doi: 10.1182/blood-2013-07-515619.

Sharpless, N. E. and Sherr, C. J. (2015) 'Forging a signature of in vivo senescence.', *Nature reviews. Cancer*, 15(7), pp. 397–408. doi: 10.1038/nrc3960.

Shay, J. W., Pereira-Smith, O. M. and Wright, W. E. (1991) 'A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence.', *Experimental cell research*, 196(1), pp. 33–9. doi: 10.1016/0014-4827(91)90453-2.

Shelton, D. N. *et al.* (1999) 'Microarray analysis of replicative senescence.', *Current biology : CB*, 9(17), pp. 939–45. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80420-5.

Shimi, T. *et al.* (2011) 'The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence.', *Genes & development*, 25(24), pp. 2579–93. doi: 10.1101/gad.179515.111.

Société Française de Radiothérapie Oncologique (2007) 'Guide des procédures de radiothérapie externe'.

Song, S. Y. *et al.* (2009) 'Fractionated stereotactic body radiation therapy for medically inoperable stage I lung cancer adjacent to central large bronchus.', *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 66(1), pp. 89–93. doi: 10.1016/j.lungcan.2008.12.016.

Spinks, J. W. T. and Woods, R. J. (1990) 'Water and Inorganic Aqueous Systems', *An introduction to radiation chemistry*, pp. 243–313.

van Steensel, B., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (1998) 'TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions.', *Cell*, 92(3), pp. 401–13. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80932-0.

Stephans, K. L. *et al.* (2018) 'Tumor Control and Toxicity for Common Stereotactic Body Radiation Therapy Dose-Fractionation Regimens in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*. Elsevier Inc, 100(2), pp. 462–469. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.10.037.

Stewart, F. A. and Dörr, W. (2009) 'Milestones in normal tissue radiation biology over the past 50 years: From clonogenic cell survival to cytokine networks and back to stem cell recovery', *International Journal of Radiation Biology*, 85(7), pp. 574–586. doi: 10.1080/09553000902985136.

Storer, M. *et al.* (2013) 'Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning.', *Cell*. Elsevier Inc., 155(5), pp. 1119–30. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.041.

Straub, J. M. *et al.* (2015) 'Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy.', *Journal of cancer research and clinical oncology*, 141(11), pp. 1985–94. doi: 10.1007/s00432-015-1974-6.

Straube, J., Huang, B. E. and Cao, K.-A. L. (2017) 'DynOmics to identify delays and co-expression patterns across time course experiments.', *Scientific reports*, 7(July 2016), p. 40131. doi: 10.1038/srep40131.

Suram, A. *et al.* (2012) 'Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions.', *The EMBO journal*, 31(13), pp. 2839–51. doi: 10.1038/emboj.2012.132.

Suzuki, M. and Boothman, D. A. (2008) 'Stress-induced premature senescence (SIPS)--influence of SIPS on radiotherapy.', *Journal of radiation research*, 49(2), pp. 105–12. doi: 10.1038/npg.els.0003865.

Takahashi, A. *et al.* (2012) 'DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells.', *Molecular cell*. Elsevier Inc., 45(1), pp. 123–31. doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.018.

Takai, H., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2003) 'DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres', *Current Biology*, 13(17), pp. 1549–1556. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00542-6.

Tchkonia, T. *et al.* (2013) 'Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities.', *The Journal of clinical investigation*, 123(3), pp. 966–72. doi: 10.1172/JCI64098.

Timmerman, R. *et al.* (2003) 'Extracranial stereotactic radioablation: results of a phase I study in medically inoperable stage I non-small cell lung cancer.', *Chest*. The American College of Chest Physicians, 124(5), pp. 1946–55. doi: 10.1378/chest.124.5.1946.

Timmerman, R. *et al.* (2006) 'Excessive toxicity when treating central tumors in a phase II study of stereotactic body radiation therapy for medically inoperable early-stage lung cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 24(30), pp. 4833–4839. doi: 10.1200/JCO.2006.07.5937.

Timmerman, R. *et al.* (2010) 'Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer.', *JAMA*, 303(11), pp. 1070–6. doi: 10.1001/jama.2010.261.

Travis, E. L. (1980) 'The sequence of histological changes in mouse lungs after single doses of x-rays.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 6(3), pp. 345–7. Available at: http://scholar.google.ca/scholar?q=related:jdd85eiqwPsJ:scholar.google.com/&hl=en&as_sdt=0,5#10.

Tsuji, T., Aoshiba, K. and Nagai, A. (2006) 'Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema.', *American journal of respiratory and critical care medicine*, 174(8), pp. 886–93. doi: 10.1164/rccm.200509-1374OC.

Turesson, I. *et al.* (2003) 'Biological response to radiation therapy', *Acta Oncologica*, 42(2), pp. 92–106. doi: 10.1080/02841860310004959.

Uekawa, N. *et al.* (2004) 'Involvement of IL-1 family proteins in p38 linked cellular senescence of mouse embryonic fibroblasts.', *FEBS letters*, 575(1–3), pp. 30–4. doi: 10.1016/j.febslet.2004.08.033.

