Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Radiosensibilisation de cellules du cancer du poumon non à petites cellules par la méthode de la létalité synthétique

Lobbens, Alison

Award date:
2018

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

UNIVERSITÉ
DE NAMUR

Faculté des Sciences

RADIOSENSIBILISATION DE CELLULES DU CANCER DU POUMON NON A PETITES CELLULES PAR LA METHODE DE LA LETALITE SYNTHETIQUE

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Alison LOBBENS

Janvier 2018

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - http://www.unamur.be

RADIOSENSIBILISATION DE CELLULES DU CANCER DU POUMON NON A PETITES CELLULES PAR LA METHODE DE LA LETALITE SYNTHETIQUE

LOBBENS Alison

Résumé

Le concept de létalité synthétique, dans lequel la combinaison de déficiences dans l'expression de deux ou plusieurs gènes conduit à la mort cellulaire, a déjà montré des résultats prometteurs lorsqu'il est exploité en utilisant des inhibiteurs de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) chez les patients cancéreux présentant une mutation BRCA1 ou BRCA2. Le but de ce travail est d'étendre l'utilisation des inhibiteurs de PARP à d'autres cancers, notamment ceux ne présentant pas de mutation BRCA. A cette fin, nous proposons un traitement combiné en ciblant deux enzymes de la réparation des dommages à l'ADN. Pour ce faire, un inhibiteur de PARP qui est l'olaparib, sera combiné avec un inhibiteur de RAD51, le B02. L'effet combiné de ces inhibiteurs est analysé dans des cellules du cancer de poumon non à petites cellules, un des cancers le plus répandu qui est associé à un faible taux de survie. En particulier, la radiosensibilisation des cellules A549 après irradiation avec des rayons X a été étudiée.

Une concentration non cytotoxique des deux inhibiteurs a été utilisée et les cellules ont été irradiées à différentes doses de rayons X. Un effet synergique des deux molécules a pu être démontré à 2 Gy. En parallèle, nous avons démontré que l'irradiation par rayons X augmentait l'expression en protéines et en ARN de p21, provoquant un arrêt du cycle cellulaire. La détection de l'activité β-galactosidase associée à la sénescence a mis en évidence une induction de la sénescence dans les cellules irradiées. Par contre, aucune apoptose n'a été détectée 24 h après irradiation. Ces résultats suggèrent que les cellules meurent majoritairement par un mécanisme d'arrêt permanent du cycle cellulaire.

En conclusion, nos résultats démontrent qu'il y a une radiosensibilisation des cellules A549 après une irradiation par rayons X en utilisant la létalité synthétique en présence d'olaparib et de B02.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2018

Promoteur: C. Michiels

REMERCIEMENTS

C'est avec beaucoup joie mais aussi avec petit un pincement au cœur que ces 10 mois passés au laboratoire se terminent. J'aimerais donc remercier toutes les personnes sur qui j'ai pu compté durant ce mémoire.

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Thierry Arnould de m'avoir accueillie au sein de l'URBC.

Ensuite, je tiens à remercier ma promotrice Carine Michiels pour sa gentillesse, ses précieux conseils et son dévouement qui m'ont aidée tout au long du mémoire et plus particulièrement lors de la rédaction. Vous avez toujours disponible quand j'en avais besoin alors que votre emploi du temps était très chargé cette année. Vous êtes vraiment une femme épatante !

Je tiens ensuite à te remercier toi Anne-Catherine... Tu es probablement la personne à qui revient le plus de mérite. Tu m'as appris tant de choses et tu as toujours été disponible pour m'aider avec toutes mes questions. Ce que j'ai le plus apprécié chez toi, c'est ta Zen attitude et ta bonne humeur quotidienne. Tu arrivais toujours à prendre mes bêtises avec humour et me faire déstresser très vite. Je te souhaite plein de bonheur à toi ainsi qu'à ta famille dans votre nouvelle maison ainsi qu'une bonne continuation dans ta carrière de chercheuse.

Je tiens à remercier l'équipe des TumHyp qui ont su me faire part de nombreux conseils durant les réunions et qui étaient toujours disponibles pour moi au laboratoire quand j'en avais besoin.

Je remercie également les autres membres du laboratoire qui étaient également là lorsque j'avais des questions. Un énorme merci aux techniciens et plus particulièrement à Catherine, Maude, Antoine qui m'ont beaucoup aidé dans la réalisation des manipes. Guy, tes petits bisous du matin vont beaucoup me manquer !

Un grand merci aux mémorants mais plus particulièrement à An, Clotilde et Jia-Wei avec qui j'ai partagé de nombreuses heures au bureau qui ont mené à une belle amitié. Vous avez toujours été là pour moi autant dans les plus chouettes mais également dans les moments les plus tristes. Le mémoire n'aurait pas été pareil sans vous ! Votre bonne humeur et vos bêtises vont beaucoup me manquer durant le stage, mais je sais qu'on se reverra très vite. Merci également à tous mes amis qui ont été là pour moi durant ces 6 ans. Je pense notamment à vous An et Audrey mais à bien d'autres également.

Enfin, je tiens à remercier ma famille ainsi que mon petit ami Maxime pour leur soutien durant toutes ces années passées à Namur. Je sais que cela était particulièrement difficile pour vous lors des périodes de blocus. Vous avez toujours su me remonter le moral quand je n'allais pas bien et avez toujours montré beaucoup d'intérêt pour mes études.

Alison

LISTE DES ABREVIATIONS

3DCRT	Three dimensional conformal radiation therapy
53BP1	p53-binding protein 1
7-AAD	7-aminoactinomycine D
ADNc	ADN complémentaire
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APE1	AP endonuclase 1
ATG	Autophagy protein
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia Rad3 related
ATRIP	ATR interacting protein
Bad	Bcl-2-associated death promoter
Bax	Bcl-2–associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BER	Base excision repair
BRCA	Breast cancer gene
BSA	Bovine serum albumin
Cdc25	Cell division cycle 25
CDI	Coefficient of drug interaction
Cdk	Cyclin-dependent kinase
Chk1	Checkpoint kinase 1
Chk2	Checkpoint kinase 2
CKIs	Cdk inhibitors
CRT	Conformal radiotherapy
Ct	Threshold cycle
DDR	DNA damage response
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI
DISC	Death-inducing signaling complex
DNA-PKcs	DNA dependent protein kinase catalytic subunit
DSBs	Double-strand breaks
EME1	Essential meiotic structure-specific endonuclease 1
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
FADD	Fas-associated protein with death domain
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and drug administration
FEN1	Flap endonuclease 1
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GBM	Glioblastome multiforme
GEN1	Holliday junction 5' flap endonuclease
Gy	Gray
HR	Homologous recombination
IAP	Inhibitor of apoptosis
IF	Immunofluorescence
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IGRT	Image-guided radiotherapy
IL	Interleukin
IMRT	Intensity-modulated radiation therapy
LET	Linear energy transfer
LQ	Linear quadratic
MDM2	Murine double minute 2
MDR1	Multidrug resistance protein 1
MEM	Modified eagle's medium

MMR	Mismatch repair
MMS	Méthane sulfonate de méthyle
Mre11	Meiotic recombination 11 homolog A (*S. cerevisiae*)
MRN	Mre11–Rad50–Nbs1
NAD+	Nicotinamide adenine dinucleotide oxydé
Nbs1	Nijmegen breakage syndrome 1
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	Non-homologous end-joining
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NSCLC	Non small cell lung cancer
OH	Hydroxyle
OMS	Organisation mondiale de la santé
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p53	Protein p53
PARP-1	Poly(ADP-ribose)polymerase 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Plating efficiency
PFA	Paraformaldehyde
PNK	Polynucléotide kinase
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinylidene fluoride
Rb	Retinoblastoma protein
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication protein A
rpm	Round per minute
RT	Radiation therapy
RT	Room temperature
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SAHF	Senescence-associated heterochromatic foci
SA-βgal	Senescence-associated β-galactosidase
SBRT	Stereotactic body radiation therapy
SCLC	Small-cell lung cancer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SER	Sensitivity enhancement ratio
SF	Survival fraction
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspases
SSBs	Single-strand breaks
ssDNA	Single-strand DNA
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	Tris buffered saline tween
TNF	Tumor necrosis factor
TP53BP1	Tumor protein p53 binding protein 1
WB	Western blot
XRCC	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells

TABLE DES MATIERES

I INTRODUCTION 1

1 Le cancer 1

1.1 Généralités 1

1.2 Le cancer du poumon 1

2 Les traitements 2

2.1 Les traitements conventionnels 2

2.1.1 La chirurgie 2

2.1.2 La chimiothérapie 3

2.1.3 La radiothérapie 3

2.1.3.1 Les radiations ionisantes 3

2.1.3.2 Les techniques utilisées en radiothérapie 4

2.2 La thérapie ciblée 5

3 Les réponses cellulaires aux radiations ionisantes 6

3.1 Les dommages à l'ADN 6

3.2 Les réponses aux dommages à l'ADN (DDR) 6

3.2.1 Les senseurs des dommages à l'ADN 6

3.2.2 L'activation de p53 : le gardien du génome 7

3.2.3 L'arrêt du cycle cellulaire 7

3.2.4 Les mécanismes de réparation de l'ADN 7

3.2.4.1 Mécanisme BER 7

3.2.4.2 Mécanisme HR 8

3.2.4.3 Mécanisme NHEJ 8

3.3 La mort cellulaire 9

3.3.1 L'apoptose 9

3.3.1.1 Définition 9

3.3.1.2 La voie intrinsèque 9

3.3.1.3 La voie extrinsèque 10

3.3.1.4 La voie d'exécution 10

3.3.2 La sénescence 10

3.3.2.1 Définition 10

3.3.2.2 Voies de signalisation impliquées dans la sénescence 11

3.3.2.3 Marqueurs des cellules sénescentes 11

3.3.3 La mitose catastrophique 12

3.3.4 L'autophagie 12

3.3.5 La nécrose 12

4 Courbes de survie 12
4.1 Radiosensibilité cellulaire 12
4.2 Test de clonogénicité et courbes de survie 13
4.2.1 Paramètres de radiosensibilité 13
4.2.2 Sensitivity Enhancement Ratio (SER) 14
5 La létalité synthétique 14
5.1 Définition 14
5.2 Inhibiteurs de PARP 15
5.2.1 Inhibiteurs de PARP dans le traitement du cancer du sein et de l'ovaire avec mutation BRCA1 ou BRCA2 15
5.2.2 Activité de PARP et mécanismes d'action des inhibiteurs 15
5.2.3 Mécanismes de résistance des inhibiteurs de PARP 16
5.2.4 Olaparib, un inhibiteur sélectif de PARP-1 et PARP-2 16
5.3 Inhibiteurs de RAD51 16
5.4 Index thérapeutique 17
5.5 Etudes précliniques et cliniques des inhibiteurs 18
6 Objectifs 19
II MATERIEL ET METHODES 20
1 Culture cellulaire 20
1.1 Matériel 20
1.2 Méthode 20
1.2.1 Type cellulaire 20
1.2.2 Culture cellulaire 20
1.2.3 Ensemencement 20
1.2.4 Ajout des inhibiteurs 21
2 Irradiation par rayons X 21
2.1 Matériel 21
2.2 Méthode 21
3 Test de clonogénicité 21
3.1 Matériel 21
3.2 Méthode 21
4 Western-Blot 22
4.1 Matériel 23
4.2 Méthode 23
4.2.1 Extraction de protéines 23
4.2.2 Dosage de la concentration en protéines 23
4.2.3 Préparation des gels 23

4.2.4 Electrophorèse 24
4.2.5 Transfert sur membrane 24
4.2.6 Blocking et révélation 24
5 Marquage en immunofluorescence 24
5.1 Matériel 24
5.2 Méthode 25
6 Marquage au BrdU et cytométrie de flux (FACS) 25
6.1 Matériel 25
6.2 Méthode 26
7 PCR en temps réel (qPCR) 26
7.1 Matériel 27
7.2 Méthode 27
7.2.1 Extraction ARN 27
7.2.2 Rétro-transcription 27
7.2.3 PCR en temps réel (qPCR) 28
8 Détection de l'activité β-galactosidase associée à la sénescence (SA-βgal) 28
8.1 Matériel 28
8.2 Méthode 28
III RESULTATS 30
1 Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation de l'ADN 30
1.1 Niveau de pADPr et formation de foci RAD51 après irradiation à 2 Gy 30
2 L'arrêt du cycle cellulaire, mort cellulaire et courbes de survie 30
2.1 Arrêt du cycle cellulaire et évaluation de l'apoptose après irradiation à 2 Gy 30
2.2 Induction de la sénescence par les rayons X 32
2.2.1 Induction de la sénescence après irradiation à 2 Gy 32
2.2.2 Evaluation de l'expression de p21, IGFBP3 et IL-8 après irradiation à 2 Gy 32
3 Radiosensibilité des cellules A549 33
3.1 Effet radiosensibilisant de l'olaparib, du B02 et de leur combinaison dans les cellules A549 33
4 Evaluation du niveau de cellules synthétisant de l'ADN en présence et en absence de sérum 35
IV DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES 36
V BIBLIOGRAPHIE 42

I. INTRODUCTION

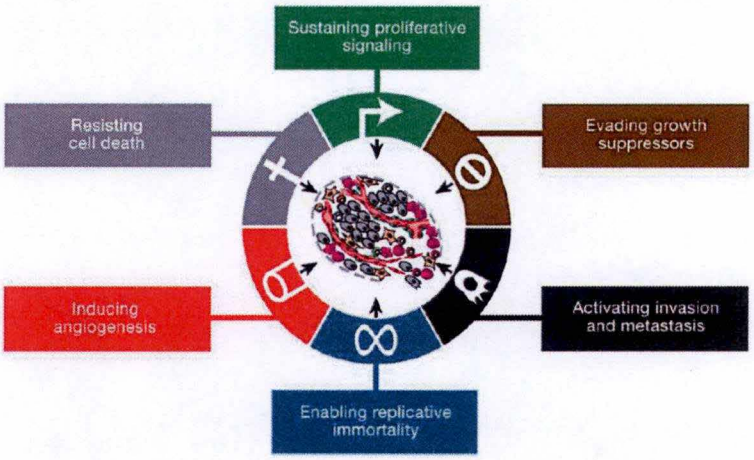


Figure 1 : Les Hallmarks du cancer. Représentation des caractéristiques typiques des cellules cancéreuses menant à un état néoplasique (Hanahan et Weinberg, 2011).

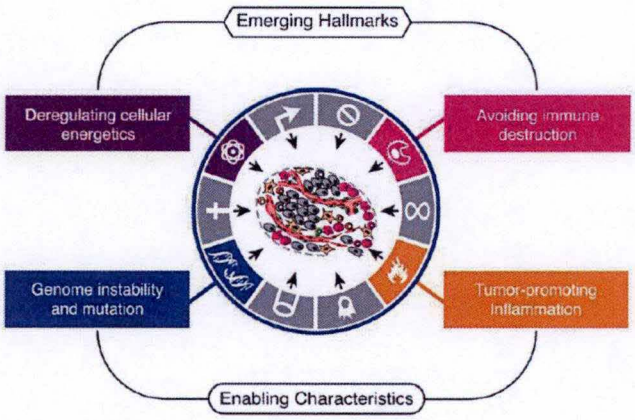


Figure 2 : Apparition de deux nouvelles capacités distinctives et de caractéristiques dites permissives favorisant la pathogénicité du cancer (Hanahan et Weinberg, 2011).

1 Le cancer

1.1 Généralités

Le cancer regroupe plusieurs maladies pouvant toucher n'importe quelle partie du corps. Cette maladie est principalement caractérisée par une prolifération anarchique de cellules anormales dont certaines, appelées métastases, peuvent envahir les tissus sains environnants. Lorsque ces cellules ne sont pas éliminées, la maladie progresse et peut mener au décès du patient (OMS, organisation mondiale de la santé).

La formation d'une tumeur ou tumorigenèse est un processus qui comprend plusieurs étapes par lesquelles une cellule saine subit des mutations engendrant sa transformation en cellule cancéreuse. Ces mutations permettent à la cellule d'acquérir différentes caractéristiques avantageuses pour la croissance de la tumeur (Figure 1). Ces caractéristiques ont été mises en évidence par Hanahan et Weinberg et appelées « hallmarks ». Elles permettent de mieux comprendre la complexité et les fondations biologiques du cancer. Ces caractéristiques sont : une prolifération cellulaire anarchique, une insensibilité aux inhibiteurs de croissance, une activation de mécanismes d'invasion menant à la formation de métastases, une immortalité réplicative, une induction de l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) et une résistance à l'apoptose (mort cellulaire) (Hanahan et Weinberg, 2000). Plus tard, deux autres capacités distinctives émergentes ainsi que deux nouvelles caractéristiques « permissives » qui ne sont pas distinctives mais qui favorisent la pathogénicité du cancer ont été mises en évidence (Figure 2). Ces dernières sont la capacité de modifier ou de reprogrammer le métabolisme énergétique et la capacité d'échapper à la destruction par le système immunitaire pour les capacités distinctives et l'instabilité génomique provoquant des mutations aléatoires telles que des réarrangements chromosomiques et l'inflammation pour les capacités dites permissives (Hanahan et Weinberg, 2011).

Le cancer peut être causé à la fois par des facteurs internes tels que les mutations héréditaires ou par des facteurs externes tels que des agents biologiques carcinogènes (infections virales, bactériennes) et les agents chimiques et physiques carcinogènes (radiations ionisantes, rayons UV, arsenic, nickel, chrome, goudron, amiante). Il existe également d'autres facteurs de risque tels que le sexe, l'âge, le tabagisme, l'alcool, la sédentarité et l'alimentation (OMS).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'incidence du cancer était d'environ 14 millions de nouveaux cas en 2012 et ce nombre de cas devrait augmenter de 70 % d'ici 20 ans. De plus, malgré les nombreux traitements utilisés pour lutter contre le cancer, tels que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, le cancer reste la deuxième cause de mortalité dans le monde avec 8,8 millions de morts en 2015. Les principaux types de cancer sont le cancer du poumon (1,69 millions de décès), le cancer du foie (788 000 décès), le cancer colorectal (774 000 décès), le cancer de l'estomac (754 000 décès) et le cancer du sein (571 000 décès). Il est dès lors très urgent d'améliorer les principaux traitements actuels, tels que la radiothérapie, afin d'augmenter la survie des patients atteints de cancer.

1.2 Le cancer du poumon

Le cancer du poumon est non seulement le cancer le plus fréquent avec 1,8 millions de nouveaux cas en 2012 (Globocan, 2012), mais il est également le cancer le plus mortel avec 1,7 millions de morts en 2015 (OMS). Environ 87 % des cancers du poumon sont causés par le tabagisme. Une exposition professionnelle répétée à un agent carcinogène chimique et

certains facteurs de risque tels que ceux susmentionnés peuvent également augmenter le risque de développer la maladie (Furrukh et al., 2013).

Le cancer du poumon est classé en deux catégories principales selon l'aspect des cellules en cause. Il y a d'une part, le cancer du poumon à petites cellules (SCLC) comprenant 15 % des cas. C'est le plus agressif de part son développement rapide, il se retrouve au niveau des bronches et il est rare chez les non-fumeurs. D'autre part, il y a le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) représentant 85 % des patients et subdivisé en 3 types : l'adénocarcinome, dont la croissance est lente et qui se situe dans une zone périphérique du poumon. C'est également la forme la plus fréquente chez les non fumeurs. Ensuite, il y a le carcinome à cellules squameuses, qui se trouve au centre du poumon et qui se développe généralement chez le fumeur. Enfin, le carcinome à grande cellule se retrouve partout dans le poumon et se propage rapidement (Stewart et al., 2010).

Malgré de nombreux traitements, le pronostic de patients atteints d'un cancer pulmonaire est mauvais, en particulier dans le cas des cancers du poumon locaux avancés et des cancers métastatiques (Parashar et al., 2013). Dans le cas des SCLC, ceux-ci restent incurables à cause du stade avancé de la maladie lors du diagnostic. Ce type de cancer du poumon est communément traité par chimiothérapie pour les stades les plus précoces à cause de sa rapide propagation. La chimiothérapie est combinée à la radiothérapie pour les stades les plus avancés (Molina et al., 2008). En ce qui concerne le NSCLC, les premiers stades sont habituellement traités par résection chirurgicale et montrent un taux de survie à 5 ans chez les patients atteints de cancer du poumon au stade précoce d'environ 50 % à 70 % (Parashar et al., 2013). D'autre part, les stades les plus avancés sont traités par chimiothérapie en combinaison avec la radiothérapie (Christoloudou et al., 2014). Le taux de survie à cinq ans chez les patients atteints d'un stade avancé est de 20 à 30 % (Haslett et al., 2014). Ce faible taux de survie est dû non seulement au stade avancé de la maladie, mais également car les radiothérapies conventionnelles atteignent un plateau thérapeutique (Christoloudou et al., 2014). C'est pourquoi il est impératif de trouver d'autres approches thérapeutiques pour traiter le cancer du poumon. Le principe de létalité synthétique, qui sera abordé plus tard dans l'introduction, semble être une approche prometteuse pour traiter ce type de cancer.

2 Les traitements

2.1 Les traitements conventionnels

2.1.1 La chirurgie

La chirurgie est le traitement le plus ancien et le plus efficace pour traiter le cancer. Elle consiste en la résection de la tumeur entière ainsi que de certains tissus sains proches lors d'une opération, contrairement à la chimiothérapie et la radiothérapie qui permettent de d'éliminer seulement une partie des cellules tumorales (Urriticoechea et al., 2010).

Ces techniques sont complémentaires et peuvent être utilisées en combinaison. La chirurgie peut être réalisée en combinaison avec la chimiothérapie et/ou la radiothérapie avant (thérapie néoadjuvant) ou après celle-ci (thérapie adjuvante). La thérapie néoadjuvante permet de diminuer la taille de la tumeur avant la résection de cette dernière. Ce traitement est recommandé pour traiter les NSCLC à un stade avancé (Zheng et al., 2016). Tandis que la

Tumor type	Proportion of all cancers	Proportion of patients receiving radiotherapy	Patients receiving radiotherapy (% of all cancers)	Reference
Breast	0.13	83	10.8	Delaney et al.[12]
Lung	0.10	76	7.6	Delaney et al.[13]
Melanoma	0.11	23	2.5	Delaney et al.[14]
Prostate	0.12	60	7.2	Delaney et al.[16]
Gynecologic	0.05	35	1.8	Delaney et al.[18,19]
Colon	0.09	14	1.3	Delaney et al.[15]
Rectum	0.05	61	3.1	Delaney et al.[15]
Head and neck	0.04	78	3.1	Delaney et al.[17]
Gall bladder	0.01	13	0.1	Delaney et al.[15]
Liver	0.01	0	0.0	Delaney et al.[15]
Esophageal	0.01	80	0.8	Delaney et al.[15]
Stomach	0.02	68	1.4	Delaney et al.[15]
Pancreas	0.02	57	1.1	Delaney et al.[15]
Lymphoma	0.04	65	2.6	Featherstone et al.[20]
Leukemia	0.03	4	0.1	Featherstone et al.[21]
Myeloma	0.01	38	0.4	Featherstone et al.[21]
Central nervous system	0.02	92	1.8	Delaney et al.[22]
Renal	0.03	27	0.8	Delaney et al.[16]
Bladder	0.03	58	1.7	Delaney et al.[16]
Testis	0.01	49	0.5	Delaney et al.[16]
Thyroid	0.01	10	0.1	Delaney et al.[22]
Unknown primary	0.04	61	2.4	Delaney et al.[22]
Other	0.02	50	1.0	See citations in text
Total	1.00	-	52.3	

Table 1 : Taux optimaux d'utilisation de la radiothérapie en fonction du type de cancer. La proportion des différents types de cancers provient de l'Australie (Delaney et al., 2005).

thérapie adjuvante permet d'éliminer les dernières cellules cancéreuses qui n'auraient pas été retirées lors de la chirurgie (Baudino et al., 2015).

2.1.2 La chimiothérapie

La chimiothérapie traite le corps entier du patient et consiste à administrer de façon systémique des agents chimiques ciblant l'ADN des cellules se divisant rapidement ou les microtubules du fuseau mitotique, empêchant la croissance et la division cellulaire. Il existe plusieurs classes d'agents chimiothérapeutiques : les agents alkylants, les inhibiteurs de topoisomérase, les anthracyclines, les alcaloïdes végétaux et les anti-métabolites.

Bien que la chimiothérapie cible les cellules cancéreuses, certaines cellules normales telles que celles des follicules pileux, les cellules de la moelle osseuse et les cellules épithéliales intestinales, qui se divisent également rapidement, sont également touchées. Ce type de thérapie mène donc à de nombreux effets secondaires tels que les nausées, les diarrhées, une perte de cheveux, une cardiotoxicité, des douleurs et la peau sèche (Baudino et al., 2015).

2.1.3 La radiothérapie

Durant leur traitement, 50% des patients atteints d'un cancer ont recours à la radiothérapie (Table 1). Dans le cancer du poumon, ce chiffre s'élève à 76% (Delaney et al., 2005). La radiothérapie est une méthode localisée de traitement du cancer utilisant des radiations ionisantes qui tuent les cellules cancéreuses ou qui les empêchent de proliférer, contrairement à la chimiothérapie qui utilise des agents chimiques agissant dans le corps entier. De cette manière, la radiothérapie permet de cibler les cellules cancéreuses en épargnant les tissus sains.

2.1.3.1 Les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes sont des rayonnements ayant la capacité d'expulser les électrons orbitaux d'un atome et de produire des ions lors de leur passage dans la matière, induisant des effets biologiques. Certains des effets liés aux radiations ionisantes sont fonction de la dose de radiations délivrée dont l'unité est le Gray (Gy). Un gray correspond à l'énergie d'un rayonnement ionisant fournissant une énergie d'un joule à une masse d'un kg.

Il existe plusieurs types de radiations ionisantes pour traiter le cancer. Les plus utilisés sont les photons (rayons X, rayons gamma). Les photons sont des rayons de faible LET (Linear Transfer Energy). Le LET correspond à l'énergie transférée par rayonnement par unité de distance, exprimée en keV/µm. La seule différence entre les rayons X et les rayons gamma est leur origine : les rayons X proviennent du cortège électronique tandis que les rayons gamma proviennent du noyau de l'atome. Les rayons X sont facilement générés par un accélérateur linéaire excitant les électrons. Les rayons gamma sont quant à eux produits lors de la désintégration d'éléments radioactifs tels que le radium, le cobalt-60 et le césium (Basker et al., 2012).

Un autre type de radiations ionisantes utilisées en radiothérapie est constitué de particules chargées comme les électrons, qui ont un LET assez faible et comparable à celui des photons, ou les protons, les particules alpha et les ions carbone qui ont un LET élevé, induisant plus de dommages à l'ADN que les photons. La façon dont ces particules chargées perdent leur énergie permet une meilleure distribution de la dose avec une dose maximale qui est déposée au niveau de la tumeur, tout en épargnant les tissus sains environnants (Pic de

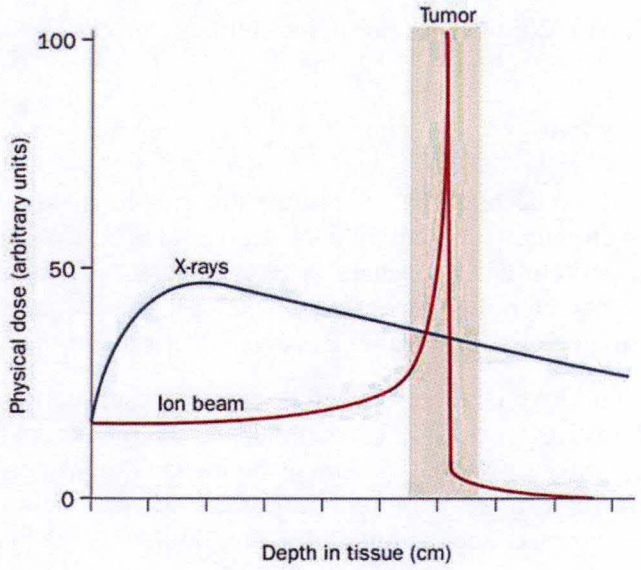


Figure 3 : Distribution de la dose des particules chargées en comparaison avec les photons. Contrairement aux rayons X dont la dose décroît au fur et à mesure de leur passage dans les tissus, les particules chargées déposent une dose maximale au niveau de la tumeur (Pic de Bragg) en épargnant les tissus sains (Durante et al., 2010).

Bragg), contrairement aux rayons X dont la dose diminue au fur et à mesure que le rayonnement passe au travers des tissus (Figure 3). En clinique, les protons sont utilisés principalement pour les cancers pédiatriques (Basker et al., 2012). Actuellement, beaucoup d'études sont menées sur leurs effets thérapeutiques chez les patients atteints d'un NSCLC à un stade avancé (Christodoulou et al., 2014). Toutefois le coût élevé pour produire ce type de particules reste encore un frein pour en faire un traitement anti-cancéreux de routine (Basker et al., 2012).

2.1.3.2 Les techniques utilisées en radiothérapie

Plusieurs techniques sont utilisées en radiothérapie : la radiothérapie conformationnelle 3D (3DCRT), la radiothérapie avec modulation de l'intensité (IMRT), la radiothérapie guidée par image (IGRT) et la radiothérapie stéréotaxique (SBRT).

Contrairement à la radiothérapie conventionnelle 2D qui utilise un champ d'irradiation de forme rectangulaire basée sur l'imagerie radiographique, la 3DCRT permet, à l'aide de scanners de la tumeur du patient, de localiser la tumeur ainsi que les tissus sains environnant et d'ensuite reconstituer la forme de la tumeur via des logiciels informatiques. Cela permet d'irradier de la tumeur en fonction du volume tumoral, épargnant ainsi mieux les tissus sains qu'en radiothérapie conventionnelle 2D (Basker et al., 2012). L'IMRT est une amélioration de la 3DCRT. Contrairement à la technique 3DCRT où l'intensité de l'irradiation est homogène, l'IMRT permet de moduler l'intensité du champ d'irradiation en fonction des irrégularités de la tumeur telles que les bosses et les parties concaves. Lors de l'irradiation, les organes ainsi que la tumeur peuvent bouger entrainant une irradiation moins ciblée sur la tumeur et pouvant endommager les tissus sains. L'IGRT est une technique permettant de voir la tumeur en temps réel grâce à différentes techniques d'imagerie. Ainsi, le faisceau d'irradiation peut être changé d'une séance à l'autre (Basker at al., 2012). Cette technique peut être utilisée en association avec les deux précédentes et prend même en compte les mouvements de respiration des patients (Christodoulou et al., 2014). Ces techniques ont considérablement amélioré la précision de la radiothérapie par l'amélioration de la conformité de la dose et sont utilisées en routine pour le traitement du cancer du poumon (Christoloudou et al., 2014).

La technique SBRT est une technique de radiothérapie de haute précision (radiochirurgie) qui utilise de fins faisceaux à très haute dose (20 Gy) qui convergent au centre de la tumeur (< 5cm) permettant l'ablation de cette dernière (Baker et al., 2016). Au départ, elle était souvent utilisée pour traiter les petites tumeurs cérébrales, mais elle est de plus en plus utilisée pour traiter les tumeurs extracrâniales (Parashar et al., 2013). Il a été rapporté que cette technique était très efficace dans le traitement du stade précoce cancer du poumon non à petites cellules chez les patients qui ne peuvent pas avoir recours à la chirurgie (Baker et al., 2016). Il a été montré également que cette technique est utilisée pour traiter les oligométastases (dont la capacité métastatique est limitée) dans le cancer du poumon (Parashar et al., 2013).

