



**HAL**  
open science

# Effet de la combinaison des nanoparticules de gadolinium et de la radiothérapie sur l'élimination des cellules tumorales

Frédéric Law

► **To cite this version:**

Frédéric Law. Effet de la combinaison des nanoparticules de gadolinium et de la radiothérapie sur l'élimination des cellules tumorales. Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS138 . tel-02861413

**HAL Id: tel-02861413**

**<https://theses.hal.science/tel-02861413>**

Submitted on 9 Jun 2020

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

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

NNT : 2017SACLS138

THESE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY  
PRÉPARÉE À  
“GUSTAVE ROUSSY CANCER CAMPUS GRAND PARIS”

ECOLE DOCTORALE N°582  
CBMS Cancérologie

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la biologie

Par

**Mr Frédéric LAW**

Effet de la combinaison des nanoparticules de gadolinium et de la radiothérapie sur  
l'élimination des cellules tumorales

**Thèse présentée et soutenue à Gustave Roussy (Villejuif), le 6 Juin 2017**

**Composition du Jury :**

Mr. PARIS François	Directeur de Recherche	Université de Nantes	Rapporteur
Mme ANDREAU Karine	Maître de Conférence	Université de Paris-Diderot	Président
Mme BRENNER Cathérine	Directeur de Recherche	Université Paris-Sud	Examinatrice
Mr TILLEMENT Olivier	Directeur de Recherche	Université Claude Bernard Lyon 1	Examineur
Mr PERFETTINI Jean-luc	Directeur de Recherche	Gustave Roussy	Directeur de thèse

*« Si dans le seul désir d'éviter tout tracasserie, nos actions suivent toujours la voie de la facilité, nous perdrons le courage de relever des défis ; par conséquent, il n'y aura ni progression, ni amélioration de soi et ni développement. [...] La confiance en soi n'est pas une chose qui s'acquiert du jour au lendemain. Ce qui importe, c'est l'esprit de se lancer des défis et d'avoir le courage de continuer à essayer. »*

*La Nouvelle Révolution Humaine, vol. 26, Chapitre : « Efforts ardents »*

*Daisaku Ikeda*

## Résumé

L'arrivée des nanobiotechnologies en cancérologie apporte un nouveau souffle dans le traitement des cancers. Les travaux réalisés par Olivier Tillement et ses collaborateurs ont permis de montrer que les nanoparticules de gadolinium (GdBN) sont capables d'augmenter d'une part la qualité d'imagerie par résonance magnétique (IRM) mais également d'augmenter les effets des rayonnements ionisants (IR) sur les tumeurs. Des études précliniques réalisées à partir des tumeurs de glioblastome greffées sur des souris C57BL/6 ont permis de révéler la capacité de la combinaison des rayonnements ionisants et de nanoparticules de gadolinium (GdBN+IR) favoriser la régression des tumeurs irradiées. Malgré le grand intérêt de ces résultats précliniques, les processus de morts cellulaires impliqués restent encore inconnus. Mes travaux de thèse ont permis de révéler que la combinaison GdBN+IR déclenche au niveau des cellules cancéreuses irradiées, un stress oxydatif qui implique la NAPDH oxydase 5 (NOX-5). Ce processus biologique cause l'arrêt de la prolifération des cellules (selon un mécanisme qui nécessite la protéine P21) et aboutit au déclenchement de la sénescence cellulaire et d'un processus de cannibalisme cellulaire au niveau des cellules irradiées. Nous avons révélé au cours de ces travaux que le cannibalisme cellulaire des cellules irradiées élimine les cellules cancéreuses internalisées. Les travaux de recherche que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont donc souligné la capacité de la combinaison des rayonnements ionisants avec les nanoparticules de Gadolinium à éliminer les cellules cancéreuses en déclenchant de façon simultanée leur sénescence ainsi que leur activité cannibale. Nous souhaitons que mes travaux de recherche puissent aboutir comme application ultime au développement de nouvelles approches thérapeutiques basées sur l'utilisation combinée des rayonnements ionisantes et des nanoparticules de Gadolinium afin d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie lors du traitement du cancer.

## **Abstract**

The nanobiotechnologies in oncology brings an alternative for cancer treatment. Pr Olivier Tillement and his collaborators showed that gadolinium nanoparticles (GdBN) can improve resolution of Magnetic Resonance Imaging (MRI) and radiation Ionizing (IR) on tumors. Preclinical studies using glioblastoma tumors grafted on C57BL/6 mice revealed that the combination of radiotherapy and Gadolinium Based Nanoparticles (GdBN+IR) promote tumors regression. These preclinical results need further investigation on cell deaths process trigger by GdBN+IR. My thesis work show that the combination of GdBN+IR triggers an oxidative stress in the irradiated cancer cells, which involves NAPDH oxidase-5 (NOX-5). This mechanism inhibit cell proliferation (according to the cyclin-dependent kinase inhibitor P21 protein pathway) and lead to the initiation of cellular senescence as well as a process of cellular cannibalism in the irradiated cells. The irradiated cannibal cell lead to the elimination of internalized cells. This work that I carried out during my thesis underline the capacity of the combination of ionizing radiation with the nanoparticles of Gadolinium to eliminate the cancer cells by simultaneously triggering their senescence as well as their cannibal activity. We hope that my research work will lead to the development of new therapeutic approaches based on the combination of ionizing radiation and the Gadolinium-based nanoparticle to improve the effectiveness of radiotherapy in cancer treatment.

<b>Résumé .....</b>	<b>2</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>Table des illustrations .....</b>	<b>7</b>
<b>Table des abréviations .....</b>	<b>11</b>
<b>Chapitre 1 : Les nanosciences et la radiothérapie en oncologie .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1. Généralités en oncologie et en radiothérapie.....</b>	<b>16</b>
1.1.1. La naissance de l'industrie de la nanobiotechnologie.....	16
1.1.2. Définition d'une nanoparticule.....	17
1.1.3. Les différents types de nanoparticules utilisés en médecine .....	18
1.1.3.1. Les nanoparticules organiques.....	18
1.1.3.2. Les nanoparticules inorganiques.....	19
1.1.4. Applications technologiques des nanoparticules en milieu médical.....	19
1.1.4.1. Généralités .....	19
1.1.4.2. Comportements des nanoparticules dans l'organisme.....	20
1.1.5. L'application de la nanobiotechnologie en radiothérapie .....	21
1.1.5.1. Les rayonnements ionisants.....	21 <sup>2</sup>
1.1.5.2. Principe fondamental de la radiothérapie .....	22
1.1.5.3. Principe fondamental de la dosimétrie.....	22
1.1.6. Les agents contrastants à haut poids moléculaire .....	23
1.1.7. Les agents radiosensibilisants .....	25
<b>1.2. Les nanoparticules de Gadolinium à usage multimodales .....</b>	<b>27</b>
1.2.1. La synthèse des nanoparticules de gadolinium, AgulX .....	27
1.2.2. Adressage des nanoparticules au sein de la tumeur .....	28
1.2.3. Les mécanismes d'internalisation et de distribution des GdBN .....	29
1.2.3.1. Internalisation des nanoparticules .....	29
1.2.3.2. Localisation subcellulaire des nanoparticules.....	31
1.2.4. Biodistribution et toxicité des nanoparticules de gadolinium.....	32
<b>1.3. Les effets de l'interaction entre les nanoparticules avec les rayons ionisants</b>	<b>34</b>
1.3.1. Les paramètres de radiosensibilité .....	34
1.3.2. Les conséquences des rayons ionisants aux niveaux de l'ADN .....	35
1.3.3. Les réponses aux lésions de l'ADN .....	36
1.3.4. Les réponses aux stress oxydatives radio-induites.....	38
1.3.4.1. Rôles physiologiques des ROS .....	38
1.3.4.2. Les stress oxydatifs endogènes .....	39
1.3.4.2.1. Le métabolisme mitochondrial .....	39
1.3.4.2.2. Les NADPH oxydases et les duo-oxydase (DUOX) .....	40
1.3.4.2.3. La caractérisation du NADPH oxydase-5 .....	43

1.3.4.2.4. Les peroxysomes.....	44
1.3.4.2.5. La xanthine oxydase.....	45
1.3.4.2.6. La lipoxygénase.....	45
1.3.4.3. Les stress oxydatifs exogènes.....	45
1.3.5. Les processus de morts cellulaires déclenchés par les nanoparticules de gadolinium et de l'irradiation .....	46
<b>Chapitre 2 : Les processus d'élimination des cellules cancéreuses .....</b>	<b>48</b>
<b>2.1. Généralités .....</b>	<b>48</b>
<b>2.2. Les formes de morts cellulaires typiques .....</b>	<b>49</b>
2.2.1. La mort cellulaire de type 1 : L'apoptose .....	49
2.2.1.1. Morphologie et caractéristiques biochimiques de l'apoptose .....	49
2.2.1.2. Identification des facteurs pro-apoptotiques .....	50
2.2.1.2.1. Les protéases spécifiques des cystéinyl-aspartate (caspases).....	51
2.2.1.2.2. Les protéines de la famille des Bcl-2 .....	53
2.2.1.3. Les voies de signalisation de l'apoptose .....	54
2.2.1.3.1. L'étape d'initiation de la voie extrinsèque .....	55
2.2.1.3.2. L'étape d'initiation de la voie intrinsèque .....	57
2.2.1.3.3. La voie des Perforine/Granzyme .....	59
2.2.1.3.4. L'étape commune de l'exécution de l'apoptose.....	61
2.2.1.4. Le rôle physiologique et physiopathologique de l'apoptose .....	61
2.2.2. La mort cellulaire de type 2 : la mort autophagique .....	62
2.2.2.1. Morphologie et caractéristiques biochimiques de l'autophagie .....	62
2.2.2.2. Les acteurs moléculaires de la régulation de l'autophagie .....	63
2.2.2.3. Les mécanismes de l'autophagie .....	64
2.2.2.4. Aspects physiologiques de l'autophagie.....	65
2.2.3. La mort cellulaire de type 3 : La nécrose et la nécroptose.....	66
2.2.3.1. Morphologies et caractéristiques biochimiques de la nécrose .....	66
2.2.3.2. Les voies de signalisations de la nécrose et de la nécroptose.....	66
2.2.3.3. Les voies d'initiation de la nécroptose .....	67
2.2.3.3.1. La formation du complexe I .....	68
2.2.3.3.2. La formation du complexe II .....	69
2.2.3.3.3. La formation du nécrosome .....	69
2.2.3.4. L'exécution de la nécroptose .....	69
2.2.3.5. Le rôle physiologique de la nécrose et de la nécroptose .....	70
<b>2.3. Les autres formes de morts cellulaires atypiques et la sénescence cellulaire</b>	<b>70</b>
2.3.1. Généralités .....	70
2.3.2. L'entose, le processus d'invasion cellulaire .....	71
2.3.2.1. Les aspects morphologiques et biochimiques de l'entose .....	71

2.3.2.2. Les voies initiatrices de l'entose .....	72
2.3.2.3. Les conséquences de l'entose .....	73
2.3.2.3.1. Conséquences au niveau de la cellule hôte .....	73
2.3.2.3.2. Conséquences au niveau de la cellule cible.....	73
2.3.2.4. Rôles physiologiques et physiopathologiques de l'entose .....	75
2.3.2.4.1. Rôles physiologiques de l'entose .....	75
2.3.2.4.2. Rôle de l'entose dans le processus physiopathologique .....	77
2.3.3. La sénescence cellulaire .....	78
2.3.3.1. Les aspects morphologiques et biochimiques de la sénescence cellulaire..	78
2.3.3.2. Les mécanismes moléculaires associés à la sénescence cellulaire .....	79
2.3.3.2.1. Rôle de TP53 sur le déclenchement de la sénescence.....	80
2.3.3.2.2. La voie de signalisation dépendante de la protéine P16 <sup>INK4A</sup> /RB.....	81
2.3.3.3. Les mécanismes de déclenchement de la sénescence cellulaire .....	82
2.3.3.3.1. La sénescence répliquative .....	82
2.3.3.3.2. La sénescence induite par les oncogènes.....	83
2.3.3.3.3. La sénescence induite par la perte de PTEN (PICS) .....	83
2.3.3.3.4. La sénescence induite par les stress oxydatives.....	84
2.3.3.4. Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence cellulaire .....	85
2.3.3.4.1. Rôle bénéfique des SASP sur les tissus .....	86
2.3.3.4.2. Rôle néfaste des SASP sur les tissus.....	87
2.3.3.5. Aspects physiologiques et physiopathologiques de la sénescence cellulaire.....	88
2.3.4. La catastrophe mitotique .....	89
2.3.4.1. Déroulement de la mitose.....	90
2.3.4.2. Déclenchement de la catastrophe mitotique.....	91
<b>Article scientifique .....</b>	<b>95</b>
<b>Discussions Scientifiques.....</b>	<b>96</b>
1. La combinaison GdBN et IR déclenche une sénescence cellulaire.....	96
2. La combinaison GdBN+IR déclenche le cannibalisme cellulaire .....	98
3. Les cellules sénescents sont cannibales .....	99
4. Les cellules sénescents cannibales dégradent la cellule cible.....	100
5. Un mécanisme s'apparentant à la phagocytose ? .....	102
6. La combinaison GdBN+IR peut déclencher une réponse anti-tumorale .....	103
7. Contexte pratique de l'utilisation des nanoparticules de gadolinium et de la radiothérapie dans le traitement des cancers.....	104
<b>Annexe .....</b>	<b>106</b>
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>107</b>