Uematsu, M. *et al.* (2001) 'Computed tomography-guided frameless stereotactic radiotherapy for stage I non-small cell lung cancer: a 5-year experience.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 51(3), pp. 666–70. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597807.

Vaughan, D. E. *et al.* (2017) 'Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is a Marker and a Mediator of Senescence.', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 37(8), pp. 1446–1452. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309451.

Vaurijoux, A. *et al.* (2017) 'Transmission of persistent ionizing radiation-induced foci through cell division in human primary cells.', *Mutation research*. Elsevier B.V., 797–799, pp. 15–25. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.03.003.

Vávrová, J. and Rezáčová, M. (2011) 'The importance of senescence in ionizing radiation-induced tumour suppression.', *Folia biologica*, 57(2), pp. 41–6. doi: FB2011A0008 [pii].

Vicente, R. *et al.* (2016) 'Cellular senescence impact on immune cell fate and function.', *Aging cell*, 15(3), pp. 400–6. doi: 10.1111/acel.12455.

Videtic, G. M. M. *et al.* (2015) 'A Randomized Phase 2 Study Comparing 2 Stereotactic Body Radiation Therapy Schedules for Medically Inoperable Patients With Stage I Peripheral Non-Small Cell Lung Cancer: NRG Oncology RTOG 0915 (NCCTG N0927).', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 93(4), pp. 757–64. doi: 10.1016/j.ijrobp.2015.07.2260.

Vujaskovic, Z. *et al.* (2001) 'Radiation-induced hypoxia may perpetuate late normal tissue injury.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 50(4), pp. 851–5. doi: 10.1016/S0360-3016(01)01593-0.

Wagner, M. *et al.* (2001) 'Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis.', *Experimental gerontology*, 36(8), pp. 1327–47. doi: 10.1016/S0531-5565(01)00105-X.

Wang, J. *et al.* (2004) 'Hirudin ameliorates intestinal radiation toxicity in the rat: support for thrombin inhibition as strategy to minimize side-effects after radiation therapy and as countermeasure against radiation exposure.', *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 2(11), pp. 2027–35. doi: 10.1111/j.1538-7836.2004.00960.x.

Wang, Y., Boerma, M. and Zhou, D. (2016) 'Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases.', *Radiation research*, 000, p. RR14445.1. doi: 10.1667/RR14445.1.

Watanabe, S. *et al.* (2017) 'Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases.', *Cancer science*, 108(4), pp. 563–569. doi: 10.1111/cas.13184.

Watters, D. (1999) 'Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis.', *Immunology and cell biology*, 77(3), pp. 263–71. doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00824.x.

Weber, A., Wasiliew, P. and Kracht, M. (2010) 'Interleukin-1 (IL-1) pathway.', *Science signaling*, 3(105), p. cm1. doi: 10.1126/scisignal.3105cm1.

Wiley, C. D. *et al.* (2016) 'Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype.', *Cell metabolism*, 23(2), pp. 303–14. doi: 10.1016/j.cmet.2015.11.011.

Wiley, C. D. *et al.* (2017) 'Analysis of individual cells identifies cell-to-cell variability following induction of cellular senescence', *Aging Cell*, (May), pp. 1–8. doi: 10.1111/acel.12632.

Wohleb, E. S. *et al.* (2014) 'Knockdown of interleukin-1 receptor type-1 on endothelial cells attenuated stress-induced neuroinflammation and prevented anxiety-like behavior.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(7), pp. 2583–91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3723-13.2014.

Wynn, T. a, Yugandhar, V. G. and Clark, M. a. (2013) 'Cellular and molecular mechanisms of fibrosis', *J Pathol*, 46(2), pp. 26–32. doi: 10.1002/path.2277.Cellular.

Xu, M. *et al.* (2015) 'JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), pp. E6301-10. doi: 10.1073/pnas.1515386112.

Xu, Y. *et al.* (2014) 'Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence.', *Trends in biochemical sciences*, 39(6), pp. 268–76. doi: 10.1016/j.tibs.2014.04.004.

Xue, W. *et al.* (2007) 'Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas.', *Nature*, 445(7128), pp. 656–60. doi: 10.1038/nature05529.

Yamamoto, K. *et al.* (2005) 'Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly.', *Cardiovascular research*, 66(2), pp. 276–85. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.11.013.

Yang, H. *et al.* (2017) 'cGAS is essential for cellular senescence.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(23), pp. E4612–E4620. doi: 10.1073/pnas.1705499114.

Yang, J. *et al.* (1999) 'Human endothelial cell life extension by telomerase expression.', *The Journal of biological chemistry*, 274(37), pp. 26141–8. doi: 10.1074/jbc.274.37.26141.

Ye, C. *et al.* (2013) 'Radiation-induced cellular senescence results from a slippage of long-term G2arrested cells into G1phase', *Cell Cycle*, 12(9), pp. 1424–1432. doi: 10.4161/cc.24528.