La radiothérapie est généralement fractionnée. Ce principe est basé sur le fait que les cellules saines se divisent moins rapidement que les cellules cancéreuses, celles-ci ont donc plus de temps pour réparer les dommages induits par les radiations, ce qui engendre une meilleure réparation des dommages sublétaux des cellules normales par rapport aux cellules cancéreuses. Lors du fractionnement, la dose totale d'irradiation à administrer est donc divisée en plusieurs fractions afin de laisser les tissus sains réparer les dommages induits par

l'irradiation à chaque fraction (Baskar et al., 2012). En radiothérapie conventionnelle, cette méthode consiste à administrer une fraction de dose de 1,8 à 2 Gy à raison de 5 fois par semaine durant 5 à 7 semaines afin d'avoir un contrôle tumoral optimal avec un taux de complication au niveau des tissus sains faible. Suivant le contexte clinique et le but du traitement, cette dose peut être augmentée ou diminuée. On parle d'hypofractionnement, d'hyperfractionnement et de fractionnement accéléré. Dans l'hyperfractionnement, le rayonnement est délivré en une petite dose (1,2 à 1,5 Gy) par fraction avec deux ou trois fractions livrées par jour, permettant un meilleur contrôle local de la tumeur avec une diminution des effets toxiques à long terme. Cette technique est utilisée lorsque le rapport α/β (dont la signification sera expliquée plus tard) est plus grand dans les cellules cancéreuses que dans les tissus sains. Dans les cellules de NSCLC A549 par exemple, ce rapport est élevé (14-25 Gy) (Karagounis et al., 2017). D'autre part, l'hypofractionnement consiste à délivrer une dose plus forte (> 2,2 Gy) mais avec un nombre de fractions moindre. Celui-ci est pratiqué principalement pour les tumeurs avec un rapport α/β faible dans les cellules cancéreuses et élevé dans les tissus sains, ainsi que dans les soins palliatifs. Les cancers du sein et de la prostate ont un rapport α/β faible (Karagounis et al., 2017). Enfin, le fractionnement accéléré utilise les mêmes doses qu'en radiothérapie conventionnelle mais les doses sont délivrées plus rapidement dans le temps, afin de contrer la repopulation des cellules cancéreuses. L'une ou l'autre méthode sera utilisée suivant le volume à irradier et si la tumeur est proche d'un organe critique, ce qui est le cas dans le cancer du poumon. De plus, les méthodes peuvent être utilisées en combinaison. Actuellement, dans le cancer du poumon non à petites cellules, on tend de plus en plus à utiliser l'hyperfractionnement accéléré (Haslett et al., 2014).

Les thérapies susmentionnées sont des techniques externes. Il existe également la radiothérapie interne appelée brachythérapie qui utilise des isotopes radioactifs qui sont placés dans la tumeur ou à proximité de celle-ci et émettent des photons pour tuer les cellules cancéreuses (Borrego-Soto et al., 2015).

2.2 La thérapie ciblée

La thérapie ciblée permet d'éviter les effets secondaires parfois graves induits par les thérapies anti-cancéreuses conventionnelles. Ce type de thérapie consiste à utiliser des composés inhibant la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que la formation de métastases en utilisant un mécanisme d'action différent (Baudino et al., 2015). Cette thérapie cible des protéines spécifiques à un cancer en particulier. La thérapie ciblée est donc bénéfique pour plusieurs types de cancer tels que le NSCLC au stade avancé, le cancer du sein, de la prostate, du rein et d'autres (Chan et al., 2015 ; Mungala et al., 2011 ; Corcoran et al.,2012 ; Hutson et al., 2007).

Il existe deux principaux types de thérapie ciblées : les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de petites molécules. Les anticorps monoclonaux permettent le recrutement et l'activation du système immunitaire en plus de cibler la protéine d'intérêt. Les inhibiteurs de petites molécules ciblent quant à eux des enzymes spécifiques au cancer ainsi que les récepteurs aux facteurs de croissance (Baudino et al., 2015).

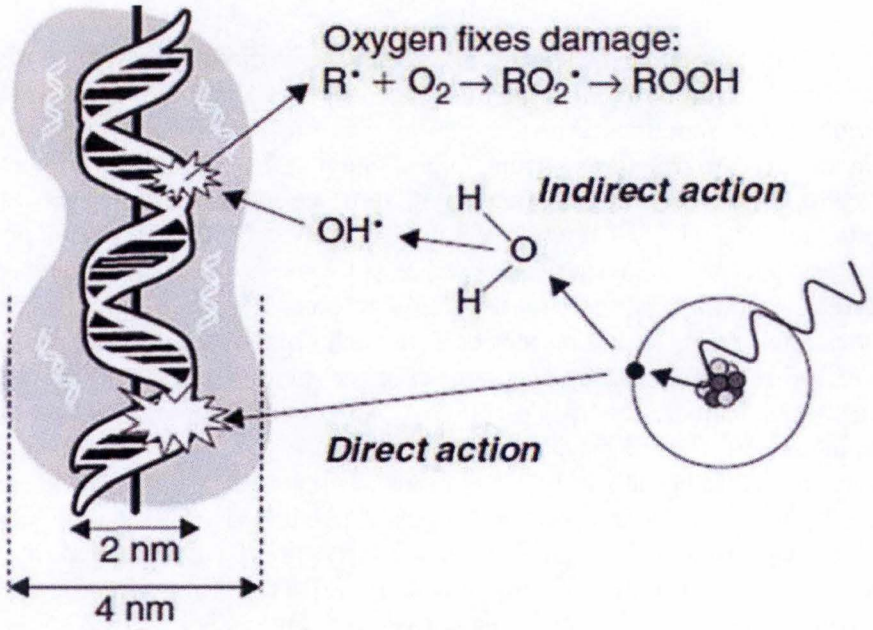


Figure 4 : Les radiations ionisantes induisent des dommages directs et indirects à l'ADN. Les dommages directs à l'ADN sont la conséquence d'une action directe des radiations ionisantes sur l'ADN tandis que les dommages indirects sont la conséquence d'une radiolyse de l'eau induisant la formation de radicaux hydroxyles très réactifs endommageant l'ADN (Kogel et Joiner, 2009).

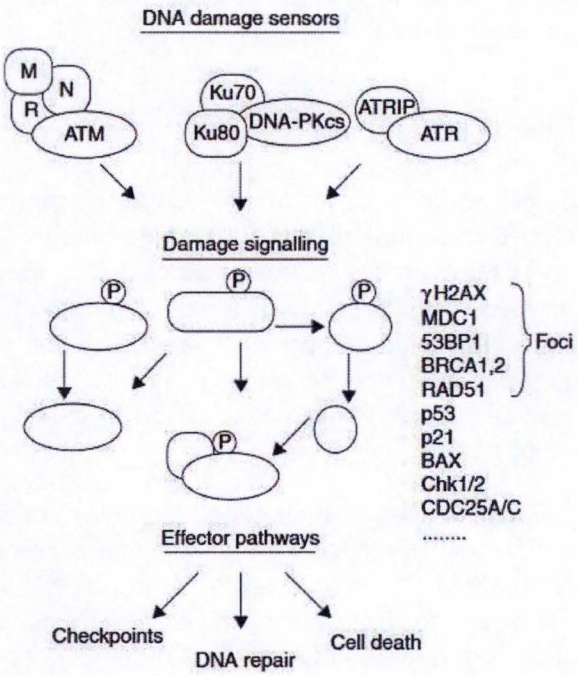


Figure 5 : Les senseurs de dommages à l'ADN. La réponse aux dommages de l'ADN mène à l'activation de senseurs et d'effecteurs. Les senseurs sont des complexes protéiques qui reconnaissent les dommages à l'ADN et forment des complexes que sont MRN-ATM, Ku-ADN-PKcs et ATRIP-ATR. Ces complexes induisent la phosphorylation de nombreuses autres protéines qui activent trois voies effectrices importantes: les points de contrôle, la réparation de l'ADN et la mort cellulaire (Kogel et Joiner, 2009).

3 Les réponses cellulaires aux radiations ionisantes

3.1 Les dommages à l'ADN

Durant une radiothérapie, des radiations ionisantes telles que les rayons X passent au travers de la cellule. Lors de leur passage, de l'énergie est déposée aléatoirement dans la cellule et ionise des biomolécules la constituant entrainant des dommages cellulaires.

Toutefois, il a été montré que les effets biologiques induits par les radiations ionisantes sont principalement dus aux dommages à l'ADN. Lorsque les rayons ionisants passent au travers de la cellule, ils peuvent endommager l'ADN de manière directe ou indirecte (Figure 4). Lors des dommages directs à l'ADN, les radiations ionisantes endommagent directement l'ADN, tandis que, pour les dommages indirects à l'ADN, les radiations ionisantes interagissent d'abord avec d'autres molécules de la cellule, telles que l'eau, produisant ainsi des radicaux hydroxyles très réactifs qui endommagent ensuite l'ADN. Les dommages provoqués à l'ADN par les rayons X sont principalement dus à l'action indirecte de ces radicaux (Hall et al., 2006).

L'irradiation par rayons X génère plusieurs types de dommages tels que des cassures simple-brin (SSB pour Single Strand Break), des cassures double-brin (DSB pour Double Strand Break), des dommages aux sucres et aux bases. Une irradiation par rayons X à une dose de 1 Gy provoque environ 3000 bases endommagées, 1000 SSB et 40 DSB (Lomax et al., 2013). Les SSB ne mènent pas directement à la mort cellulaire, mais lorsque l'ADN se réplique, des DSB apparaissent lorsque la fourche de réplication arrive à ces cassures (Neal et al., 2011). Les DSB sont les dommages les plus létaux induits par les rayonnements ionisants (Hall et al., 2006).

3.2 Les réponses aux dommages à l'ADN (DDR)

3.2.1 Les senseurs des dommages à l'ADN

Lorsque l'ADN des cellules est endommagé, des mécanismes de réponses aux dommages à l'ADN (DDR pour DNA Damage Response) sont activés (Figure 5). La première étape est la détection des dommages à l'ADN par les senseurs ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) et ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated and RAD3-related). ATM est impliquée dans la détection des DSB et son activation requiert le complexe protéique MRN qui contient trois protéines, MRE11, RAD50 et NSB1. Comme ATM, la DNA-PKcs est incapable d'agir seule comme senseur de dommages. Sa fonction requiert la liaison des protéines Ku-70 et Ku-80 au préalable. Le troisième senseur de dommages à l'ADN est ATR, dont l'activation requiert la proteine ATRIP (ATR interacting protein) (Kogel et Joiner, 2009). ATR est plutôt impliquée dans la détection des SSB induits par les radiations ionisantes (Maier et al., 2016). ATM, DNA-PKcs et ATR sont des kinases initiatrices de la phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans les voies de signalisation de la DDR telles que les protéines γH2AX, BRCA 1 et 2, RAD51, CHK1, CHK2, p53, 53BP1, BAX et de nombreuses autres protéines (Kogel and Joiner, 2009).

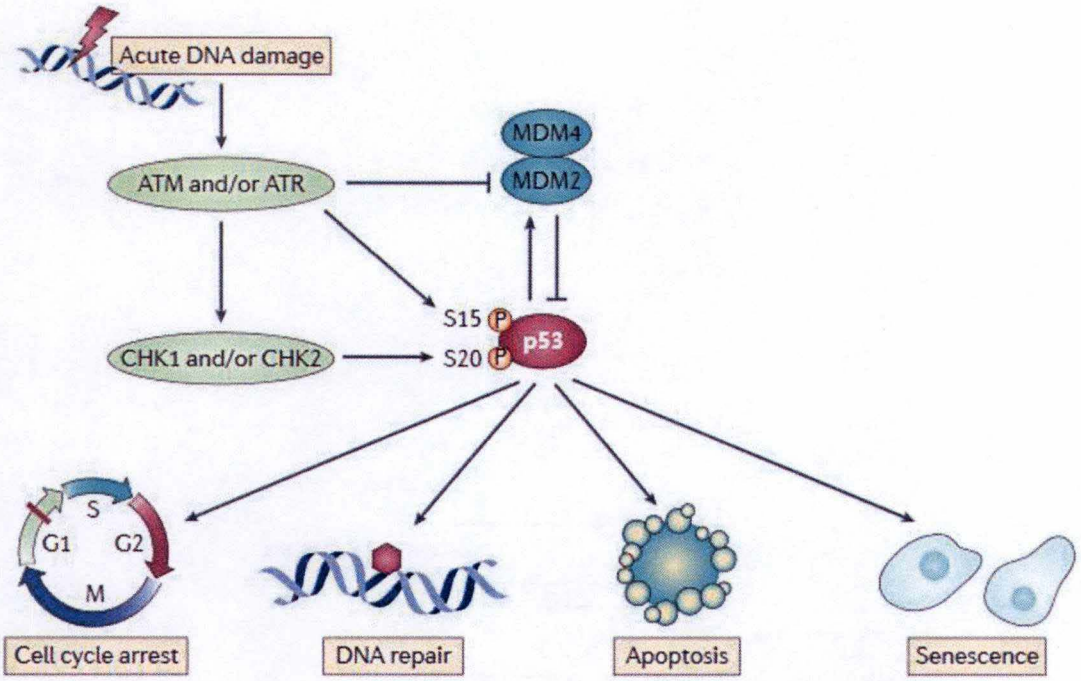


Figure 6 : Activation et réponses de p53, le gardien du génome. p53 est un acteur central de la DDR qui permet l'activation de nombreuses voies de signalisation menant à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'activation de la réparation de l'ADN, à l'activation de l'apoptose et à l'activation de la sénescence (Bieging et al., 2014).

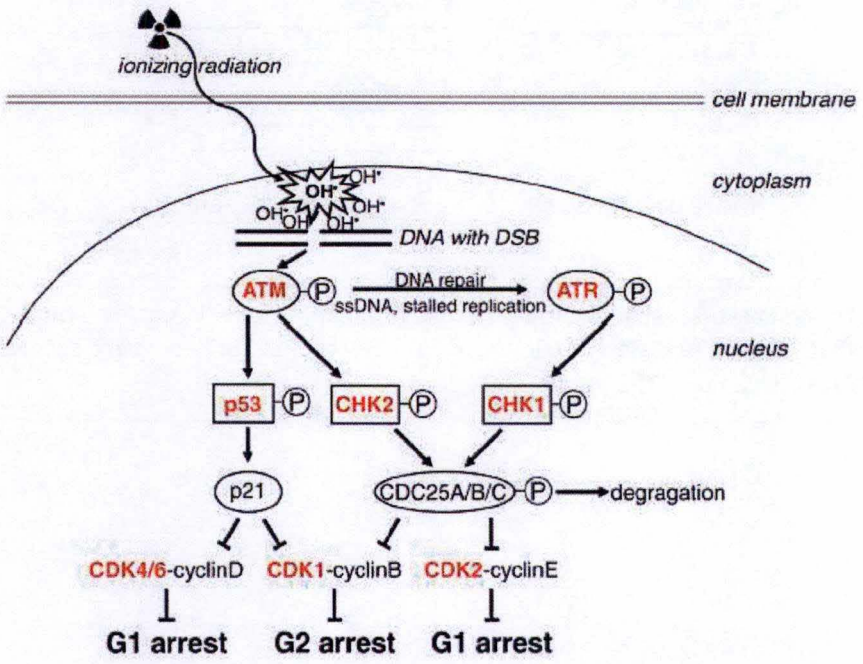


Figure 7 : Induction de l'arrêt du cycle cellulaire après irradiation. L'activation de p53 et des protéines CHK2 et CHK1 mènent à l'inhibition des kinases dépendantes des cyclines qui sont des protéines régulatrices du cycle cellulaire. L'inhibition de ces kinases induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et/ou G2 en fonction de la voie de signalisation activée (Maier et al., 2016).

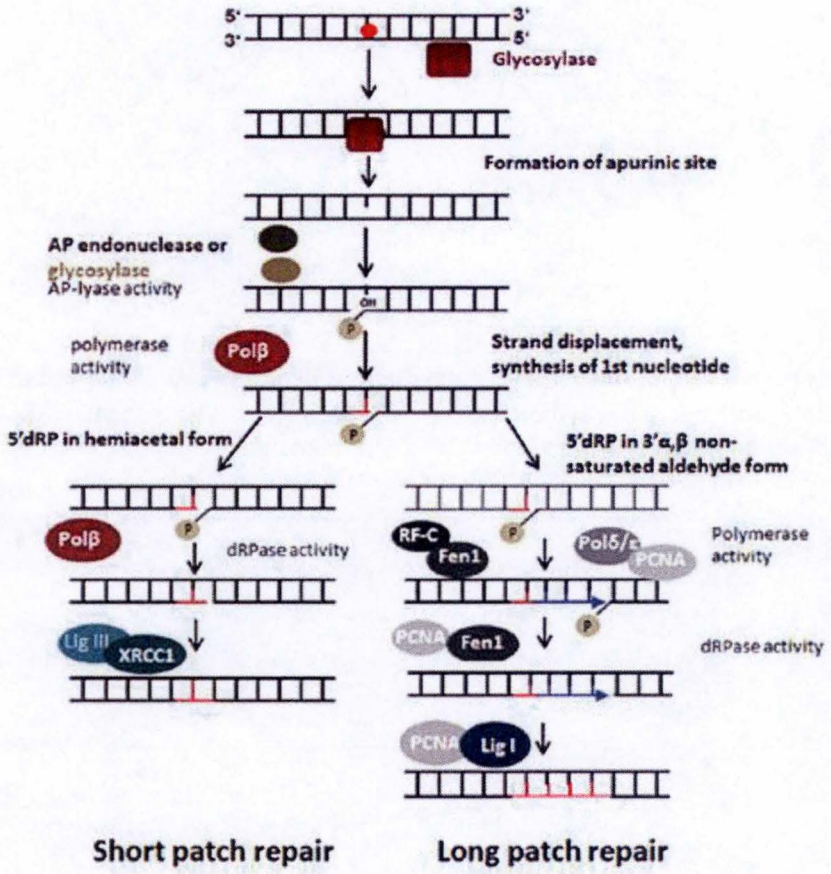


Figure 8 : Représentation schématique de la réparation des cassures simple-brin par le mécanisme BER (Base Excision Repair). Les cassures simples brin peuvent être réparées par un mécanisme BER court ou long (Reynolds et al., 2015).

3.2.2 L'activation de p53 : le gardien du génome

Une fois que les senseurs ont détecté les dommages à l'ADN, les premières protéines cibles de ATM et ATR sont respectivement CHK1 et CHK2 (Checkpoint Kinase-1 et -2). Une fois activés, CHK1 et CHK2 activent par phosphorylation le facteur de transcription p53, qui est une protéine suppresseur de tumeur. La protéine p53 joue un rôle central dans la DDR car elle décide de l'avenir de la cellule en augmentant la transcription de nombreux gènes en aval qui, en fonction des dommages induits à l'ADN, peuvent mener soit à la survie cellulaire, soit à la mort cellulaire (Figure 6). La protéine p53 est exprimée de manière constitutive dans la cellule, mais elle est liée à MDM2 (Mouse Double Minute 2) qui est une E3 ubiquitine ligase ciblant p53 pour une dégradation par le protéasome. Une fois p53 phosphorylée par ATM, CHK1 ou CHK2, elle se dissocie de MDM2 et se dirige vers le noyau où elle va agir en tant que facteur de transcription. Ainsi, p53 peut activer la transcription de gènes impliqués dans soit l'arrêt du cycle cellulaire soit la mort cellulaire, d'où son appellation « gardien du génome » (Bieging et al., 2014).

3.2.3 L'arrêt du cycle cellulaire

L'arrêt du cycle cellulaire permet de laisser le temps aux cellules de réparer les dommages à l'ADN et de maintenir la stabilité du génome. Afin d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, p53 augmente la transcription du gène p21 (CDKN1A, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A). L'augmentation de l'expression de p21 permet d'une part de bloquer la transition entre la phase G2 et la phase M du cycle cellulaire par sa liaison au complexe CDK-1-cycline B. D'autre part, p21 peut se lier aux CDK4/CDK6, inhibant leur activité et menant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. D'autres protéines sont également impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire telles que les protéines CHK1/CHK2 qui phosphorylent la phosphatase cdc25 (cell civision cycle 25) menant à l'inactivation des kinases dépendant de cycline CDK2 (cycline E) et CDK1 (cycline B). L'inactivation des kinases CDK2 et CDK1 mène à l'arrêt du cycle cellulaire en phases G1 et G2, respectivement (Figure 7) (Maier et al., 2016).

3.2.4 Les mécanismes de réparation de l'ADN

Bien que les radiations ionisantes induisent des SSB et des DSB, la plupart d'entre eux sont réparés par les mécanismes de réparation de l'ADN. Il existe plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN : BER (Base Excision Repair), MMR (Mismatch Repair), NER (Nucleotide Excision Repair), NHEJ (Non-Homologous End Joining) et HR (Homologous recombination), mais ce sont les BER, NHEJ et HR qui sont les plus relevants en radiothérapie, c'est pourquoi nous nous attarderons seulement sur ces derniers.

3.2.4.1 Mécanisme BER

Les SSB sont réparés par le mécanisme de réparation par excision de base (BER) (Figure 8). La première étape du mécanisme BER est de retirer la base endommagée par une ADN glycosylase qui est spécifique au type de dommage induit, menant à un site abasique. Ce site abasique est ensuite reconnu par APE1 (AP endonuclease 1) qui clive l'ADN au niveau du dommage induisant un SSB de manière indirecte. L'étape suivante consiste à synthétiser l'ADN manquant par l'ADN polymérase. Suivant la voie (courte ou longue), la polymérase est différente. Dans la voie courte, la polymérase β insert la base manquante et les extrémités de l'ADN sont ensuite liguées par la ligase 3. Tandis que la voie longue requiert

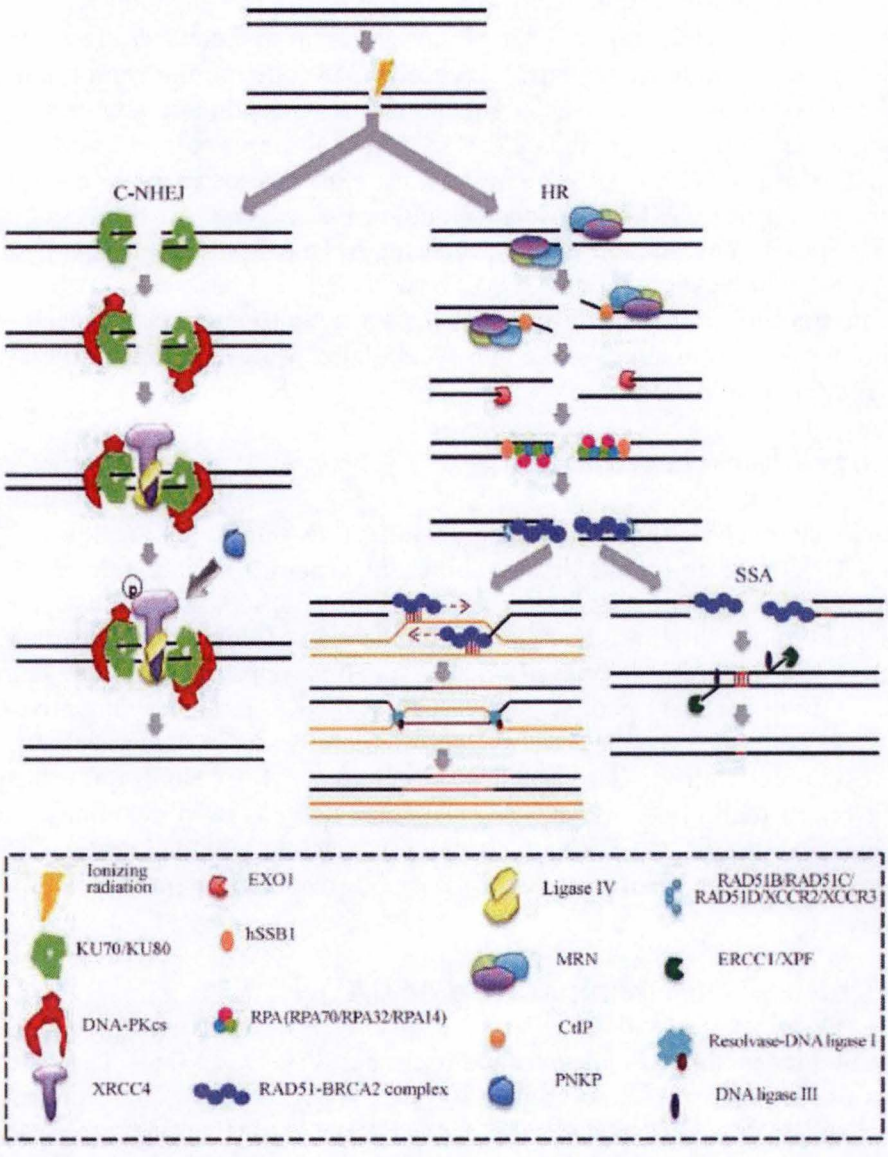


Figure 9 : Représentation schématique de la réparation des cassures double-brin par les mécanismes de recombinaison homologue et du NHEJ canonique. Le mécanisme NHEJ canonique est représenté à gauche de la figure et le mécanisme de recombinaison homologue à droite (Borrego-Soto et al., 2015).

les protéines FEN1 (flap endonuclease 1) et PCNA (proliferating cellular nuclear antigen), qui retirent et remplacent jusqu'à 10 nucléotides à l'aide des polymérases δ et ε avant que les extrémités ne soient liguées par la ligase 1. Deux autres protéines importantes jouent un rôle dans ce mécanisme dont la première est la protéine XRCC1 qui sert d'échafaudage mais qui recrute également plusieurs protéines impliquées dans le BER. La deuxième protéine est PARP-1 dont le rôle sera décrit dans le chapitre sur la létalité synthétique (Reynolds et al., 2015 ; Kogel et Joiner, 2009).

3.2.4.2 Mécanisme HR

Les DSB peuvent être réparés par plusieurs mécanismes dont les deux principaux sont la réparation par recombinaison homologue et le mécanisme NHEJ (Figure 9) (Hall et al. 2006). HR est un mécanisme de réparation de l'ADN qui se fait sans erreur et qui se déroule uniquement pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire, car il nécessite une chromatide soeur comme matrice pour la réparation de l'ADN. Le NHEJ quant à lui peut réparer l'ADN durant toutes les phases du cycle cellulaire mais il opère le plus souvent en phase G1 (Neal et al., 2011).

Dans le HR, les DSB sont reconnus par le complexe MRN qui est impliqué dans la résection de l'ADN afin de générer des extrémités libres dont MRE11 est la composante active de cette étape. Ensuite, l'ADN simple-brin est recouvert par la protéine RPA (Replication Protein A) qui sert à protéger ce dernier de la dégradation. Ensuite, RPA est remplacée par RAD51 ainsi qu'une série de protéines paralogues à celle-ci (RAD51B/ RAD51C/ RAD51D/ XRCC2/ XRCC3) menant à la formation d'un nucléofilament d'ADN. Ce remplacement est catalysé par la protéine BRCA2. La formation du nucléofilament permet l'invasion et la recherche d'homologie avec la chromatide sœur qui sert de matrice d'ADN pour réparer l'ADN endommagé. Une fois que l'invasion de la chromatide sœur et l'alignement de séquence homologue de l'ADN ont eu lieu, RAD51 est retiré et l'ADN polymérase synthétise l'ADN. C'est cette étape de synthèse qui permet de récupérer l'information perdue au site de cassure. Une fois la synthèse d'ADN étendue au-delà de la région de la cassure, les résolvases MUS81, EME1 et GEN1 permettent de résoudre les jonctions Hollidays alors que la ligase 1 rejoint les extrémités d'ADN (Borrego-Soto et al., 2015).

3.2.4.3 Mécanisme NHEJ

Le mécanisme NHEJ permet de lier les extrémités d'ADN ensemble sans avoir recours à des séquences d'ADN homologues. Contrairement à la réparation homologue qui assure l'intégrité du génome, le NHEJ est un mécanisme induisant plus d'erreurs car il nécessite parfois un « processing » avant la ligation, ce qui amène à des insertions ou délétions dans l'ADN et finalement à des aberrations chromosomiques. Cependant grâce à cette rapidité, c'est un excellent moyen de réparer l'ADN des cellules afin de maximiser leur chance de survie (Kogel et Joiner, 2009). Ce mécanisme mène donc soit à la survie, à la mort ou à l'instabilité génomique (Hall et al., 2006).

La première étape de ce mécanisme est la liaison des protéines Ku-70 et Ku-80 sur les extrémités d'ADN. Ces protéines permettent d'empêcher la dégradation de l'ADN lors du processus de réparation et permettent le recrutement et l'activation de la DNA-PKcs. Cette kinase est une large protéine dont la structure permet de se lier aux deux extrémités de l'ADN

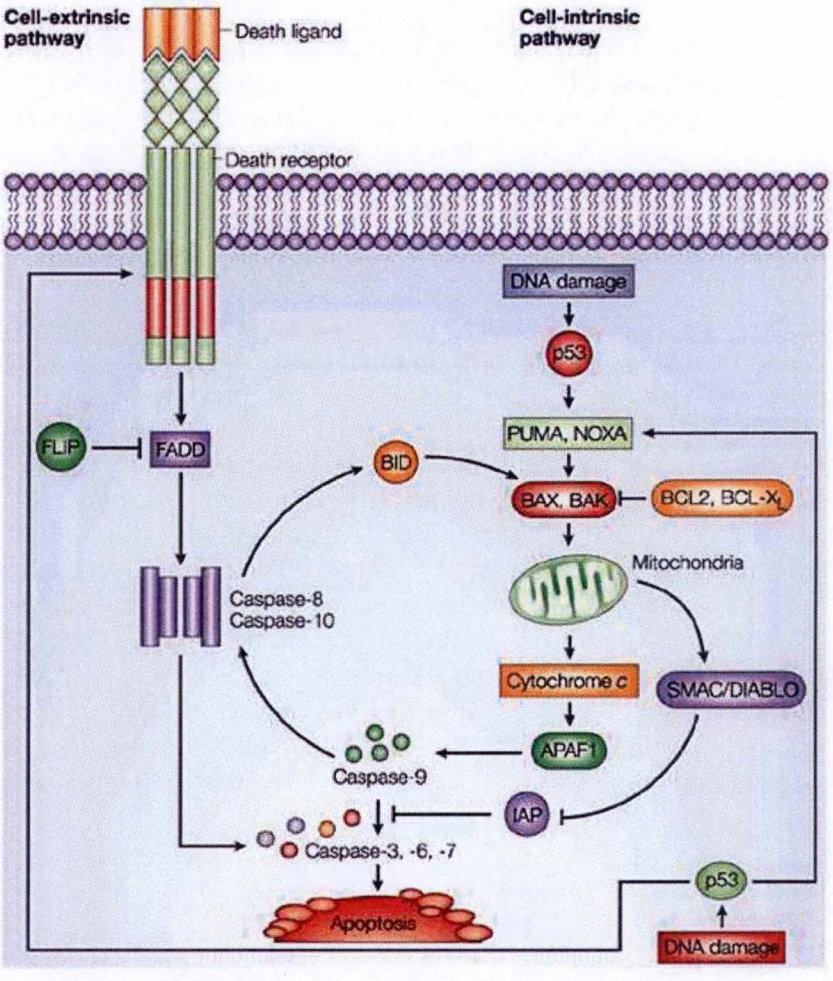


Figure 10 : Représentation schématique des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose suite à l'activation de p53. L'apoptose intrinsèque mène à l'activation de la caspase initiatrice 9 et l'apoptose extrinsèque mène à l'activation des caspases initiatrices 8 et 10 (Ashkenazi et al., 2002).

en formant un pont entre celles-ci. Souvent, les extrémités de l'ADN sont irrégulières et doivent être résolues avant la ligation. La DNA PKcs peut se lier sous forme de complexe avec la protéine Artemis qui est une nucléase coupant les extrémités d'ADN afin de les adapter pour la ligation. Une autre enzyme pouvant remanier ces extrémités irrégulières est la PNK (polynucleotique kinase), qui peut ajouter ou retirer des groupement phosphates aux extrémités OH 5' et 3' respectivement pour pouvoir liguer les extrémités d'ADN. Enfin, l'étape finale est la ligation entre les deux extrémités d'ADN. Cette étape est réalisée à l'aide des protéines XRCC4 (X-ray repair complementing defective repair protein in Chinese hamster cells 4) et la ligase IV (Borreto-Soto et al., 2015 ; Kogel et Joiner, 2009).

Des mécanismes de réparation défectueux peuvent conduire soit à la mort cellulaire, à l'aberration chromosomique ou l'instabilité génomique, qui peuvent finalement être létaux pour la cellule. Ainsi, l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN influence l'issue des traitements dont la radiothérapie. De plus, leur inhibition est dorénavant utilisée pour induire la radiosensibilisation des cellules cancéreuses (Senra et al., 2011, Miura et al., 2012).

3.3 La mort cellulaire

Il existe différents types de mort cellulaire induite par les radiations ionisantes : l'apoptose, la mitose catastrophique, la sénescence, l'autophagie et la nécrose.

3.3.1 L'apoptose

3.3.1.1 Définition

L'apoptose ou « mort cellulaire programmée » est un processus de suicide cellulaire induit notamment par les radiations ionisantes. Celle-ci peut être induite par plusieurs voies dont les deux principales sont la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 10). Ces deux voies sont fonction de la dose d'irradiation et du type cellulaire, mais les radiations ionisantes induisent l'apoptose généralement par la voie intrinsèque. L'irradiation de cellules cancéreuses mène à des dommages à l'ADN dans certaines cellules et induit l'apoptose par une voie dépendante de p53, lorsque les mécanismes de réparation de l'ADN ne sont pas effectifs. Les SSB et DSB engendrés activent la voie intrinsèque de l'apoptose (Elmore et al., 2007). Au niveau de la morphologie, l'apoptose est caractérisée par un bourgeonnement de la membrane, une fragmentation du cytoplasme en corps apoptotiques, ainsi qu'une condensation et une digestion de l'ADN en petits fragments (Kogel et Joiner, 2009).