## Table des illustrations

### **Chapitre 1 : Les nanosciences et la radiothérapie en cancérologie**

Figure 1 : Photo de Richard Feynman .....	16
Figure 2 : Propriétés d'une nanoparticule .....	18
Figure 3 : Phénomène de rétention et de perméabilité (EPR) .....	21
Figure 4 : Principe de microdosimétrie et répartition de la dose d'irradiation en présence de nanoparticules .....	23
Figure 5 : Les agents de contraste à haut poids moléculaire avec AgulX .....	24
Figure 6 : Distribution des GdBN dans les poumons .....	25
Figure 7 : Principe d'un agent radiosensibilisant de haut poids moléculaire.....	26
Figure 8 : Synthèse des nanoparticules de gadolinium, AgulX.....	28
Figure 9 : Mécanisme d'internalisation des nanoparticules .....	31
Figure 10: Localisation subcellulaire des nanoparticules de gadolinium .....	32
Figure 11 : Mesure de l'internalisation des nanoparticules de gadolinium dans les différents organes après 3h ou 24h d'injection en intraveineuse.....	33
Figure 12 : Biodistribution des nanoparticules de gadolinium <i>in vivo</i> .....	34
Figure 13 : Adaptation aux conditions de stress hypoxique.....	35
Figure 14: Mécanisme moléculaire en réponse aux lésions de l'ADN .....	37
Figure 15 : Activation des isoformes de NOX .....	41

### **Chapitre 2 : Les nanosciences et la radiothérapie en cancérologie**

Figure 16 : Classification des différentes formes de morts cellulaires. ....	48
Figure 17 : Morphologie d'une cellule en apoptose .....	49
Figure 18 : Mécanisme d'apoptose chez <i>C.elegans ced</i> par rapport aux cellules des mammifères .....	51
Figure 19 : Classification des caspases en fonction de leur domaine .....	53
Figure 20 : Les différents domaines composants BCL2. ....	54
Figure 21 : Mécanisme moléculaire de l'apoptose extrinsèque .....	57
Figure 22 : Mécanisme moléculaire de l'apoptoses intrinsèque .....	58
Figure 23 : Mécanisme d'oligomérisation de APAF-1 .....	59
Figure 24 : Mécanisme de la voie des Granzymes .....	60
Figure 25 : Voie de signalisation de l'autophagie.....	64
Figure 26 : Voie de signalisation associée à la nécroptose .....	68
Figure 27 : Structure de cellule dans une cellule : l'invasion cellulaire .....	72
Figure 28 : Mécanismes moléculaires de la sénescence cellulaire .....	80

Figure 29 : La sénescence réplivative.....	82
Figure 30 : La sénescence induite par les oncogènes.....	83
Figure 31 : La sénescence induite par la perte de PTEN .....	84
Figure 32 : La sénescence induite par d'autres stress cellulaires.....	85
Figure 33 : La régulation des SASP.....	86
Figure 34 : Rôle physiologique et physiopathologique de la sénescence cellulaire .....	88
Figure 35 : Déroulement des différentes étapes de la mitose.....	91
Figure 36: Les différentes morphologies résultant d'une division cellulaire anormale .....	92
Figure 37 : Schéma comparatif de différents types de catastrophe mitotique .....	93
Figure A1 : Représentation chimique de la nanoparticule de gadolinium .....	106

## Remerciements

Je voudrais avant tout remercier le Dr. Jean-luc Perfettini, mon tuteur scientifique durant mes années de Master et mon directeur de thèse. Durant ces six dernières années passées, il m'a apporté de nombreux conseils et une confiance inébranlable qui m'ont été précieuse. Durant les périodes les plus difficiles, il a su me redonner courage et espoir. Ainsi je voudrais tout simplement dire lui exprimer un grand **Merci** pour ses encouragements, sa patience et sa disponibilité! Ensuite, mes remerciements viennent pour le Pr. Eric Deutsch pour m'avoir accueilli dans le laboratoire (et codirigé avec Jean-Luc) et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse à leurs côtés. Les conseils qui m'ont été prodigué pendant les réunions de laboratoire (*in english, of course*) ont été instructives et m'ont permis de me pousser à m'exprimer en anglais. Ces présentations orales devant le laboratoire ont d'ailleurs été une période de stress intensive. Toutefois, on se rend rapidement compte qu'il s'agit d'un moment privilégier pour exposer ces résultats et prendre du recul sur ces propres travaux de recherche. Par ailleurs, je n'oublie pas d'exprimer mes sincères remerciements au Pr Olivier Tillement et les collaborateurs de la société Nano-H pour m'avoir apporté des conseils, invité à des congrès sur les nanoparticules (Nanohybride) et bien sûr les envois de fiole de nanoparticules de gadolinium.

Ensuite, je voudrais remercier mes collègues Laurent, Audrey P., Raza, Haïthem, Qiuji, Isabelle, Nazanine ainsi qu'auc nouveau arrivants Camille, Awatef, Mélanie et d'Elodie, au cours de l'année. Leur joie et leur bonne humeur ont été une source de motivation et de re-motivation. Leur aide et les nombreux encouragements ont été un atout pour m'aider atteindre la ligne d'arrivée avec brio. J'espère qu'ils se souviendront de mon magnifique cadeau dans la salle de culture le 22 avril 2015. Ce jour restera gravé à jamais dans ma mémoire et même dans nos mémoires ! Bien entendu, mes remerciements vont également à l'ensemble du laboratoire à savoir : Michèle, Céline C., Audrey n°2, Sonia, Vanessa, Emilie, Dorine, Nathalie, Sofia Lydia, WL, Ping, Céline L et Delphine pour leur soutien et leur aide.

Je fais également un petit clin d'œil à mon ancien laboratoire d'accueil l'UMR1185 (ou anciennement appelé U693). Ce laboratoire était pour moi le début de ma vie dans la recherche. Le professeur Marc Lombès ainsi que son équipe (Say, Mathilde, Damien) m'ont accueilli dans leur laboratoire au cours de mes deux années de BTS. Leur générosité et leur passion pour la recherche ont été un tremplin dans ma carrière. Je voudrais ainsi leur rendre l'appareil en leur remerciant de tout cœur.

Enfin je voudrais terminer mes mots en remerciant ma famille et mes amis d'avoir été patient et compréhensif au cours de mes années d'étude en biologie. En effet, je n'ai pas pu être présent à tous les événements majeurs et je tenais à m'excuser. Toutefois, leur présence au cours de ma soutenance de thèse me ferait chaud au cœur car je voudrais qu'ils apprécient à sa juste valeur mon investissement dans mon travail. Enfin, ce jour marquera enfin la fin d'un épisode rempli de sacrifices et de difficultés mais aussi le début d'une nouvelle histoire.

## Table des abréviations

### Noms de protéines et molécules chimiques

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	<i>Apoptosis induced-factor</i>
<i>AgulX</i>	<i>Activation guided by irradiation by X-rays</i>
AMBRA-1	<i>Beclin 1 regulated autophagy</i>
APAF-1	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
APC/C	<i>CDH1-containing anaphase-promoting complex</i>
APTES	aminopropyl-triéthoxysilane
ARN	Acide ribonucléique
ATG	<i>Autophy related protein</i>
ATG8-LC3	<i>Microtubule associated protein light chain 3</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
Au	Atome d'Or
BAG	<i>Bcl-2 associated athanogenes</i>
BAX	<i>Bcl-2-Associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BH	<i>Bcl-2 homology</i>
BID	<i>BH3-interacting domain death</i>
BIF-1	<i>Bax-interacting factor 1</i>
BMF	<i>Bcl2 modifying factor</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
BUB1	<i>Budding uninhibited by benzimidazole 1</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CASP	Caspase
CD	Cluster de différenciation
CDC25A	<i>Cell division cycle 25 homolog</i>
CDKI	<i>Cyclin dependant kinase inhibitor</i>

CED	<i>Caenorhabditis elegans ced</i>
CHK2	<i>Checkpoint kinase-2</i>
clAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis 1</i>
CMFDA	5-Chloro-méthyl fluorescéine
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMTMR	5-6-(((4-chloro-méthyl)benzoyl)amino)tétra-méthyl rhodamine)
CRD1	<i>Cystein rich domain-1</i>
CSF-1	<i>Macrophage colony-stimulating factor-1</i>
DED	<i>Death effector domain</i>
DEG	Diéthylène glycol
DIABLO	<i>Direct IAP-associated binding protein with pl</i>
DIOC <sub>6</sub> (3)	<i>3,3'-Dihexyloxacarboyanine iodide</i>
DISC	<i>CD95 death-inducing signaling complex</i>
DOTAGA	Acide tri-acétique 2,2',2''-(10-(2,6-dioxotétrahydro-2H-pyran-3-yl)-1,4,7,10-tétra-azacyclododécane-1,4,7-triyl)
DPI	Di-phényleneiodinium
DTPA	Acide diéthylène triamine penta-acétique
DUOX	<i>Dual oxidase</i>
DUOXA	<i>Dual oxidase activator</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ETS	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 homolog</i>
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADD	Domaine FAS
FAS-R/L	Connu sous le nom de <i>apoptosis Antigen 1</i> (APO-1 ou CD95)
Fe	Fer
FLIP	FLICE-inhibitory protein
GADD45	<i>The growth arrest DNA damage</i>
Gd	Gadolinium
GdBN	<i>Gadolinium-based nanoparticle</i> (pour nanoparticule de gadolinium)
Gzm	Granzyme
H2A.X	Histone H2A.X
H2O2	Dihydrogène
HDM2	<i>Human double minute 2</i>

Hf	Hafnium
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia induced factor-1 <math>\alpha</math></i>
htrA2/OMI	<i>Temperature requirement A2, mitochondrially-located serine protease</i>
ICAD	<i>Inhibitor of caspase-activated DNase</i>
ICAM1	<i>Intracellular-adhesion molecule 1</i>
Il-1	Interleukine-1
I $\kappa$ K	<i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
LAMP	<i>Lysosomal-associated membrane protein</i>
LCT	Lymphocytes cytotoxique T
LFA1	<i>Leukocyte function associated protein 1</i>
LIMP	<i>Lysosomal-integral membrane protein</i>
MAD1-MAD2	<i>(Mitotic spindle assembly checkpoint -1/-2)</i>
MAPK-P38	<i>Mitogen associated protein kinase</i>
MCC	<i>Mitotic checkpoint complex</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MKK3	<i>MAP kinase kinase 1</i>
MKK6	<i>MAP kinase kinase 6</i>
MLC2	<i>Myosin light chain 2</i>
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
MMP	<i>Matrix metallo-proteinase</i>
MNR	Complexe protéique composé de la protéines <i>Mre11</i> , <i>Rad50</i> et <i>Nbs1</i>
MntBAP	Acide 4-benzoïque-manganèse-tetrakis-porphyrine
MPT	Transition de perméabilité mitochondriale
MRE11	<i>Meitotic recombination 11 homolog 1</i>
MPS1	<i>monopolar spindle protein 1</i>
mTOR	<i>Mammlian target of rapamycin</i>
NAC	N-acétyl cystéine
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
NEMO	<i>NF<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NF $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NKG2D	<i>Natural-killer group 2, member D</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor pyrin domain containing 3</i>
NOX	<i>NAPDH oxidase</i>

NOXA	<i>NADPH oxidase activator 1</i>
O2	Dioxygène
PARP-1	Poly-(ADP-Ribose) polymérase 1
PE	<i>Phosphatidyl-éthanolamine</i>
PEG	Polyéthylène glycol
PLAD	<i>Pre-Ligand assembly domain</i>
PP12	<i>Placenta protein 12</i>
PPAR- $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\alpha</math></i>
PPM	Perte du potentiel mitochondriale
PS	Phosphatidyl-sérine
PTEN	<i>Phosphatase tensin homolog</i>
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RB	<i>Retinoblastoma</i>
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RP1	<i>Receptor-interacting serin/threonine-protein kinase 1</i>
SAHF	<i>Senescence associated heterochromatin foci</i>
SASP	<i>Senescence associated secretory phenotype</i>
SDF	<i>Senescence associated DNA damage foci</i>
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SOD-1	Superoxyde dismutase 1
SOD-2	Superoxyde dismutase 2
TEOS	Orthosilicate de tétraéthyle
TNF-1R	<i>Tumor necrosis factor 1 receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis Factor <math>\alpha</math></i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TRADD	<i>TNFR associated death domain</i>
TRAF2	<i>TNFR-associated factor 2</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRAIL-R1	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1</i>
TRAIL-R2	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2</i>
TWEAK	<i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>



UVRAG	<i>UV radiation resistance associated gene</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine-1
VPS	<i>Vacuolar protein sorting 34</i>
WEE1	<i>WEE1 G2 checkpoint kinase</i>
Z-VAD FMK	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O- méthyl]- fluorométhylkétone