Ye, X. *et al.* (2007) 'Definition of pRB- and p53-dependent and -independent steps in HIRA/ASF1a-mediated formation of senescence-associated heterochromatin foci.', *Molecular and cellular biology*, 27(7), pp. 2452–65. doi: 10.1128/MCB.01592-06.

Yentrapalli, R. *et al.* (2013) 'The PI3K/Akt/mTOR Pathway Is Implicated in the Premature Senescence of Primary Human Endothelial Cells Exposed to Chronic Radiation', *PLoS ONE*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0070024.

Yeoh, E. K. and Horowitz, M. (1987) 'Radiation enteritis.', *Surgery, gynecology & obstetrics*, 165(4), pp. 373–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3310287.

Zeman, M. K. and Cimprich, K. A. (2014) 'Causes and consequences of replication stress.', *Nature cell biology*, 16(1), pp. 2–9. doi: 10.1038/ncb2897.

Zhu, Y. *et al.* (2015) 'The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs.', *Aging cell*, 14(4), pp. 644–58. doi: 10.1111/acel.12344.

Résumé

La radiothérapie constitue l'une des principales modalités dans le traitement des cancers, mais celle-ci est associée à des atteintes radio-induites aux tissus sains. Les cellules endothéliales du système vasculaire sont connues comme participant à l'évolution de ces lésions. La sénescence cellulaire est un puissant mécanisme suppresseur de tumeurs mais, paradoxalement, sa persistance peut devenir délétère pour l'homéostasie tissulaire. La présence de cellules sénescentes au sein des lésions radio-induites a déjà été démontrée mais leur rôle reste encore à élucider. Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à identifier et à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la sénescence radio-induite ainsi que son rôle dans le développement des lésions après irradiation pulmonaire en conditions stéréotaxiques. *In vivo*, en utilisant des souris exprimant le gène codant la luciférase, placé sous le contrôle du promoteur de p16, acteur majeur de la sénescence ($p16^{Ink4}$-LUC), nous avons détecté la présence de cellules sénescentes au sein de la lésion radio-induite après irradiation en conditions stéréotaxiques réalisées sur une plateforme dédiée d'irradiation du petit animal. Que l'irradiation soit effectuée en dose unique ou fractionnée, nous avons observé par imagerie en bioluminescence l'activation de $p16^{Ink4}$ dans le champ d'irradiation et sa persistance jusqu'à 21 mois après irradiation. L'immunohistochimie des poumons a révélé une forte hétérogénéité des populations de cellules sénescentes et notamment la présence de pneumocytes, de macrophages ou encore de cellules endothéliales (CE). L'analyse transcriptionnelle de 44 gènes impliqués dans la sénescence, réalisée sur 6 types de CE, a montré après irradiation que les CE de veine ombilicale (HUVEC) sont les plus pertinentes pour étudier la sénescence radio-induite (SRI). Le profil moléculaire dynamique associé à la SRI chez les HUVEC a été analysé après 9 doses d'irradiation à différents pas de temps. Une analyse approfondie par méthodes mathématiques et bio-informatiques, a permis l'identification de la voie de l'IL-1 comme un important nœud moléculaire impactant le phénotype sénescent.

Mots-clés : radiothérapie stéréotaxique, poumon, sénescence, endothélium vasculaire

Abstract

Radiotherapy is the main modality in cancer treatment but is associated with radiation damages on healthy tissues. Endothelial cells (ECs) play a key role in the evolution of radiation-induced normal tissue injuries. Cellular senescence is a powerful tumor suppressor mechanism but, paradoxically, long-term senescence can be deleterious for tissue homeostasis. The presence of senescent cells within the radiation-induced lesions has been shown but their role is not well understood. We aimed to identify and understand the molecular mechanisms involved in radiation-induced senescence and its role in radiation-induced lung injuries after stereotactic irradiation. *In vivo*, using luciferase knock-in mice ($p16^{Ink4}$-LUC) to detect activation of a senescence player, we explored the presence of senescent cells in radiation-induced pulmonary injury after a stereotactic irradiation performed with a Small Animal Radiation Research Platform. After single/fractionated high-dose lung irradiation of $p16^{Ink4}$-LUC mice and using bioluminescence imaging we showed the overexpression of p16 in the irradiation field and its persistence up to 21 months after radiation exposure. Immunostainings revealed a panel of heterogeneous senescent cells including pneumocytes, macrophages and endothelial cells (EC). mRNA expression of 44 genes involved in senescence in 6 human primary irradiated ECs revealed that Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) are the most relevant in term of gene expression. The dynamic molecular profile associated to radiation-induced senescence (RIS) in HUVECs was analyzed after 9 doses and 7 time points. Using a deep analysis by mathematical/bioinformatics methods, we deciphered the dynamical transcriptional program involved in RIS and we identified IL1-signaling pathway as a key molecular hub which could potentially modulate the senescence phenotype.

Keywords: stereotactic radiation therapy, lung, senescence, vascular endothelium.