3.3.1.2 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque ou voie mitochondriale de l'apoptose peut être induite d'une part par des signaux extracellulaires tels qu'un manque en facteurs de croissance, hormones ou cytokines ou intracellulaires tels que l'hypoxie, les radiations ionisantes, les toxines, l'hyperthermie, les radicaux libres ou les infections virales. Le contrôle et la régulation des événements mitochondriaux apoptotiques se produisent à travers les membres de la famille Bcl-2 (Lymphome à cellules B 2). Les protéines appartenant à cette famille peuvent être soit pro-apoptotiques soit anti-apoptotiques et sont impliquées dans la régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale. Lorsque p53 est activé suite aux dommages à l'ADN causés par les radiations, celui-ci s'accumule dans le noyau de la cellule et active l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que PUMA, NOXA, BAX, BAD et BID. C'est le ratio entre protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui conditionne la libération

du cytochrome-c de l'espace intermembranaire vers le cytosol. Si l'abondance de Bcl-2 est plus importante que Bax alors il n'y a pas de formation d'apoptosome. Tandis que, si l'abondance de Bax est plus importante en que Bcl-2, cela déclenche l'activation de l'apotosome (Maier et al., 2016). Le cytochrome c une fois libéré de la mitochondrie, s'associe avec la protéine APAF-1 ainsi qu'à la procaspase 9 induisant la formation d'un complexe appelé l'apoptosome. Ce complexe mène à l'activation de la caspase 9 qui active ensuite les caspases effectrices 3, 6 et 7 et à l'apoptose de la cellule. D'autres protéines telles que SMAC et DIABLO sont également relarguées par la mitochondrie lorsque BID interagit avec BAX et BAK, et mènent également à l'activation de la caspase 3 en inhibant la protéine IAP (inhibitor of apoptosis) (Ashkenazi et al., 2002).

3.3.1.3 La voie extrinsèque

L'apoptose induite par les radiations est également exécutée par la voie apoptotique extrinsèque canonique. Cette voie peut être dépendante ou indépendante de l'activation de p53. La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort de l'apoptose est induite via les récepteurs FasL/FasR et TNF-α/TNFR1 qui sont les mieux caractérisés dans cette voie. Les dommages à l'ADN induisent une augmentation de l'expression de ces récepteurs qui augmente la sensibilité de ces récepteurs à leur ligand. Lors de la liaison du ligand au récepteur, des protéines adaptatrices cytoplasmiques présentant des domaines de mort se lient au récepteur. Par exemple, la liaison du ligand Fas au récepteur Fas entraîne la liaison de la protéine adaptatrice FADD et la liaison du ligand du TNF au récepteur du TNF entraîne la liaison de la protéine adaptatrice TRADD, engendrant ensuite le recrutement de FADD et RIP. La protéine adaptatrice FADD se lie ensuite à la procaspase-8 via sa trimérisation. Cela mène à la formation d'un complexe de signalisation induisant la mort (DISC) qui engendre l'activation de la procaspase-8 (Elmore et al., 2007).

3.3.1.4 La voie d'exécution

Une fois que les caspases 8, 9 et 10, dites initiatrices, sont activées par la voie intrinsèque ou extrinsèque de l'apoptose, la phase finale de l'apoptose qui est la voie d'exécution est induite. Durant celle-ci, les caspases initiatrices activent les caspases 3, 6 et 7, dites effectrices, qui sont responsables du clivage de substrats tels que PARP, menant finalement à la mort cellulaire (Elmore et al., 2007). La combinaison des voies facilite l'induction de la mort des cellules qui seraient résistantes à l'une ou l'autre voie (Ashkenazi et al., 2002).

3.3.2 La sénescence

3.3.2.1 Définition

La sénescence est un mécanisme suppresseur de tumeur menant à un arrêt permanent du cycle cellulaire, c'est-à-dire une mort réplicative. Les cellules sénescentes ne se divisent plus, mais elles restent métaboliquement actives. La sénescence se produit généralement dans les cellules normales qui ont atteint leur limite proliférative en raison du raccourcissement des télomères. Ce raccourcissement est reconnu comme un ADN endommagé engendrant un arrêt de la croissance qu'on appelle sénescence réplicative. Les radiations ionisantes telles que les rayons X peuvent également mener à la sénescence lorsque les DDR sont activées de manière permanente. L'activation de la sénescence permet de ne pas propager les dommages engendrés par les radiations ionisantes aux futures générations de cellules (Eriksson et al., 2010). On parle de sénescence induite par des stress.

Marker	Marker type
Cellular phenotype	
Morphology†	Visual
SA-β-gal activity	Enzyme/staining
Glb1	RNA, IHC
SSC	Flow cytometry
Proliferation arrest	
BrdU Incorporation	IHC, flow cytometry
DAPI/Hoechst 33342	DNA stain
Decreased KI-67	IHC
Apoptosis exclusion	
Propidium iodide/annexin V staining	Flow cytometry
Cleaved PARP	IHC, western
Cleaved caspase 2/3/9	IHC, western
TUNEL staining	IHC
CKIs	
$p16^{Ink4a}$	IHC
$p21^{waf1/cip1}$	IHC
$p27^{kip1}$	IHC
Heterochromatin foci	
DAPI/Hoechst 33342	DNA Stain
HIRA	IHC
H3K9-methyl	IHC
HP1-γ	IHC
Secretory proteins	
IGF2	RNA, IHC
IGFBP3, IGFBP5, IGFBP7	RNA, IHC
IL-6, IL-8, CXCR2, and others	RNA, IHC
Miscellaneous	
Versican	RNA
CXCL14	RNA
Mitochondrial fusion/hFis1/OPA1	IHC
Dec1	IHC
DcR2	IHC

Table 2 : Caractéristiques cellulaires et marqueurs moléculaires de la sénescence dans les cellules sauvages et cancéreuses (Ewald et al., 2010).

3.3.2.2 Voies de signalisation impliquées dans la sénescence

Deux voies principales de signalisation sont impliquées dans la sénescence. Il y a d'une part la voie p53/p21 dans lesquelles en plus d'activer l'apoptose, l'activation du facteur de transcription p53 par les radiations ionisantes peut mener à la sénescence en augmentant l'expression de p21. P21 est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 comme vu dans le point sur le cycle cellulaire. D'autre part, il y a la voie de signalisation p16/pRB. P16 est un inhibiteur de la CDK4/6 qui bloque la phosphorylation de RB1 (rétinoblastome 1) qui reste lié au facteur de transcription E2F. E2F inhibé ne peut pas induire l'expression de gènes impliqués dans l'activation de la phase S, menant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Vavrova et al., 2011). L'activation de p21 peut également mener à l'inhibition de la protéine pRb par la même voie que p16.

3.3.2.3 Marqueurs des cellules sénescentes

Les cellules sénescentes présentent plusieurs caractéristiques typiques telles qu'un changement de morphologie, l'arrêt de la prolifération, l'augmentation de l'expression d'inhibiteurs de CDK (CKI), la présence de foci d'hérétochromatine et le phénotype sécrétoire (Table 2).

Au niveau de leur morphologie, les cellules sénescentes sont caractérisées par une morphologie particulière : les cellules s'élargissent et s'aplatissent et montrent une granularité augmentée. Le marqueur le plus utilisé pour la sénescence est le marquage dans la cellule de la β-galactosidase. Cette enzyme des compartiments lysosomaux catalyse l'hydrolyse des β-galactosides en monosaccharides et est surexprimée dans les cellules sénescentes. Les marqueurs les plus utilisés pour identifier l'arrêt de la prolifération cellulaire sont la diminution de l'expression de Ki67 et la diminution du nombre de cellules en phase S. Pour évaluer l'arrêt du cycle cellulaire, la surexpression des protéines p16, p21 et p27, qui sont des CKI impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, est le plus souvent quantifiée. Les foci hétérochromatiques associés à la sénescence (SAHF) sont des régions condensées d'hétérochromatine qui s'accumulent durant la sénescence. Ceux-ci contiennent des histones méthylées et déacétylées (ex : la méthylation de l'histone 3 aux lysines 9 et 27). La phosphorylation des histones de la famille H2A est également un marqueur de sénescence.

Enfin, les cellules sénescentes ont également phénotype sécrétoire typique. Ces facteurs secrétés peuvent être à la fois suppresseurs de tumeur en renforçant l'arrêt de la croissance de la tumeur mais peuvent également être pro-tumoraux dans certaines circonstances (Baxter et al., 2014). Une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-8 et IL-6 est associée à la sénescence. Il a été rapporté que l'IL-8 a un effet sur la résistance des cellules cancéreuses face au système immunitaire en modifiant le microenvironnement tumoral par l'accumulation de cellules immunitaires immunosuppressives telles que les neutrophiles et en activant la transition épithélio-mesenchymateuse (EMT) permettant l'invasion tumorale (David et al., 2016). D'autres protéines secrétées sont celles impliquées dans la voie de signalisation IGF (Insulin Growth Factor) telles que IGF2 et les IGFBPs 3, 5, 6 et 7 (Ewald et al., 2010). Il a été rapporté qu'une augmentation de l'expression de IGFBP3 pouvait augmenter l'apoptose et diminuer la survie cellulaire lorsque des agents causant des DSB étaient utilisés dans le cancer du sein (Butt et al., 2000). Il a également été montré qu'il y avait une radiosensibilisation lorsque l'expression de IGFB3 était augmentée dans les tissus (Yoshino et al., 2011 ; Zhao et al.,

2012). Toutefois, il a été montré également que IGFBP3 était impliquée dans le mécanisme de réparation de l'ADN NHEJ, menant à la survie cellulaire (Lin et al., 2014).

3.3.3 La mitose catastrophique

La mitose catastrophique a été caractérisée comme étant la principale mort cellulaire induite par les radiations ionisantes. Elle est due à une entrée prématurée en mitose, avant que la phase S et G2 ne soient achevées, menant à une réparation inappropriée des dommages à l'ADN. Il a été rapporté que l'inhibition de protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire telles que ATM/ATR, CHK1/CHK2 et p21 mène à de la mitose catastrophique. Elle apparait après plusieurs mitoses consécutives amenant à des aberrations morphologiques, dues à une mauvaise ségrégation des chromosomes, telles que des micronucléations ou des multinucléations. Elle mène finalement à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. La catastrophe mitotique est un type retardé de mort cellulaire exécuté quelques jours après le début d'un traitement par irradiation (Hall et al., 2006).

3.3.4 L'autophagie

L'autophagie peut mener à la mort cellulaire via une dégradation partielle du cytoplasme et des organites de la cellule dans des vésicules avec une double membrane appelées phagolysosomes. L'autophagie permet d'une part à la cellule de recycler les métabolites afin de produire de l'énergie lorsque la cellule est privée en éléments nutritifs. D'autre part, une activation excessive de l'autophagie mène à la mort cellulaire (Hall et al., 2006). Au niveau de la morphologie, elle est caractérisée par une condensation partielle de la chromatine, un bourgeonnement de la membrane et une augmentation du nombre de vésicules dans le cytoplasme (Kogel et Joiner, 2009).

3.3.5 La nécrose

La nécrose est une mort cellulaire alternative à l'apoptose, qui est incontrôlable et passive. Elle se déroule lorsque les conditions sont extrêmement défavorables comme un manque en énergie (ATP). Cette mort est caractérisée par un gonflement de la cellule, la formation de vacuoles cytoplasmiques, une rupture de la membrane (contrairement à l'apoptose où la membrane est intacte), une dégradation aléatoire de l'ADN, une libération du cytoplasme, engendrant souvent une inflammation dans le tissu environnant. Ce type de mort cellulaire est souvent rencontré lorsque les doses d'irradiation utilisées sont élevées (Elmore et al., 2007).

4 Courbes de survie

4.1 Radiosensibilité cellulaire

Comme décrit dans les paragraphes précédents, les radiations ionisantes peuvent activer différentes voies de signalisation dans les cellules telles que les voies des dommages à l'ADN, de l'arrêt du cycle cellulaire, de la réparation des dommages à l'ADN et de la mort des cellules. Toutefois, étant donné que chaque tumeur est différente, de part une grande hétérogénéité génétique, ces dernières ne répondent pas de la même manière aux radiations

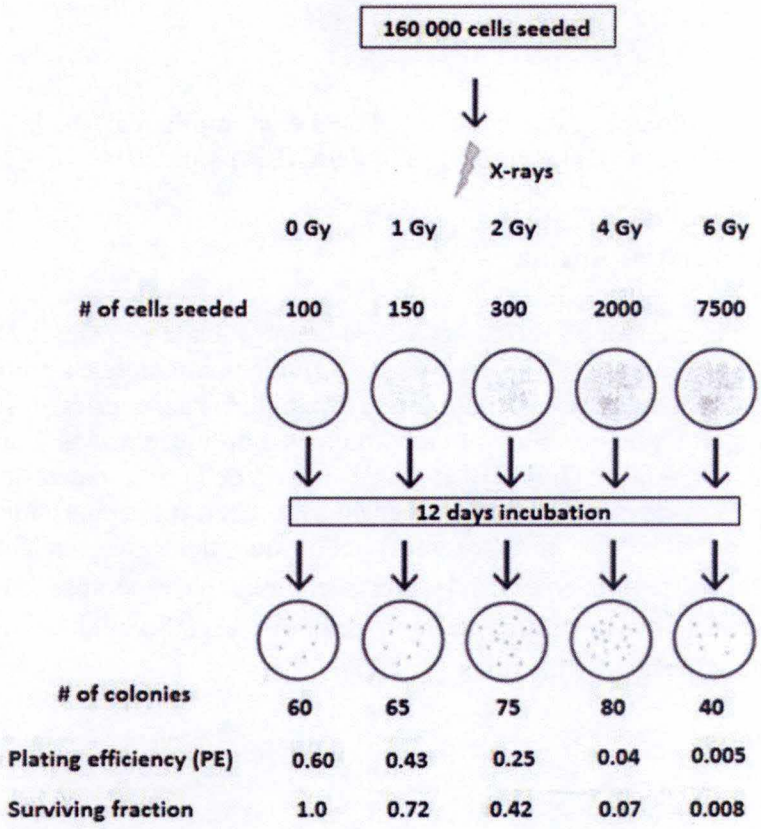


Figure 11 : Réprésentation schématique d'un test de clonogénicité. Les cellules sont ensemencées à différentes densités suivant la dose d'irradiation et sont incubées durant 12 jours. Le nombre de colonies est ensuite compté afin de calculer le plating efficiency et la fraction de survie. L'illustration a été adaptée à ce qui a été réalisé durant le mémoire (Nenoi, 2015).

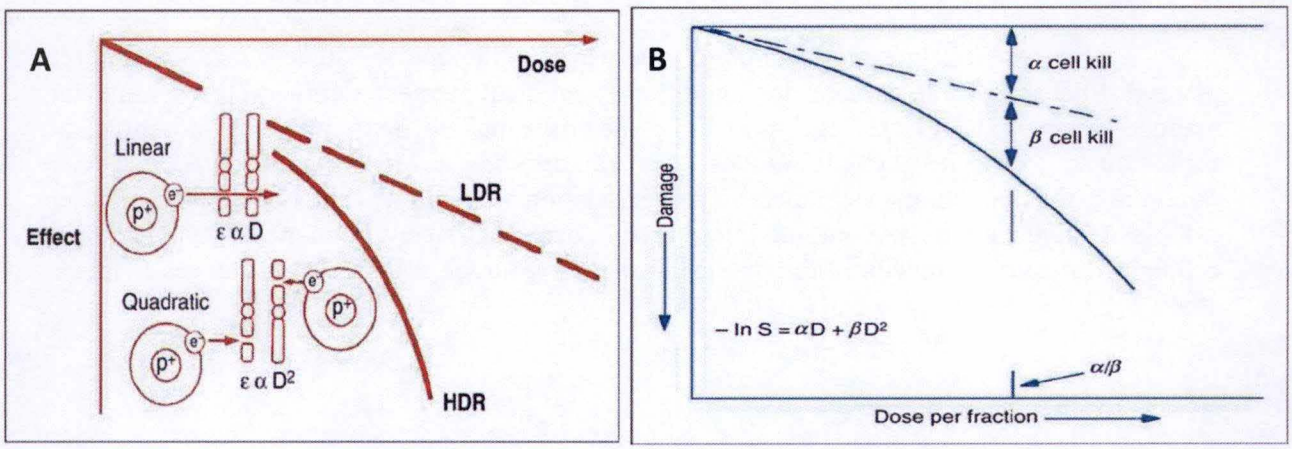


Figure 12 : Courbes de survie et modèle linéaire quadratique. Le modèle quadratique suppose qu'il y a deux paramètres qui mènent à la destruction des cellules, les paramètres α et β. Le paramètre α représente la partie linéaire de la courbe de survie et est la conséquence d'un seul évènement létal tandis que le paramètre β est représenté par la partie quadratique de la courbe et est dû à deux ou plusieurs évènements dits sub-létaux (A). Le rapport α/β correspond à la dose à laquelle α est égal à β (B) (Hall et al., 2006).

ionisantes. Les réponses cellulaires cancéreuses aux radiations ionisantes dépendent de plusieurs facteurs tels que la radiosensibilité intrinsèque, la position de la cellule dans le cycle cellulaire (phase M et G2 sont les plus sensibles), les altérations génétiques et l'environnement (ex : niveau d'oxygénation) (Brown et al., 2014). Cibler des marqueurs de cellules cancéreuses par des agents chimiques en combinaison avec la radiothérapie permet d'en augmenter son efficacité tout en épargnant les tissus sains. Les inhibiteurs de PARP, qui seront abordés plus loin dans l'introduction, ciblent plusieurs de ces facteurs et sont dès lors actuellement considérés comme étant des bons agents radio-sensibilisants (Lesueur et al., 2017).

4.2 Test de clonogénicité et courbes de survie

Le but de la radiothérapie est de tuer les cellules cancéreuses en les privant de leur potentiel de réplication. Les cellules peuvent toutefois garder leur capacité métabolique (Eriksson et al., 2010). La radiosensibilité intrinsèque peut être mesurée par le test de clonogénicité, qui est le « gold standard » pour évaluer la mort réplicative après une radiothérapie ou pour comparer d'autres agents cytotoxiques (Francken et al., 2006). Le principe du test de clonogénicité est basé sur la capacité qu'a une cellule à former des colonies d'au moins 50 cellules, *in vitro*. Ce test mène *in fine* à l'élaboration de courbes de survie qui reprennent les différentes fractions de survie (axe Y) par rapport aux différentes doses d'irradiation (axe X) (Kogel et Joiner, 2009). Généralement, les courbes de survie sont définies suivant une échelle logarithmique pour deux raisons. D'une part, car si la mort cellulaire est aléatoire, la fraction de survie diminue de façon exponentielle suivant la dose d'irradiation et sur un graphique semi-logarithmique, cela forme une droite. D'autre part, cela permet de comparer plus facilement des fractions de survie faibles afin d'obtenir une réduction significative de la taille de la tumeur (Kogel et joiner, 2009). Pour obtenir ces courbes de survie, un nombre connu de cellules est ensemencé après l'irradiation. Ce nombre doit être à la fois faible, afin de laisser de la place aux cellules pour former les colonies, mais assez élevé afin de pouvoir compter un nombre suffisant de colonies pour avoir un résultat statistiquement interprétable. Un exemple de test de clonogénicité est représenté à la Figure 11.

Afin d'obtenir la fraction de cellules survivantes à chaque dose, un ratio est fait entre le nombre de colonies comptées par rapport au nombre de cellules ensemencées, qui est lui-même divisé par ce même rapport pour les cellules non irradiées. Les résultats sont ensuite ajustés avec le modèle quadratique linéaire afin de décrire et d'analyser la relation entre la fraction de survie (SF) et la dose d'irradiation (D) $SF = e^{(-\alpha D - \beta D^2)}$.

4.2.1 Paramètres de radiosensibilité

Le modèle linéaire quadratique présenté ci-dessus comprend une composante linéaire ($e^{-\alpha D}$) et une composante quadratique ($e^{-\beta D^2}$) qui déterminent la forme de la courbe. α (Gy^{-1}) et β (Gy^{-2}) sont des paramètres ajustables de radiosensibilité qui déterminent par quel type d'événement la cellule meurt (Figure 12.A). Le modèle linaire quadratique suppose deux types de mort cellulaire induite par l'irradiation. La mort cellulaire peut provenir d'une part d'un seul évènement létal (dommages non réparables), qui est représenté par la partie linéaire de l'équation. Autrement dit, la mort cellulaire est induite par des cassures double-brin dues à un seul événement. D'autre part, la mort cellulaire peut provenir de l'addition de deux évènements sublétaux (dommages réparables), qui sont décrits par la partie quadratique de

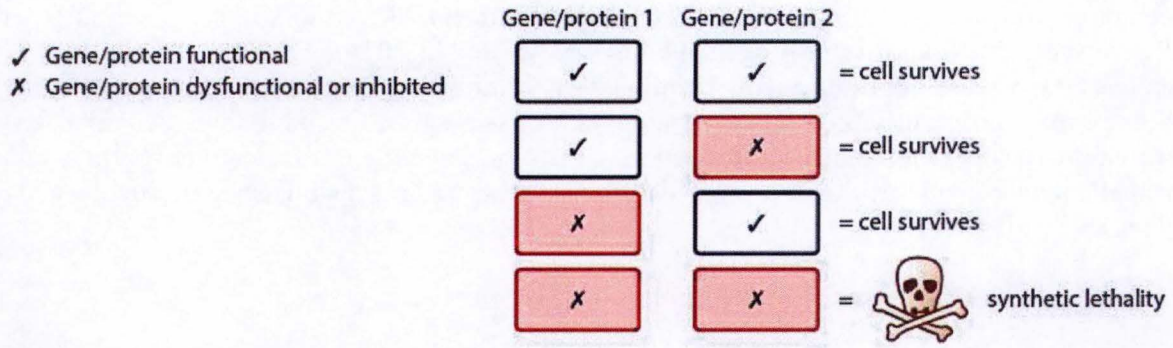


Figure 13 : Principe de la létalité synthétique. Une combinaison de gènes ou protéines dysfonctionnels mène à la létalité synthétique (Lord et al., 2015)

l'équation. Autrement dit, la mort cellulaire est induite par l'accumulation de cassures double-brin suite à plusieurs évènements. Le rapport α/β correspond à la dose (en Gy) pour laquelle $\alpha D=\beta D^2$, c'est-à-dire où la mortalité est due en parts égales aux dommages directement létaux (partie linéaire de l'équation) et à l'accumulation de dommages sublétaux (partie quadratique de l'équation) (Figure 12.B).

Ce rapport permet d'évaluer la radiosensibilité intrinsèque cellulaire ou tissulaire. De faibles valeurs α/β caractérisent les cellules et tissus normaux (par exemple les fibroblastes et les cellules endothéliales) et signifient qu'ils sont moins sensibles aux petites fractions de radiation, tandis que les dommages induits augmentent rapidement avec l'augmentation de la dose par fraction. Tandis que, dans les cellules normales se divisant rapidement (par exemple les cellules des muqueuses et de l'épithélium cutané, cellules de la moelle osseuse), le rapport α/β est élevé. Les dommages induits par les radiations sont fonction de la dose totale délivrée et dépendent moins de la fraction de radiation (Karagounis et al., 2017). Bien que les cellules cancéreuses sont des cellules proliférant rapidement, le rapport α/β n'est pas toujours élevé et est différent selon le type de cancer. L'évaluation de ce rapport est donc importante en clinique pour prédire pour chaque type de cancer, la réponse des cellules cancéreuses à la radiothérapie et ainsi personnaliser le traitement en adaptant le protocole d'irradiation. Cela permet aussi d'utiliser des traitements non conventionnels tels que l'hyperfractionnement, l'hypofractionnement et le fractionnement accéléré.

4.2.2 Sensitivity Enhancement Ratio (SER)

L'ampleur de l'effet radiosensibilisant est généralement exprimé par le SER (Sensitivity Enhancement Ratio) (Kogel and Joiner, 2009). Le SER est défini comme le rapport des doses de rayonnement qui produisent le même effet biologique, en l'absence et en présence du médicament. Plus le SER est élevé, plus le sensibilisateur est efficace. Pour un même effet biologique, par exemple la fraction de survie à 10 %, un SER égal à 1 indique qu'il n'y aucune différence entre les deux traitements alors qu'un SER > 1, par exemple SER=1,5 indique que le traitement est 1,5 fois plus efficace que le traitement de référence.

5 La létalité synthétique

5.1 Définition

Une nouvelle approche thérapeutique pour traiter le cancer s'appelle la létalité synthétique. Ce concept a été décrit pour la première fois par Bridges en 1922 chez la drosophile (Nijman et al., 2010). Deux gènes sont synthétiquement létaux dans le cas où une mutation dans un ou l'autre gène est compatible avec la viabilité cellulaire mais, lorsque cette mutation est associée à celle d'un autre gène, elle conduit à la mort cellulaire (Figure 13) (Lord et al., 2015). Ce principe exploite les altérations génétiques dans les cellules cancéreuses pour les rendre plus sensibles aux médicaments car l'effet d'un médicament sur un gène ressemble fortement au phénotype d'une mutation dans ce même gène. Des cellules cancéreuses peuvent donc être sensibilisées à un agent chimiothérapeutique ciblant un partenaire synthétique létal. Les altérations génétiques dans le cancer peuvent mener à la fois à une suppression de la fonction de ce gène ou à son amplification. La létalité synthétique peut cibler plusieurs types de gènes tels que les gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN, les gènes de réplication de l'ADN et le métabolisme cellulaire (Kaelin

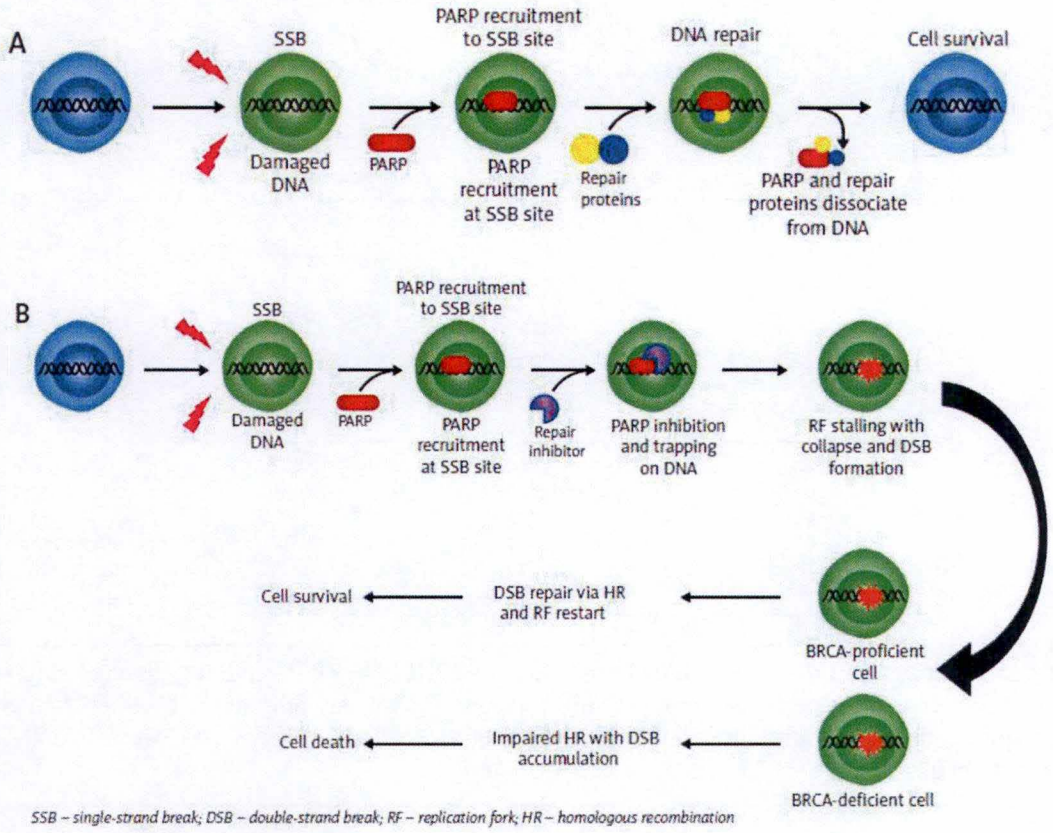


Figure 14 : Les inhibiteurs de PARP induisent une létalité synthétique dans les cellules déficientes en BRCA. A) Mécanisme de réparation de l'ADN avec la protéine PARP fonctionnelle menant à une réparation de l'ADN. B) La tentative de réparation des cassures simple-brin (SSB) de l'ADN en présence d'inhibiteur de PARP entraîne la formation de cassures double-brin (DSB). Les cellules avec la protéine BRCA fonctionnelle ont la capacité de réparer le DSB et mène à la survie cellulaire. Les cellules déficientes en BRCA sont incapables de réparer les DSB qui s'accumulent et entraînent inévitablement la mort cellulaire (Dziadkowiec et al., 2016).

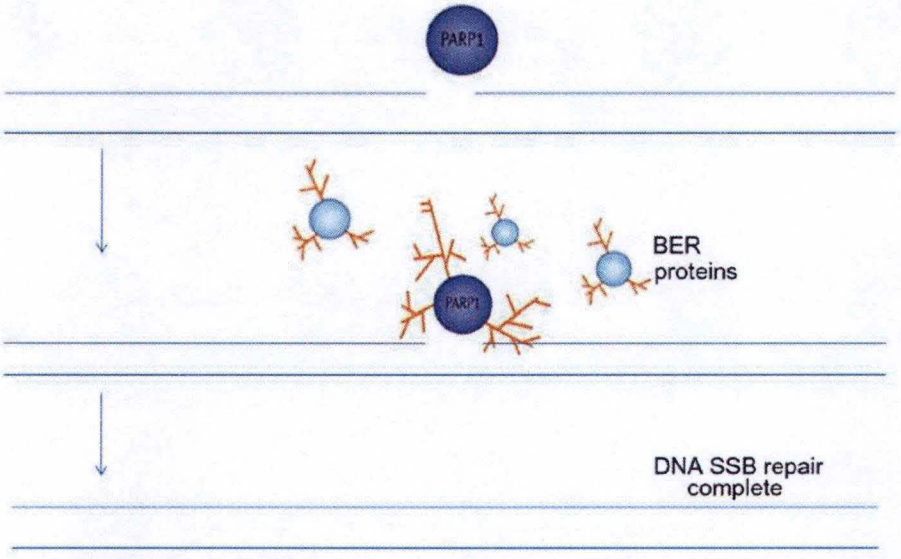


Figure 15 : Implication de PARP dans le mécanisme BER. PARP détecte les cassures simple-brin d'ADN (SSB) et utilise le NAD + comme substrat pour former des polymères d'unités ADP ribose (PAR), qui se fixent aux protéines impliquées dans la réparation des SSB ainsi qu'à PARP-1 elle-même (Hall et al., 2015)

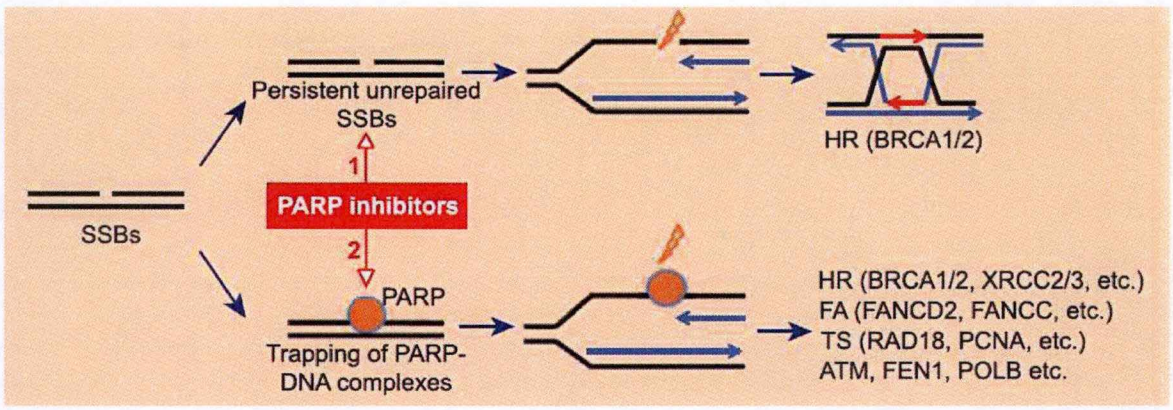


Figure 16 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de PARP. Il y a deux mécanismes par lesquels inhibiteurs de PARP fonctionnent. Le premier est l'inhibition catalytique (voie supérieure) de PARP, qui interfère avec la réparation des SSB, conduisant à des dommages au niveau de la fourche de réplication et qui nécessitent une réparation par recombinaison homologue (HR). Dans le second mécanisme (voie inférieure) les complexes PARP-ADN sont piégés par l'inhibiteur. Cela conduit également à des cassures double-brin au niveau de la fourche de réplication qui nécessitent une réparation via des voies de réparation complémentaires (Murai et al., 2012).

et al., 2005). Plusieurs cibles ont déjà été identifiées comme étant des cibles de létalité synthétique mais une approche récente utilisant des inhibiteurs de PARP-1 chez des patients atteints dans le cancer du sein et de l'ovaire avec mutation de BRCA1 ou BRCA2 semble être très prometteuse.