### **Termes scientifiques et techniques**

CDB	Cassures Double Brins
DAMPs	<i>damage associated molecular patterns</i>
DSB	double strand break
EPR	<i>enhanced permeability retention</i>
GdBN+IR	Combinaison GdBN et IR
Gy	Gray
IR	Irradiation
IRM	Imagerie à résonance magnétique
KERMA	<i>Kinetic energy released per unit mass</i>
LMDS	Dommages multiple localisés
MSC	Cellules mésenchymateuses
NK	<i>Natural killer</i>
NP	Nanoparticules
OIS	Oncogene induced senescence
ORL	Oto-rhino-laryngée
PAMPs	<i>Pathogens associated molecular patterns</i>
PCS	Spectroscopie à Corrélation Photonique
PICS	<i>PTEN loss-induced cellular senescence</i>
QD	Quantum dot
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SIDA	Syndrôme de l'immuno-déficience acquise
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase UTP nick end labelling</i>

### **Autres**

ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
DGS	Direction générale de la santé

## Chapitre 1 : Les nanosciences et la radiothérapie en oncologie

### 1.1. Généralités en oncologie et en radiothérapie

Le cancer est un problème majeur de santé publique mondiale. Cette maladie cause plusieurs millions de décès chaque année. De nombreuses possibilités thérapeutiques sont disponibles pour traiter cette maladie. Les principales techniques employées sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces dernières peuvent s'avérer être efficaces pour traiter les tumeurs, mais elles présentent toutes l'inconvénient de ne pas être totalement efficaces et d'être mal supportées par les patients (effets indésirables). De nombreux efforts ont été mis en place afin de diminuer les effets secondaires de chacune de ces techniques. Grâce à la modernisation de la société et aux avancées technologiques, une nouvelle discipline a fait son apparition aux côtés de ces traitements : la nanobiotechnologie. La nanotechnologie a connu un immense progrès et couvre de nombreux domaines tels que l'industrie cosmétique, l'industrie pharmaceutique, la médecine, l'informatique et l'environnement. De nos jours, de nombreux produits dérivés reposent sur la nanobiotechnologie et ces produits s'invitent de plus en plus dans le marché public. Au cours de ce manuscrit, nous nous intéresserons à la place de la nanobiotechnologie en oncologie et plus particulièrement, au côté de la radiothérapie.

#### 1.1.1. La naissance de l'industrie de la nanobiotechnologie



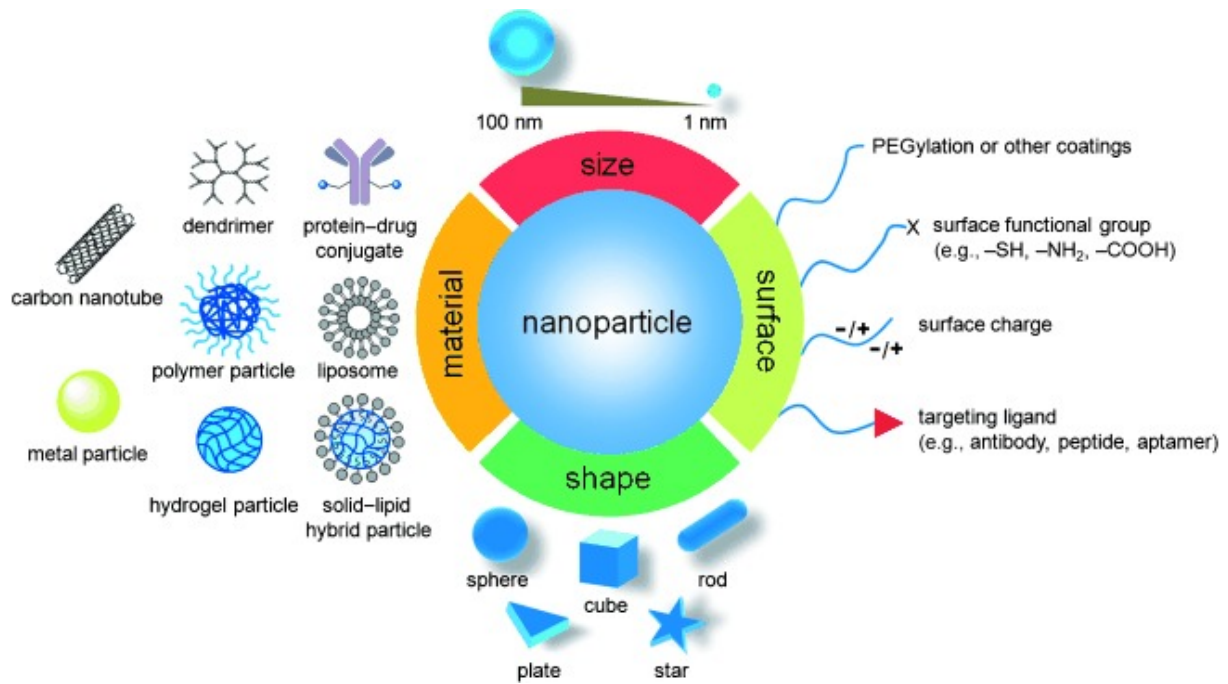
**Figure 1 : Photo de Richard Feynman** (Illustration venant de Emilio segre visual archives)

Le rêve du physicien Richard Feynman (Prix Nobel 1959) était de créer des outils révolutionnaires permettant d'explorer l'infiniment petit. Au cours de sa conférence nommée « *There's plenty of Room at the Bottom* », qui littéralement signifie « Une chambre cachée au fin fond de la trappe », le Professeur Feynman a fait naître la possibilité de développer des matériaux à l'échelle nanométrique. A cette époque, les outils technologiques n'étaient pas suffisamment avancés pour élaborer un tel projet. A partir des années 1970, les études de physique, de chimie et la science des matériaux ont permis de donner naissance aux premiers matériaux à l'échelle nanométriques. Ce n'est qu'à partir de 1981 que la nanobiotechnologie est reconnue par la communauté scientifique. En oncologie, de nombreux chercheurs ont conçu de nouveaux matériaux aux fonctions multiples qui est (i) de

détecter les tumeurs, (ii) de modéliser avec précision la tumeur, (iii) de délivrer le principe actif tout en épargnant les tissus sains contre les effets indésirables des traitements et donc d'améliorer l'index thérapeutique. Ces matériaux ont été rendus possibles grâce à d'importants moyens à la fois humains et financiers et continuent d'apporter un intérêt majeur au côté de la chirurgie, de la chimiothérapie et de la radiothérapie.

### **1.1.2. Définition d'une nanoparticule**

La conception de tels nano-objets doit être encadrée afin d'évaluer les potentiels risques sanitaires aussi bien pour l'environnement que pour l'Homme. La définition des critères physico-chimiques d'une nanoparticule a été recensée, en partie, dans le texte de référence décrite par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM). L'ANSM définit que les nanoparticules sont des composées sous une forme cristalline inférieure à 100 nanomètres. Ces dernières peuvent s'agglomérer pour former des structures complexes. Une liste de plusieurs catégories de produit utilisant les nanoparticules a été établie par la Direction Générale de la Santé (DGS). Ces nanoparticules sont classées selon leur degré de porosité, de la répartition de taille des nanoparticules, de la pureté de l'échantillon, de l'aspect (forme, longueur, largeur), de la surface, des charges globales, de leur biodisponibilité, de la distribution dans l'organisme et de la pénétration cutanée (Figure 2). L'ensemble de ces caractéristiques conditionne les propriétés physiques et chimiques qui pourront être utilisées dans des domaines spécifiques. Bien que ces nanoparticules suscitent des interrogations par la population, la communauté scientifique et les autorités publiques sur la sécurité sanitaire des nanoparticules ont mis en œuvre des études toxicologique afin d'évaluer l'innocuité des nanoparticules. Par ailleurs, étant donné la complexité des nanoparticules tant par leur diversité que par leurs propriétés méconnues, la classification de ces dernières est susceptible d'évoluer. Malgré le manque de législation française et européenne, il reste tout de même important de préciser que la manipulation des nanoparticules est encadrée auprès d'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire).



**Figure 2 : Propriétés d'une nanoparticule**

Les nanoparticules se différencient par la taille (entre 1 nm et 100 nm), le type de matériaux (nanotubes de carbone, dendrimères, protéines conjuguées, particules métalliques, particules en polymères, liposomes, particules en hydrogel, particules hybrides entre support solide et lipide), la forme (sphère, cube, bâtonnet, plaque ou étoile) et par les groupements chimiques à la surface de la particule (PEGylation ou autres type de surfactant, groupements fonctionnels  $-SH$  ;  $-NH$  ;  $-COOH$ , charges électrostatiques ou ligands de cible tels que des anticorps, des peptides ou des aptamères). (Sun et al., 2014b)

### 1.1.3. Les différents types de nanoparticules utilisés en médecine

Les nanoparticules (NPs) destinées à l'utilisation médicale sont nombreuses et sont classées selon deux types : les NPs inorganiques ou les NPs organiques.

#### 1.1.3.1. Les nanoparticules organiques

Les nanoparticules organiques sont des matériaux compatibles au milieu biologique. Elles peuvent encapsuler des produits de nature lipidique, des acides nucléiques ou bien encore des peptides. Les NPs organiques sont principalement entourées d'une bicouche lipidique et servent de transporteurs de molécules hydrophiles comme les médicaments solubles tels que le cisplatine ou des acides nucléiques (ADN, ARN) (Devulapally and Paulmurugan, 2014). Les NPs peuvent adopter différentes structures comme des liposomes, des micelles polymériques et des dendrimères. Les formes les plus basiques sont les

liposomes tandis que les formes les plus complexes sont les micelles polymériques. Ces micelles polymériques se composent d'un ensemble de complexe lipidique ramifié. Elles ont la particularité de former une surface hydrophile qui est compatible avec un milieu physiologique tandis le cœur de la NPs forme un compartiment hydrophobe. De nombreuses études ont exploité la partie hydrophobe afin d'incorporer des molécules insolubles tels que le Paclitaxel. Des études de pharmacocinétique ont montré qu'une fois que ces NPs avaient atteintes leur cible – dans ce cas présent la tumeur - elles libèrent lentement leur contenu à proximité de cette dernière. L'emploi de tels NPs permet ainsi d'exposer durablement le principe actif au sein de la tumeur. Toutefois, elles présentent l'inconvénient de diffuser son contenu aussi bien dans les cellules saines que les cellules tumorales (Maeda, 2012).

#### 1.1.3.2. Les nanoparticules inorganiques

Les NPs inorganiques sont des composés inertes qui sont moins soluble et qui réagissent moins que les NPs organiques dans un environnement biologique. Leur comportement varie en fonction des contraintes physiques et chimiques dans laquelle elles s'exposent. Elles peuvent être à base de carbone, de quantum dots (QD), ou de molécules de haut poids moléculaire (Fer, Or, Gadolinium, Hafnium). Suivant leur nature physico-chimique, ces NPs peuvent révéler de nombreuses propriétés. Pour illustrer l'importance de la nature de ces NPs, les QD présentent des propriétés de fluorescence qui couvrent toutes les longueurs d'onde. L'émission de cette fluorescence est dépendante de la taille de la NP. Elles présentent également la particularité d'émettre une fluorescence stable (Yue et al., 2013). En biologie moléculaire et cellulaire, de nouvelles techniques de marquage fluorescent emploient ces QD afin de limiter le photo-blanchiment des préparations d'immunohistochimie. D'autres NPs inorganiques ont vu le jour ces dernières années. Il s'agit de molécules de haut poids moléculaires qui sont très utilisées en radiothérapie. Elles augmentent la dose d'irradiation au sein de la tumeur. Des travaux menés par Dr. Maggiorella et ses collaborateurs ont utilisé des NPs à base d'oxyde d'Hafnium (NBTXR3) d'une taille d'environ 50 nm. Ces travaux de recherche ont montré que la combinaison de NBTXR3 et l'irradiation favorise la régression tumorale. Néanmoins, ils ont observé une importante toxicité (Maggiorella et al., 2012). Cette toxicité s'explique par le fait que les nanoparticules n'étaient pas très bien éliminées par le système rénal. Ainsi l'inoculation avec une faible toxicité constitue une priorité en recherche translationnelle.

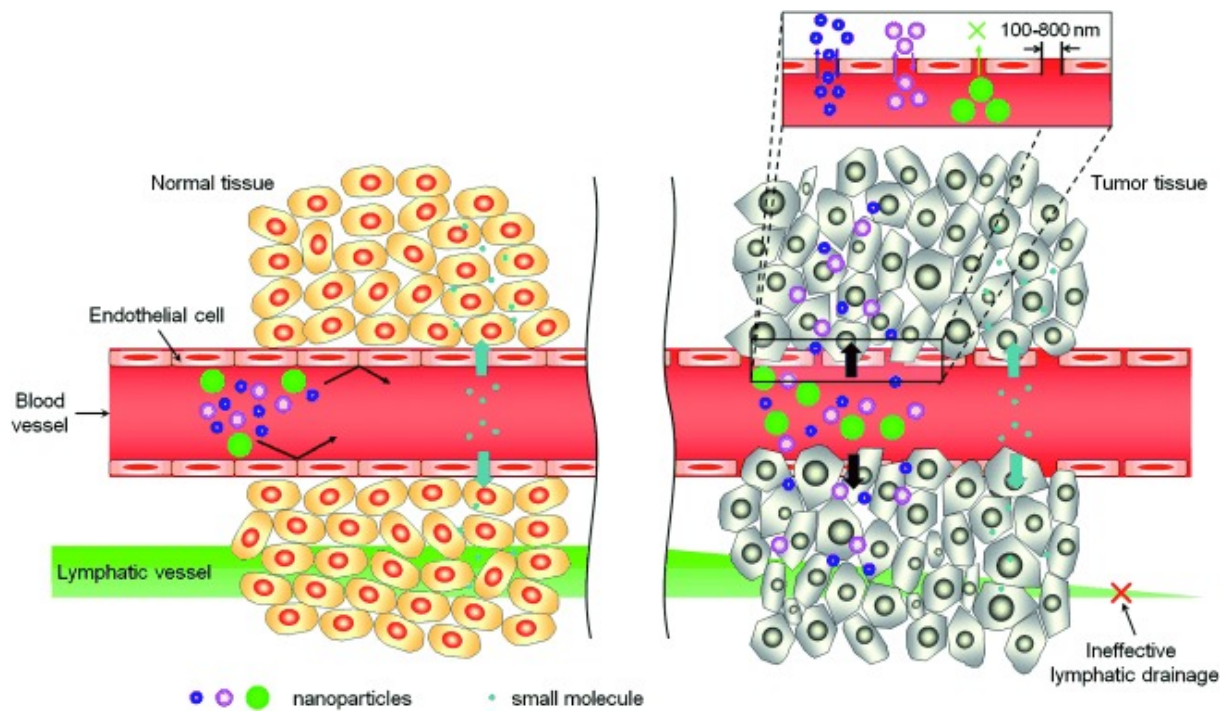
#### 1.1.4. Applications technologiques des nanoparticules en milieu médical

##### 1.1.4.1. Généralités

Le développement ambitieux de la nanotechnologie au service de la médecine et plus spécifiquement dans le traitement des cancers, a permis de générer des nanoparticules ayant des propriétés uniques (Piktel et al., 2016). Leur propriété est telle que les NPs ont permis d'améliorer les techniques de diagnostics médicaux et thérapeutiques. Ces composés dits d'utilité théranostique ont un but double, la détection/modélisation tridimensionnelle de la masse tumorale et le traitement des cancers. Ces composés peuvent s'avérer très utile pour suivre l'évolution de la tumeur et permet d'améliorer le confort des patients tout en réduisant la lourdeur des procédures. De plus, elles servent également à réduire les effets toxiques non ciblés des molécules conventionnelles utilisés (isotope ou élément radioactif).

#### 1.1.4.2. Comportements des nanoparticules dans l'organisme

Les nanoparticules ont un comportement différent par rapport aux solutés dans la circulation sanguine (Figure 3). En effet, Matsumara et ses collaborateurs ont observé une accumulation préférentielle des nanoparticules dans les tumeurs solides (Matsumara et al., 1986). Au sein de ces tumeurs, une croissance des vaisseaux sanguins en périphérie du site tumoral se forme, ce phénomène est appelé angiogénèse. Ces vaisseaux permettent d'assurer un apport continu en oxygène et en nutriment. Toutefois, la croissance tumorale étant anarchique, la structure des vaisseaux nouvellement formée rend l'environnement poreux et perméable aux composés inférieurs à 800 nm. En plus de ce phénomène de perméabilité s'ajoute un défaut de drainage lymphatique qui favorise la rétention des macromolécules au sein de la tumeur. Ainsi ces phénomènes naturels dit de rétention et de perméabilité ou effet EPR (*Enhanced Permeability Retention*) sont responsable de l'accumulation des nanoparticules et génèrent un différentiel de concentration entre le volume tumoral et la partie saine (Sun et al., 2014b). Cette accumulation préférentielle est donc bénéfique pour une application théragnostique.



**Figure 3 : Phénomène de rétention et de perméabilité (EPR)**

*Schéma représentant la distribution des nanoparticules dans les tissus sains et les tissus tumoraux. Ces tissus tumoraux étant plus poreux (entre 100 et 800nm), les nanoparticules peuvent ainsi diffusées librement au sein du volume tumoral. L'absence de drainage lymphatique favorise la rétention des nanoparticules (Sun et al., 2014b).*

### 1.1.5. L'application de la nanobiotechnologie en radiothérapie

#### 1.1.5.1. Les rayonnements ionisants

Il est décrit différents types de rayonnements ionisants et les plus décrites sont les rayonnements de type  $\gamma$  ou X. Les rayons  $\gamma$  sont des rayonnements naturellement produites par une source radioactive de césium 137. L'énergie produite est l'ordre de MeV mais cette source étant instable au cours du temps et perdre son énergie. Les rayons X sont des rayonnements électromagnétiques et sont produites artificiellement par un tube de Coolidge. L'énergie produit est l'ordre du KeV, stable au cours du temps et l'intensité de l'énergie peut être modulée. Ainsi les rayons X sont les plus utilisées en radiothérapie car en fonction de la zone à irradier, la profondeur et la nature du tissu, la dose d'irradiation à administrer est différente. Quelque soit le type de rayonnement utilisées, ces dernières peuvent induire des lésions de l'ADN ou produire des espèces réactives de l'oxygène (par effet de radiolyse). Ces stress cellulaires peuvent déclencher une réponse à l'irradiation en oxydant les protéines ou lipides, déclencher une réponse aux lésions de l'ADN. Si ces stress cellulaires persistent, ces cellules peuvent alors déclencher une mort cellulaire ou dans certains cas

contribuer à la tumorigénèse. Les cellules qui ne sont pas éliminées sont alors qualifiées de cellules radiorésistantes (Baskar et al., 2012).

#### 1.1.5.2. Principe fondamental de la radiothérapie

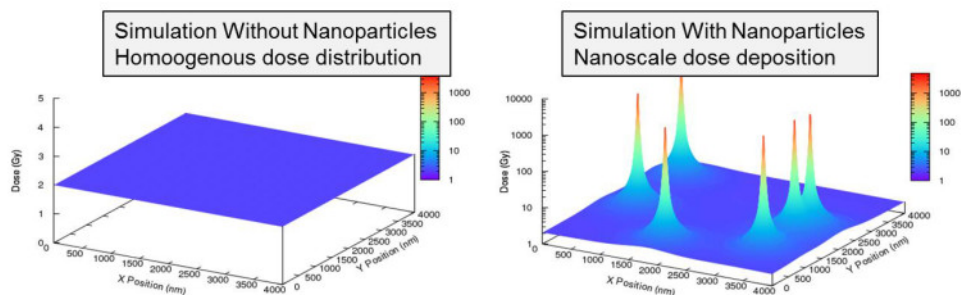
Le principe fondamental des techniques de radiothérapie consiste à exposer la zone à traiter avec des rayons ionisants. Ces rayons interagissent au sein des cellules tumorales et déclenchent différents processus létaux tels que l'apoptose, la nécrose ou d'autres formes de morts cellulaires qui participent à la destruction des cellules cancéreuses au niveau des tissus traités. Elle peut également contribuer à rendre une tumeur immunogène et permettre ainsi le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale (Ma et al., 2013). En principe, la dose totale d'irradiation délivrée dans la tumeur conditionne l'efficacité de la radiothérapie mais une exposition prolongée ou de fortes doses d'irradiation provoquent des effets indésirables à long terme sur les tissus sains adjacents (fibrose) et peut s'avérer inefficace lorsqu'il s'agit de tumeurs solides résistantes aux rayons ionisantes. La stratégie actuelle pour traiter les tumeurs radiorésistantes consiste à délivrer une forte dose d'irradiation dans le volume tumorale avec un faisceau d'électron ou un étalement des séances d'irradiation afin de permettre aux cellules saines de réparer les dommages radio-induits. Par ailleurs d'autres techniques telles que la radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle ou la radiothérapie stéréotaxique sont des techniques qui ont pour objectif de délivrer des doses suffisamment importantes dans le volume tumoral tout en limitant l'exposition au niveau des zones saines (Baskar et al., 2012). Ces prouesses technologiques ont démontré leur efficacité chez les patients suivant le type de la tumeur, sa localisation et sa taille. Toutefois, ces techniques sollicitent l'installation d'infrastructures lourdes et onéreuses. Il a donc été proposé de développer des nanoparticules encapsulant des composés à haut poids moléculaire afin d'augmenter la dose locale au sein de la tumeur, ce qui permettrait d'administrer une dose d'irradiation globale plus faible pour une même efficacité. Tout le défi des chercheurs repose ainsi sur le développement de ce type de nanoparticule capable d'augmenter la dose locale et de les utiliser comme agents radiosensibilisants qui épargnent les effets toxiques au niveau des zones saines.

#### 1.1.5.3. Principe fondamental de la dosimétrie

La dosimétrie est un principe primordial afin de comprendre la relation entre l'effet physique des NPs encapsulant des composés de haut poids moléculaire et l'augmentation de la dose globale. En radiothérapie, la détermination de la dose exacte déposée au sein du



tissu est essentielle afin de ne pas dépasser le seuil de toxicité. En effet, l'énergie transmise par les rayonnements ionisants dans un milieu biologique doit être mesurée pour des raisons de radioprotection. Cette énergie est mesurée en prenant en considération le dépôt de dose globale dans un volume donné. Le Kerma (*Kinetic Energy Released per unit MAss*) exprimée en  $K.Kg^{-1}$  ou en Gray (Gy) est l'unité permettant de mesurer l'énergie absorbée. En présence de nanoparticules de haut poids moléculaire dans un volume donné, l'irradiation génère un dépôt de dose locale à proximité des particules de haut poids moléculaire Z (Figure 4, panneau gauche). Une simulation de Monte Carlo permet de prévoir un phénomène de dépôt de dose hétérogène (Lux et al., 2015) (Figure 4, panneau de droite). En prenant ainsi en compte le phénomène de l'ionisation de l'eau par la présence d'oxygène, appelé radiolyse de l'eau se produit. Une grappe d'ionisation forme des espèces réactives de l'oxygène appelées ROS (*Reactive Oxygen Species*) à proximité des nanoparticules. Ces composés sont toxiques pour la cellule et engendrent des perturbations dans les fonctions biologiques (Hervé du Penhoat, et al. 1999). Ainsi, plus la portion de NP métallique est importante dans un volume donné, plus le nombre d'impact entre les NPs et les photons seront importants. L'effet global pourrait alors être suffisamment important pour induire un effet biologique. Il est ainsi indispensable d'estimer la concentration minimale de NP en fonction du volume et la dose d'irradiation afin d'obtenir l'effet biologique voulu en radiothérapie.

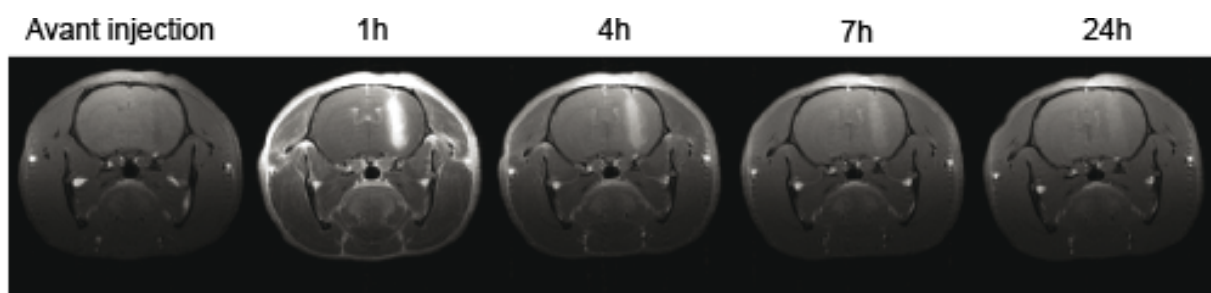


**Figure 4 : Principe de microdosimétrie et répartition de la dose d'irradiation en présence de nanoparticules**

*Courbe théorique réalisée par la simulation de Monte-Carlo consiste à prédire le dépôt de dose local exprimé en Gray (Gy) à proximité des nanoparticules au cours d'une exposition aux irradiations comparé à un dépôt de dose homogène. Cette simulation prédit une augmentation aiguë de la dose d'irradiation à proximité des nanoparticules contenant des atomes de haut poids moléculaires (tels que le Fer, l'Or ou le Gadolinium) (Lux et al., 2015).*

#### 1.1.6. Les agents contrastants à haut poids moléculaire

L'imagerie médicale a une place prédominante en radiothérapie et permet de d'apprécier le volume tumoral (Figure 5). L'usage d'agents de contraste de haut poids moléculaire permet d'améliorer la résolution dans le cadre d'imagerie à résonance magnétique (IRM). Les principaux agents de contraste sont l'oxyde de fer ou l'oxyde de gadolinium. Ils sont administrés par voie intraveineuse ou par voie orale. Ces composés, comme par exemple l'oxyde de gadolinium, possèdent des propriétés magnétiques. En présence d'un champ magnétique externe, l'oxyde de gadolinium émet un signal magnétique sous faible dose qui lui confère des propriétés d'agent de contraste améliorant l'IRM. Ces signaux sont traités informatiquement et permettent d'apprécier les structures tissulaires, le réseau vasculaire et surtout de modéliser la tumeur à irradier. Une fois que la tumeur a été identifiée, le radiothérapeute adapte la zone d'irradiation en fonction de la taille de la tumeur tout en prenant compte les organes vitaux qu'il ne faut pas irradier (cœur, pancréas, cerveau). Toutefois, l'ion de gadolinium libre ( $Gd^{3+}$ ) est toxique pour l'organisme et est rapidement pris en charge par le système hépatique. La vectorisation de l'ion  $Gd^{3+}$  dans des nanoparticules inorganiques ou organiques augmentent la durée de vie de la nanoparticule dans l'organisme, réduit la toxicité hépatique et stabilise le contraste global de l'image (Tubiana et al., 2010)