5.2 Inhibiteurs de PARP

5.2.1 Inhibiteurs de PARP dans le traitement du cancer du sein et de l'ovaire avec mutation BRCA1 ou BRCA2

La méthode de la létalité synthétique a été principalement utilisée à l'aide d'inhibiteurs de mécanismes de réparation de l'ADN. Plusieurs études récentes ont montré des résultats prometteurs de la létalité synthétique pour traiter le cancer en utilisant des inhibiteurs de la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP-1) dans le cancer du sein et de l'ovaire avec perte de la fonction du gène suppresseur de tumeur BRCA1 ou BRCA2 impliqué dans la recombinaison homologue (Figure 14) (Munroe et al., 2016). Dans le contexte des cancers du sein et de l'ovaire avec mutation BRCA1 et BRCA2, l'inhibition de PARP-1 conduit à une cassure simple-brin non réparée, qui lors de la rencontre avec la fourche de réplication, forme une cassure double-brin qui ne peut également pas être réparée par recombinaison homologue en raison de la mutation BRCA. Toutefois, les cassures double-brin peuvent encore être réparées par le mécanisme NHEJ mais ce mécanisme mène souvent à de l'instabilité génomique et finalement à la mort cellulaire. Le BER et la HR étant deux voies de réparation de l'ADN complémentaires, l'inhibition de PARP-1 dans des cellules portant une mutation BRCA peuvent donc conduire à une létalité synthétique (Munroe et al., 2016). Contrairement aux cellules cancéreuses comprenant la mutation BRCA, les tissus sains comportent une copie normale du gène BRCA et peuvent réparer les cassures double-brin induites par l'inhibition de PARP-1 par recombinaison homologue. Ils ne seront donc pas affectés. Actuellement, plusieurs études sont réalisées sur les inhibiteurs de PARP et montrent déjà des résultats très prometteurs (Hall et al., 2015).

5.2.2 Activité de PARP et mécanismes d'action des inhibiteurs

Les protéines PARP constituent une famille regroupant 18 protéines ayant de multiples fonctions : réparation de l'ADN, régulation transcriptionnelle, modifications de la chromatine, régulation du cycle cellulaire et mort cellulaire. PARP-1 est la protéine la mieux caractérisée et la plus abondante. Cette protéine clé est impliquée dans le mécanisme de réparation de l'ADN, principalement dans la réparation de cassures simple-brin par le mécanisme de BER (Benafif et Hall, 2015). PARP-1 est également recruté pour la réparation DSB et forme un complexe PARP-DSB. Ces glycosyltransférases sont localisées dans le noyau cellulaire et détectent les SSB. Grâce son domaine N-terminal zinc finger, PARP se lie au site de SSB et transfère des centaines d'unités d'ADP-ribose à l'aide de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD +) aux protéines réceptrices ainsi qu'à lui-même pour former des polymères d'unités ADP ribose (PAR). Cette auto-ribosylation permet ensuite le recrutement d'un complexe protéique impliqué dans la réparation de l'ADN sur le site de la cassure (Chalmers et al., 2004). Ensuite, PARP subit des changements moléculaires réduisant son affinité pour l'ADN. La libération de PARP permet le recrutement d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, et leur activation (Figure 15).

Les inhibiteurs de PARP quant à eux (Figure 16), agissent en se liant au domaine catalytique de PARP-1 conduisant à l'inhibition de l'enzyme. Cette inhibition laisse des SSB

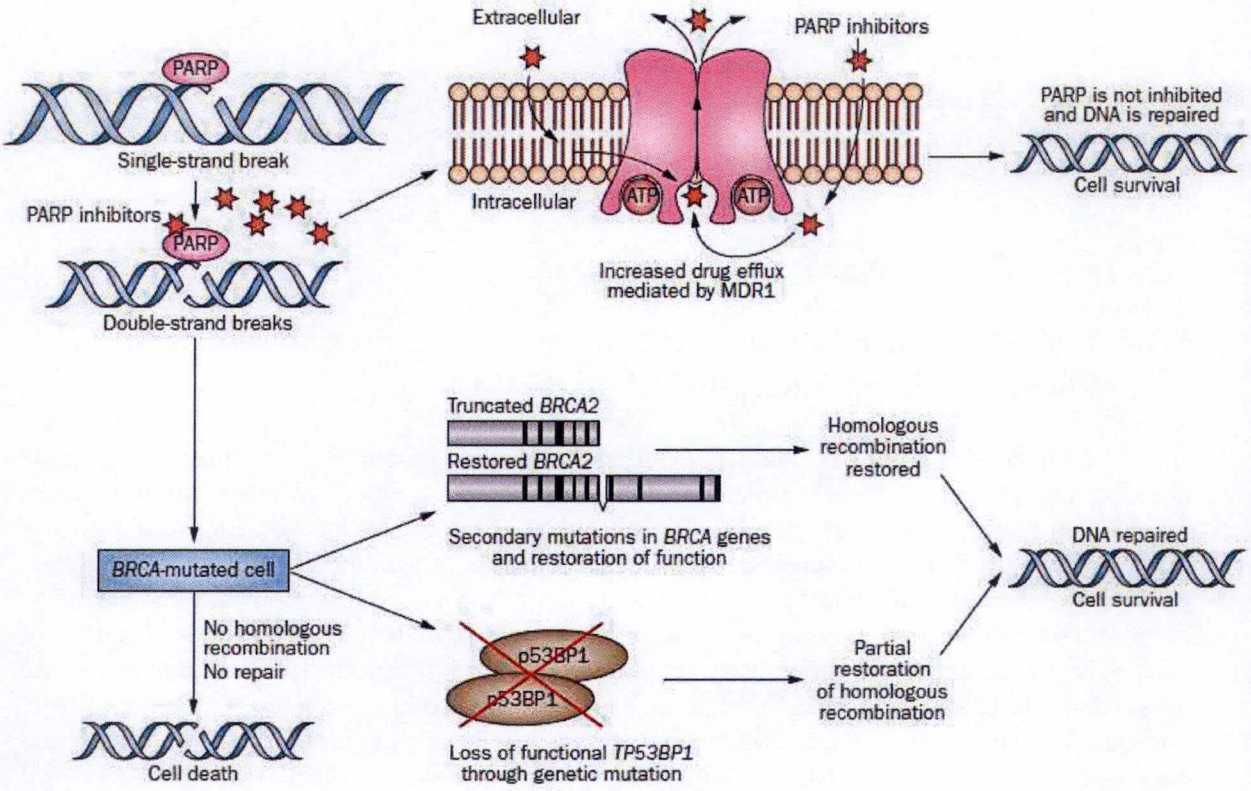


Figure 17 : Mécanismes de résistance des inhibiteurs de PARP. Les cellules cancéreuses pourraient devenir résistantes aux inhibiteurs de la PARP par trois différents mécanismes. Le premier est l'apparition de mutations secondaires dans le gène BRCA qui restaurent la fonction de la protéine BRCA. Cela permet d'obtenir un mécanisme de recombinaison homologue fonctionnel. Le deuxième mécanisme est la mutation somatique de TP53BP1, qui code pour p53BP1. Cela entraîne une restauration partielle de la recombinaison homologue et, par conséquent, une réparation de l'ADN. Enfin, une augmentation de l'efflux des inhibiteurs de PARP médiée par le transporteur MDR1 limiterait l'exposition des cellules cancéreuses à ces molécules (Sonnenblick et al., 2014).

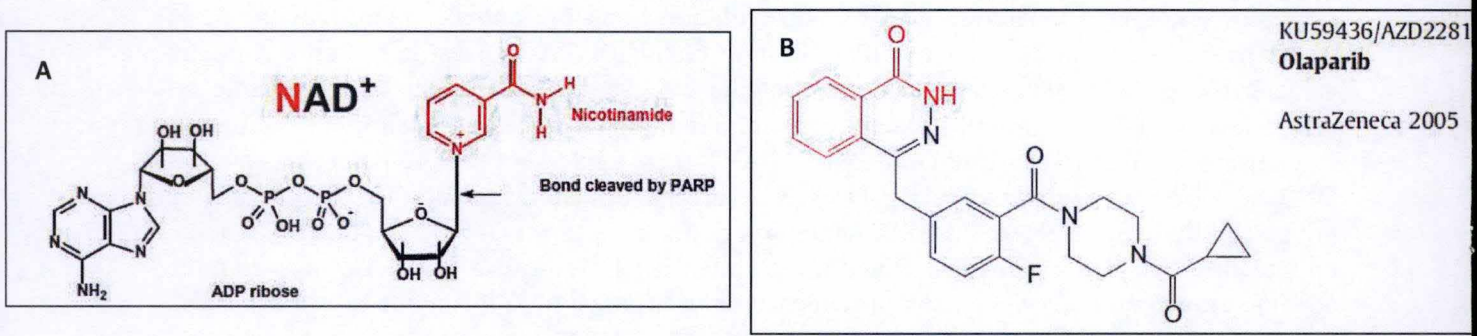


Figure 18 : Structure moléculaire de l'olaparib. En clivant le NAD+, PARP libère la nicotinamide (A) dont la structure est similaire à celle de l'olaparib (B) (Curtin et al., 2013).

ne pouvant pas être réparés qui, lors de la rencontre avec la fourche de réplication, mènent à des dommages devant être réparés par HR (Benafif and Hall, 2015). En 2012, l'étude de Murai et al. a montré qu'il existait un autre mécanisme d'inhibition de PARP. Les inhibiteurs de PARP agiraient en emprisonnant des complexes PARP-ADN menant également à des DSB lors de la fourche de réplication mais ces derniers nécessiteraient d'autres protéines de réparation de l'ADN en plus de la HR (Murai et al., 2012). Dans une autre étude, il été rapporté qu'une suractivation de PARP pouvait mener à l'apoptose et la nécrose à cause de l'épuisement en NAD+ et ATP qui est néfaste pour la cellule (Sodhi et al., 2010).

5.2.3 Mécanismes de résistance des inhibiteurs de PARP

Malheureusement, bien que le concept de létalité synthétique impliquant les inhibiteurs de PARP dans les cancers du sein et de l'ovaire avec mutation BRCA soit prometteur, des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de PARP ont été rapportés. A ce jour, trois mécanismes de résistance ont été décrits (Figure 17) (Sonnenblick et al., 2014). Le premier est l'apparition de mutations secondaires dans BRCA pouvant restaurer son cadre de lecture et sa fonction dans la recombinaison homologue. Le second est l'augmentation de l'efflux des médicaments via le transporteur MDR1 qui limite l'exposition de la cellule aux inhibiteurs de PARP. Enfin, le troisième mécanisme est l'apparition de mutations somatiques menant à la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur TP53BP, qui encode la protéine 53BP1. Cette protéine est également impliquée dans la recombinaison homologue qui lorsqu'elle est mutée, mène à une restauration partielle de la recombinaison homologue et dès lors de la réparation de l'ADN (Sonnenblick et al., 2014). Dès lors, il est impératif de trouver d'autres gènes ou protéines à cibler afin de conduire d'une part à une létalité synthétique dans les cancers avec des mutations BRCA, mais également afin d'étendre son utilisation à d'autres cancers qui n'ont pas d'altérations génétiques au niveau de gènes impliqués dans la recombinaison homologue, tels que le cancer du poumon non à petites cellules.

5.2.4 Olaparib, un inhibiteur sélectif de PARP-1 et PARP-2

Il existe plusieurs inhibiteurs de PARP tels que l'olaparib, le veliparib, le talazoparib, le rucaparib, le niraparib et le NMS/p118. Ceux-ci possèdent une structure dont le squelette est similaire à la nicotinamide (Figure 18) (Curtin et al., 2013). Toutefois, dans ce mémoire nous avons décidé de nous concentrer sur l'olaparib (Lynparza, AstraZenecca) car l'olaparib est le premier inhibiteur sélectif de PARP-1 et PARP-2 à avoir été approuvé par la FDA en décembre 2014. Il est indiqué en monothérapie en cas de rechute pour les patients porteurs d'une mutation BRCA et atteints d'un cancer de l'ovaire avancé. Actuellement, l'olaparib est étudié dans plusieurs essais cliniques en monothérapie ou en combinaison, pour le traitement de plusieurs tumeurs solides du sein, du pancréas, de la prostate et colorectal (Gavande et al., 2016). Ce médicament est administré oralement et est généralement bien toléré par les patients. Les effets secondaires les plus rapportés sont des nausées, des vomissements, de la diarrhée, de la fatigue et de l'anémie (Munroe et al., 2016).

5.3 Inhibiteurs de RAD51

Des récentes études ont montré que l'inhibition d'autres protéines impliquées dans le HR telles que RAD51, RPA1, ATR, ATM, CHK1, CHK2 pouvait également sensibiliser les cellules cancéreuses aux inhibiteurs de PARP (McCabe et al., 2006). Dans ce mémoire, nous avons décidé de nous focaliser sur la protéine RAD51. Elle est tout d'abord une protéine

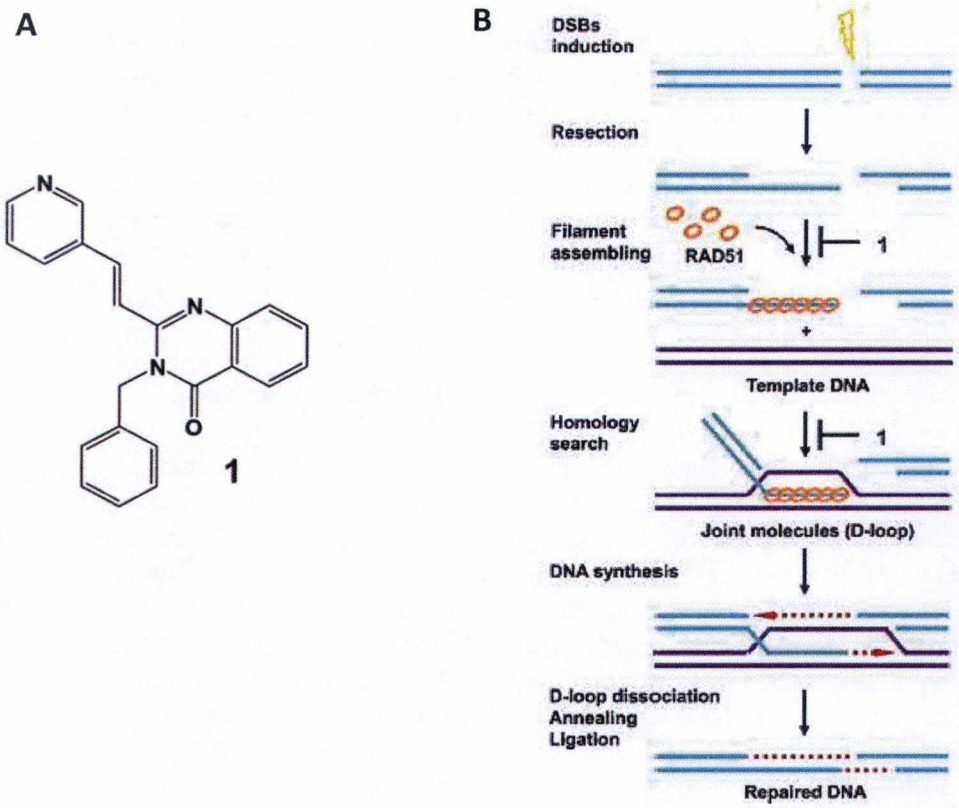


Figure 19 : Mécanisme d'action du B02. Structure moléculaire du B02 (A). Le B02 inhibe le mécanisme de recombinaison homologue en perturbant la liaison de RAD51 à l'ADN durant la formation du nucléofilament, induisant une déstabilisation du complexe formé entre RAD51 et l'ADN. Cela conduit à une inhibition de la recombinaison homologue (Huang et al., 2012).

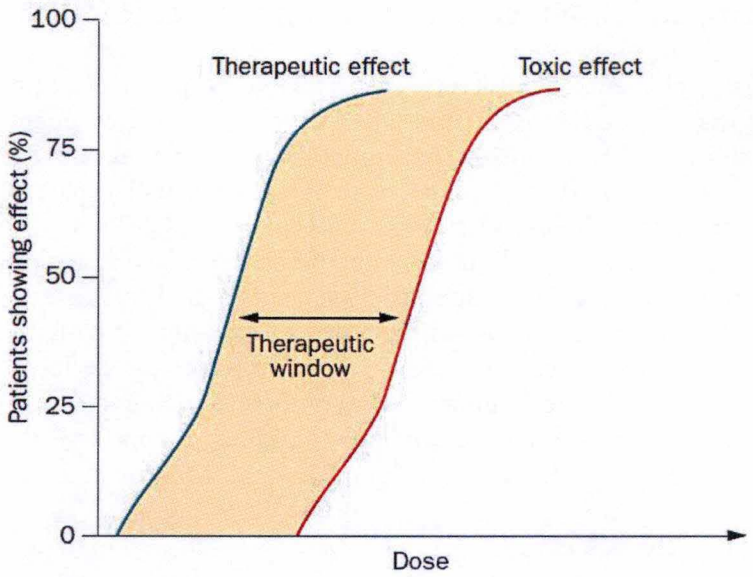


Figure 20 : Représentation schématique de la fenêtre thérapeutique. La courbe bleue correspond au seuil de concentration où on commence à voir un effet thérapeutique. En dessous de ce seuil, le médicament est inactif. Tandis que la courbe rouge correspond au seuil de concentration au dessus duquel des effets indésirables apparaissent. Dès lors, il est important que la dose utilisée se situe entre ces deux courbes afin que le médicament soit actif et que les effets indésirables n'apparaissent pas (Mathijssen et al., 2014).

centrale impliquée dans la réparation de cassures double-brin par le mécanisme de recombinaison homologue. De plus, il a été montré que le niveau d'expression de RAD51 est plus élevé dans beaucoup cancers, tels que le NSCLC, que dans les cellules normales (Qiao et al., 2005). RAD51 peut dès lors être une cible pertinente pour les thérapies combinées telles que la létalité synthétique.

RAD51 possède une unique fonction qui est l'invasion de la chromatide sœur conduisant aux échanges de brin d'ADN pour la recherche d'homologie (Renodon-Cornire et al., 2013). Récemment, B02, un inhibiteur de RAD51 a été identifié par le criblage à haut débit de plus de 200 000 composés provenant du NIH Small Molecule Repository (Huang et al. 2011). B02 est un inhibiteur de RAD51 qui agit lors de l'échange de brin d'ADN durant la HR (Figure 19). Celui-ci altère l'interaction entre RAD51 et l'ADN lors de la formation du nucléofilament et déstabilise ainsi le complexe RAD51-ssDNA conduisant à une inhibition de la recombinaison homologue, sensibilisant ainsi les cellules aux DBS (Huang et al., 2012).

Cibler RAD51 en combinaison avec un inhibiteur de PARP tel que l'olaparib peut donc être un traitement potentiel pour mener à une létalité synthétique après irradiation. Une étude en cours dans notre laboratoire a démontré un effet synergique lorsque les cellules de cancer du poumon non à petites cellules A549 (NSCLC) sont irradiées avec des protons en association avec de l'olaparib et B02 en présence de sérum mais pas en son absence. Les résultats ont montré que cet effet synergique pourrait être dû à la proportion accrue de cellules synthétisant de l'ADN en présence de sérum, ce qui augmente la sensibilité des cellules à l'olaparib. De plus, la combinaison des deux inhibiteurs augmente la quantité de dommages à l'ADN qui ne peuvent plus être réparés (Wéra et al., 2017).

5.4 Index thérapeutique

L'index thérapeutique est défini comme étant le rapport entre les effets bénéfiques et les effets toxiques d'un traitement. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'index thérapeutique : le traitement lui-même et la nature de la cible (c'est-à-dire sa distribution, sa fonction normale). En effet, lorsqu'une protéine est ciblée, cela induit un changement dans la physiologie normale et peut mener à des effets indésirables. La sélectivité et la spécificité sont dès lors très importantes dans un traitement afin de limiter ces derniers. La sélectivité d'un traitement peut être envisagée de deux manières. D'une part, en ciblant un gène ou une protéine essentielle présente seulement dans les cellules cancéreuses (ex : le gène de fusion BCR-ABL) et d'autre part, en identifiant et ciblant une situation dans laquelle l'expression du gène est quantitativement ou qualitativement différente par rapport aux cellules normales (ex : l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN). Cette seconde option est la plus utilisée dans les traitements chimiothérapeutiques (Kaelin et al., 2005).

Bien que les agents chimio thérapeutiques et la radiothérapie permettent de tuer les cellules cancéreuses, leur toxicité reste élevée, induisant de nombreux effets indésirables. La fenêtre thérapeutique est la gamme de doses à laquelle un médicament est efficace sans effets indésirables inacceptables. Souvent, cette fenêtre thérapeutique est étroite et un petit changement peut mener soit à l'inefficacité du traitement ou à une toxicité extrême (Figure 20) (Tamargo et al., 2015). Celle-ci doit donc être élargie afin d'avoir une meilleure balance entre les effets bénéfiques et les effets indésirables. Cela peut se faire d'une part en sensibilisant les cellules cancéreuses au traitement en utilisant des stratégies biologiques, d'autre part en protégeant les tissus sains environnant en améliorant la technologie de la

conformité aux doses d'irradiation (Baumann et al., 2016). Il existe plusieurs stratégies pour optimiser la réponse du cancer et tissus normaux aux radiations dont la létalité synthétique (Moding et al., 2013).

Contrairement aux agents chimio thérapeutiques, la létalité synthétique exploite les différences génétiques entre les cellules cancéreuses et les cellules normales afin de diminuer les effets secondaires chez les patients et augmenter ainsi l'effet du traitement en épargnant les tissus sains (Gavande et al., 2016).

5.5 Etudes précliniques et cliniques des inhibiteurs

Actuellement, de nombreuses études sont menées afin d'optimiser l'utilisation de l'olaparib et de B02 en monothérapie, et/ou en combinaison avec la radiothérapie ou chimiothérapie, dans d'autres cancers que les cancers BRCAness (cancers ayant un gène impliqué dans la réparation homologue défectueux, lié ou non à une mutation de BRCA). A notre connaissance, aucune étude utilisant les deux inhibiteurs ensemble et en combinaison avec la radiothérapie n'a encore été rapportée. Dans l'étude de Huang en 2012, il a toutefois été rapporté que le B02 augmentait la sensibilité des fibroblastes embryonnaires de souris aux inhibiteurs de PARP lorsque du MMS (méthane sulfonate de méthyle) était utilisé afin d'engendrer des dommages à l'ADN (Huang et al., 2012).

Etant donné que l'olaparib a été approuvé par la FDA en 2014 pour les patients ayant subi une rechute du cancer de l'ovaire avancé avec mutation BRCA, plusieurs études précliniques *in vivo* et *in vitro* ont été rapportées lorsque celui-ci est utilisé en combinaison avec la chimiothérapie ou la radiothérapie. Il a été montré par exemple que l'inhibition de l'activité de PARP-1 par l'olaparib permet une radiosensibilisation en retardant la réparation de cassures simple-brin dans des cellules de cancer du poumon non à petites cellules *in vitro* mais aussi *in vivo* chez des souris nude porteuses d'une xénogreffe de tumeur pulmonaire (Senra et al., 2011). L'olaparib a également montré un effet synergique lorsqu'il est combiné au cisplatine dans des cellules de cancer du poumon déficientes en PTEN (Minami et al., 2013). Un autre exemple est l'étude clinique de phase III qui est actuellement en cours pour l'olaparib en combinaison avec le paclitaxel chez des patients atteints de cancer gastrique avancé (ClinicalTrials.gov).

B02 a été découvert plus récemment (Huang et al., 2012), aucune étude clinique n'a encore été menée pour le traitement du cancer. Toutefois, quelques études précliniques *in vitro* et *in vivo* ont déjà été rapportées. Il a été montré par exemple que B02 pouvait augmenter la sensibilité chimiothérapeutique des cellules de myélome multiple humain à la doxorubicine, qui est un agent induisant des cassures double-brin (Alagpulinsa et al., 2014). De plus, la combinaison de doxorubicine et de B02 conduit à une importante létalité synthétique (Alagpulinsa et al., 2014). Une autre étude a également montré que cibler RAD51 par B02 était efficace dans la radiosensibilisation des cellules souches de gliome (King et al., 2017).

Ensemble, ces études ont montré que le développement d'inhibiteurs à petites molécules ciblant les mécanismes de réparation de l'ADN pourrait être une stratégie prometteuse pour traiter de nombreux types de cancers. En outre, étant donné que ces inhibiteurs ciblent des mécanismes de réparation différents, leur combinaison pourrait être davantage efficace afin de sensibiliser les cellules cancéreuses lorsqu'ils sont associés à la radiothérapie.

6 Objectifs

Le mémoire part d'une étude réalisée au laboratoire dont le but était de radiosensibiliser les cellules A549 par la méthode de la létalité synthétique en utilisant une irradiation par protons (Wéra et al., 2017). L'olaparib et le B02 étaient les deux inhibiteurs des mécanismes de réparation de l'ADN choisis. Lors de cette étude, un effet synergique entre les inhibiteurs avait été montré lorsque du sérum était ajouté dans le milieu. Le sérum contient des facteurs de croissance ainsi que de nombreuses autres protéines qui permettent aux cellules de survivre et de proliférer. Il a été hypothétisé que cet effet synergique pouvait être donc dû à la proportion accrue de cellules synthétisant l'ADN qui augmenterait la sensibilité cellulaire à l'olaparib. En effet, en inhibant PARP, l'olaparib permet d'engendrer plus de dommages à l'ADN. Lors de la synthèse d'ADN, les SSB qui ne peuvent pas être réparés par BER à cause de l'inhibition de PARP, menent à la formation de DSB au niveau de la fourche de réplication. La combinaison des deux inhibiteurs engendrerait dès lors encore plus de dommages qui ne peuvent plus être réparés par recombinaison homologue.

Etant donné que les molécules cytotoxiques affectent également les cellules normales, les deux inhibiteurs sont utilisés à une concentration conduisant à la mort cellulaire lorsque les cellules sont irradiées, mais induisent un effet cytotoxique limité lorsque les cellules ne sont pas irradiées. Dans un contexte clinique, cela permet d'élargir la fenêtre thérapeutique (Mathijssen et al., 2014). Pour cela, différentes concentrations en inhibiteurs ont été évaluées par un test de clonogénicité. Les résultats ont montré qu'une concentration de 0,5 µM en olaparib et 10 µM de B02 menaient à une faible cytotoxicité.

Le but du mémoire est de radiosensibiliser les cellules A549 par la méthode de la létalité synthétique avec une irradiation par rayons X. Les résultats de cette étude pourront donc être comparés à ceux obtenus lors des irradiations par protons obtenus précédemment. Pour ce faire, nous avons étudié dans un premier temps l'effet des rayons X sur la réparation des lésions de l'ADN via un marquage par immunofluorescence. Ensuite, afin d'évaluer l'effet des inhibiteurs pris seuls ou en combinaison sur l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose après irradiation, l'abondance de plusieurs protéines impliquées dans les deux processus a été mesurée par Western-blot.

Toutefois, étant donné que l'apotose n'est pas le seul type de mort cellulaire, nous nous sommes également intéressés à la sénescence, qui est un autre type de mort cellulaire. Afin d'évaluer si la sénescence est induite par les rayons X, un test SA-βgalactosidase ainsi que l'évaluation par RT-qPCR de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la sénescence ont été réalisés.

Afin de caractériser les effets des rayons X en association avec les inhibiteurs utilisés seuls ou ensemble, des courbes de survie ont été réalisées par des tests de clonogénicité. Enfin, étant donné que le sérum permet la prolifération cellulaire, nous avons voulu également comparer le nombre de cellules synthétisant de l'ADN lorsque le sérum est ajouté dans le milieu en comparaison avec le milieu sans sérum par un marquage au BrdU.

L'ensemble de ces études a permis de comparer les effets des rayons X et des protons et de montrer que, dans les deux cas, la combinaison des deux inhibiteurs apporte un effet radiosensibilisateur.

II. MATERIEL ET METHODES

Table 1 : Matériel pour la culture des cellules A549

Matériel	Fournisseur	Stockage
MEM Glutamax	Thermo Fisher Scientific, USA	4°C
Sérum de veau fœtal	Thermo Fisher Scientific, USA	Aliquots à - 20 °C
PBS (Phosphate Buffered Saline) stérile : - 20 mL de tampon phosphate 0,5 M - 9 g NaCl - Qsp 1 L d'eau milliQ	 Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA	4°C
Trypsine-EDTA: Trypsine (0,5 g/L) EDTA (0,2 g/L)	Thermo Fisher Scientific, USA	Aliquots à - 20°C

Table 2 : Volume de milieu, densité cellulaire et nombre de cellules ensemencées suivant les différentes boites de culture utilisée

Boites de culture (Corning)	Volume de milieu	Densité cellulaire par puits	Nombre de cellules ensemencées par puits
6-puits	2 mL	800 cellules/µL	160 000
12-puits	1 mL	800 cellules/µL	40 000

Table 3 : Matériel utilisé pour les expériences avec inhibiteurs

Matériel	Fournisseur	Stockage
Milieu CO_2 indépendant	Thermo Fisher Scientific, USA	4°C
L-glutamine	Sigma, USA	Aliquots à - 20°C
Sérum de veau fœtal (FBS)	Thermo Fisher Scientific, USA	-20°C
Olaparib (23 mM)	Selleckchem, France	Aliquots à - 80°C
B02 (73,66 mM)	Merck Millipore, USA	Aliquots - 20°C
Penicilline-Streptomycine	Sigma Aldrich, USA	Aliquots à -20°C

1 Culture cellulaire

1.1 Matériel

Voir Tables 1, 2 et 3.

1.2 Méthode

1.2.1 Type cellulaire

Les cellules cancéreuses A549 ont été utilisées dans ce travail. Cette lignée cellulaire a été isolée à partir du carcinome du pulmonaire d'un homme de type caucasien âgé de 58 ans. Elle est fortement utilisée comme modèle *in vitro* de NSCLC (Gazdar et al., 2010). De plus, les cellules A549 possèdent un statut p53 sauvage (Yusein-Myashkova et al., 2016).

1.2.2 Culture cellulaire

Les cellules A549 sont cultivées dans des boîtes de culture en polystyrène de 75 cm^2 (Corning, USA) dans du milieu MEM (Modified Eagle Medium) Glutamax contenant 10 % de sérum de veau fœtal. Les cellules sont cultivées à 37°C et dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2 et de l'air humidifié.

Etant donné que les cellules adhèrent à la surface de la flasque de polystyrène. Pour la culture cellulaire, les cellules doivent être « passées » lorsque les cellules approchent de la confluence. Cela permet à la culture cellulaire de ne pas être perturbée par l'inhibition de contact. Pour « passer » les cellules, les cellules doivent être détachées afin de pouvoir être resuspendues dans du milieu MEM frais. Avant de détacher les cellules avec de la trypsine, les cellules sont rincées au PBS afin d'enlever les protéines pouvant interagir avec cette dernière. La trypsine est une peptidase qui clive les protéines permettant à la cellule de s'attacher à la matrice extracellulaire. Une fois que la trypsine est ajoutée, les cellules sont incubées à 37°C pendant 5 minutes. Lorsque les cellules sont détachées, du milieu MEM contenant 10 % de sérum est ajouté afin d'inhiber l'action de la trypsine. Après cela, le milieu comprenant les cellules et la trypsine est récupéré et centrifugé durant 5 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est enlevé, les cellules sont resuspendues dans du milieu MEM frais et sont déposées dans une nouvelle boîte de culture à une dilution un huitième.

1.2.3 Ensemencement

Pour réaliser les différentes expériences de manière la plus reproductible possible, les cellules doivent être ensemencées à une densité précise afin d'être à la même confluence lors des irradiations. Afin d'obtenir le nombre adéquat de cellules par puits, les cellules sont comptées par le cell counter (Invitrogen, USA) lors du repiquage et la suspension cellulaire est diluée en fonction du nombre de cellules souhaité. Les cellules sont ajoutées sous forme de goutte afin qu'elles soient toutes au même stade du cycle cellulaire. Une fois que ces dernières ont adhéré à la boite, le volume de milieu adéquat au type de boite de culture utilisé est ensuite ajouté et les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2.