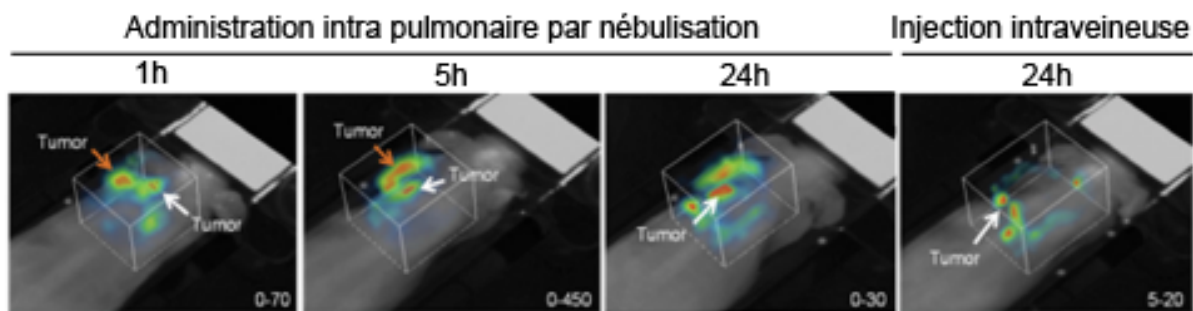


**Figure 5 : Les agents de contraste à haut poids moléculaire avec AgulX**

*Radiographie d'une coupe transversale du cerveau à partir d'une souris. L'image a été obtenue par une technique d'imagerie à résonance magnétique (IRM) en présence d'un agent de contraste, AgulX (nanoparticules de gadolinium à différents temps (avant injection, 1h, 4h, 7h, 24h après injection)). On observe que les nanoparticules accentuent les structures en périphérie de la boîte crânienne et au niveau de la tumeur après 1h suivant l'injection. Le signal s'estompe à partir de 4h (Verry et al., 2011).*

L'usage des GdBN dans le cas des cancers du poumon est intéressant lorsqu'il s'agit de cellules cancéreuses présentant une dissémination métastatique élevée. En effet, les cellules cancéreuses pulmonaires sont capables de se disséminer rapidement dans les poumons. Elles forment de nombreuses tumeurs secondaires. Ainsi, l'administration des

GdBN dans les voies aériennes constitue une stratégie de choix. Dans ce cas présent, des études menées par Bianchi et Tassali ont établi un modèle de murin pour lequel le système immunitaire est déficient et présentant des tumeurs pulmonaires humaines. Après administration par voie aérienne des GdBN, les résultats d'IRM ont permis de détecter et de modéliser les différents sites de croissance tumorale. L'usage de ces GdBN en diagnostique s'avère efficace (Bianchi et al., 2014, 2015; Tassali et al., 2016) (Figure 6).



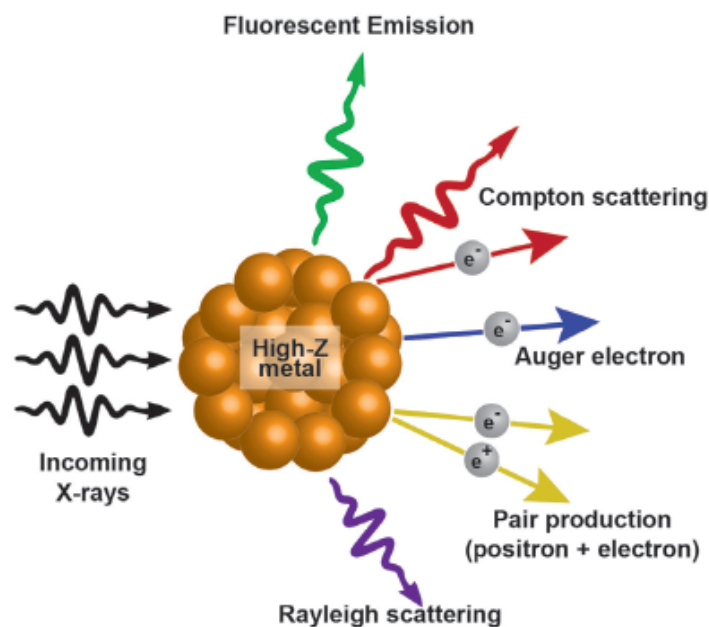
**Figure 6 : Distribution des GdBN dans les poumons**

Séquence d'image obtenue à différents temps après une administration des nanoparticules de gadolinium (GdBN) par voie aérienne comparée à une administration intraveineuse. On observe une meilleure accumulation dans le volume tumoral dans les poumons lorsque celle-ci est administrée par les voies respiratoires (Dufort et al., 2015).

#### 1.1.7. Les agents radiosensibilisants

Une fois que la tumeur a été détectée puis modélisée, le radiothérapeute peut ainsi procéder à l'irradiation de la tumeur. Afin d'améliorer l'efficacité du traitement, le clinicien peut notamment employer des agents radiosensibilisants qui peuvent être de nature chimique, comme le cisplatine (Toulany et al., 2014) ou plus récemment des agents de haut poids moléculaire tels que l'oxyde de gadolinium ou de fer (Kwatra et al., 2013). Les agents de haut poids moléculaire ont la particularité d'avoir une dose d'absorption élevée correspondant à son numéro atomique  $Z$  élevé. En effet, ces atomes présentent un ou plusieurs électron(s) libre(s) au niveau de leur couche externe (Figure 7). Lorsqu'un ou plusieurs photons bombardent la couche externe, un électron libre est alors éjecté de son orbite et ionise les molécules adjacentes. Ce phénomène est appelé l'effet photoélectrique. Par ailleurs, un électron d'Auger peut se produire lorsqu'un électron est éjecté de sa couche interne. Un atome dépourvu de son électron dans sa couche interne est appelé une lacune. Ainsi, un électron d'une énergie plus élevée va alors combler ce vide. Par conséquent, il y aura une libération importante d'énergie. La présence d'agent radiosensibilisant à proximité des tumeurs va augmenter l'effet photoélectrique et le nombre d'éjection d'électron d'Auger. Par conséquent, il a été observé un effet différentiel d'énergie entre la tumeur et les cellules

saines. Les effets secondaires tels que la fibrose seront réduits (Tubiana et al., 2010). Par exemple, dans le cas du modèle murin immunodéficient porteur de cellules cancéreuses pulmonaires, un traitement radiothérapeutique de 10 Gray a été réalisé. Les résultats démontrent que le traitement combiné avec des nanoparticules de gadolinium et de l'irradiation, augmente significativement la survie des souris. Aucun effet secondaire comme des inflammations (fibrose) ou de la toxicité chronique n'ont pas été observé. De manière surprenante, un certain nombre de sujet se rétablissait de leur tumeur (Dufort et al., 2015). Ainsi, l'utilisation combinée d'agent radiosensibilisant et de la radiothérapie pourrait constituer une stratégie de choix dans le traitement anticancéreux chez les patients atteints de cancers



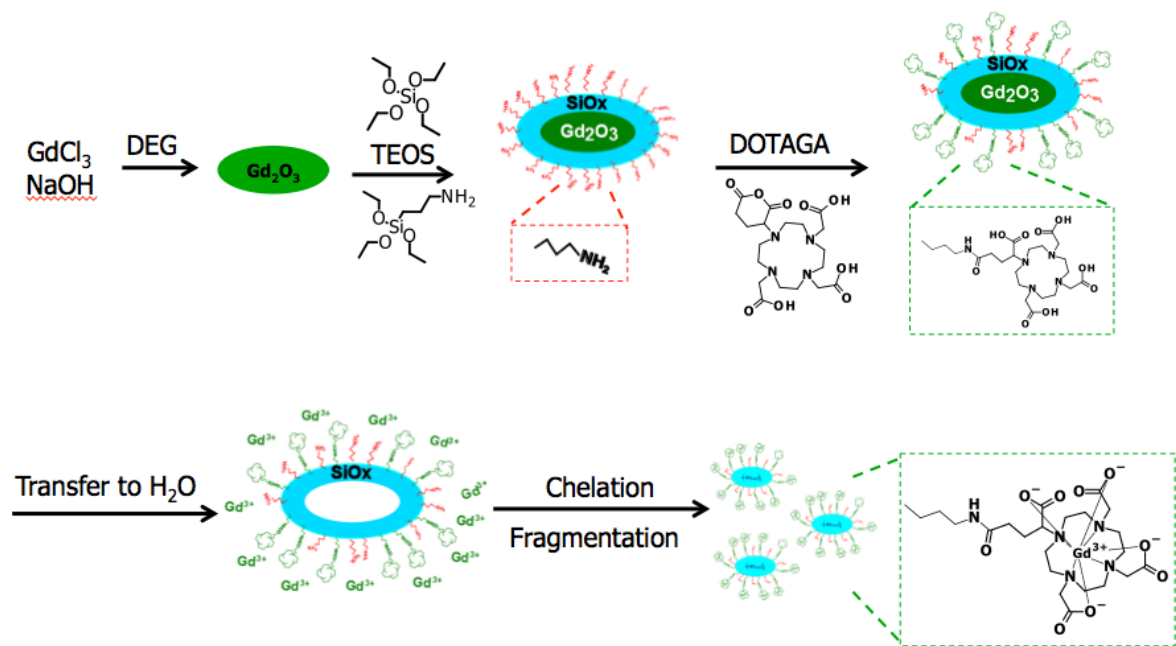
**Figure 7 : Principe d'un agent radiosensibilisant de haut poids moléculaire**

*Ce schéma représentant l'effet de l'interaction des rayons X sur un atome métallique de haut poids moléculaire (Z élevé). Lorsque les rayons X interagissent avec ces atomes, elles peuvent produire des photons, des électrons d'Auger, des positrons ainsi que des électrons, un effet de Compton ou bien un effet de Rayleigh. Ces phénomènes physiques peuvent modifier leur microenvironnement. Toutefois, l'étude de ces effets ne seront pas développées dans ce manuscrit (Kwatra et al. 2013).*

## 1.2. Les nanoparticules de Gadolinium à usage multimodales

### 1.2.1. La synthèse des nanoparticules de gadolinium, AgulX

De nombreuses études scientifiques emploient l'or comme agent radiosensibilisant sur une grande variété de tumeurs. Toutefois, l'administration directe d'oxyde de gadolinium, d'oxyde d'hafnium ou d'oxyde d'or dans l'organisme est rapidement prise en charge par le système rénal, en plus d'être toxique. Ainsi, ces composés sont vectorisés dans des nanostructures. La plupart des études ont synthétisé des nanoparticules à base d'or. Toutefois, le coût du produit brut est trop élevé. En effet, l'or coûte 200\$/mg (soit 39\$/ $\mu\text{mol}$ ) alors que le gadolinium coûte 1\$/mg (1,95\$/mg). La substitution de l'or par le gadolinium permet de réduire de 200 fois le coût de l'administration. Ainsi, l'équipe du Pr Olivier Tillement, a développé des nanoparticules à base de Gadolinium (GdBN) ou (également connu sous le nom commercial AgulX® (prononcé A-gui-x pour *Activation Guided by Irradiation by X-rays*) et quatre brevets valorisent ces travaux. Les caractéristiques physico-chimiques sont détaillées en **annexe**. Leurs travaux de synthèse de la nanoparticule sont résumés sur la Figure 8. Brièvement, le cœur des nanoparticules d'oxyde de gadolinium est formé selon l'équation suivante :  $2 \text{GdCl}_3 + 6 \text{NaOH} \rightarrow \text{Gd}_2\text{O}_3 + 3\text{H}_2\text{O} + 6 \text{NaCl}$  dans un milieu réactionnel à base de diéthylène glycol (DEG). Le DEG permet de prévenir l'agglomération des nanoparticules grâce à la viscosité de la solution et facilite l'assemblage des différents groupements. L'enveloppe de polysiloxane se ramifie par l'addition de l'APTES (aminopropyl-triéthoxysilane) et de l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) autour du cœur de  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ . A la fin de la réaction, un contrôle de la taille est réalisé par Spectroscopie à corrélation photonique (PCS). Cette technique permet de déterminer la taille du composé qui devrait être de l'ordre du nanomètre (4,5 nm). Du fait de la nature amphiphile du réseau de silice, les groupements amine  $-\text{NH}_3$  vont préférentiellement être exposés au niveau de la surface de la nanoparticule pour de futurs couplages. Le DOTAGA-OH est additionné dans le milieu réactionnel pour former une liaison peptidique entre la fonction alcool  $-\text{OH}$  et les fonctions amines  $-\text{NH}_3$ . Contrairement au PEG ou du DTPA, le ligand DOTAGA a été spécifiquement choisi afin de chélater préférentiellement les ions  $\text{Gd}^{3+}$ . Ainsi, lorsque les nanoparticules sont transférées dans l'eau, le complexe  $\text{Gd}_2\text{O}_3$  se solubilise et les ions libres de  $\text{Gd}^{3+}$  sont captés par le DOTAGA. A la fin de cette étape, les nanoparticules sont contrôlées, purifiées puis lyophilisées pour être stockées.