Table 4 : Matériel pour le test de clonogénicité

Matériel	Fournisseur	Stockage
PBS (Phosphate Buffered Saline) stérile : - 20 mL de tampon phosphate 0,5 M - 9 g NaCl - Qsp 1 L d'eau milliQ	 Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA	4°C
Trypsine-EDTA: Trypsine (0,5 g/L) EDTA (0,2 g/L)	Thermo Fisher Scientific, USA	Aliquots à - 20°C
MEM Glutamax	Thermo Fisher Scientific, USA	4°C
Sérum de veau fœtal	Thermo Fisher Scientific, USA	Aliquots à - 20°C
Penicilline-Streptomycine (10,000 U/mL)	Sigma Aldrich, USA	Aliquots à -20°C
Paraformaldéhyde 4 % dans du PBS	Merck, Allemagne	Aliquots à -20°C
Crystal violet: - 1 g de crystal violet - 10 mL d'éthanol - Qsp 500 mL d'eau	Thermo Fisher Scientific, USA	RT

Table 5 : Densité cellulaire et nombre de cellules ensemencées en fonction des doses d'irradiation

Dose (Gy)	Densité cellulaire(milieu sans sérum)	Densité cellulaire (milieu avec sérum)	Nombre de cellules ensemencées (milieu sans sérum)	Nombre de cellules ensemencées (milieu avec sérum)
0	2 cellules/µL	2 cellules/µL	100-200	100-200
1	2 cellules/µL	2 cellules/µL	150-300	150-300
2	2 cellules/µL	2 cellules/µL	300-600	300-600
4	6 cellules/µL	10 cellules/µL	600-1200	2000-4000

1.2.4 Ajout des inhibiteurs

Pour certaines expériences, des inhibiteurs sont ajoutés dans un milieu CO_2 indépendant supplémenté avec 500 nM de L-glutamine, avec ou sans sérum, 3 à 4 heures avant l'irradiation. Les deux inhibiteurs utilisés sont l'Olaparib et le B02. L'Olaparib et le B02 sont dilués afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 µM et 10 µM respectivement.

2 Irradiation par rayons X

2.1 Matériel

Générateur de rayons X, X-RAD 225-XL (Precision X-ray).

2.2 Méthode

24 heures avant l'irradiation, les cellules sont ensemencées dans des plaques six ou 12 ou 24 puits sous la forme d'une goutte contenant 800 cellules/µL. Le milieu MEM est ajouté 3 heures plus tard, lorsque les cellules ont adhéré au support. Le lendemain, 3 heures à 4 heures avant l'irradiation, les cellules sont incubées dans un milieu CO_2 indépendant supplémenté de L-glutamine 500 nM avec ou sans sérum avec soit : aucun inhibiteur, de l'olaparib à 0,5 µM, du B02 à 10 µM ou une combinaison des deux inhibiteurs (10 µM B02 et 0,5 µM d'olaparib). Les plaques sont placées dans le générateur de rayons X de 225 kV à RT et sont irradiées à un débit de dose de 2 Gy/min.

3 Test de clonogénicité

Le principe du test de clonogénicité ainsi que les courbes de survie ont déjà été décrits dans l'introduction page 13.

3.1 Matériel

Voir Tables 4 et 5.

3.2 Méthode

24 heures avant l'irradiation, 160 000 cellules sont ensemencées dans des plaques six puits sous forme d'une goutte de 200 µL contenant une densité de 800 cellules/µL. 3 heures plus tard, du milieu MEM contenant de la pénicilline-streptomycine à 0,5 % est ajouté. Le lendemain, 3-4 heures après l'ajout des inhibiteurs dans le milieu CO_2 indépendant, les cellules sont irradiées. Les doses d'irradiation utilisées sont de 0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy.

Directement après l'irradiation, les cellules sont trypsinisées, comptées et réensemencées pour le test de clonogénicité. Les cellules sont réensemencées dans des plaques 6 puits dans du milieu MEM contenant les inhibiteurs, supplémenté de 10 % de FBS et de pénicilline-streptomycine à 0,5 %. Le nombre de cellules ensemencées dépend de la dose d'irradiation utilisée. Afin de connaître le nombre réel de cellules ensemencées au départ, les cellules sont également ensemencées dans des plaques 12 puits avec le même nombre de

cellules et le même milieu. Ces plaques 12 puits restent durant 1h30 à 37°C afin que les cellules puissent adhérer au support. Ensuite, les cellules sont fixées grâce à la PFA (paraformaldéhyde) 4 % pendant 10 minutes et sont rincées 2X au PBS. Le nombre de cellules ensemencé au départ est compté manuellement au microscope optique.

24 heures plus tard, le milieu des cellules en plaques 6 puits est changé avec du milieu MEM sans inhibiteur, supplémenté de FBS et de pénicilline-streptomycine 0,5 %. Les cellules sont incubées dans ce milieu complet durant 12 jours à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2 afin d'obtenir des colonies. 12 jours plus tard, les cellules sont colorées avec du cristal violet. Pour colorer les colonies, le crystal violet est ajouté durant quelques secondes. Les boîtes sont directement rincées deux fois à l'eau de ville avant de sécher à l'air libre. Les colonies (>50 cellules) sont ensuite comptées.

Le plating efficiency (PE) et la fraction de survie (SF) sont calculés par les formules suivantes :

$$PE = \frac{nb\ de\ colonies\ formées}{nb\ de\ cellules\ ensemencées} \qquad SF = \frac{PE\ irr}{PE\ CTL}$$

Les données expérimentales sont ajustées à un modèle quadratique linéaire (LQ), en utilisant le programme GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Logiciel) donné par la formule :

$$SF = e^{(-\alpha D - \beta D^2)}$$

Où SF est la fraction de survie, α (Gy^{-1}) et β (Gy^{-2}) sont les paramètres de radiosensibilité et D est la dose.

Trois expériences indépendantes ont été réalisées (12 puits sont comptés pour chaque dose) respectivement pour le milieu avec et sans sérum et les erreurs ont été évaluées par la déviation standard. Les paramètres de radiosensibilité sont donnés par GraphPad Prism 5.0 (Logiciel GraphPad) basé sur la loi de régression des moindres carrés. Les erreurs sont données par erreur standard (SE). Finalement, le sensitivity enhancement ratio (SER) et le coefficient of drug interaction (CDI) sont calculés selon les formules :

$$SER = \frac{Dir\ only}{Dir+Drug}$$ Où Dir est la dose d'irradiation

$$CDI = \frac{relative\ survival\ (drugA+drugB)}{relative\ survival\ (drugA)\ X\ relative\ survival\ (drugB)}$$

Où la survie relative est le rapport entre chaque fraction de survie (calculée à partir des paramètres α et β des courbes de survie ajustées au modèle (LQ) avec la fraction de survie sans inhibiteur.

4 Western-Blot

Le Western-Blot est une technique qui permet d'évaluer l'abondance d'une protéine de manière relative. Celui-ci se déroule en plusieurs étapes. La première est l'extraction protéique totale des cellules. Ensuite, l'électrophorèse consiste à séparer les protéines dans un gel suivant leur poids moléculaire, les plus petites protéines migrants plus vite que les grandes. Le poids moléculaire de la protéine est déterminé à l'aide d'un étalon de poids

Table 6 : Matériel utilisé pour l'extraction des protéines et le dosage de la concentration en protéines

Matériel	Fournisseur	Stockage
H_2O milliQ	Millipore, Allemagne	RT
PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer): PNPP (Para-NitroPhényl Phosphate) 250 nMβ- β-glycérophosphate 250 nM NaF 125 nM Na_3VO_4 25 nM	 Sigma, USA Sigma-Aldrich, USA Merck, Allemagne Sigma-Aldrich, USA	Aliquots à -20°C
PIC (Protease Inhibitor Cocktail): Une tablette de Complete protease inhibitor cocktail 25X diluée dans 2 mL d'eau	Roche, Allemagne	Aliquots à -20°C
Tampon de lyse 2X : - 2,23g de KCl (300 mM) - 929 mg de Tris (80 mM) - 74,44 mg d'EDTA (2 mM) - Qsp 50 mL d'H_2O milliQ - pH 7,5	 Merck, Allemagne ICN Biomedicals, USA Merck, Allemagne Millipore, USA	4°C
Tampon de lyse protéique complet : - 500 µL de tampon de lyse 2X - 290 µL H_2O - 10 µL Triton X100 - 85 µL de PIC - 85 µL de PIB	 Millipore, USA Merck, Allemagne Roche, Allemagne	4°C
BSA (Bovine Serum Albumine)	Sigma, USA	Aliquots à -20°C
Réactif de Pierce	Thermo Scientific, USA	RT

Table 7 : Matériel utilisé pour le western-blot

Matériel	Fournisseur	Stockage
Tampon de migration 10X : - 30,25 g de Tris - 144 g de glycine - 10 g de SDS - Qsp 1L d'eau milliQ - pH 8,7	 Sigma, USA Merck, Allemagne ICN Biomedicals, USA	4°C
Bleu de charge 5X : - 10 mL de tampon de concentration - 10 mL de SDS 20 % - 5 mL de β-mercaptoéthanol - 10 mL de glycérol - 17,5 mg de Bleu de bromophénol	 ICN Biomedicals, USA Flucka, USA Merck, Allemagne Amersham Biosciences, Suède	Aliquots à -20°C
Tampon de concentration : - 6,06 g de Tris - 0,4 g de SDS - Qsp100 mL d'eau milliQ - pH 6,8	 ICN Biomedicals, USA ICN Biomedicals, USA Millipore, USA	4°C
Tampon de séparation : - 36,3 g de Tris - 0,8 g de SDS - Qsp 200 mL d'eau milliQ - pH 8,9	 ICN Biomedicals, USA ICN Biomedicals, USA Millipore, USA	4°C
Running gel 12 % : - 2,9 ml de tampon de séparation - 4,8 mL d'acrylamide 30 % - 4,3 mL d'eau - 60 µL d'APS 25 % - 3,6 µL de TEMED	 Biorad, USA Millipore, USA Biorad, USA Biorad, USA	/
Tampon de transfert : - 20 mL de tampon de transfert 5X - 20 mL d'éthanol - 60 mL d'eau milliQ	 Biorad, USA Merck, Allemagne Millipore, USA	4°C
Stacking gel 3,5 % : - 1,25 mL de tampon de concentration - 0,5 mL d'acrylamide 30 % - 3,25 mL d'eau - 20 µL d'APS 25 % - 5 µL de TEMED	 Biorad, USA Millipore, USA Biorad, USA Biorad, USA	/
Gel complet: - 10 mL de running gel 12 %		4°C

- 3 mL de stacking gel		
Méthanol	Merck, Allemagne	RT
TBS 10X (Tris Buffered Saline): - 60,5 g Tris - 87,6 g NaCl - Qsp 1L d'eau - pH 7,5	 ICN Biomedicals, USA Merck Millipore, USA Millipore, USA	
Solution de blocage: - TBS 1X - Blocking Licor TBS (mélange 50/50)	 Licor Biosciences, USA	4°C
Tween 20	Biorad, USA	RT

Table 8 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le western-blot

Anticorps	Fournisseur	Type	Source	Dilution	Référence
p53	EMD Millipore	monoclonal	Souris	1:1000	05-224
p21	Cell Signaling Technology	monoclonal	Souris	1:1000	2946
Caspase 7	Cell Signaling Technology	monoclonal	Lapin	1:1000	9286
PARP	BD Biosciences	monoclonal	Souris	1:2000	551024
β-Actin	Sigma-Aldrich	monoclonal	Souris	1:20000	A5441
IRDye 800CW Goat anti-rabbit IgG	Li-Cor Biosciences	polyclonal	Chèvre	1:10000	926-32211
IRDye 680RD Goat anti-mouse IgG	Li-Cor Biosciences	polyclonal	Chèvre	1:10000	926-68070

moléculaire. L'étape suivante est le transfert, qui consiste à transférer les protéines du gel sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF). Afin de détecter la protéine d'intérêt sur la membrane, un anticorps primaire se liant à la protéine est ensuite ajouté. A cet anticorps primaire est ajouté un anticorps secondaire qui reconnaît l'anticorps primaire en s'y liant. L'anticorps secondaire étant couplé à un fluorochrome, celui-ci peut être excité par une lumière à une certaine longueur d'onde et réémet une lumière à une autre longueur d'onde, permettant la visualisation de la protéine sur la membrane.

4.1 Matériel

Voir Tables 6, 7 et 8.

4.2 Méthode

4.2.1 Extraction de protéines

24 heures avant l'irradiation, 160 000 cellules sont ensemencées dans une plaque six puits sous forme d'une goutte de 200 µL contenant 800 cellules/µL. 3 heures plus tard, du milieu MEM + sérum contenant de la pénicilline-streptomycine à 0,5 % est ajouté (voir Tables 1, 2 et 3).

24 heures après l'irradiation aux doses de 0 Gy et 2 Gy, le milieu est récupéré et est centrifugé pendant 5 minutes à 1200 rpm à 4°C (Eppendorf, Allemagne). Après deux lavages au PBS, les cellules sont lysées dans 50 µL de tampon de lyse (Table 6). Les cellules sont ensuite raclées à l'aide d'un grattoir et sont ajoutées au culot de la centrifugation précédente dont le surnageant a été décanté. Ensuite, le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 13 000 rpm à 4 ° C (Eppendorf, Allemagne). Les surnageants sont récupérés et sont conservés à -80° C.

4.2.2 Dosage de la concentration en protéines

Pour chaque échantillon, la concentration en protéines est évaluée par un dosage Pierce. Afin de déterminer celle-ci, une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant 5 concentrations différentes connues de BSA (albumine de sérum bovin) : 0 µg/µL ; 2 µg/µL ; 5 µg/µL ; 7 µg/µL et 10 µg/µL. Dans une plaque à 96 puits, les différentes concentrations de BSA sont ajoutées ainsi que 2 µL de chaque échantillon. 150 µL de réactif de dosage de protéines Pierce 660 nm sont ajoutés et la plaque 96 puits est ensuite laissée dans l'obscurité pendant au moins 5 minutes avant de mesurer l'absorbance à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Biorad, USA). La concentration de chaque échantillon est ensuite calculée en utilisant l'équation de la ligne droite d'étalonnage ($y = ax + b$) où y est l'absorbance et x la concentration en protéines.

4.2.3 Préparation des gels

Un montage comprenant un portoir avec une bande amovible, un support, une grande plaque avec un spacer ainsi qu'une petite plaque, est tout d'abord réalisé. Ensuite, le gel de séparation (running) 12 % est coulé. Une fine couche de SDS 0,1 % est ajoutée délicatement pour éviter tout contact avec l'air. Le gel polymérise ensuite durant 40 minutes à température ambiante. Une fois la polymérisation terminée, le SDS est enlevé et le gel est rincé à l'eau

Table 9 : Matériel utilisé pour le marquage en immunofluorescence

Matériel	Fournisseur	Stockage
Mowiol (0,1 g par mL de Tampon Tris 1,5 M pH 8,8 contenant 22% de glycérol)	Sigma-Aldrich, Allemagne	RT
Paraformaldéhyde 4 % dans du PBS	Merck, Allemagne	Aliquots à -20°C
DAPI (2,5 mg/mL) dans H_2O	Sigma, USA	Aliquots à -20°C
PBS : - 20 ml de tampon phosphate - 0,5 M 9 g NaCl - Qsp 1 L d'eau)	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA	4°C

Table 10 : Anticorps primaires utilisés pour le marquage en immunofluorescence

	Fournisseur	Type	Source	Dilution	Référence
pADPr	Abcam, UK	Monoclonal	Souris	1:400	ab14459
RAD51	Sigma-Aldrich, USA	Polyclonal	Lapin	1:400	HPA039310

Table 11 : Anticorps secondaires utilisés pour le marquage en immunofluorescence

Anticorps	Fournisseur	Dilution
Alexa 488 nm anti-rabbit antibody	Thermo Fisher Scientific, USA	1:1000
Alexa 568 nm anti-mouse antibody	Thermo Fisher Scientific, USA	1:1000

distillée. Le gel de concentration (stacking) 4 % est ensuite coulé. Un peigne comprenant 10 puits est inséré et le gel polymérise durant 30 minutes.

4.2.4 Electrophorèse

Les lysats cellulaires obtenus à partir de l'extraction protéique sont mélangés avec de l'H_2O et du bleu de charge 5X afin de charger 20 µg de protéines par puits. Le mélange est chauffé ensuite à 100°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines et les tubes sont centrifugés ensuite à 13000 rpm durant 2 minutes. Le gel est ensuite placé dans une cuve comprenant 1 L de tampon de migration 1X. Les protéines sont ensuite chargées et sont séparées pendant 1h à 150 V, 60 W et 400 mA sur le gel.

4.2.5 Transfert sur membrane

Avant de transférer les protéines sur une membrane en PVDF, cette dernière doit être immergée durant 1 minute dans du méthanol absolu. Ensuite, la membrane ainsi que deux stacks sont immergés dans le tampon de transfert durant au moins 3 minutes. La membrane, les stacks et le gel sont ensuite placés dans le Trans-Blot Turbo (Biorad, USA) sous forme de sandwich (de bas en haut : stack, membrane, gel, stack). Les protéines sont transférées durant 7 minutes à 2.5 A et 25 V sur la membrane par le Trans-Blot Turbo (Biorad, USA) selon le protocole fourni par la firme.

4.2.6 Blocking et révélation

La membrane est bloquée sous agitation avec la solution de blocage (Table 6) pendant une heure. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dans du Licor TBS avec 0,1 % de Tween 20, pendant une nuit, à 4 ° C. La membrane est ensuite rincée 3 fois avec la solution TBS-T (Table 7) pendant 5 minutes et est incubée avec l'anticorps secondaire pendant une heure dans du Licor TBS avec 0,1 % de Tween 20. Ensuite, la membrane est lavée 3 fois avec TBS-T pendant 5 minutes et 2 fois dans du TBS 1X. La membrane est finalement laissée dans l'obscurité à 37°C pour sécher. Finalement, la membrane est scannée avec l'Odyssey Infrared Imager (Li-cor Biosciences) et la fluorescence a été quantifiée à l'aide du logiciel d'imagerie Odyssey V3.0 de l'Odyssey Infrared Imager (Li-cor Biosciences, USA).

5 Marquage en immunofluorescence

Le marquage en immunofluorescence est une technique permettant à la fois d'évaluer l'abondance d'une protéine de manière relative ainsi que sa localisation subcellulaire. Cette expérience consiste à reconnaitre la protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps primaires et secondaires. Afin que l'anticorps primaire puisse détecter la protéine d'intérêt, les cellules doivent être fixées puis perméabilisées à l'aide d'un agent détergent. Ensuite l'anticorps primaire est ajouté et finalement l'anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente. La molécule fluorescente est excitée à une certaine longueur d'onde et réémet de la lumière à une autre longueur d'onde, qui est visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence, dans ce cas-ci un microscope confocal.

5.1 Matériel

Voir Tables 9, 10 et 11.

Table 12 : Matériel utilisé pour le marquage au BrdU

Matériel	Firme	Stockage
BrdU Flow Kit: - Flurochrome-conjugated anti-BrdU Antibody - BD Cytofix/Cytoperm Buffer - BD Perm/Wash Buffer (10X) - BD Cytoperm Permeabilization Buffer plus - 7-AAD - BrdU (10 mg/mL) - DNAse (1 mg/mL)	BD Pharmingen, USA	4°C
PBS : - 20 mL de tampon phosphate 0,5 M - 9 g NaCl - Qsp 1 L d'eau miliQ	 Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Millipore, USA	4°C
Staining Buffer : - PBS - 3% HIF (heat-inactivated FBS)	 Thermo Fisher Scientific, USA	4°C

5.2 Méthode

24 heures avant l'irradiation, les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre dans des plaques 12 puits sous forme d'une goutte de 50 µL contenant 800 cellules/µL. 3 heures plus tard, du milieu MEM contenant de la pénicilline-streptomycine à 0,5 % est ajouté.

10 minutes, 3 heures et 24 heures après une irradiation à 0 Gy et 2 Gy, les cellules sont fixées pendant 10 minutes avec de la PFA 4 % et sont rincées 1X avec du PBS. Ensuite, les cellules sont perméabilisées à température ambiante avec du PBS-triton à 1 % pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées ensuite 3 fois pendant 15 minutes avec PBS-BSA 2 %. Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 2 heures à température ambiante. Ensuite, les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS-BSA 2 % et sont incubées pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire dans l'obscurité à température ambiante. Ensuite, les cellules sont lavées 3 fois avec PBS-BSA 2 % et une fois avec du PBS. Ensuite, les cellules sont incubées avec du DAPI dilué 1/2500 fois, pendant 10 minutes dans l'obscurité pour la coloration du noyau. Les cellules sont rincées 3 fois au PBS. Les cellules sont montées avec une solution de Mowiol chauffée à 57°C. Les lames sont ensuite stockées à 4°C avant l'observation en microscopie confocale (Leica SP5).

6 Marquage au BrdU et cytométrie de flux (FACS)

Le marquage au BrdU est une technique permettant d'une part de déterminer la position des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire et d'autre part d'évaluer de manière quantitative le nombre de cellules synthétisant de l'ADN lors de la prolifération cellulaire. Le BrdU est un analogue de la thymidine. Lorsque les cellules prolifèrent, l'ADN doit être répliqué avant que les cellules puissent se diviser. Lorsque du BrdU est ajouté, les cellules en prolifération peuvent l'incorporer dans leur ADN, tout comme elles incorporeraient de la thymidine. Afin de détecter et de quantifier la quantité de BrdU incorporé dans l'ADN des cellules, des anticorps fluorescents anti-BrdU sont ajoutés et sont détectés à l'aide de la cytométrie en flux. Souvent, un marquage de l'ADN total est réalisé avec un colorant qui se lie à l'ADN total, tel que le 7-AAD (7-aminoactinomycine D), est couplé avec le marquage immunofluorescent au BrdU. Une analyse de cytométrie en flux des deux marquages permet ensuite l'énumération et la caractérisation des cellules qui synthétisent activement l'ADN (incorporation de BrdU) et donne également la position des cellules dans le cycle cellulaire (c'est-à-dire les phases G0 / 1, S ou G2 / M) qui est défini par les intensités de coloration de 7-AAD.

La cytométrie en flux est une technique de caractérisation individuelle et quantitative de cellules en suspension dans un liquide. Cette technique permet de compter et de caractériser des cellules en les faisant défiler à grande vitesse dans un faisceau laser. La lumière réémise permet de quantifier la fluorescence associée à chaque cellule.

6.1 Matériel

Voir Table 12.

6.2 Méthode

24 heures avant l'irradiation, 160000 cellules sont ensemencées dans des plaques six puits sous forme d'une goutte de 200 µL contenant une densité de 800 cellules/µL. 3 heures plus tard, du milieu MEM contenant de la pénicilline-streptomycine à 0,5 % est ajouté.

Le lendemain le milieu est remplacé par du milieu CO_2 indépendant contenant ou non du sérum avec les inhibiteurs. 45 minutes avant l'heure d'irradiation présumée, le BrdU dilué à une concentration finale de 10 µM est ajouté. Après ces 45 minutes, les cellules sont rincées, trypsinisées et centrifugées 5 minutes à 1200 rpm. Afin de fixer et de perméabiliser les cellules pour un marquage immunofluorescent ultérieur des protéines intracellulaires, celles-ci sont resuspendues dans du BD Cytofix/Cytoperm et incubées pendant 20 minutes à 4°C. Ensuite, les cellules sont rincées avec du BD Perm/wash Buffer 1X et sont centrifugées pendant 5 minutes à 1200 rpm. Les cellules sont resuspendues dans du Staining Buffer et sont ensuite incubées à 4°C overnight.

Le lendemain, les cellules sont resuspendues dans du BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus, qui est un réactif permettant d'améliorer le marquage et qui est également un perméabilisant secondaire, et sont incubées 10 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite rincées avec du BD Perm/Wash Buffer et sont centrifugées durant 5 minutes à 1200 rpm. Les cellules sont refixées avec du BD Cytofix/Cytoperm et sont incubées pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, les cellules sont rincées avec du BD Perm/Wash Buffer 1X et sont centrifugées pendant 5 minutes à 1200 rpm. Un traitement avec de la DNase est ensuite réalisé afin d'exposer le BrdU. Pour cela, les cellules sont resuspendues dans de la DNase diluée à 300 µg/mL dans du PBS et sont incubées durant 1 heure à 37°C. Les cellules sont rincées avec du BD Perm/Wash Buffer et sont centrifugées pendant 5 minutes à 1000 rpm. Le BrdU est marqué ensuite avec des anticorps conjugués au fluorochrome FITC (isothiocyanate de fluorescéine). A cette fin, les cellules sont resuspendues du BD Perm/Wash Buffer contenant les anticorps anti-BrdU dilués 50X et sont incubées durant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées avec du BD Perm/Wash Buffer 1X et sont centrifugées pendant 5 minutes à 1200 rpm. Enfin, les cellules sont resuspendues dans du staining buffer et 20 µL de 7-AAD sont ajoutés par échantillon afin de marquer l'ADN total. Les cellules doivent être conservées à 4°C et dans l'obscurité avant d'être analysées en cytométrie de flux.

7 PCR en temps réel (qPCR)

La qPCR est une méthode de biologie moléculaire permettant de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ADNc. Cette expérience se déroule en plusieurs étapes. La première est l'extraction de l'ARN à partir de cellules. Ensuite, la transcription inverse est le processus par lequel l'ARN est rétrotranscrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Enfin, la PCR en temps réel amplifie un fragment du gène d'intérêt grâce à des amorces. La RT-qPCR permet de connaître le niveau d'expression d'un gène dans un échantillon en comparaison avec un gène de référence dont l'expression est stable dans les différentes conditions étudiées.

Ce type de PCR permet de suivre en temps réel le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR nouvellement formés. La détection

Table 13 : Matériel utilisé pour l'extraction ARN

Matériel	Firme	Stockage
Kit RNeasy Mini kit: Buffer RLT RPE RW1 H_2O RNAse Free	QIAGEN, Allemagne	RT
SDS 1 %	MP Biomedicals, France	RT

Table 14 : Matériel utilisé pour la rétro-transcription

Matériel	Firme	Stockage
Kit PROMEGA: Enzyme Mix Buffer Mix Oligo dT H_2O RNase Free	Promega, USA	- 20°C

Table 15 : Matériel utilisé pour la qPCR

Matériel	Firme	Stockage
PowerSYBRGreenPCR Master Mix	Promega, USA	- 20°C
H_2O milliQ	Milipore, Allemagne	RT

Table 16 : Amorces utilisées pour la qPCR

Gène	Séquence de l'amorce Forward	Séquence de l'amorce Reverse
GAPDH	ACCCACTCCACCTTTGAC	GTCCACCACCCTGTTGCTGTA
IL-8	CTGGCCGTGGCTCTCTTG	GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG
p21	GGAGACTCTCAGGGTCGAAA	GGATTAGGGCTTCCTCTTGG
IGFBP3	CAGAGCACAGATACCCAGAACTTC	CACATTGAGGAACTTCAGGTGATT

peut se faire à l'aide d'un agent intercalant fluorescent (SYBR Green) qui s'intercale dans l'ADN double-brin lors de l'amplification de l'ADN. Le niveau auquel la fluorescence est mesurable est appelé le cycle de seuil (Ct). Un nombre de Ct élevé pour un gène signifie qu'il y avait moins d'ADN au départ et inversement.

7.1 Matériel

Voir Tables 13, 14, 15 et 16.

7.2 Méthode

7.2.1 Extraction ARN

48 heures avant l'extraction ARN, 160000 cellules sont ensemencées dans des plaques six puits sous forme d'une goutte de 200 µL contenant une densité de 800 cellules/µL. 3 heures plus tard, du milieu MEM contenant de la pénicilline-streptomycine à 0,5 % est ajouté. Le lendemain, 3-4 heures après l'ajout des inhibiteurs dans le milieu CO_2 indépendant les cellules sont irradiées à 0 Gy et 2 Gy.

24 heures plus tard, l'extraction d'ARN est réalisée. Etant donné que l'ARN est une molécule plus fragile que l'ADN, il est important de travailler dans des conditions « RNAse-Free ». Le matériel ainsi que les solutions utilisées sont donc RNAse free, le port des gants est obligatoire et la zone de travail doit être nettoyée au SDS 1% avant de commencer l'extraction. L'extraction d'ARN se fait de manière automatisée en utilisant le RNeasy Mini Kit et le Qiacube (Qiagen, Allemagne). Avant de placer les échantillons dans la machine, les cellules doivent être lysées à l'aide d'un tampon de lyse RLT (350 µL/puits). Les cellules sont raclées à l'aide d'un grattoir et le lysat est collecté. Ensuite, en suivant le protocole fourni par le fournisseur, les échantillons ainsi que le matériel nécessaire sont placés dans le QiaCube qui exécute toutes les étapes nécessaires à la purification de l'ARN, c'est-à-dire des étapes de centrifugation, de rinçage et d'élution. L'ARN purifié est ensuite récupéré dans un volume de 40 µL. Les échantillons sont ensuite dosés à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop (Thermo scientific, USA) pour connaître la concentration en ARN. Le spectrophotomètre permet également d'évaluer les contaminations en protéines et en sels des échantillons, ce qui permet de déterminer la pureté de l'ARN extrait.

7.2.2 Rétro-transcription

La rétrotranscription de l'ARN en ADN se réalise également dans des conditions RNAse-Free. Elle est réalisée à l'aide du Kit Promega (Promega, Allemagne). D'abord, 2 µg d'ARN totaux sont dilués dans de l'eau RNAse free afin d'obtenir un volume total de 12 µL. Ensuite, les échantillons sont incubés durant 5 minutes à 70°C afin de dénaturer la structure secondaire de l'ARN. Durant ce temps, un mix de réaction contenant comprenant 4 µL de Buffer avec oligo dT, 2 µL Enzyme Mix et 2 µL d'eau RNAse Free, est préparé pour chaque échantillon. Une fois que la dénaturation est terminée, les échantillons sont directement mis sur glace et 8 µL du mix sont ajoutés par test. Le mélange est ensuite incubé durant 5 minutes à 25°C pour l'hybridation des amorces, 60 minutes à 42°C pour la polymérisation en ADNc et 15 minutes à 70°C pour l'inactivation de l'enzyme et afin de déshybrider le complexe ARNm/ADN. Ces étapes d'incubation sont réalisées de manière automatisée dans le Thermocycler (Eppendorf, Allemagne). Les échantillons d'ADNc obtenus sont stockés à -20°C.

Table 17 : Matériel utilisé pour le marquage de la SA-βgal

Matériel	Fournisseur	Stockage
PBS : - 20 mL de tampon phosphate 0,5 M - 9 g NaCl - Qsp 1 L d'eau milliQ	 Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA	4°C
Solution de fixation : - 2 % formaldéhyde - 0,2 % glutaraldéhyde - PBS	 Belgolabo, Belgique Merck Millipore, USA	4°C
Solution de coloration : - Tampon phosphate, pH 6 NaH_2PO_4 0,1 M $NaHPO_4$ 01 M - Ferrocyanure de potassium 0,1 M - Ferricyanure de potassium 0,1 M - NaCl 2,5 M - $MgCl_2$ 1 M - Solution de X-gal (20 mg/mL) dilué dans du N,N-diméthylformamide - H_2O	 Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Amresco, USA Janssen Chimica, Belgique	4°C
Méthanol	Merck, Allemagne	RT

7.2.3 PCR en temps réel (qPCR)

Cette étape est réalisée en plaque 96 puits. Pour chaque gène testé, un mix réactionnel comprenant 2 µL d'eau milliQ, 2 µL d'amorce forward, 2 µL d'amorce reverse et 10 µL de PowerSYBRGreenPCR Master Mix est préparé. Les amorces sont diluées afin d'obtenir une concentration finale de 300 nM. Ensuite, 16 µL du mix sont ajoutés par puits. A ces 16 µL sont rajoutés 4 µL d'ADNc dilué 100X dans de l'eau. Chaque échantillon est analysé en duplicat. Une fois les échantillons déposés dans la plaque 96 puits, un film adhésif est déposé sur la plaque afin de la sceller. La plaque est ensuite centrifugée durant 1 minute à 1200 rpm avant d'être placée dans la machine ViiA 7 (Thermo Fisher Scientific, USA). Ensuite, le run est lancé. Durant le run, les échantillons subissent une succession de 40 cycles d'incubations de durées différentes à différentes températures. La température est d'abord augmentée à 95° afin de dénaturer l'ADN. Ensuite, la température diminue jusqu'à 65°C afin que les amorces puissent se lier à l'ADN et permettre la synthèse d'un nouveau brin d'ADN. Enfin, la température remonte jusqu'à 74°C pour l'élongation de l'ADN.

8 Détection de l'activité β-galactosidase associée à la sénescence (SA-βgal)

La β-galactosidase est une enzyme lysosomale catalysant l'hydrolyse des β-galactosides en monosaccharide à pH 4. Cette enzyme est surexprimée dans les cellules sénescentes et peut être active jusqu'à un pH de 6. La β-galactosidase est capable de cliver le X-gal, produisant un composé bleu. En utilisant un tampon à pH 6, les cellules sénescentes peuvent donc être distinguées des cellules non sénescentes.

8.1 Matériel

Voir Table 17.

8.2 Méthode

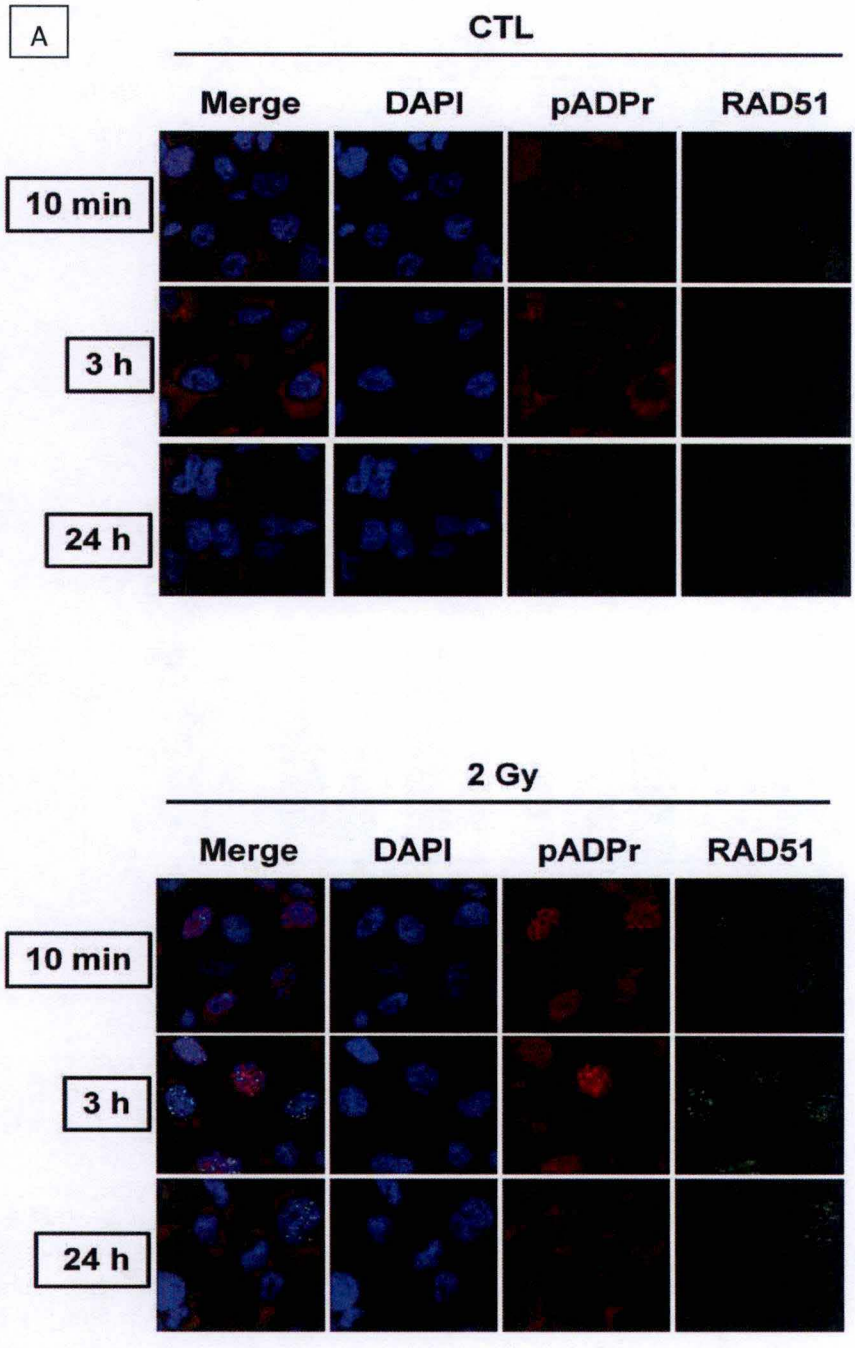
24 heures avant l'irradiation, 160 000 cellules sont ensemencées dans des plaques six puits sous forme d'une goutte de 200 µL contenant une densité de 800 cellules/µL. 3 heures plus tard, du milieu MEM contenant de la pénicilline-streptomycine à 0,5 % est ajouté.

Le lendemain, 3-4 heures après l'ajout du milieu CO_2 indépendant, les cellules sont irradiées aux doses de 0 Gy et 2 Gy. Directement après l'irradiation, les cellules sont trypsinisées, comptées dans des plaques 6 puits dans du milieu MEM, supplémenté de 10 % de sérum et de pénicilline-streptomycine à 0,5 %. Le nombre de cellules ensemencées dépend de la dose d'irradiation utilisée (Table 5). Les cellules restent durant 7 jours à 37 ° C dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2.

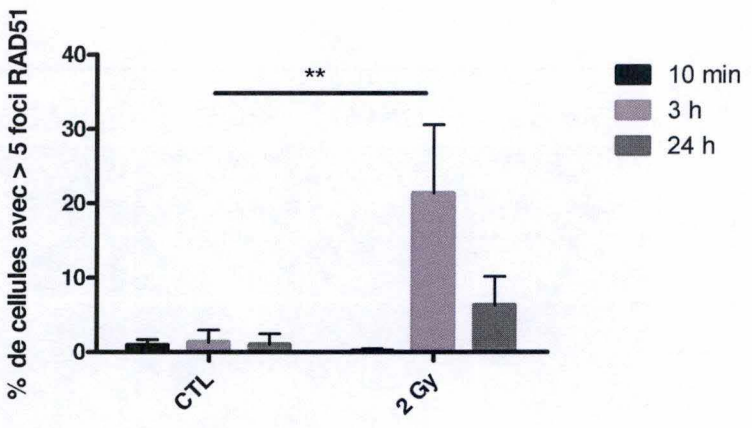
Les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de fixation (2 mL/puits) pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées deux fois au PBS (2 ml/puits) et incubées 16 heures dans une solution de coloration (2 mL/puits) fraichement préparée contenant du X-gal (20 mg/mL), du tampon phosphate à pH 6,0, du ferricyanure de potassium (100 mM), du ferrocyanure de potassium (100 mM), du NaCl (2,5 M), et du $MgCl_2$ (1M).

Après l'incubation, les cellules sont rincées deux fois au PBS (2 mL/puits) et deux fois au méthanol (2 mL/puits) et sont laissées à sécher à l'air sous hotte chimique, à l'abri de la lumière. Les cellules sénescentes sont visualisées ensuite au microscope optique.

III. RESULTATS


A
CTL
Merge
DAPI
pADPr
RAD51
10 min
3 h
24 h
2 Gy
Merge
DAPI
pADPr
RAD51
10 min
3 h
24 h

B



C

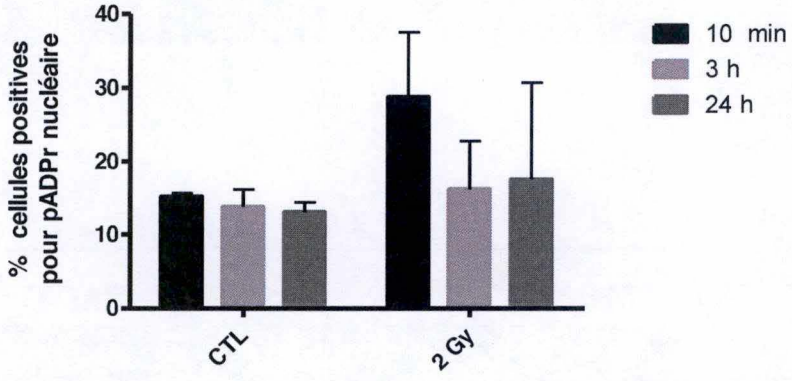


Figure 1: Niveau de pADPr et formation de foci RAD51 après irradiation à 2 Gy. (A) Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles couvre-objet 24 heures avant l'irradiation, irradiées ou non à 2 Gy et ont été fixées 10 minutes, 3 heures et 24 heures après l'irradiation. 3-4 heures avant l'irradiation, du milieu avec sérum a été ajouté. Le noyau a été coloré par le DAPI, pADPr est détecté en utilisant l'anticorps monoclonal anti-pADPr et RAD51 est détecté en utilisant l'anticorps polyclonal anti-RAD51. L'observation a été réalisée en utilisant un microscope confocal à fluorescence en gardant le photomultiplicateur constant (grossissement 40x). Quantification de la formation des foci RAD51 (B) et du niveau de pADPr (C). Au moins 400 cellules ont été comptées pour évaluer le pourcentage de cellules positives pour pADPr et le pourcentage de cellules ayant plus de 5 foci de RAD51. Les comparaisons par paires ont été réalisées en utilisant une analyse ANOVA unidirectionnelle (**: $0,001 < P < 0,01$). 3 expériences indépendantes ont été réalisées.

1 Dommages à l'ADN et mécanismes de réparation de l'ADN

1.1 Niveau de pADPr et formation de foci RAD51 après irradiation à 2 Gy

En réponse aux dommages induits à l'ADN, les mécanismes de réparation de l'ADN sont activés. Un marquage par immunofluorescence a été réalisé afin de détecter l'effet de l'irradiation par rayons X sur les protéines ciblées par les inhibiteurs. Ces protéines sont pADPr (réparation des SSB) pour l'olaparib et RAD51 (réparation des DSB) pour B02. Pour cela, le niveau de pADPr nucléaire qui est la forme catalytiquement active de PARP et la formation de foci de RAD51 ont été évalués à trois temps différents post-irradiation: 10 minutes, 3 heures et 24 heures après une irradiation à 2 Gy dans du milieu contenant du sérum.

La Figure 1.A représente les images du marquage par immunofluorescence pour le niveau de pADPr et la formation de foci RAD51 après irradiation à 2 Gy aux 3 différents temps. Pour la quantification, le pourcentage de cellules ayant plus de 5 foci de RAD51 et le pourcentage de cellules positives (seuil calculé à partir des cellules témoins) pour pADPr nucléaire sont représentés respectivement à la Figure 1.B et à la Figure 1.C. La Figure 1.B montre que 21,3 % des cellules présentaient plus de 5 foci RAD51 3 heures après l'irradiation à 2 Gy, ce qui est statistiquement plus élevé que dans les cellules non irradiées. Après 24 heures, seulement 6,4 % des cellules irradiées contenaient plus de cinq foci de RAD51. Cela suggère une réparation des DSB. Aucune différence n'a été observée 10 minutes après l'irradiation par rapport au témoin. En ce qui concerne le niveau de pADPr, la Figure 1.C montre que 28,8 % des noyaux étaient déjà positifs 10 minutes après l'irradiation à 2 Gy par rapport au témoin non irradié. 3 heures et 24 heures après l'irradiation, le niveau de pADPr revient à la valeur des cellules non irradiées. Ces résultats suggèrent une réparation complète de SSB après 3 heures (16,2 %) et 24 heures (17,7 %) post-irradiation.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le niveau d'activité des protéines ciblées par les inhibiteurs est plus élevé lorsque les cellules A549 ont été irradiées à 2 Gy par rapport aux cellules contrôles non irradiées. De plus, les DSB (RAD51) semblent avoir besoin de plus de temps pour être réparés après irradiation à 2 Gy par rapport aux SSB (pADPr) qui sont déjà réparés après 3 heures.

2 L'arrêt du cycle cellulaire, mort cellulaire et courbes de survie

2.1 Arrêt du cycle cellulaire et évaluation de l'apoptose après irradiation à 2 Gy

Etant donné que les radiations ionisantes mènent à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort cellulaire, nous avons voulu évaluer les effets de l'olaparib, de B02, ainsi que leur combinaison sur l'arrêt du cycle cellulaire 4 heures et 24 heures après une irradiation à 2 Gy en présence ou en absence de sérum dans le milieu. Nous avons également évalué leur effet sur l'apoptose 24 heures après irradiation, en présence ou en absence de sérum. Pour ce faire, nous avons choisi de mesurer l'abondance protéique de p53 et p21 pour évaluer l'arrêt du cycle cellulaire et le taux de PARP, de PARP clivée, de caspase 7 et de caspase 7 clivée pour quantifier l'apoptose. La méthode utilisée pour évaluer l'abondance relative de ces protéines est le Western-Blot.

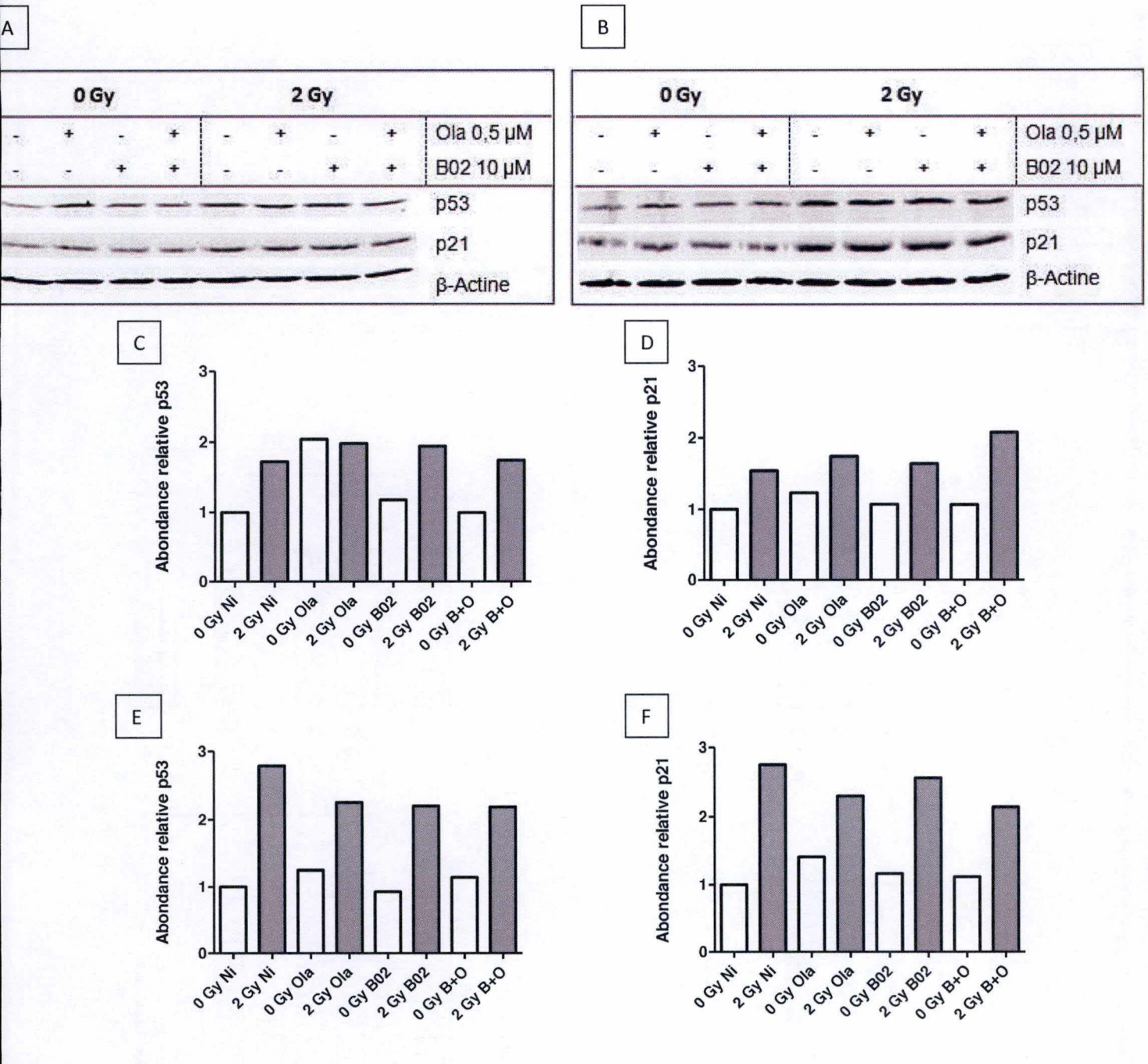
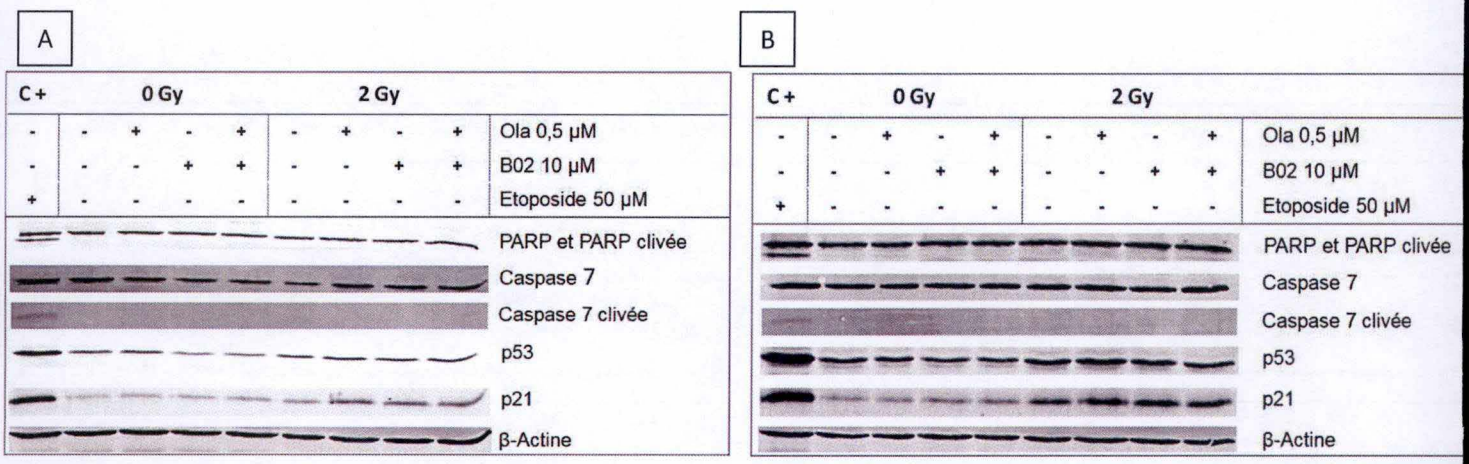


Figure 2 : Effet de l'irradiation par rayons X à une dose de 2 Gy sur l'abondance des protéines p21 et p53. 3-4 heures avant l'irradiation, l'olaparib 0,5 µM et B02 10 µM ont été ajoutés seuls ou en combinaison dans un milieu avec et sans sérum. Les cellules ont été irradiées à 2 Gy et l'extraction des protéines a été effectuée 4 heures après l'irradiation. L'abondance de p21 et de p53 a été évaluée par Western-blot pour les cellules incubées dans un milieu sans (A) ou avec du sérum (B). Le contrôle de charge utilisé pour la normalisation est la β-actine. L'abondance relative de p53 et p21 dans le milieu sans sérum (C) et (D) et avec sérum (E) et (F) a été normalisée par rapport aux cellules contrôles (pas d'irradiation, sans inhibiteur). Une seule expérience a été réalisée.



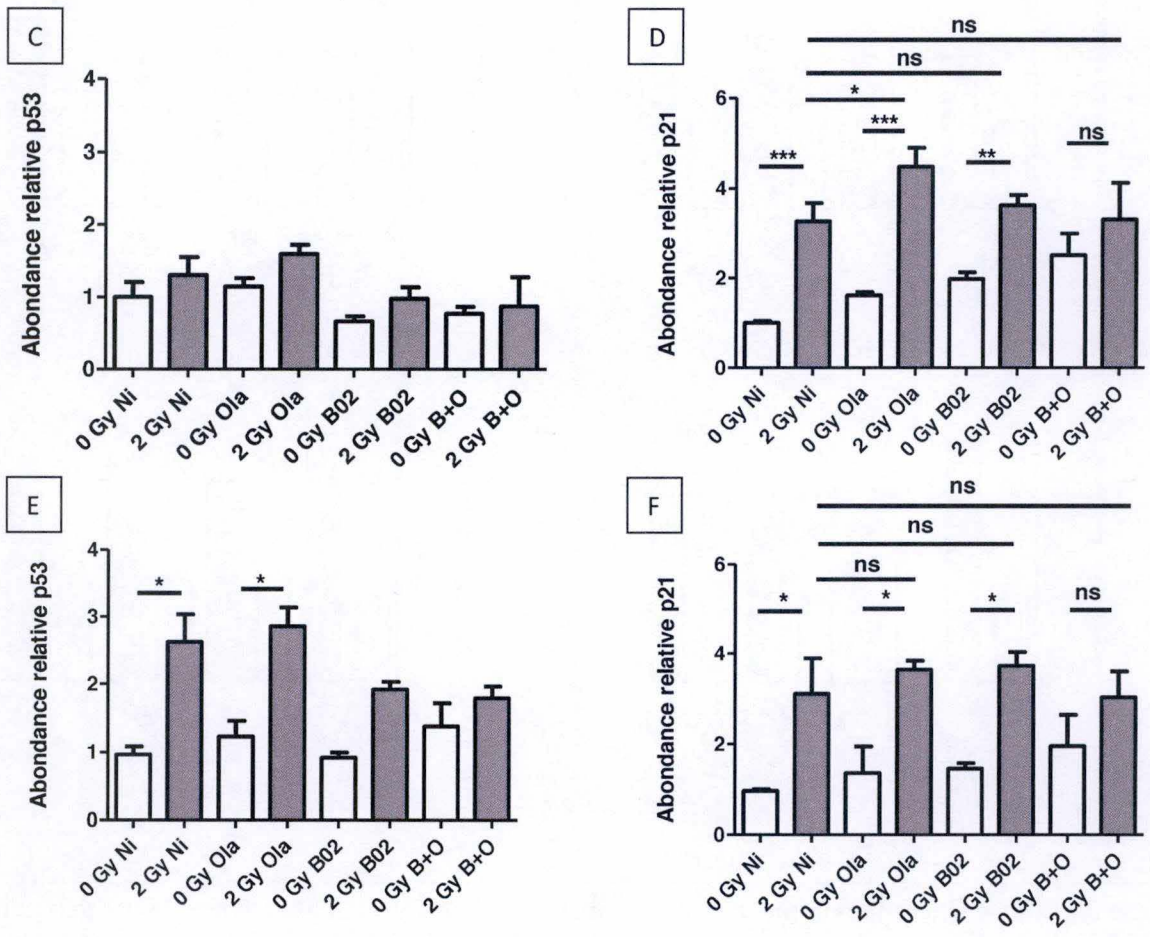


Figure 3 : Effet de l'irradiation par rayons X à une dose de 2 Gy sur l'abondance des protéines p21 et p53. 3-4 heures avant l'irradiation, l'olaparib 0,5 µM et B02 10 µM ont été ajoutés seuls ou en combinaison dans un milieu avec et sans sérum. Les cellules ont été irradiées à 2 Gy et l'extraction de la protéine a été effectuée 24 heures après l'irradiation. L'abondance de p21, de p53, de la caspase-7 clivée et de PARP clivée a été évaluée par Western-blot pour les cellules incubées dans un milieu sans (A) ou avec du sérum (B). Le contrôle de charge utilisé pour la normalisation est la β-actine. L'abondance relative de p53 et p21 dans le milieu sans sérum (C) et (D) et avec sérum (E) et (F) a été normalisée par rapport aux cellules contrôles (pas d'irradiation, sans inhibiteur). 3 expériences indépendantes ont été réalisées. Les comparaisons par paires ont été réalisées en utilisant une analyse ANOVA unidirectionnelle et les comparaisons avec le contrôle (sans inhibiteur, non irradié) avec un post test de Tukey (NS: non significatif, *: 0,01 <P <0,05, **: 0,001 <P <0,01, *** P <0,001).

Les résultats des analyses par Western-blot sont présentés aux Figures 2 et 3. Ces analyses ont été réalisées respectivement 4 heures et 24 heures après irradiation. Les western blot réalisés pour le temps 4 heures dans un milieu sans sérum sont représentés à la Figure 2.A et avec sérum à la Figure 2.B. Tandis que les western blot réalisés 24 heures après irradiation dans un milieu sans sérum sont présentés à la Figure 3.A et ceux avec sérum à la Figure 3.B.

Les résultats de la Figure 2.C montrent une augmentation de l'expression de p53 lorsque les cellules sont irradiées à 2 Gy en absence de sérum, sauf lorsque l'olaparib est ajouté. L'abondance relative de p53 est augmentée respectivement de 1,7 fois lorsque les cellules sont irradiées sans inhibiteur, 1,6 fois pour les cellules irradiées en présence de B02 et 1,8 fois lorsque les cellules sont irradiées avec les inhibiteurs combinés. L'expression de p21 (Figure 2.D) est également augmentée lorsque les cellules sont irradiées à la dose de 2 Gy par rapport aux cellules non irradiées. Cette augmentation est observée lorsque les cellules sont irradiées sans inhibiteur (1,5 fois), en présence d'olaparib (1,4 fois), avec le B02 (1,5 fois) et pour les deux inhibiteurs combinés (2 fois).

Lorsque du sérum est ajouté dans le milieu, les résultats sont similaires et montrent une augmentation de l'expression de p53 quand les cellules sont irradiées (Figure 2.E). Cette augmentation est de 2,8 fois lorsque les cellules sont irradiées en absence d'inhibiteur, de 1,8 fois pour l'olaparib, de 2,4 en présence de B02 et 1,9 lorsque les inhibiteurs sont combinés. Concernant p21, l'abondance relative est également augmentée après l'irradiation. L'augmentation de l'expression de p21 est de 1,5 fois, 1,4 fois, 1,5 fois et 2 fois respectivement, lorsque les cellules sont irradiées en absence d'inhibiteur, en présence d'olaparib, en présence de B02 et avec les inhibiteurs combinés (Figure 2.F).

Les résultats de la Figure 3.C montrent une légère augmentation de p53 pour les cellules irradiées en absence de sérum. Toutefois, cette augmentation est non significative par rapport aux cellules non irradiées et aucun effet des inhibiteurs n'a été montré. Pour l'arrêt du cycle cellulaire en absence de sérum, les résultats ont montré que l'abondance relative de p21 a été augmentée pour les cellules irradiées à 2 Gy par rapport au contrôle non irradié (Figure 3.D). L'abondance relative de p21 a été signicativement augmentée respectivement de 3,3 fois pour les cellules irradiées sans inhibiteur comparé au cellules non irradiées sans inhibiteur, de 2,8 fois pour les cellules irradiées en présence d'olaparib et de 1,8 fois pour les cellules irradiées avec B02 mais pas pour les cellules irradiées avec les inhibiteurs combinés.

Pour les cellules irradiées en présence de sérum (Figure 3.E et 3.F), les résultats montrent une augmentation significative de l'expression de p53 dans les cellules irradiées sans inhibiteur (2 fois) et avec olaparib (3,2 fois). Une augmentation a également été montrée avec B02 (1,90 fois) et les inhibiteurs combinés (2,9 fois), mais elle n'est pas significative. De plus, aucun effet des inhibiteurs n'a été montré. En ce qui concerne p21, les résultats restent assez similaires et montrent que l'expression de p21 (Figure 3.F) est 2,3 fois plus élevée lorsque les cellules ont été irradiées sans inhibiteur, 5 fois plus élevée lorsqu'elles sont irradiées en présence d'olaparib, 2,7 fois plus élevée lorsque les cellules sont irradiées en présence de B02 et 3,2 fois plus élevée pour les cellules irradiées avec les inhibiteurs combinés, en comparaison avec les contrôles non irradiés. L'augmentation de l'expression de p21 est significative sauf lorsque les inhibiteurs sont combinés. De plus, les inhibiteurs n'ont pas montré d'effet. Comme dans les cellules contrôles irradiées sans sérum, l'expression de p21 est augmentée en présence des inhibiteurs. Que ce soit en présence (Figure 3.B) ou en absence de sérum (Figure 3.A), les protéines PARP clivée et caspase-7 clivée ne sont pas visibles sur le western-blot, suggérant qu'il n'y a pas d'activation de l'apoptose 24 heures après

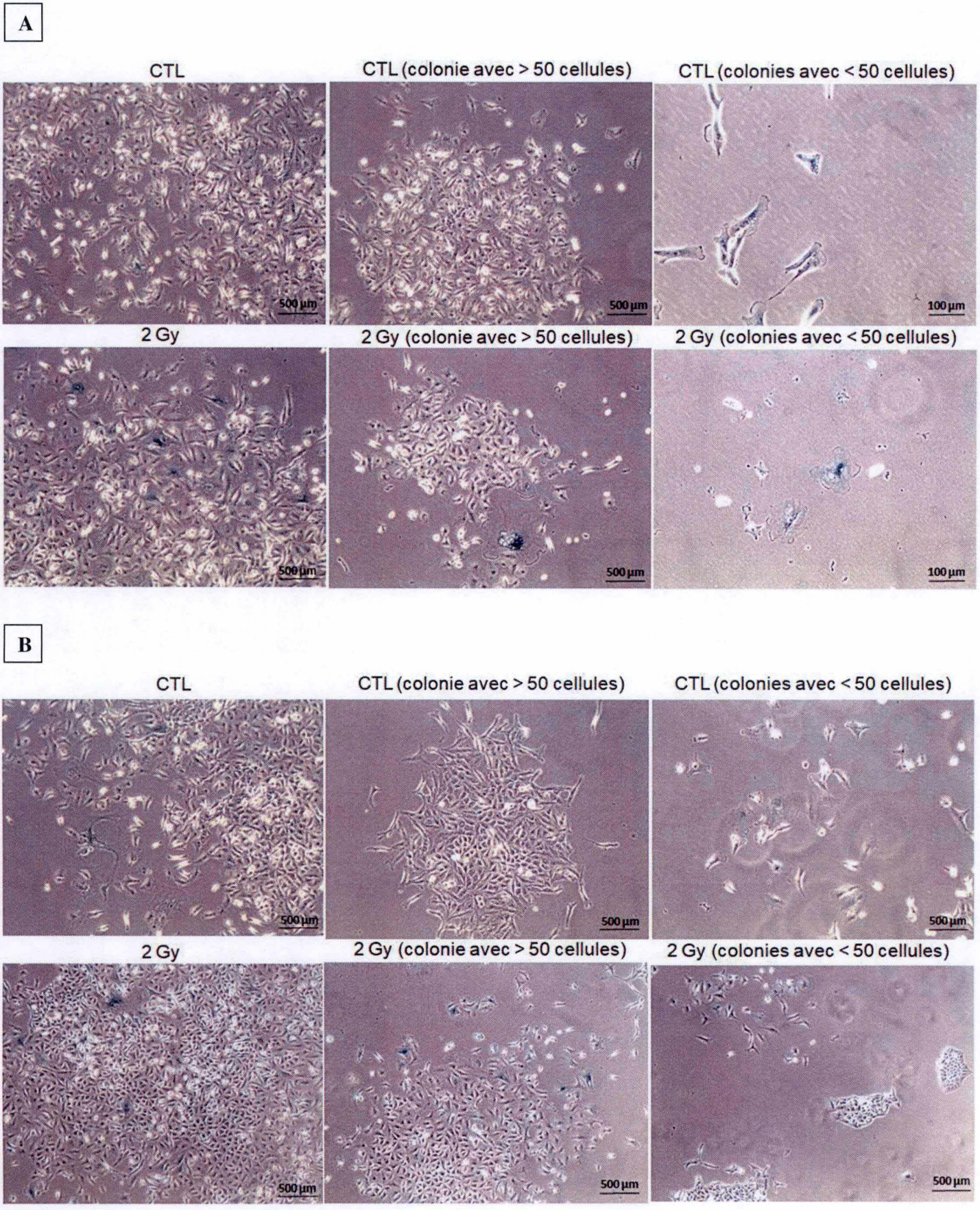


Figure 4 : Induction de la sénescence après irradiation à 2 Gy. 3-4 heures avant l'irradiation, du milieu avec ou sans sérum a été ajouté. 7 jours après l'irradiation, les cellules ont été marquées pour leur activité SA-βgalactosidase, colorant les cellules sénescentes en bleu. Les photos représentent une vue d'ensemble des cellules ainsi que des colonies avec plus ou moins de 50 cellules par colonie sans sérum (A) et avec sérum (B). L'expérience a été réalisée une seule fois.