**Figure 8 : Synthèse des nanoparticules de gadolinium, AguIX**

Schéma décrit les étapes de synthèse des nanoparticules de gadolinium. En présence de NaOH et de DEG, le précipité de chlorure de gadolinium III se transforme en oxyde de gadolinium. Le TEOS est additionné dans le milieu réactionnel pour former un réseau d'oxyde de silice pour lequel l'oxyde de gadolinium est emprisonné dans le noyau tandis les groupements amine  $-NH_3$  sont exposés à la surface du réseau. Le DOTAGA est ensuite additionné et forme une liaison peptidique (entre  $-NH_3$  et  $-COOH$ ). Enfin, le complexe est transféré dans de l'eau, ce qui libère et fragmente l'oxyde de gadolinium en ion de gadolinium. Le DOTAGA chélate l'ion de gadolinium et forme la nanoparticule finale (Illustration réalisée à Vu long).

### 1.2.2. Adressage des nanoparticules au sein de la tumeur

L'adressage du principe actif est un autre critère à prendre en compte lorsqu'il s'agit de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Des études menées sur les nanoparticules de gadolinium (GdBN) ont montré qu'elles accumulent naturellement au sein de la tumeur solide. En effet, ces dernières ciblent passivement le compartiment tumoral par effet EPR (Sun et al., 2014). Pour des utilisations plus spécifiques, les GdBN peuvent faire l'objet d'un couplage spécifique par un anticorps ou un motif protéique spécifique en fonction de la nature de la tumeur et peut ainsi permettre la détection d'une tumeur avec un phénotype particulier. Pour cela, comme décrit dans la partie précédente, des fonctions

amines  $-NH_3$  libres persistent au niveau de la surface de la nanoparticule. Des anticorps, des fluorophores ou autres composés présentant une fonction  $-COOH$  peuvent ainsi être greffés. La tumeur ou les cellules cancéreuses peuvent ainsi être visualisées. La recherche d'un motif d'adressage consiste à identifier des récepteurs surexprimés au niveau de la surface des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. Le plupart des travaux scientifiques se sont intéressés dans le cible des récepteurs du VEGF (*Vascular endothelial growth factor receptor*) ou du récepteur de l'EGF (*Epidermal growth factor receptor*) (Milane et al., 2011; Shi et al., 2015). Toutefois, cette stratégie présente un inconvénient. En effet, toutes les cellules tumorales n'expriment pas de la même façon un récepteur et les effets risquent de ne pas être homogènes. Toutefois, le couplage avec un récepteur spécifique de cellules cancéreuses circulantes pourrait aux moins permettre de détecter ces dernières. A ce jour, peu le couplage de ces nanoparticules ciblant spécifiquement une population tumorale reste limitée. En effet, en considérant qu'une population génétique d'une tumeur est hétérogène, l'efficacité pourrait ainsi être diminuée ((Billaud, 2012). Afin d'illustrer l'aspect bénéfique de ces nanoparticules, une étude intéressante qui consiste à diagnostiquer la maladie de Parkinson a vu le jour. Brièvement, cette maladie se caractérise par un assemblage de monomères  $\beta$ -amyloïde soluble en un polymère de  $\beta$ -amyloïde insoluble. L'accumulation anormale de telles structures dans les cellules neuronales conduit à leur propre destruction. Le Dr Plissonneau et ses collaborateurs ont réalisé des nanoparticules de gadolinium couplées avec un motif peptidique reconnaissant les sites responsables de l'assemblage des plaques  $\beta$ -amyloïdes. L'administration de telles nanoparticules dans les cellules neuronales permettrait de détecter avec précision les plaques amyloïdes. Ainsi les résultats de ces travaux scientifiques permettraient de diagnostiquer des patients atteints de la maladie de l'Alzheimer. A long terme, ces GdBN pourraient potentiellement empêcher la polymérisation de ces plaques. Une étude approfondie dans ce sens pourrait ainsi permettre d'étendre ces travaux pour d'autres pathologies ou bien celle du cancers (Plissonneau et al., 2016).

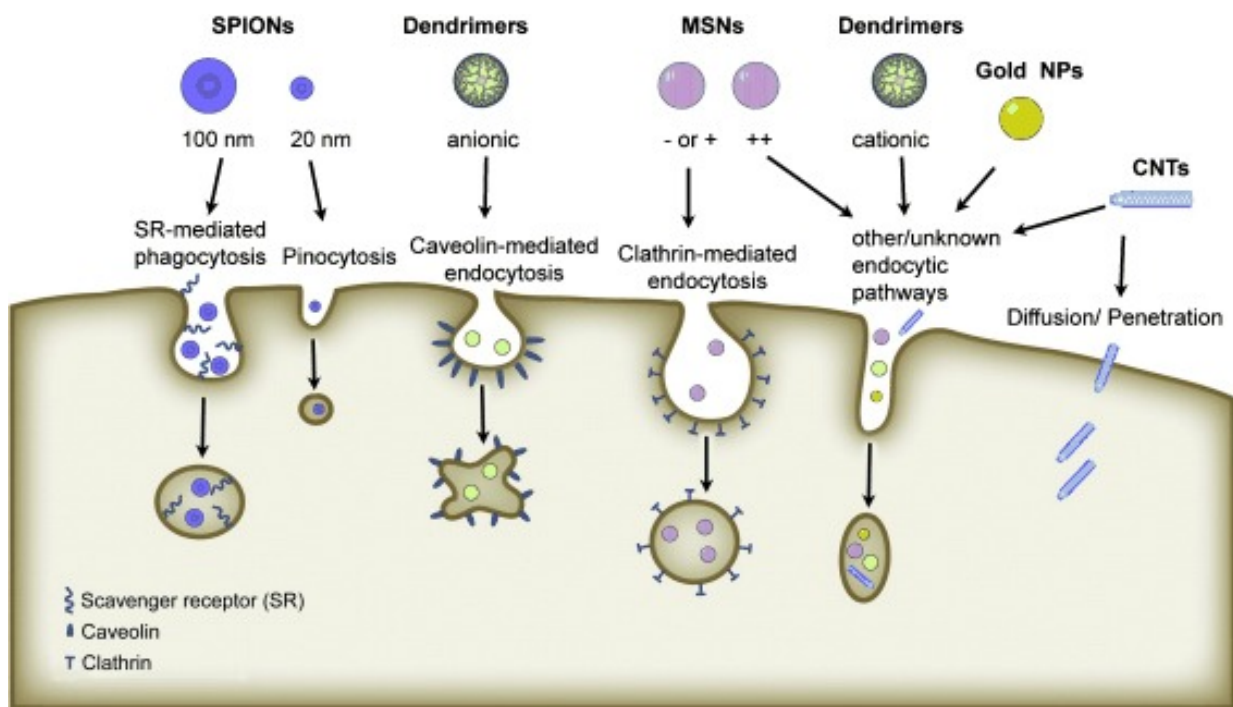
### 1.2.3. Les mécanismes d'internalisation et de distribution des GdBN

#### 1.2.3.1. Internalisation des nanoparticules

Les cellules eucaryotes, à l'exception des cellules végétales, sont entourées d'une bicouche de phospholipides et de protéines transmembranaires telles que des récepteurs membranaires ou des canaux ioniques. La membrane de la cellule forme une barrière imperméable aux solutés ou aux macromolécules et sépare le milieu extracellulaire du milieu intracellulaire. Afin de permettre les échanges de métabolites de part et d'autre de la membrane, ils ont été décrits dans la littérature scientifique plusieurs mécanismes

d'internalisation de solutés: la diffusion passive, l'endocytose dépendante des clathrines, l'endocytose dépendante de la cavéoline, la phagocytose, la pinocytose et la macropinocytose (Figure 9). Ces mécanismes se distinguent par la taille de la vésicule, de la nature du soluté ou bien encore par la présence de récepteurs spécifiques d'un composé. Différentes études se sont intéressées aux mécanismes d'internalisation des GdBN. Les travaux de recherche du Dr Rima et ses collaborateurs ont observé que ces GdBN s'internalisent par macropinocytose (Rima et al., 2013). Cette internalisation se déclenche en présence de facteur de croissance comme le CSF-1 (*macrophage colony-stimulating factor-1*) (Racoosin and Swanson, 1989) ou de l'EGF (*Epidermal growth factor*) (Haigler et al., 1979). Lorsque la membrane est en contact de ces différents facteurs, le cytosquelette se modifie et entraîne une déformation de la membrane plasmique qui forme un bras appelé lamellipode. De cette façon, une fraction du milieu extracellulaire est englobée puis le lamellipode se referme sur lui-même pour « piéger » en quelque sorte le soluté. Une vésicule appelée la macropinosome se forme et le contenu peut être recyclé ou être libéré directement au sein de la cellule. Une étude récente a permis de montrer que les GdBN peuvent être internalisées par endocytose. Cette étude a permis de montrer, notamment par des techniques utilisant la microscopie électronique à transmission (MET), que les GdBN étaient invaginées au sein de la cellule par la membrane plasmique. La fraction extracellulaire est alors internalisée sous la forme d'endosome. Ces vésicules vont ainsi fusionner avec les lysosomes (Porcel et al., 2014) (Figure 10).



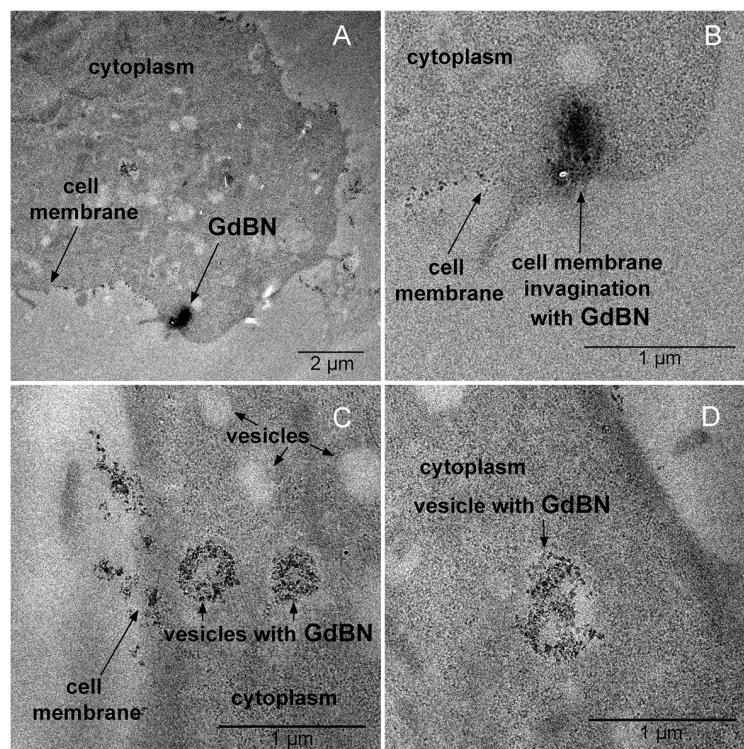


**Figure 9 : Mécanisme d'internalisation des nanoparticules**

*Ce schéma récapitule les différents mécanismes d'internalisation des nanoparticules au sein de la cellule en fonction de leur nature et de leur taille. Les nanoparticules de l'ordre de 100 nm sont internalisées par phagocytose par les récepteurs « éboueurs » tandis que les molécules inférieures à 20 nm sont majoritairement internalisées par pinocytose. Les nanoparticules de nature anionique sont préférentiellement internalisées par endocytose dépendantes de la cavéoline. Les mécanismes d'internalisation nanoparticules cationiques ou des nanoparticules d'or restent encore méconnues (Sun et al., 2014b).*

### 1.2.3.2. Localisation subcellulaire des nanoparticules

A la suite de l'internalisation des GdBN, ces dernières se retrouvent dans des peroxysomes mais pas dans le compartiment mitochondrial (Luchette et al., 2014). Des travaux de recherche sur la présence de ces GdBN au sein des peroxysomes restent encore à être caractérisés. Toutefois, il est important de préciser que des travaux de recherche dans le domaine de la chimie ont montré que dans des conditions physiologiques, les GdBN se désintègrent et forment des agrégats. Une accumulation importante nanoparticules au sein des peroxysomes pourraient engendrer des perturbations cellulaires et induire un stress comme une production de ROS (Grall et al., 2015) (Figure 10)

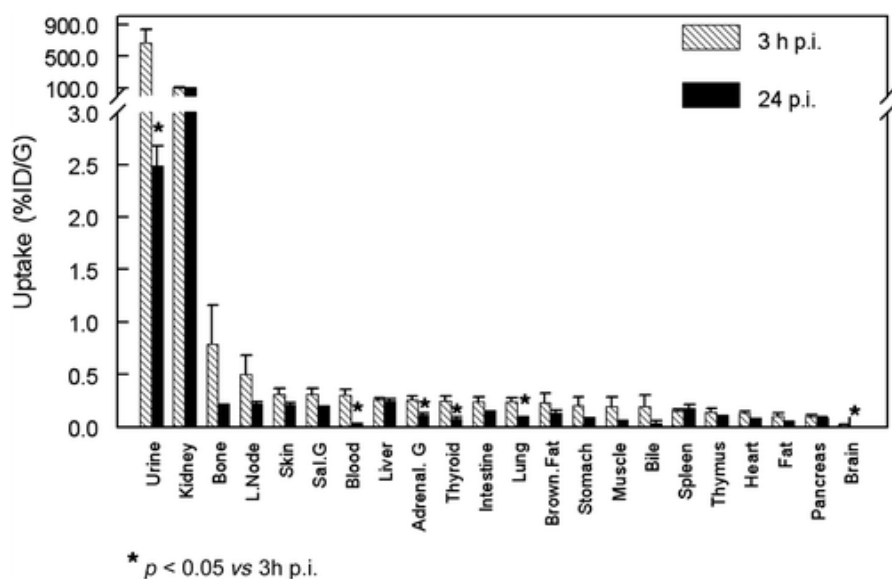


**Figure 10: Localisation subcellulaire des nanoparticules de gadolinium**

Ces images obtenues par microscopie électronique sur des frottis de cellules traitées par des nanoparticules de gadolinium permettent d'apprécier l'invagination des nanoparticules (a,b). Une fois internalisée, ces dernières sont présentes dans des vésicules (c,d) (Luchette et al., 2014; Porcel et al., 2014).