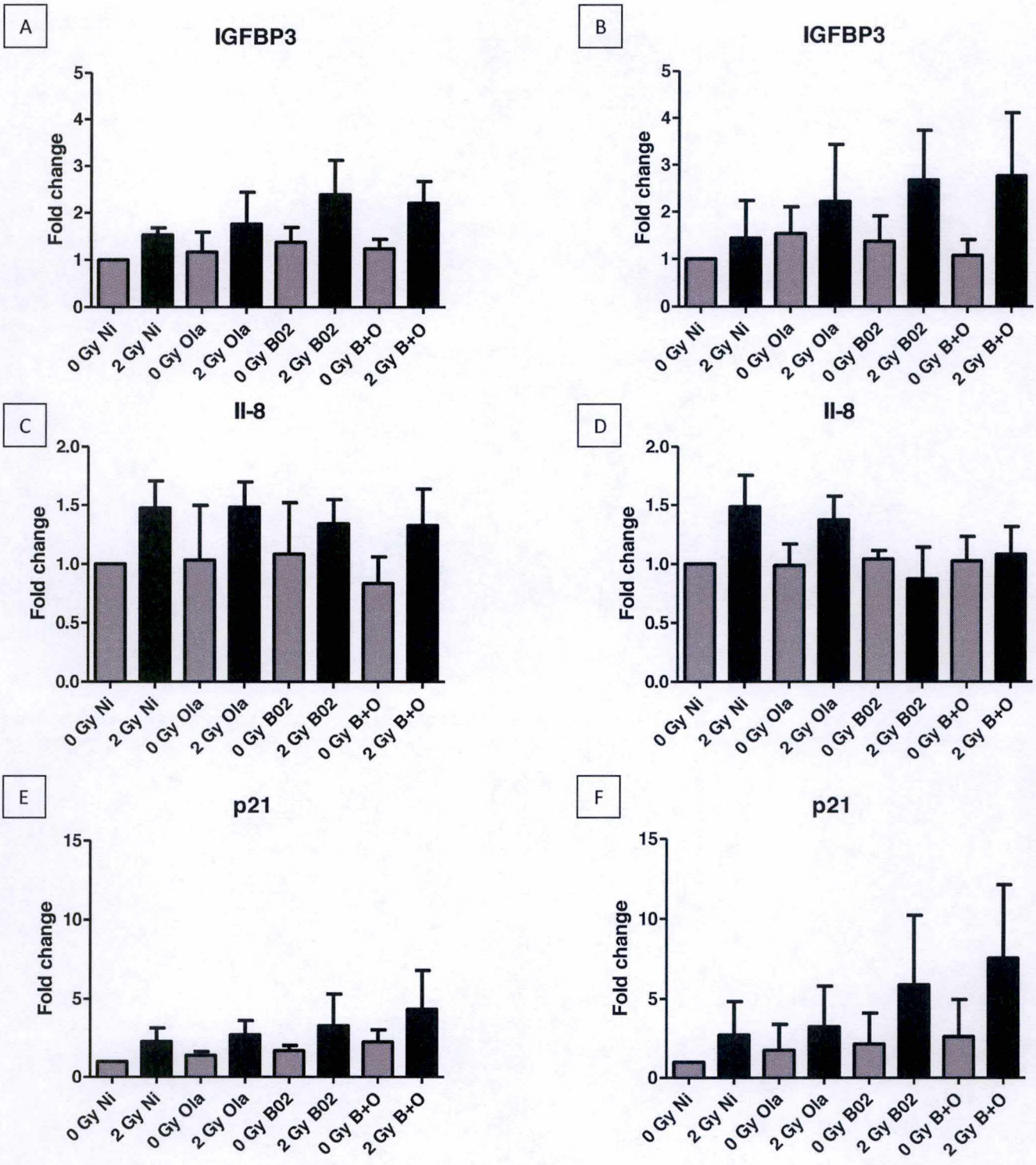


Figure 5 : Effet de l'irradiation par rayons X à une dose de 2 Gy sur l'expression des gènes IGFBP3, Il-8 et p21. 3-4 heures avant l'irradiation, l'olaparib 0,5 µM et B02 10 µM ont été ajoutés seuls ou en combinaison dans un milieu avec et sans sérum. Les cellules ont été irradiées à 2 Gy et l'extraction de la protéine a été effectuée 24 heures après l'irradiation. L'expressiond'IGFBP3, de l'Il-8 et de p21 a été évaluée par RT-qPCR. Le housekeeping gene utilisé pour la normalisation est la GAPDH (23 kDa). L'expression relative d'IGFBP3 (A), de l'IL-8 (C) et de p21 (E) dans le milieu sans sérum ou avec sérum (B), (D) et (F) a été normalisée par rapport aux cellules contrôles (pas d'irradiation, sans inhibiteur). 3 expériences indépendantes ont été réalisées. Les comparaisons par paires ont été réalisées en utilisant une analyse ANOVA unidirectionnelle et les comparaisons avec le contrôle avec un post test de Tukey.

l'irradiation à 2 Gy. Un contrôle positif (C+) à l'étoposide a été utilisé afin d'appuyer ces résultats (Figures 3.A et 3.B). L'étoposide a été ajouté dans le milieu contenant les cellules pendant 24 heures à une concentration de 50 µM. Dans ce cas, on observe bien le clivage de PARP et de la caspase 7, indiquant que la technique est appropriée.

Ensemble, ces résultats suggèrent que 4 heures après l'irradiation par rayons X à une dose de 2 Gy, p53 est active et par conséquent mène à la surexpression p21, induisant l'arrêt du cycle cellulaire. Après 24 heures, p53 semble être encore active mais les résultats ne sont pas significatifs et l'expression relative est moins élevée qu'à 4 heures. Toutefois, l'expression de p21 est davantage augmentée 24 heures après l'irradiation comparé à 4 heures. De plus, aucun effet des inhibiteurs n'a été montré sauf pour p21 qui a montré une différence significative lorsque les cellules sont irradiées sans inhibiteur ou avec l'olaparib dans le milieu contenant du sérum. Enfin, il n'y a pas d'induction de l'apoptose 24 heures après l'irradiation à 2 Gy.

2.2 Induction de la sénescence par les rayons X

Etant donné que l'apoptose n'est pas le seul type de mort cellulaire, nous avons voulu étudier la sénescence, qui est un autre type de mort cellulaire. Ceci a été réalisé après une irradiation à 2 Gy des cellules A549. Pour cela, nous avons décidé d'évaluer plusieurs marqueurs de la sénescence tels que la SA-βgalactosidase, qui est le marqueur le plus utilisé en recherche (Ewald et al., 2010), ainsi que l'expression des gènes Il-8, p21 et IGFBP3. L'activité de la SA-βgalactosidase a été évaluée par un test SA-βgal tandis que le niveau d'expression des gènes Il-8, IGFBP3 et p21 a été évalué par RT-qPCR.

2.2.1 Induction de la sénescence après irradiation à 2 Gy

L'activité SA-βgalactosidase des cellules A549 a été étudiée 7 jours après une irradiation à 2 Gy en présence et en absence de sérum en comparaison avec un contrôle non irradié. Les résultats de la Figure 4 montrent que lorsque les cellules sont irradiées à 2 Gy, le nombre de cellules positives pour l'activité SA-βgal (c'est-à-dire le nombre de cellules avec une coloration bleue) est augmenté en comparaison avec le contrôle non irradié. Cela est visible lorsque les cellules sont isolées ou en colonie, que ce soit en présence ou en absence de sérum (Figure 4). Ces résultats suggèrent qu'il y a une induction de la sénescence après une irradiation par rayons X à une dose de 2 Gy.

2.2.2 Evaluation de l'expression de p21, IGFBP3 et IL-8 après irradiation à 2 Gy

Les résultats des RT-qPCR sont représentés à la Figure 5. Une tendance à une augmentation est visible pour le taux d'expression d'IGFBP3 lorsque les cellules sont irradiées en absence de sérum (Figure 5.A) et en présence de sérum dans le milieu (Figure 5.B). Les résultats de la Figure 5.A montrent une augmentation d'environ 1,5 fois lorsque les cellules sont irradiées en absence d'inhibiteurs, en présence d'olaparib, en présence de B02 et lorsque les deux inhibiteurs sont combinés en comparaison avec les contrôles non irradiés. En présence de sérum, les résultats tendent également à augmenter lorsque les cellules irradiées sans inhibiteur (1,4 fois), avec l'olaparib (1,4 fois), avec le B02 (2 fois) et pour la

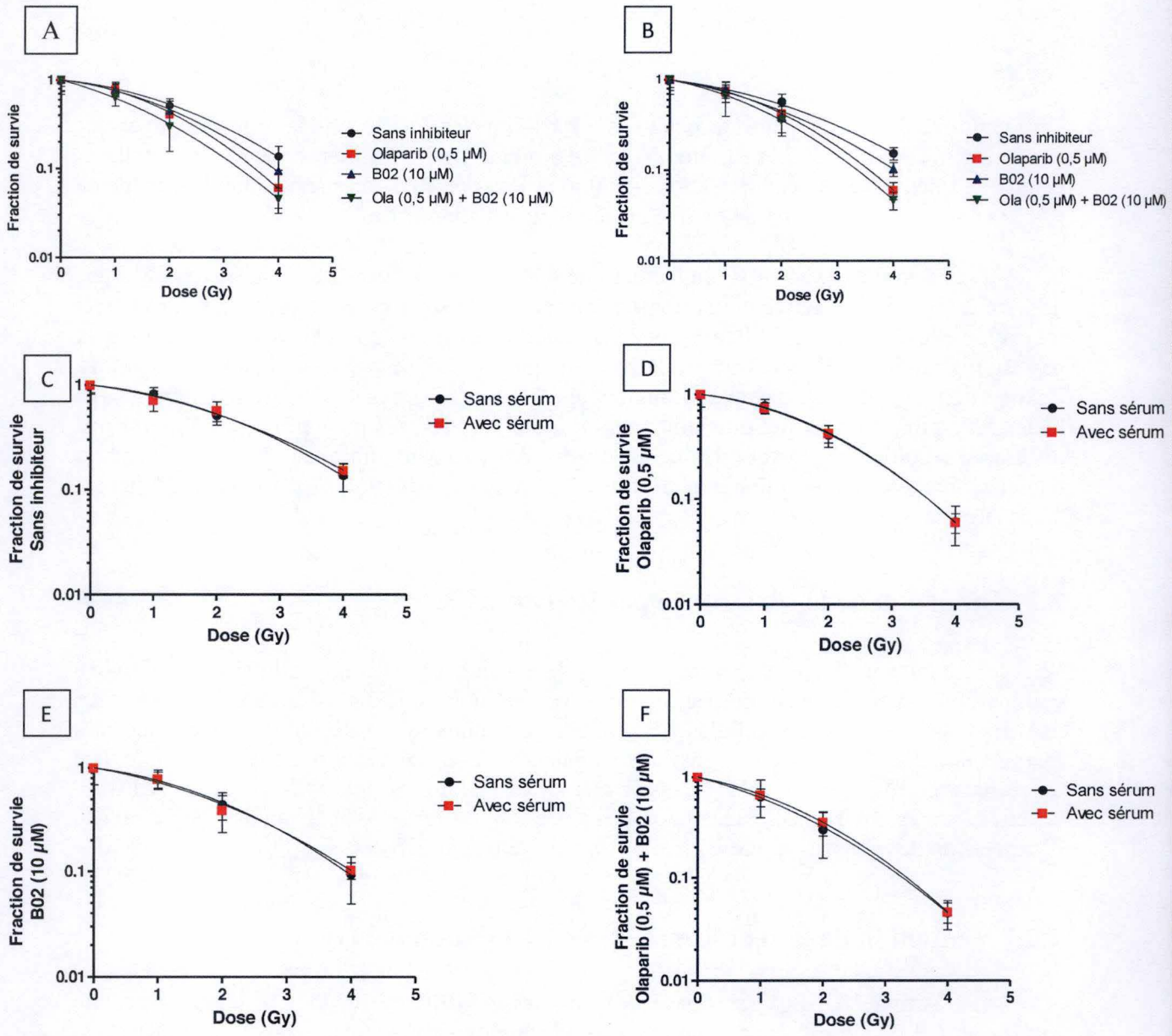


Figure 6: Effet radiosensibilisant de l'olaparib, du B02 et de leur combinaison dans les cellules A549. 3-4 heures avant l'irradiation, l'olaparib 0,5 µM et B02 10 µM ont été ajoutés seuls ou en combinaison dans un milieu avec ou sans sérum. Les cellules sont irradiées à 4 doses différentes (0 Gy, 1 Gy, 2 Gy et 4 Gy). 12 jours plus tard, les cellules sont colorées au crystal violet et sont comptées afin d'obtenir le plating efficiency et les fractions de survies. Les données expérimentales ont été ajustées au modèle LQ en prenant les déviations standard en compte (loi de régression des moindres carrés). Les courbes de survie de cellules A549 irradiées par rayons X dans un milieu sans sérum (A) ou avec sérum (B) en présence d'aucun inhibiteur (C), olaparib à 0,5 µM (D), B02 à 10 µM (E) ou olaparib à 0,5 µM + B02 à 10 µM (F). Les résultats sont présentés comme des moyennes ± 1 écart-type de 3 expériences indépendantes et 12 puits sont comptés pour chaque donnée.

combinaison des deux molécules (2,6 fois) (Figure 5.B). Cette augmentation de l'expression de IGFBP3 due à l'irradiation n'est pas significative et les inhibiteurs ne montrent pas d'effet.

Lorsque le sérum n'est pas ajouté dans le milieu, en comparaison avec les contrôles non irradiés, l'expression de l'IL-8 tend à augmenter lorsque les cellules sont irradiées en absence des inhibiteurs et en présence d'olaparib. Tandis que l'expression de l'IL-8 n'augmente pas lorsque les cellules sont irradiées en présence de B02 et avec les inhibiteurs combinés (Figure 5.C). Toutefois, lorsque les cellules sont irradiées en présence de sérum (Figure 5.D), l'expression de l'IL-8 est augmentée lorsque les inhibiteurs sont absents, en présence d'olaparib, mais également lorsque le B02 et les inhibiteurs combinés sont ajoutés dans le milieu, contrairement à ce qui a été observé lorsque le milieu des cellules ne contenait pas de sérum. Les résultats ne sont pas significatifs et les inhibiteurs ne montrent pas d'effet que ce soit en présence ou en absence de sérum.

Les résultats pour le milieu sans sérum montrent une tendance à une augmentation de l'expression de p21de 2 fois lorsque les cellules sont irradiées sans inhibiteurs, en présence d'olaparib, en présence de B02 et lorsque les inhibiteurs sont combinés en comparaison avec les cellules non irradiées (Figure 5.E). Lorsque le sérum est ajouté (Figure 5.F), les résultats restent similaires. Que ce soit en présence ou en absence de sérum, les résultats ne sont pas significatifs et aucun effet des inhibiteurs n'a été montré.

Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour évaluer l'expression de ces différents gènes. Pour chacune de celles-ci, une augmentation est toujours visible mais le fold change est différent d'une expérience à l'autre, ce qui engendre une grande variabilité. Ceci explique pourquoi les analyses statistiques n'ont pas montré de différences significatives. Toutefois, ces résultats suggèrent qu'il y a une induction de la sénescence 24 heures après une irradiation à 2 Gy, que ce soit en présence ou en absence de sérum dans le milieu.

3 Radiosensibilité des cellules A549

3.1 Effet radiosensibilisant de l'olaparib, du B02 et de leur combinaison dans les cellules A549

Etant donné que les tests de clonogénicité sont le gold standard en radiothérapie, nous avons réalisé ces tests afin de caractériser les effets des rayons X en association avec l'olaparib et le B02 seuls ou combinés dans des cellules A549, en présence ou en absence de sérum.

La Figure 6 montre la réponse des cellules A549 aux rayons X (225 kV) en présence et en absence de sérum dans le milieu contenant les inhibiteurs : olaparib à 0,5 µM, B02 à 10 µM, ou de la combinaison d'olaparib à 0,5 µM et B02 à 10 µM. Pour obtenir les courbes de survie, nous avons effectué une irradiation aux rayons X à un débit de dose de 2 Gy/min, à quatre doses différentes (0 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy).

Les résultats de la Figure 6.A, réalisés dans un milieu sans sérum, montrent une diminution de la fraction de survie lorsque la dose d'irradiation est augmentée. Cette diminution est plus importante lorsque les cellules sont irradiées avec l'olaparib ou le B02 en comparaison avec les cellules irradiées sans inhibiteur (contrôle). Les fractions de survie à 2 Gy étaient respectivement égales à 51 % pour les cellules irradiées sans inhibiteur, 44 % pour

Tableau 1 : Paramètres de radiosensibilité et valeurs du sensitivity enhancement ratio (SER) pour les cellules A549 irradiées dans du milieu sans sérum. Abréviation: SER50 = sensitivity enhancement ratio à 50 % de survie. Les données sont présentées sous forme de paramètres ± erreurs types. Les R^2 représentent la qualité de l'ajustement au modèle quadratique linéaire.

	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	R^2	SER_{50} sans sérum
Rayons X	0,134 ± 0,028	0,092 ± 0,009	0,9979	
Rayons X + 0,5μM Olaparib	0,136 ± 0,035	0,143 ± 0,012	0,9981	1,19 ± 0,21
Rayons X + 10 μM B02	0,170 ± 0,027	0,107 ± 0,009	0,9986	1,13 ± 0,19
Rayons X + 0,5 μM Olaparib + 10 μM B02	0,372 ± 0,027	0,100 ± 0,007	0,9990	1,55 ± 0,23

Table 2 : Paramètres de radiosensibilité et valeurs du sensitivity enhancement ratio (SER) pour les cellules A549 irradiées dans du milieu avec sérum. Abréviation: SER50 = sensitivity enhancement ratio à 50 % de survie. Les données sont présentées sous forme de paramètres ± erreurs types. Les R^2 représentent la qualité de l'ajustement au modèle quadratique linéaire.

	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	R^2	SER_{50} avec sérum
Rayons X	0,173 ± 0,066	0,074 ± 0,018	0,9846	
Rayons X + 0,5μM Olaparib	0,163 ± 0,004	0,136 ± 0,001	1,000	1,21 ± 0,27
Rayons X + 10 μM B02	0,234 ± 0,084	0,084 ± 0,022	0,9860	1,17 ± 0,52
Rayons X + 0,5 μM Olaparib + 10 μM B02	0,275 ± 0,005	0,123 ± 0,001	0,9999	1,40 ± 0,31

Table 3 : Valeurs du coefficient of drug interaction (CDI) pour les cellules A549 irradiées dans un milieu sans sérum. Un CDI <1, = 1 ou> 1 indique respectivement qu'il existe un effet synergique, additif ou antagoniste des inhibiteurs combinés.

Rayons X	CDI no serum
1 Gy	0,868
2Gy	0,845
4 Gy	1,137

Table 4 : Valeurs du coefficient of drug interaction (CDI) pour les cellules A549 irradiées dans un milieu avec sérum. Un CDI <1, = 1 ou> 1 indique respectivement qu'il existe un effet synergique, additif ou antagoniste des inhibiteurs combinés.

Rayons X	CDI serum
1 Gy	0,972
2Gy	0,990
4 Gy	1,178

B02 et 41 % pour olaparib. De plus, lorsque les inhibiteurs étaient combinés, la fraction de survie était égale à 30 %. Cela indique une diminution plus importante de la fraction de survie par rapport aux cellules contrôles et aux cellules irradiées avec un seul des deux inhibiteurs.

Les données expérimentales ont ensuite été ajustées avec le modèle linéaire quadratique en utilisant GraphPad Prism 5.0 (Logiciel GraphPad) afin de déterminer les paramètres de radiosensibilité α et β (dont la signification a été vue dans l'introduction). Les paramètres de radiosensibilité ont été calculés pour chaque condition en prenant chaque courbe de survie séparément. La Table 1 montre que les paramètres α et ß augmentent lorsque les inhibiteurs sont combinés. Cela suggère une mortalité cellulaire plus importante due aux inhibiteurs. Ces paramètres ont ensuite été utilisés pour calculer le SER (Sensitivity Enhancement Ratio) à 50 % (Table 1). Les résultats montrent une augmentation du SER lorsque les inhibiteurs sont pris séparément en comparaison et une augmentation plus importante lorsque les inhibiteurs sont combinés, en comparaison avec le contrôle sans inhibiteur.

Des tests de clonogénicité ont ensuite été effectués dans un milieu contenant du sérum (Figure 6.B). Les résultats montrent également que la fraction de survie diminue avec l'augmentation des doses et que celle-ci diminue d'autant plus lorsque les deux inhibiteurs étaient ajoutés seuls ou combinés. La fraction de survie à 2 Gy est respectivement égale à 57 % pour les cellules irradiées sans inhibiteur, 39 % pour les cellules irradiées en présence de B02, 42 % pour les cellules irradiées en présence d'olaparib et 35 % pour les cellules irradiées avec la combinaison des deux molécules. Après avoir ajusté les courbes au LQ modèle, les paramètres de radiosensibilité α et β ont été calculés (Table 2). Les données montrent que le paramètre α augmente pour la combinaison d'inhibiteurs par rapport aux cellules irradiées sans inhibiteur. Ces résultats suggèrent une mort cellulaire plus importante due à la présence de ces inhibiteurs. Les SER ont ensuite été calculés à 50 % de survie et sont détaillés dans la Table 2. Comme dans le test de clonogénicité sans sérum, les résultats montrent également une augmentation du SER pour les inhibiteurs combinés. À 50 % de survie, le SER des tests de clonogénicité réalisés dans un milieu sans sérum est légèrement plus élévé que celui avec sérum. Ces résultats suggèrent un effet similaire dans un milieu avec et sans sérum contrairement à ce qui avait été observé avec les protons (Wéra, 2017).

Un moyen d'évaluer si deux composés ont un effet synergique est de calculer le CDI (coefficient of drug interaction). Un CDI inférieur à 1 (CDI < 1) indique qu'il y a un effet synergique entre les deux traitements, un CDI égal à 1 (CDI = 1) indique qu'il y a un effet additif et un CDI supérieur à 1 (CDI > 1) indique un antagonisme. Dans le test de clonogénicité réalisé dans le milieu sans sérum (Table 3), les CDI aux doses de 1 Gy et 2 Gy sont inférieurs à 1, suggérant un effet synergique des inhibiteurs à ces doses. Tandis qu'à 4 Gy, le CDI est supérieur à 1, induisant un effet antagoniste des inhibiteurs. De manière similaire, les CDI du test de clonogénicité réalisés dans le milieu contenant du sérum (Table 4) ont un CDI inférieur à 1 pour les doses 1 Gy et 2 Gy et un CDI supérieur à 1 à 4 Gy. Ces résultats suggèrent un effet synergique des molécules à 1 Gy et 2 Gy et un effet antagoniste à 4 Gy.

Ensemble, ces résultats suggèrent que les deux inhibiteurs ont un effet sur la radiosensibilité des cellules A549 lorsqu'ils sont utilisés seuls ou en combinaison. De plus, les résultats montrent un effet similaire sur la radiosensibilité des cellules A549 lorsque l'irradiation est effectuée en présence ou en absence de sérum, contrairement à ce qui a été observé avec les protons (Wéra, 2017). La comparaison des tests clonogéniques avec et sans

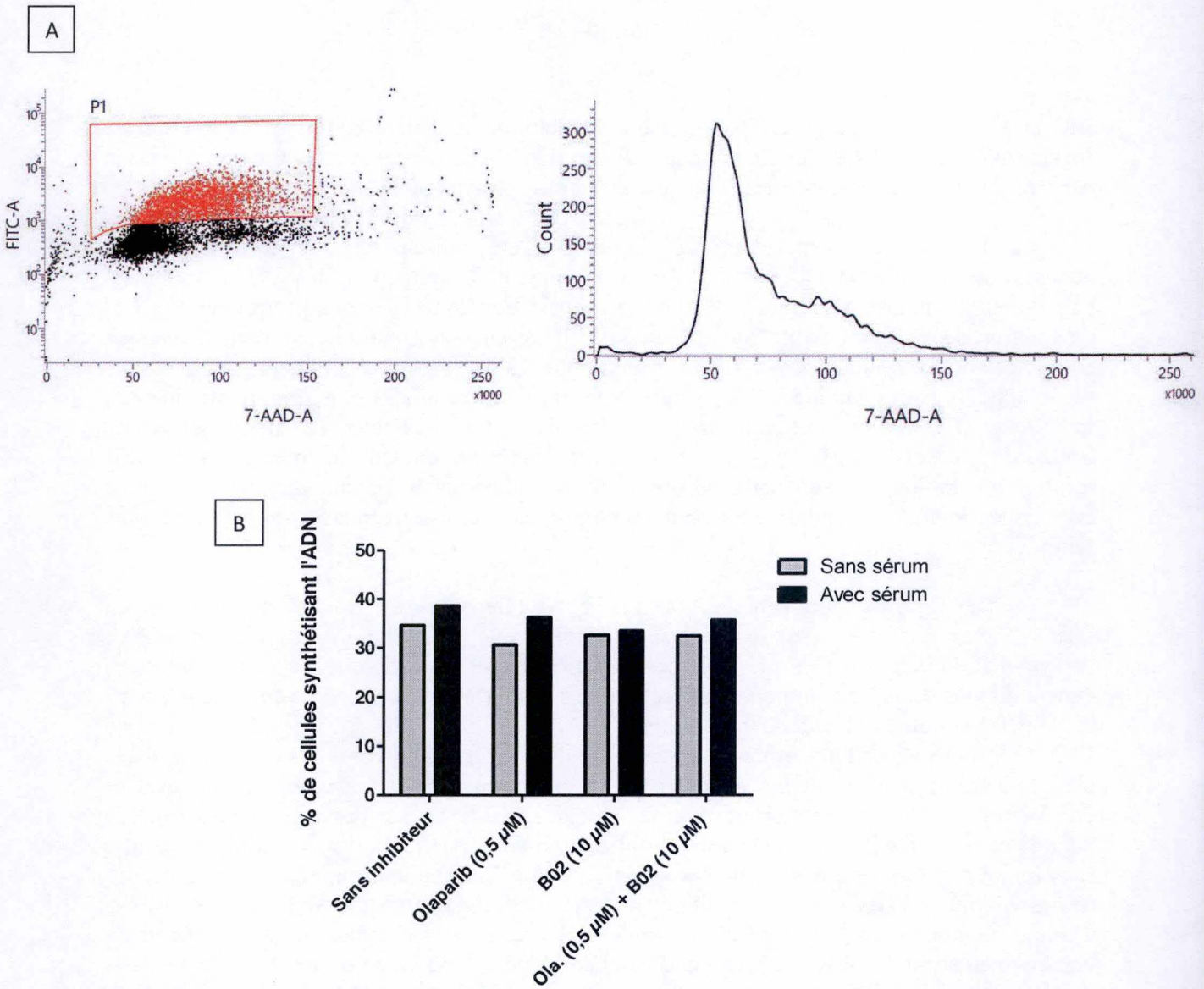


Figure 7 : Proportion de cellules synthétisant de l'ADN au moment de l'irradiation. 3-4 heures avant l'irradiation, l'olaparib 0,5 µM et B02 10 µM ont été ajoutés seuls ou en combinaison dans un milieu avec ou sans sérum. 45 minutes avant l'heure de l'irradiation présumée, le BrdU est ajouté. Le BrdU est marqué ensuite avec des anticorps conjugués au fluorochrome FITC et l'ADN est marqué par le 7-AAD. Analyse de la distribution dans le cycle cellulaire par le FACS (A). Le pourcentage de cellules synthétisant de l'ADN (P1) est comparé lorsque pour les cellules avec et sans sérum dans le milieu avec et sans inhibiteur (B). Une seule expérience a été réalisée.

sérum est également illustrée pour chaque courbe de survie prise séparément : sans inhibiteur (Figure 6.C), avec l'olaparib (Figure 6.D), avec le B02 (Figure 6.E) et avec les inhibiteurs combinés (Figure 6.F). Ces résultats seront discutés plus tard.

4 Evaluation du niveau de cellules synthétisant de l'ADN en présence et en absence de sérum

Comme expliqué précédemment dans les objectifs, en culture cellulaire, le sérum ajouté au milieu de culture permet aux cellules de survivre, de croitre et de proliférer. Etant donné que l'inhibition de PARP permet la création de DSB à la fourche de réplication, l'ajout de sérum devrait augmenter le nombre de DSB engendrés par l'olaparib et mener ainsi à plus de mortalité cellulaire. Afin d'évaluer l'effet du sérum sur la synthèse d'ADN dans les cellules A549, nous avons réalisé un test d'incorporation au BrDU afin de comparer la proportion de cellules synthétisant de l'ADN (phase S) au moment de l'irradiation lorsque le sérum est présent ou absent dans le milieu de culture cellulaire. Les résultats des analyses sont représentés à la Figure 7.A.

Les résultats de la Figure 7.B montrent qu'il n'y a pas de différence dans le pourcentage de cellules synthétisant de l'ADN, pour le milieu des cellules où le sérum a été ajouté sans inhibiteur, avec de l'olaparib, avec le B02 et pour les deux molécules ensemble en comparaison aux cellules où le sérum n'avait pas été ajouté.

Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de réelle différence dans la proportion de cellules en phase S en présence de sérum contrairement à ce qui a été observé précédemment pour les cellules ensemencées pour les irradiations par protons. Ces résultats seront discutés dans la discussion.

IV. DISCUSSION

Environ 50 % des patients atteints de cancer recevront une radiothérapie durant leur traitement (Delaney et al., 2005), celle-ci fait partie des trois types de traitements principaux avec la chirgurgie et la chimiothérapie. Malheureusement, la majorité des patients ne seront pas guéris et il est dès lors impératif de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter le cancer ou améliorer la qualité de vie de ces patients. La méthode de la létalité synthétique utilisant des inhibiteurs de PARP s'est révélée être une approche prometteuse pour traiter le cancer du sein et de l'ovaire dans les essais cliniques chez des patients porteurs d'une mutation BRCA1 ou BRCA2 (Munroe et al., 2016). Cependant, des mécanismes de résistance ont été rapportés dans plusieurs études précliniques (Lord et al., 2015) et on pourrait dès lors envisager à cibler d'autres protéines impliquées dans la recombinaison homologue afin de contrecarrer cette résistance. Cela permettrait également d'étendre l'utilité des inhibiteurs de PARP aux cancers non BRCAness, tels que le NSCLC.

Dans notre étude, nous avons choisi de cibler la protéine RAD51 car c'est l'un des principaux éléments impliqués dans le processus de HR (Renodon-Cornire et al., 2013). De plus, il a été montré que RAD51 était essentiel dans les cellules qui prolifèrent et que son expression était augmentée dans plusieurs cancers en comparaison avec les cellules normales (Alagpunlinsa et al., 2014). De surcroît, de nombreuses études ont montré que les inhibiteurs RAD51 en association avec les agents chimiothérapeutiques inducteurs de DSB, tels que la doxorubicine et le cisplatine, induisent une létalité synthétique dans les cellules de myélome multiples et dans le cancer du sein chez les souris portant une xénogreffe (Alagpulinsa et al., 2014 ; Huang et al., 2014). Une autre étude a montré qu'il y avait une radiosensibilisation efficace lorsque RAD51 était inhibée par le B02 dans les cellules souches du gliome (King et al., 2017). Bien que les DSB ne peuvent plus être réparés par le mécanisme de HR, le mécanisme NHEJ peut être activé et peut réparer les DSB. Toutefois, il a été montré que l'activation du mécanisme NHEJ, dans les cellules déficientes en HR, menait à une hypersensibilité aux inhibiteurs de PARP, augmentant la létalité des cellules cancéreuses (Patel et al., 2011). De surcroît, il a été montré que PARP était également impliquée dans le NHEJ (Sonnenblick et al., 2014).

Le but de cette étude était de radiosensibiliser des cellules NSCLC (lignée A549) par la méthode de la létalité synthétique. Pour cela nous avons utilisé les inhibiteurs de PARP et RAD51 de manière combinée. L'olaparib a été choisi en tant qu'inhibiteur de PARP car celui-ci est efficace et généralement bien toléré par les patients (Munroe et al., 2016). Tandis que l'inhibiteur de RAD51 choisi est B02, un inhibiteur spécifique de la protéine RAD51 humaine (Huang et al., 2011).

Dans cette optique, nous avons d'abord étudié les effets de l'irradiation par rayons X sur les protéines ciblées par les inhibiteurs. Pour cela, le pourcentage de cellules positives pour la pADPr nucléaire (réparation de SSB par BER) ainsi que le nombre de cellules comprenant plus de 5 foci de RAD51 (réparation des DSB par HR) a été évalué par un marquage par immunofluorescence en comparaison avec des contrôles non irradiés. Les cellules A549 ont été irradiées à 2 Gy et le marquage a été réalisé 10 minutes, 3 heures et 24 heures après l'irradiation. Les résultats ont montré que le niveau de RAD51 et de pADPr était plus élevé lorsque les cellules A549 étaient irradiées à 2 Gy en comparaison avec les cellules qui ne l'étaient pas et que les DSB étaient réparés moins vite que les SSB.

Etant donné que les DSB peuvent avoir des conséquences délétères telles que l'arrêt permanent du cycle cellulaire et/ou à la mort cellulaire par apoptose, la deuxième étape de notre étude avait pour but d'étudier l'abondance de plusieurs protéines impliquées dans ces deux processus cellulaires. Pour cela, l'abondance de p53 et de p21 a été étudiée afin

d'évaluer l'arrêt du cycle cellulaire. Tandis que l'abondance de PARP clivée et de la caspase 7 clivée a été mesurée pour suivre l'apoptose. De façon surprenante, aucune stabilisation de p53 n'a été observée dans les cellules irradiées sans sérum tandis qu'en ajoutant le sérum, p53 est stabilisée lorsque les cellules sont irradiées avec l'olaparib et sans inhibiteurs mais pas quand le B02 et des inhibiteurs combinés ont été rajoutés. Cela peut être dû au fait que p53 était déjà dégradé par le protéasome après 24 heures. En effet, dans les cellules non endommagées, p53 est une protéine instable qui est présente à des niveaux cellulaires très bas en raison de la dégradation continue par le protéasome de par sa liaison avec MDM2 (Moll et al., 2004). Lorsque les cellules sont irradiées, les dommages à l'ADN favorisent la phosphorylation de p53 et de MDM2, empêchant leur interaction et stabilisent p53. Ensuite, p53 induit l'expression de MDM2 formant une boucle de rétroaction autorégulée (Moll et al., 2004). Comme nous avons détecté une augmentation de l'abondance de p21, un gène cible de p53, nous avons émis l'hypothèse que la réponse p53 aurait pu être plus élevée dans les cellules irradiées avec B02 et les inhibiteurs combinés en absence de sérum. Ce qui suggère une expression plus élevée de MDM2 et une rétroaction négative plus rapide. C'est pourquoi nous avons décidé de mesurer l'abondance de p53 et de p21 après un temps plus court post-irradiation.

4 heures après irradiation, que ce soit en présence ou en absence de sérum, l'abondance de p53 semble être augmentée, sauf dans le cas où les cellules sont irradiées en présence d'olaparib dans un milieu sans sérum. Toutefois, cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et peut-être qu'il y a eu un problème avec l'échantillon au départ, au niveau de l'ensemencement tel qu'un ensemencement à une densité cellulaire différente des autres échantillons ou alors la goutte contenant les cellules lors de l'ensemencement pourrait avoir été plus étalée que les autres, ce qui pourrait influencer le cycle cellulaire, qui doit rester le même dans toutes les conditions lors des expériences. Ensuite, l'abondance de p21 a été évaluée. Nous avons démontré qu'il y avait une surexpression significative de p21 lorsque les cellules ont été irradiées à 2 Gy, après 24 heures sauf dans le cas où les cellules étaient irradiées avec les inhibiteurs combinés. Cela pourrait être expliqué par l'abondance plus élevée de p21 lorsque les cellules ne sont pas irradiées en présence des inhibiteurs par rapport aux cellules non irradiées sans inhibiteurs. A 4 heures, l'expression de p21 est également augmentée lorsque les cellules sont irradiées à 2 Gy, mais l'augmentation semble être plus faible qu'à 24 heures.

Bien qu'un arrêt du cycle cellulaire ait été montré, aucune activation de l'apoptose n'a été montrée 24 heures après l'irradiation à 2 Gy. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette observation. La première est que 24 heures ne suffisent pas pour induire l'apoptose après l'irradiation. L'apoptose peut être déclenchée plus tard. Une autre explication pourrait être que l'apoptose n'est pas le mécanisme de mort cellulaire induit par l'irradiation dans les cellules A549. En effet, la mort cellulaire retardée associée à une mitose catastrophique s'est révélée être le principal type de mort cellulaire induite après irradiation dans les cellules A549 (Eriksson et al., 2010, Riquier et al., 2013). En outre, des études ont montré que la sénescence pouvait être induite par l'irradiation aux radiations ionisantes dans les cellules cancéreuses humaines de la prostate et les cellules cancéreuses du poumon (Lehmann et al., 2007, Luo et al., 2013). De même, une étude dans notre laboratoire a montré que l'irradiation par les protons pouvait induire une sénescence dans les cellules A549 (Wéra et al., 2017).

C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier la sénescence, qui est un autre mécanisme de mort cellulaire menant à un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Les résultats ont montré que la sénescence était induite 7 jours après irradiation à 2 Gy. En effet, le marquage de la

SA-β-galactosidase montre un nombre de cellules positives plus important. De plus, l'expression d'IGFBP3 et p21 tend à augmenter 24 heures après une irradiation à 2 Gy en présence ou en absence de sérum, et l'IL-8 tend également à augmenter en absence de sérum. Toutefois l'augmentation de l'expression de ces gènes est non significative. En effet, bien que les résultats montraient une même tendance dans chaque expérience, le fold change était différent d'une expérience à l'autre, ce qui augmente la variabilité des résultats. C'est à cause de cette grande variabilité qu'il n'y a pas de signification statistique pour ces tests. Il a été remarqué également que l'expression de p21 augmentait de la même manière que son abondance 24 heures après l'irradiation à 2 Gy. Ces données appuient donc les résultats obtenus en western blot. Bien qu'ils ne soient pas significatifs, ces résultats suggèrent qu'il pourrait avoir une induction de la sénescence après irradiation. Pour confirmer ces résultats, il serait intéressant d'évaluer l'expression ainsi que l'abondance d'autres marqueurs de la sénescence tels que la diminution de l'expression de Ki67, qui est impliqué dans la prolifération cellulaire, ainsi que l'augmentation de l'expression de l'IL-6 qui est secrétée par les cellules sénescentes et l'abondance de Rb/pRb. Ces résultats suggèrent donc que le mécanisme par lequel les cellules A549 meurent, après irradiation et ajout des inhibiteurs, serait plutôt par l'arrêt permanant du cycle cellulaire plutôt que la mort cellulaire par apoptose. D'autres études sur les inhibiteurs de PARP combinés à la radiothérapie vont également dans ce sens et ont montré que les cellules ne subissaient pas ou peu l'apoptose (Alotaibi et al., 2016 ; Barreto-Andrade et al., 2011 ; Liu et al., 2008).

Toutefois, que ce soit pour l'abondance de p53 et p21 pour le cycle cellulaire ou l'expression de p21, IL-8 et IGFBP3 pour la sénescence, aucun effet des inhibiteurs n'a été montré après 24 heures, alors que les tests de clonogénicité ont montré que la fraction de survie diminuait en leur présence en comparaison avec la condition sans inhibiteur. Afin de mieux voir l'effet des inhibiteurs, il faudrait peut-être utiliser des doses d'irradiation plus fortes, des concentrations plus élevées en inhibiteurs ou encore laisser les cellules en présence des inhibiteurs plus de 24 heures. Toutefois nous avons préféré travailler avec une dose d'irradiation de 2 Gy qui cliniquement pertinente et avec des concentrations et des temps d'incubation des inhibiteurs menant à une cytotoxicité limitée lorsque les cellules ne sont pas irradiées.

Enfin, des tests de clonogénicité ont été réalisés afin de déterminer s'il existe un effet radiosensibilisant de l'olaparib, du B02 et de leur association sur les cellules A549 en milieu avec ou sans sérum. Selon une étude en cours dans notre laboratoire, la présence de sérum dans le milieu cellulaire a conduit à un effet synergique lors de la combinaison des deux inhibiteurs avec une irradiation par protons (Wéra et al., 2017). Les résultats de cette étude ont montré qu'il y avait une augmentation de la population de cellules en phase G2 du cycle cellulaire lors de l'ajout de sérum. Il est connu que les cellules de la phase G2 du cycle cellulaire sont plus sensibles aux rayonnements (Pawlik et al., 2004). De plus, les résultats ont également montré que les cellules synthétisent activement plus l'ADN lorsque les cellules sont incubées dans un milieu contenant du sérum avant l'irradiation. Le nombre plus élevé de cellules synthétisant l'ADN peut potentialiser l'effet de l'olaparib générant des complexes endommageant l'ADN qui peuvent conduire à une fourche de réplication bloquée et à la production de nouveaux DSB. Puisque chaque agent agit sur une phase différente du cycle cellulaire et des dommages à l'ADN, leur combinaison peut conduire à une probabilité plus élevée de mort cellulaire.

Dans ce travail, nous avons cherché à confirmer ces résultats en utilisant l'irradiation aux rayons X. Nous avons donc comparé l'effet du sérum dans le milieu de culture lorsque des

cellules A549 ont été irradiées avec ou sans les inhibiteurs. Contrairement aux résultats obtenus en utilisant l'irradiation aux protons, nous avons montré qu'il y avait un effet synergique avec l'irradiation pour les inhibiteurs pris seuls et en combinaison, à la fois dans un milieu avec et sans sérum. Seulement, un effet antagoniste a été montré à 4 Gy à la fois en présence ou en absence de sérum. Cet effet peut être expliqué par les grandes marge d'erreur des CDI car ces derniers sont calculés à partir des paramètres de radiosensibilité α et β qui ont eux même des marges d'erreur élevées à 4 Gy. De plus, vu que nous sommes dans un modèle linéaire quadratique, la forme de chaque courbe de survie est déterminée par les paramètres α et β qui sont différents pour chaque courbe. Celles-ci finissent donc par se rapprocher et se croiser lorsqu'on est dans des taux de survie plus faibles. Le rapprochement des courbes pourrait induire ainsi un biais dans le calcul des CDI et proposer alors un effet antagoniste des inhibiteurs. Cependant, la dose d'irradiation la plus pertinente est de 2 Gy. En effet, en thérapie conventionnelle, une dose totale allant de 30 Gy à 90 est délivrée par fraction de 2 Gy à raison d'une fraction par jour et ce, 5 jours par semaine (Bernier et al., 2004). Le CDI à 2 Gy a montré un effet synergique dans les deux tests de clonogénicité. Les résultats ont montré qu'à 50 % de survie, le SER était légèrement plus élevé lorsque l'irradiation était réalisée dans un milieu ne contenant pas de sérum avec les deux inhibiteurs ensemble.

Chaque expérience a été réalisée avec et sans sérum dans le milieu et a montré des résultats assez similaires, contrairement à ce qui avait été montré lors du test clonogénique avec l'irradiation par protons pour la même lignée cellulaire (A549). Cela peut être expliqué par les résultats du BrdU qui ont montré que le nombre de cellules synthétisant de l'ADN au moment de l'irradiation n'était pas augmenté en présence de sérum. Ce résultat est assez surprenant car la même lignée cellulaire, le même milieu et les mêmes concentrations en sérum ont été utilisés dans l'étude menée sur les protons. Deux hypothèses sont dès lors suggérées. La première hypothèse est basée sur les boites de culture qui sont différentes selon le type d'irradiation réalisé. En effet, les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits lors de l'irradiation par rayons X tandis que pour l'irradiation par protons, les cellules ont été ensemencées dans des chambres d'irradiation qui ne sont pas « confortables » pour les cellules. Dès lors, l'ajout de sérum pourrait davantage augmenter la prolifération des cellules dans les chambres par rapport aux plaques 6 puits. Une autre hypothèse est que les inhibiteurs ne seraient pas ajoutés exactement au même moment, changeant ainsi peut être la distribution des cellules dans le cycle cellulaire. En conclusion pour les tests de clonogénicité, nos résultats suggèrent qu'il existe une radiosensibilisation des cellules A549 après irradiation aux rayons X en utilisant la létalité synthétique en présence des deux molécules d'intérêt.

Les perspectives de ce mémoire seraient tout d'abord d'évaluer si une augmentation des dommages à l'ADN est visible en présence des inhibiteurs. En effet, étant donné que l'olaparib empêche la réparation des SSB et mène dès lors à la formation de DSB lors de la rencontre avec la fourche de réplication, on s'attend à avoir une augmentation des dommages à l'ADN lorsque l'on ajoute les inhibiteurs seuls. Cela a déjà été montré dans plusieurs études avec l'olaparib ou le B02 combinés aux traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques (Senra et al., 2011 ; Alagpulinsa et al., 2014). Etant donné que le B02 agit sur la réparation des DSB, la combinaison des inhibiteurs devraient augmenter davantage le nombre de dommages à l'ADN. Il serait donc intéressant d'évaluer la persistance de foci γH2AX, la formation de foci de RAD51 et l'intensité de pADPr, après irradiation et ajout des inhibiteurs combinés.

Ensuite, étant donné que les cellules sont plus radiosensibles en phase G2/M (Pawlik et al., 2004) et que l'olaparib devrait être plus efficace en phase S, il serait intéressant

d'évaluer la distribution des cellules A549 après traitement, dans le cycle cellulaire. Dans cette optique, on pourrait faire une analyse en cytométrie de flux après un marquage à l'iodure de propidium (PI) lorsque les cellules ne sont pas irradiées avec et sans inhibiteurs en comparaison avec les cellules irradiées avec et sans inhibiteurs, afin d'expliquer comment les inhibiteurs seuls et combinés peuvent mener à une diminution de la fraction de survie. Une étude a montré que l'olaparib augmentait le nombre de cellules en phase S et en phase G2/M en comparaison avec un contrôle non traité dans plusieurs lignées cellulaire (Miura et al., 2012 ; Yang et al., 2014 ; Miyasaka et al., 2014).

Bien qu'une radiosensibilisation des cellules A549 ait été observée par les tests de clonogénicité, l'apoptose, un des principaux types de mort cellulaire induit par les radiations, n'a pas été observée lors de cette en présence ou en absence des inhibiteurs, avec ou sans sérum. Plusieurs études ont déjà montré qu'il n'y avait pas d'induction de l'apoptose en présence des inhibiteurs de PARP après irradiation (Gewirtz et al., 2016). Il serait toutefois intéressant de voir s'il y a toujours une radiosensibilité des cellules irradiées en présence des inhibiteurs lorsque l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose est inhibée. De plus, l'autophagie, qui est un autre type de mort cellulaire, pourrait également être étudiée en présence ou en absence des inhibiteurs après une irradiation à 2 Gy. Il a d'ailleurs été montré que l'autophagie précédait et pouvait induire la sénescence (Alotaibi et al., 2016) . En outre, étant donné que l'autophagie est un mécanisme cellulaire induisant soit la survie cellulaire, soit la mort cellulaire, la cibler pourrait également être assez intéressant afin d'augmenter la radiosensibilisation des cellules cancéreuses et non des cellules normales suivant l'agent utilisé. Afin d'étudier l'autophagie, l'abondance de p62, ATG5, ATG7 et LC3 II et/ou un marquage à l'acridine orange pourraient être réalisés après irradiation.

Bien que la sénescence a été montrée comme étant une mort cellulaire réplicative irréversible, plusieurs études ont montré que la sénescence prématurée induite par les radiations ionisantes pouvait être réversible et mener à une récupération de la capacité de prolifération de la tumeur (Gewirtz et al., 2016 ; Alotaibi et al., 2016). Une évaluation de la réversibilité de la sénescence pourrait donc être réalisée par un marquage SA-β-galalactosidase, afin de voir si les cellules A549 sénescentes retrouvent la capacité de former des colonies sur le long terme en présence et absence des inhibiteurs. De plus, un test de prolifération cellulaire après irradiation pourrait également être réalisé, par exemple en utilisant la technique du MTT.

Il a été montré que RAD51 jouait un rôle dans la résistance des cellules souches aux inhibiteurs de PARP dans de cancer du sein triple négatif (Liu et al., 2017). De plus son inhibition sensibilise ces dernières aux inhibiteurs de PARP (Whang et al., 2017). Dès lors, on pourrait étudier si le traitement pourrait également permettre de contrer la résistance des inhibiteurs de PARP dans les cancers avec mutation BRCA, avec restauration de la fonction de BRCA suite à une mutation secondaire. De surcroît, il serait intéressant d'étudier si des effets similaires pourraient être observés dans une autre lignée cellulaire de cancer BRCAness. Etudier les effets des inhibiteurs sur la lignée cellulaire du glioblastome (GBM) T98G pourrait être intéressante. En effet, étant donné que la radiosensibilisation des cellules cancéreuses dépend de la réplication, la combinaison d'olaparib et de B02 pourrait être prometteuse pour traiter les GBM qui sont des cellules à réplication rapide contrairement aux cellules normales qui les entourent et ne prolifèrent pas (Dungey et al., 2008).

En conclusion, ce travail nous a permis de montrer qu'il y avait une activation de pADPr et de RAD51 afin de réparer les dommages à l'ADN induits par l'irradiation. De plus

nous avons montré que le principal type de mort cellulaire induit par l'irradiation et les inhibiteurs dans les cellules A549 pourrait être l'arrêt permanent du cycle cellulaire. Nous avons également montré un effet radiosensibilisant des inhibiteurs lorsque ceux-ci étaient ajoutés seuls ou de manière combinée dans le milieu des cellules. Ensemble, ces résultats suggèrent que la méthode de la létalité synthétique utilisant les inhibiteurs de PARP en combinaison avec la radiothérapie et/ou chimiothérapie n'étaient pas seulement efficace dans les cancers avec un mécanisme de HR déficient, mais qu'ils pouvaient également l'être pour traiter le NSCLC lorsqu'il est seul ou combiné à un inhibiteur de RAD51, qui est également impliqué dans la recombinaison homologue. La combinaison de l'olaparib et du B02 a montré un effet synergique lorsque ces inhibiteurs sont associés à la radiothérapie à des doses d'irradiation classiques (2 Gy). Bien que de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* doivent encore être menées, ces résultats semblent déjà être très prometteurs dans l'élaboration d'un futur traitement du NSCLC combinant les inhibiteurs de PARP et de RAD51 en association avec la radiothérapie.

V. BIBLIOGRAPHIE

Alagpulinsa, D. A., Ayyadevara, S., & Shmookler Reis, R. J. (2014). A Small-Molecule Inhibitor of RAD51 Reduces Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to Doxorubicin. *Frontiers in Oncology*, *4*, 289.

Alotaibi, M., Sharma, K., Saleh, T., Povirk, L. F., Hendrickson, E. A., & Gewirtz, D. A. (2016). Radiosensitization by PARP Inhibition in DNA Repair Proficient and Deficient Tumor Cells: Proliferative Recovery in Senescent Cells. *Radiation Research*, *185*(3), 229–245.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Reviews Cancer*, *2*(6), 420–430.

Baker, S., Dahele, M., Lagerwaard, F. J., & Senan, S. (2016). A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Radiation Oncology*, *11*(1), 115.

Barreto-Andrade, J. C., Efimova, E. V, Mauceri, H. J., Beckett, M. A., Sutton, H. G., Darga, T. E., … Weichselbaum, R. R. (2011). Response of human prostate cancer cells and tumors to combining PARP inhibition with ionizing radiation. *Molecular Cancer Therapeutics*, *10*(7), 1185–93.

Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, *9*(3), 193–199.

Baudino, T. A. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies*, *12*(1), 3–20.

Baumann, M., Krause, M., Overgaard, J., Debus, J., Bentzen, S. M., Daartz, J., … Bortfeld, T. (2016). Radiation oncology in the era of precision medicine. *Nature Reviews Cancer*, *16*(4), 234–249.

Baxter, R. C. (2014). IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nature Reviews Cancer*, *14*(5), 329–341.

Benafif, S., & Hall, M. (2015). An update on PARP inhibitors for the treatment of cancer. *OncoTargets and Therapy*, *8*, 519–28.

Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J.-L., Greiner, R. H., … European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 22931. (2004). Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, *350*(19), 1945–1952.

Bieging, K. T., Mello, S. S., & Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*, *14*(5), 359–370.

Borrego-Soto, G., Ortiz-López, R., & Rojas-Martínez, A. (2015). Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. *Genetics and Molecular Biology*, *38*(4), 420–432.

Brown, J. M., Carlson, D. J., & Brenner, D. J. (2014). The Tumor Radiobiology of SRS and SBRT: Are More Than the 5 Rs Involved? *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, *88*(2), 254–262.

Butt, A. J., Firth, S. M., King, M. A., & Baxter, R. C. (2000). Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 Modulates Expression of Bax and Bcl-2 and Potentiates p53-independent

Chalmers, A. J. (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and ionizing radiation: sensor, signaller and therapeutic target. *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, *16*(1), 29–39.

Chan, B. A., & Hughes, B. G. M. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational Lung Cancer Research*, *4*(1), 36–54.

Christodoulou, M., Bayman, N., McCloskey, P., Rowbottom, C., & Faivre-Finn, C. (2014). New radiotherapy approaches in locally advanced non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, *50*(3), 525–534.

Clinical trials.gov, Efficacy and Safety Study of Olaparib in Combination With Paclitaxel to Treat Advanced Gastric Cancer, https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01924533, consulté le 12 décembre 2017.

Corcoran, N. M., & Gleave, M. E. (2012). Targeted therapy in prostate cancer. *Histopathology*, *60*(1), 216–231.

Curtin, N. J., & Szabo, C. (2013). Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(6), 1217–1256.

David, J., Dominguez, C., Hamilton, D., & Palena, C. (2016). The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines*, *4*(3), 22.

Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment. *Cancer*, *104*(6), 1129–1137.

Dungey, F. A., Löser, D. A., & Chalmers, A. J. (2008). Replication-Dependent Radiosensitization of Human Glioma Cells by Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase: Mechanisms and Therapeutic Potential. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, *72*(4), 1188–1197.

Durante, M., & Loeffler, J. S. (2010). Charged particles in radiation oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *7*(1), 37–43.

Dziadkowiec, K. N., Gąsiorowska, E., Nowak-Markwitz, E., & Jankowska, A. (2016). PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. *Przeglad Menopauzalny = Menopause Review*, *15*(4), 215–219.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516.

Eriksson, D., & Stigbrand, T. (2010). Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biology*, *31*(4), 363–372.

Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G., & Jarrard, D. F. (2010). Therapy-induced senescence in cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *102*(20), 1536–46.

Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, *1*(5), 2315–2319.

Furrukh, M. (2013). Tobacco Smoking and Lung Cancer: Perception-changing facts. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, *13*(3), 345–58.

Gavande, N. S., VanderVere-Carozza, P. S., Hinshaw, H. D., Jalal, S. I., Sears, C. R., Pawelczak, K. S., & Turchi, J. J. (2016). DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacology & Therapeutics*, *160*, 65–83.

Gewirtz, D. A., Alotaibi, M., Yakovlev, V. A., & Povirk, L. F. (2016). Tumor Cell Recovery from Senescence Induced by Radiation with PARP Inhibition. *Radiation Research*, *186*(4), 327–332.

GLOBOCAN, Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/lung-new.asp, consulté le 12 décembre 2017.

Hall, E. J., & Giaccia, A. J. (2006). *Radiobiology for the radiologist* (Lippincott Williams & Wilkins).

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674.

Haslett, K., Pöttgen, C., Stuschke, M., & Faivre-Finn, C. (2014). Hyperfractionated and accelerated radiotherapy in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, *6*(4), 328–35.

Huang, F., Mazin, A. V., Jalali, F., Rashid, S. Al, & Ran, J. (2014). A Small Molecule Inhibitor of Human RAD51 Potentiates Breast Cancer Cell Killing by Therapeutic Agents in Mouse Xenografts. *PLoS ONE*, *9*(6), e100993.

Huang, F., Mazina, O. M., Zentner, I. J., Cocklin, S., & Mazin, A. V. (2012). Inhibition of Homologous Recombination in Human Cells by Targeting RAD51 Recombinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, *55*(7), 3011–3020.

Huang, F., Motlekar, N. A., Burgwin, C. M., Napper, A. D., Diamond, S. L., & Mazin, A. V. (2011). Identification of Specific Inhibitors of Human RAD51 Recombinase Using High-Throughput Screening. *ACS Chemical Biology*, *6*(6), 628–635.

Kaelin, W. G. (2005). The Concept of Synthetic Lethality in the Context of Anticancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, *5*(9), 689–698.

Karagounis, I. V, Skourti, E. K., Liousia, M. V, & Koukourakis, M. I. (2017). Assessment of Radiobiological α/β Ratio in Lung Cancer and Fibroblast Cell Lines Using Viability Assays. *In Vivo (Athens, Greece)*, *31*(2), 175–179.

King, H. O., Brend, T., Payne, H. L., Wright, A., Ward, T. A., Patel, K., … Short, S. C. (2017). RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *8*(1), 125–139.

Kogel, A.V.D, and Joiner, M. (2009). *Basic Clinical Radiobiology* (Hodder Arnold).

Lehmann, B. D., McCubrey, J. A., Jefferson, H. S., Paine, M. S., Chappell, W. H., & Terrian, D. M. (2007). A Dominant Role for p53-Dependent Cellular Senescence in Radiosensitization of Human Prostate Cancer Cells. *Cell Cycle*, *6*(5), 595–605.

Lesueur, P., Chevalier, F., Austry, J.-B., Waissi, W., Burckel, H., Noël, G., … Joly, F. (2017). Poly-(ADP-ribose)-polymerase inhibitors as radiosensitizers: a systematic review of pre-clinical and clinical human studies. *Oncotarget*, *8*(40), 69105–69124.

Lim, Y. C., Roberts, T. L., Day, B. W., Harding, A., Kozlov, S., Kijas, A. W., … Lavin, M. F. (2012). A Role for Homologous Recombination and Abnormal Cell-Cycle Progression in Radioresistance of Glioma-Initiating Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, *11*(9), 1863–1872.

Lin, M. Z., Marzec, K. A., Martin, J. L., & Baxter, R. C. (2014). The role of insulin-like growth factor binding protein-3 in the breast cancer cell response to DNA-damaging agents. *Oncogene*, *33*(1), 85–96.

Liu, X., Luo, X., Shi, Y., Zhu, G.-D., Penning, T., Giranda, V. L., & Luo, Y. (2008). Poly (ADP-ribose) polymerase activity regulates apoptosis in HeLa cells after alkylating DNA damage. *Cancer Biology & Therapy*, *7*(6), 934–41.

Lomax, M. E., Folkes, L. K., & O'Neill, P. (2013). Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clinical Oncology*, *25*(10), 578–585.

Lord, C. J., Tutt, A. N. J., & Ashworth, A. (2015). Synthetic Lethality and Cancer Therapy: Lessons Learned from the Development of PARP Inhibitors. *Annual Review of Medicine*, *66*(1), 455–470.

Luo, H., Wang, L., Schulte, B. A., Yang, A., Tang, S., & Wang, G. Y. (2013). Resveratrol enhances ionizing radiation-induced premature senescence in lung cancer cells. *International Journal of Oncology*, *43*(6), 1999–2006.

Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., & Herskind, C. (2016). Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(1), 102.

Mallick, S., Benson, R., Julka, P. K., & Rath, G. K. (2016). Altered fractionation radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, *28*(2), 73–80.

Martin, S. A., McCabe, N., Mullarkey, M., Cummins, R., Burgess, D. J., Nakabeppu, Y., … Ashworth, A. (2010). DNA polymerases as potential therapeutic targets for cancers deficient in the DNA mismatch repair proteins MSH2 or MLH1. *Cancer Cell*, *17*(3), 235–48.

Mathijssen, R. H. J., Sparreboom, A., & Verweij, J. (2014). Determining the optimal dose in the development of anticancer agents. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *11*(5), 272–281.

McCabe, N., Turner, N. C., Lord, C. J., Kluzek, K., Białkowska, A., Swift, S., … Ashworth, A. (2006). Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Research*, *66*(16), 8109–8115.

Minami, D., Takigawa, N., Takeda, H., Takata, M., Ochi, N., Ichihara, E., … Kiura, K. (2013). Synergistic Effect of Olaparib with Combination of Cisplatin on PTEN-Deficient Lung Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*, *11*(2), 140–148.

Miura, K., Sakata, K., Someya, M., Matsumoto, Y., Matsumoto, H., Takahashi, A., & Hareyama, M. (2012). The combination of olaparib and camptothecin for effective radiosensitization. *Radiation Oncology*, *7*(1), 62.

Moding, E. J., Kastan, M. B., & Kirsch, D. G. (2013). Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(7), 526–542.

Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, *83*(5), 584–94.

Moll, U. M., & Petrenko, O. (2004). The MDM2-p53 Interaction. *Molecular Cancer Research*, *1*(14).

Munagala, R., Aqil, F., & Gupta, R. (2011). Promising molecular targeted therapies in breast cancer. *Indian Journal of Pharmacology*, *43*(3), 236.

Munroe, M., & Kolesar, J. (2016). Olaparib for the treatment of BRCA-mutated advanced ovarian cancer. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *73*(14), 1037–1041.

Murai, J., Huang, S. -y. N., Das, B. B., Renaud, A., Zhang, Y., Doroshow, J. H., … Pommier, Y. (2012). Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Research*, *72*(21), 5588–5599.

Neal, J. A., Dang, V., Douglas, P., Wold, M. S., Lees-Miller, S. P., & Meek, K. (2011). Inhibition of Homologous Recombination by DNA-Dependent Protein Kinase Requires Kinase Activity, Is Titratable, and Is Modulated by Autophosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(8), 1719–1733.

Nenoi, M. (Ed.). (2015). *Evolution of Ionizing Radiation Research*. InTech.

Nijman, S. M. B. (2011). Synthetic lethality: general principles, utility and detection using genetic screens in human cells. *FEBS Letters*, *585*(1), 1–6.

OMS, cancer, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/, consulté le 12 décembre 2017.

Parashar, B., Arora, S., & Wernicke, A. G. (2013). Radiation therapy for early stage lung cancer. *Seminars in Interventional Radiology*, *30*(2), 185–90.

Pawlik, T. M., & Keyomarsi, K. (2004). Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*, *59*(4), 928–942.

Qiao, G.-B., Wu, Y.-L., Yang, X.-N., Zhong, W.-Z., Xie, D., Guan, X.-Y., … Stuerzbecher, H.-W. (2005). High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. *British Journal of Cancer*, *93*(1), 137–143.

Renodon-Cornire, A., Weigel, P., Le, M., & Fleury, F. (2013). New Potential Therapeutic Approaches by Targeting Rad51- Dependent Homologous Recombination. In *New Research Directions in DNA Repair*.

Reynolds, P., Cooper, S., Lomax, M., & O'Neill, P. (2015). Disruption of PARP1 function inhibits base excision repair of a sub-set of DNA lesions. *Nucleic Acids Research*, *43*(8), 4028–38.

Riquier, H., Wera, A.-C., Heuskin, A.-C., Feron, O., Lucas, S., & Michiels, C. (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*, *106*(3), 397–403.

Senra, J. M., Telfer, B. A., Cherry, K. E., McCrudden, C. M., Hirst, D. G., O'Connor, M. J., … Stratford, I. J. (2011). Inhibition of PARP-1 by Olaparib (AZD2281) Increases the Radiosensitivity of a Lung Tumor Xenograft. *Molecular Cancer Therapeutics*, *10*(10), 1949–1958.

Sodhi, R. K., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2010). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. *Vascular Pharmacology*, *53*(3–4), 77–87.

Sonnenblick, A., de Azambuja, E., Azim, H. A., & Piccart, M. (2014). An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *12*(1), 27–41.

Tamargo, J., Le Heuzey, J.-Y., & Mabo, P. (2015). Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *71*(5), 549–567.

Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Viñals, F., & Capellá, G. (2010). Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, *16*(1), 3–10.

Vávrová, J., & Rezáčová, M. (2011). The importance of senescence in ionizing radiation-induced tumour suppression. *Folia Biologica*, *57*(2), 41–6.

Wang, D., Du, R., & Liu, S. (2017). Rad51 inhibition sensitizes breast cancer stem cells to PARP inhibitor in triple-negative breast cancer. *Chinese Journal of Cancer*, *36*(1), 37.

Wéra A-C, personal communication, (2017).

Woon, E. C. Y., & Threadgill, M. D. (2005). Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition - where now? *Current Medicinal Chemistry*, *12*(20), 2373–92.

Xie, L., Yu, J., Guo, W., Wei, L., Liu, Y., Wang, X., & Song, X. (2013). Aldo-keto reductase 1C3 may be a new radioresistance marker in non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Therapy*, *20*(4), 260–266.

Yang, X., Ndawula, C., Zhou, H., Gong, X., Jin, J., & JIN, J. (2015). JF-305, a pancreatic cancer cell line is highly sensitive to the PARP inhibitor olaparib. *Oncology Letters*, *9*(2), 757–761.

Yoshino, K., Motoyama, S., Koyota, S., Shibuya, K., Usami, S., Maruyama, K., … Ogawa, J. (2011). IGFBP3 and BAG1 enhance radiation-induced apoptosis in squamous esophageal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *404*(4), 1070–1075.

Zhao, L., He, L.-R., Xi, M., Cai, M.-Y., Shen, J.-X., Li, Q.-Q., … Liu, M.-Z. (2012). Nimotuzumab promotes radiosensitivity of EGFR-overexpression esophageal squamous cell carcinoma cells by upregulating IGFBP-3. *Journal of Translational Medicine*, *10*(1), 249.

Zheng, Y., Jaklitsch, M. T., & Bueno, R. (2016). Neoadjuvant Therapy in Non–Small Cell Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, *25*(3), 567–584.