#### 1.2.4. Biodistribution et toxicité des nanoparticules de gadolinium

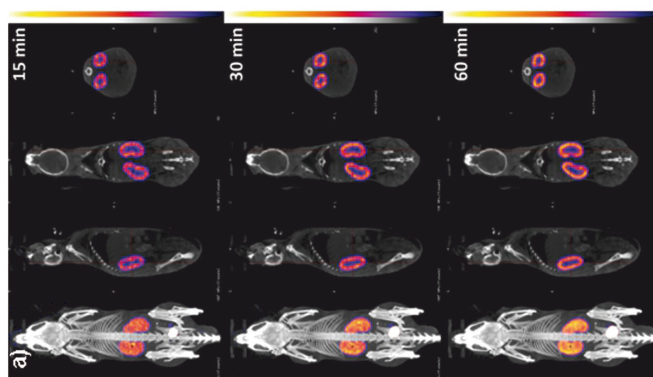
L'internalisation des nanoparticules de gadolinium n'est pas anodine pour la cellule et peut donc avoir des conséquences biologiques. Ces dernières peuvent modifier leur fonction biologique voire leur viabilité. L'utilisation en radiothérapie requiert une analyse toxicologique approfondie. Dans la littérature scientifique, de nombreux protocoles *in vitro* sont disponibles afin d'évaluer les différents paramètres qui concernent : la formation de ROS, l'activité métabolique, de l'inflammation telles que l'induction de NLRP3 (Sayan and Mossman, 2016), les altérations du cycle cellulaire ainsi que des lésions de l'ADN létales (Miladi et al., 2015). Ces différents effets peuvent modifier l'activité des cellules et provoquer une dérégulation des fonctions biologiques voire conduire à leur propre élimination. Les données toxicologiques sur les GdBN ont été réalisées par les collaborateurs du Dr Tillement sur un modèle murin C57BL/6. La première concerne la biodistribution des GdBN dans les différents organes (foie, cerveau, cœur et reins) (Figure 11).



**Figure 11 : Mesure de l'internalisation des nanoparticules de gadolinium dans les différents organes après 3h ou 24h d'injection en intraveineuse**

*Cette mesure est réalisée par spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP-AES) a été obtenue par prélèvement des différents organes. Après 3h ou 24h suivant l'administration des nanoparticules de gadolinium, ces dernières permettent de montrer une filtration rénale des nanoparticules ainsi qu'une élimination de ces dernières dans les urines (Lux, 2011).*

Leur étude a permis de démontrer que les GdBN se distribuent principalement au niveau du rein à hauteur de 30% et au niveau de la vessie à hauteur de 60% au bout de 3h après administration par voie intraveineuse. Au niveau des reins, les valeurs se stabilisent au bout de 24h. Au-delà, ces nanoparticules sont complètement éliminées de la vessie. Ces résultats montrent qu'au bout de 3h, les nanoparticules sont rapidement pris en charge par le système rénal afin d'être rapidement éliminées (Lux et al., 2011) (Figure 12). Dans cette même étude, ils ont observé que ces GdBN sont retenues au sein de la tumeur. Par ailleurs, ces nanoparticules ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique. Toutefois, dans le cas des glioblastomes (cancer du cerveau), la croissance tumorale entraîne une rupture de cette barrière. De ce fait, les GdBN peuvent ainsi cibler passivement les tumeurs par effet EPR. Grâce à ces études toxicologiques, ces travaux de recherche ont permis d'accéder à une approbation concernant l'innocuité des GdBN par l'agence américaine sur la sécurité sanitaire des produits *Food and Drug Administration* (FDA).



**Figure 12 : Biodistribution des nanoparticules de gadolinium *in vivo*.**

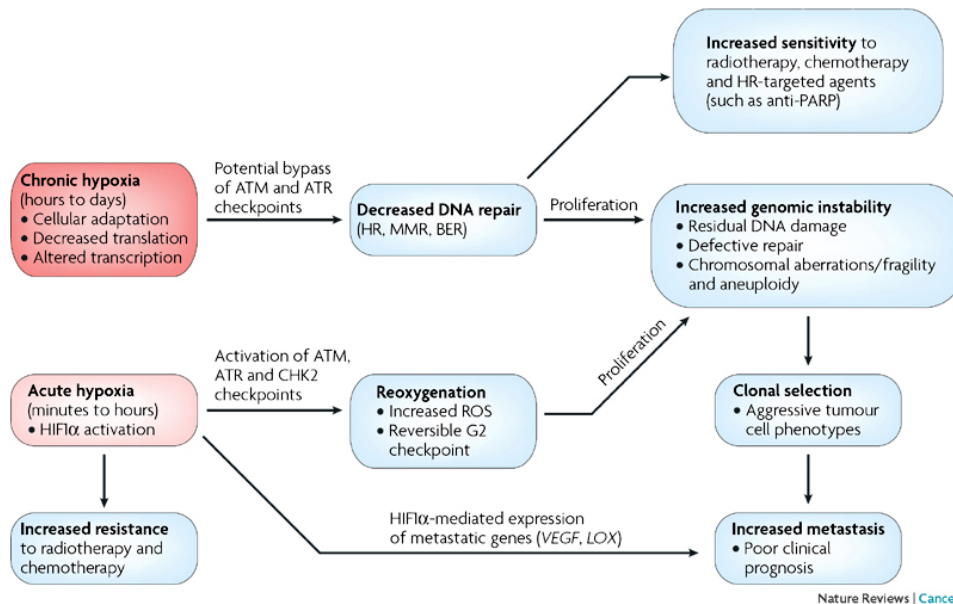
Ces différentes images obtenues par IRM montrent une élimination des nanoparticules de gadolinium au niveau des reins après 15 min suivant l'injection de ces dernières (Lux et al., 2011).

### 1.3. Les effets de l'interaction entre les nanoparticules avec les rayons ionisants

#### 1.3.1. Les paramètres de radiosensibilité

La radiosensibilité d'une population de cellules de mammifères varie lorsqu'elle est irradiée par des rayons X ou  $\gamma$  (Figure 13). Il a été admis durant plus de 60 ans une relation entre radiosensibilité et la présence de l'oxygène (Ewing, 1998). Le taux d'oxygène disponible au sein de la tumeur conditionne l'efficacité de la radiothérapie à produire un effet biologique donné. Le fond génétique et d'autres stimuli de survie cellulaire peuvent s'ajouter à ces paramètres. De nombreux travaux s'accordent sur l'importance de l'oxygénation des cellules dans le contrôle des mécanismes de réparation des lésions de l'ADN. D'autres travaux complémentaires ont rapporté une différence de survie cellulaire et en particulier une réduction du taux d'oxygène au sein de la tumeur (Littbrand and Revesz, 1964). En effet, dans des conditions de normoxie, l'irradiation provoque des cassures doubles brins et des pontages entre l'ADN et les protéines. Une accumulation importante de ces lésions entraîne la mort de la cellule. Toutefois, une diminution de la pression partielle en  $O_2$  (1 mHg) inverse le phénomène de sensibilité des cellules tumorales. De nombreux travaux ont noté une augmentation d'expression de HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia-Induced Factor-1 $\alpha$* ) lorsque le niveau d' $O_2$  diminue. HIF-1 $\alpha$  déclenche un mécanisme moléculaire qui diminue les activités métaboliques de la cellule (Bristow and Hill, 2008) et les réponses aux lésions de l'ADN (Azad et al., 2008). Ainsi, l'oxygène doit être présent au moment de l'irradiation pour exercer pleinement son effet radiosensibilisant. L'efficacité du traitement combinant GdBN et irradiation doit également prendre en compte la présence d' $O_2$ . En effet, l'étude physico-chimique de Butterworth et de Zheng a montré une formation d'ionisation au voisinage direct des

nanoparticules en présence d'O<sub>2</sub> pour former des radicaux libres. Ces radicaux libres vont ainsi pouvoir agir sur leur cible, et notamment sur l'ADN (Butterworth et al., 2008; Zheng and Sanche, 2009). Dans des conditions *in vivo*, la tumeur étant vascularisée, la combinaison du traitement GdBN et l'irradiation sera effective. Les mécanismes moléculaires qu'elle déclenche reste actuellement à être définis.



**Figure 13 : Adaptation aux conditions de stress hypoxique**

L'exposition chronique ou aiguë dans un environnement hypoxique entraîne différents phénomènes. L'hypoxie chronique entraîne une diminution de la réparation de l'ADN. Si ces cellules parviennent à proliférer, elles peuvent augmenter l'instabilité génomique. Toutefois, ces cellules sont sensibles aux certains traitements ciblant PARP. Concernant l'hypoxie aiguë, elle provoque une activation de HIF1α et sont plus résistantes à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Toutefois, lorsque ces cellules retournent dans des conditions de normoxie, le niveau de ROS augmente brutalement et provoque une instabilité génomique. La radiosensibilité doit prendre en considération l'ensemble de ces paramètres (Bristow and Hill, 2008).

### 1.3.2. Les conséquences des rayons ionisants aux niveaux de l'ADN

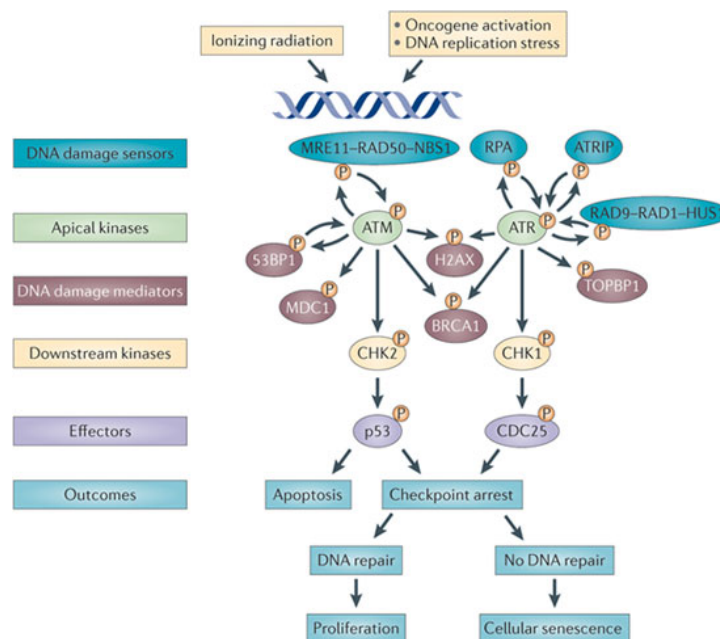
L'ADN est une longue chaîne composée de différentes bases azotées (Guanine, Thymidine, Adénine, Cytosine, Uracile). La séquence des deux brins sont complémentaires et s'assemblent en double hélice pour former une structure électroniquement neutre. Ces deux brins d'ADN comportent plusieurs gènes codant pour différentes protéines. L'altération de ces gènes provoque des modifications conduisant à la dérégulation des activités

biologiques. Ces dommages peuvent être provoqués par des altérations épi-génétiques, des phénomènes de méthylation, des défauts de réplifications, des stress exogènes tels que les dérivés de l'oxygène (ROS), ou par des pontages de l'ADN avec des protéines par effet d'ionisation. Une accumulation trop importante de ces lésions peut déclencher la mort de la cellule. En réponse à ces lésions, un mécanisme de réparation de l'ADN est alors activé. L'ADN ou les mécanismes de réparation sont des cibles de choix qui ont fait l'objet de nombreuses stratégies thérapeutiques anti-cancéreux (Kelley et al., 2014). Celle qui est la plus référencée concerne les cassures double brins (CDB) ou les dommages multiples localisés (LMDS). Les cassures qui sont qualifiées de « directes » concernent les lésions de l'ADN sont provoquées en absence d'intermédiaire chimique comme par exemple l'ionisation directe des bases azotées. Les cassures dites d'« indirectes » sont provoquées par des intermédiaires tels que les ROS. Quel que soit l'origine des stress cellulaires conduisant aux lésions de l'ADN, la plupart des stratégies thérapeutiques sont basées sur l'induction de ces nombreuses lésions de l'ADN comme par exemple la bléomycine, le cisplatine ou de forte doses d'irradiation ou des irradiation répétées (Chen et al., 2008). Ces stratégies thérapeutiques ne sont pas totalement efficaces car elles induisent de nombreux effets secondaires qui sont liées à une dose trop toxique. Ainsi l'utilisation combinée des GdBN et de l'irradiation constitue une stratégie de choix pour s'affranchir de ces effets secondaires. En effet les travaux de Miladi et ses collaborateurs ont montré une augmentation de lésions de l'ADN au sein de la population traitées. Cette augmentation de lésions de l'ADN est corrélée avec une augmentation des CDB observées grâce à un marquage fluorescent des foci de  $\gamma$ H2AX. L'origine de ces lésions de l'ADN s'explique par l'effet direct de l'irradiation mais également par les effets indirects causés par une augmentation importante de ROS au sein de la cellule. L'effet combiné de ces deux paramètres favorise la mort de la cellule cancéreuse (Miladi et al., 2015).

### 1.3.3. Les réponses aux lésions de l'ADN

La protéine qui a été identifiée dans la réponse initiale aux lésions de l'ADN est la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Figure 14). Il s'agit d'une protéine oligomérique dont l'activité kinase est stimulée par les CDB. La protéine NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*), MRE11 (*Meiotic recombination 11 homolog 1*) et RAD50 forme le complexe MRN. Il s'associe avec la protéine ATM et permet le recrutement et l'activation du point de contrôle CHK2 (*Checkpoint kinase-2*) (Lee and Paull, 2004). L'autophosphorylation de la kinase ATM au niveau de la sérine 1981 permet à la protéine de modifier sa forme multimérique (qui est inactive) en une forme monomérique (qui est active) (Bakkenist and Kastan, 2003). En absence de lésions d'ADN, ATM est inhibée par association directe avec

PP12 (Goodarzi et al., 2004). Lorsque l'ADN est lésé, ATM se dissocie de PP12 (*Placental protein 12*) et s'autosphosphoryle. Une fois activée, ATM phosphoryle à son tour de nombreuses protéines et notamment les histones H2A au niveau de la sérine 139 (ou  $\gamma$ H2AX) ce qui va provoquer le recrutement de MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*), et favorise ainsi le recrutement du complexe MRN (*Mre11, Rad50 et Nbs1*). ATM va également phosphoryler CHK, qui, à son tour, déclencher d'autres substrats comme CDC25A (*Cell division cycle 25 homolog*) par phosphorylation. La phosphorylation de CDC25A bloque l'entrée en mitose tant que les lésions de l'ADN ne sont pas réparées (Zhou and Elledge, 2000). Par ailleurs, la phosphorylation de CHK2 est capable de transactiver TP53 et P21. Ces deux protéines sont responsables de l'arrêt immédiat en phase G1 (Ekholm and Reed, 2000). Par ailleurs la phosphorylation de CDC25C au niveau de la sérine 216 amplifie la réponse de CDC2 (Mailand et al., 2000). La phosphorylation de CHK2 permet ainsi de contrôler la réparation CDB, en relocalisant BRCA1 (*BReast CAncer 1*) (Zhuang et al., 2006). Enfin, si les lésions de l'ADN sont beaucoup trop importantes, les processus de morts cellulaires seront alors engagés.



Nature Reviews | Cancer

**Figure 14: Mécanisme moléculaire en réponse aux lésions de l'ADN**

A la suite d'une exposition à un rayonnement ionisant, à des défauts de réplication de l'ADN ou à des oncogènes, le complexe MRN (*MRE11-RAD50-NBS1*) active ATM ou ATR. Le complexe active une cascade de réaction qui aboutit à une activation par phosphorylation au niveau de CHK2/P53 ou de CHK1/CDC25. Ces deux voies entraînent un arrêt du cycle. Si les lésions de l'ADN sont réparées, le cycle cellulaire reprend son cours sinon la cellule rentre dans un état d'apoptose ou de sénescence cellulaire (Sulli et al., 2012).

#### 1.3.4. Les réponses aux stress oxydatives radio-induites

Le stress oxydatif au niveau cellulaire est un phénomène qui se caractérise par un déséquilibre entre un système oxydant et système réducteur au sein d'un compartiment cellulaire. Les principales sources de production d'espèce réactive à l'oxygène (ROS) endogène sont situées au niveau des mitochondries, du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique (chaîne respiratoire), des peroxysomes et dans le cytoplasme. Les ROS d'origine exogène sont issus de la radiolyse de l'eau, des xénobiotiques (antibiotiques ou pesticides) et du système immunitaire (Rahal et al., 2014). Ces sources de ROS participent dans de nombreuses fonctions biologiques tels que l'arrêt de la prolifération et les mécanismes d'adaptions aux pressions O<sub>2</sub> et à l'élimination des pathogènes (B. Richardson and Harper, 2015). Néanmoins, une accumulation d'espèce oxydante exerce des effets délétères sur l'ADN et sur des mécanismes moléculaires. Dans les cas les plus critiques un arrêt de prolifération définitif ou une mort par apoptose peut survenir.

##### 1.3.4.1. Rôles physiologiques des ROS

Les ROS sont classés en deux catégories : les radicaux oxygénés libres tels que le radical hydroxyle, le superoxyde, l'anion superoxyde, l'oxyde nitrique et des radicaux oxygénés tels que le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le peroxydrite ou l'oxygène. Ces espèces sont donc tous dérivées de l'O<sub>2</sub>. Les radicaux libres sont des molécules qui comportent un électron libre sur leur couche périphérique et confère un pouvoir oxydatif. Toutefois, ces radicaux libres sont chimiquement instables et se transforment rapidement en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Thannickal and Fanburg, 2000). Ces ROS sont majoritairement produits au niveau des mitochondries, de la membrane plasmique par l'intermédiaire des NADPH oxydase (NOX), ou dans le cytoplasme par les peroxysomes. Les ROS provoquent des altérations par oxydation, sur des acides aminés, des molécules soufrées, des composés basiques et des composés aromatiques. Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques et sont éliminées par les protéases. En conditions physiologiques, le niveau de ROS intracellulaire est finement régulé afin de limiter les dégâts au sein de la cellule. Les ROS peuvent activer différentes voies de signalisation cellulaire tels que la voie P38, la voie *NF-κB* (*Nuclear factor κB*), ou comme messagers dans l'adaptation aux stress hypoxiques (Baeuerle and Baltimore, 1996). Ces ROS activent des kinases impliquées dans la phosphorylation des facteurs d' *IκB* en entraînant la dissociation de *NF-κB*. L'inhibition des ROS par des molécules antioxydantes telles que le N-acétyl cystéine (NAC) empêche la dissociation de *NF-κB*. Ces voies sont impliquées dans la réponse immunitaire. Les ROS sont primordiaux dans la régulation de différentes fonctions biologiques. Dans le cas d'un stress oxydatif important, un



mécanisme détoxification intervient afin de rétablir un niveau de ROS acceptable. On parlera ainsi d'« l'homéostasie redox » (Dröge, 2002). Ce contrôle est assuré par des enzymes capables de transformer les ROS en un composé moins toxique. Dans la littérature, deux familles d'enzymes ont été caractérisées, les superoxydes dismutase SOD-1, SOD-2, et la catalase. Toutefois lorsque ces mécanismes de régulation ne parviennent pas à compenser le niveau élevé de ROS, la cellule déclenche un programme de mort irréversible (Thiels and Klann, 2002).

#### 1.3.4.2. Les stress oxydatifs endogènes

Au niveau cellulaire, la principale source de production des ROS se situent au niveau de la matrice mitochondriale (métabolisme mitochondriale), la membrane plasmique (NADPH oxydases ou NOX) et dans le cytoplasme (peroxysomes).

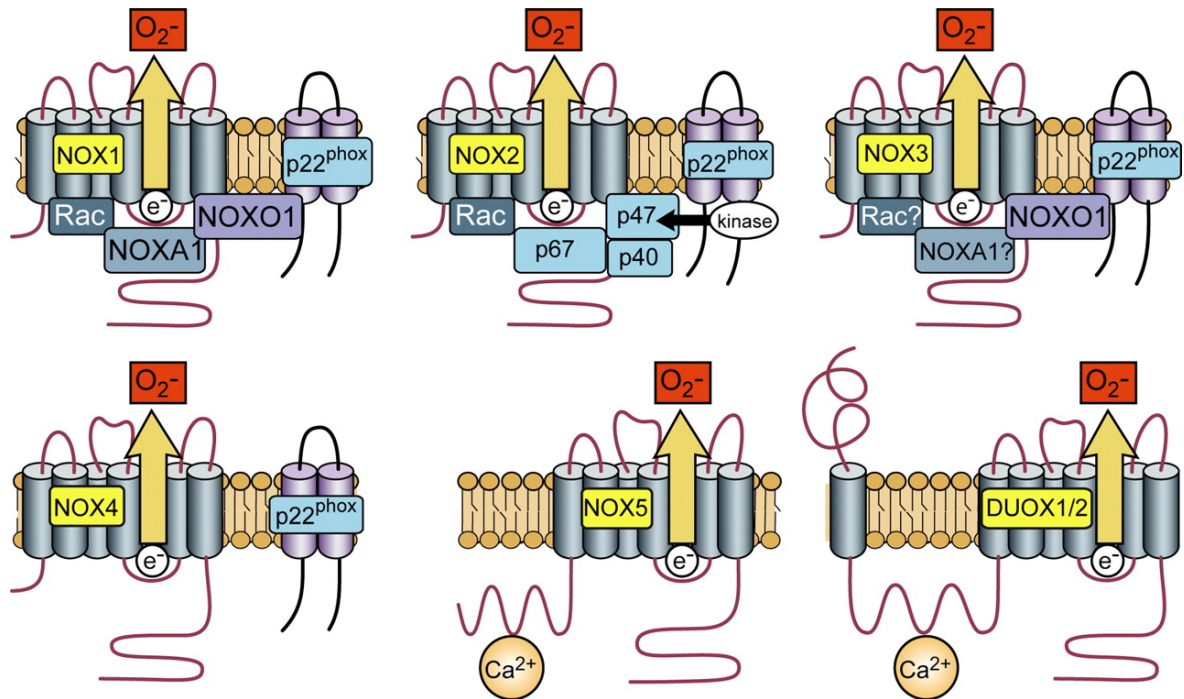
##### 1.3.4.2.1. Le métabolisme mitochondrial

La mitochondrie est un organite qui est responsable de la majorité de la production de l'énergie sous la forme d'ATP. Elle est le siège principal de production de l'énergie pour les activités cellulaires. Ces ROS sont produits au sein de la chaîne mitochondriale et plus particulièrement au sein de la matrice mitochondriale interne. Le taux de production de ROS mitochondriale varie selon le type de tissu. Lorsque le métabolisme est altéré, les ROS peuvent être libérés de leur compartiment mitochondriale et oxyder les composants cytoplasmiques. Les ROS jouent le rôle de messenger entre les différents compartiments intracellulaires et les mitochondries, ainsi qu'en réponse aux modifications de la pression  $O_2$ . A titre d'exemple, la déplétion du cytochrome c oxidase inhibe la production de ROS dans des conditions d'hypoxie dans de nombreuses lignées cellulaires. Des études préliminaires sur des souris de corps de carotide avec des chémorécepteurs démontrent qu'une hypoxie modérée conduit à une augmentation de la production de ROS. Toutefois, des souris déficientes pour p47phox empêchent la production de ROS (Baby et al., 2005) . Ce mécanisme de production des ROS dans des conditions en hypoxie est de nos jours mal élucidé. En effet, dans des conditions physiologiques, la chaîne mitochondriale produit des ROS sous la forme d' $H_2O_2$ . Le débit de production de ROS est également établi en fonction du flux d'électron au niveau de la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons. Cependant, la production de ROS apparaît plutôt liée au potentiel de la membrane mitochondriale que du flux d'électrons de la chaîne respiratoire. Il semblerait qu'il y ait une relation directe entre le potentiel de la membrane mitochondriale et la production d'anions superoxyde. Les ROS sont donc de puissant activateur des pores de

transition de la perméabilité mitochondriale. Il en résulte ainsi une chute du potentiel membranaire mitochondriale, un gonflement de la matrice mitochondriale, et dans les cas les plus extrême une rupture de la membrane externe, une libération des ROS dans le compartiment cytoplasmique et enfin la libération de cytochrome c ou du facteur proapoptotique AIF (*Apoptosis Induced-Factor*), ce qui entraîne la mort de la cellule par apoptose. Par ailleurs, les ROS sous l'action de l'anion superoxyde peuvent inhiber la chaîne respiratoire et endommager les composants mitochondriaux tels que le complexe de la chaîne respiratoire, la membrane externe, l'ADN mitochondriale.

#### 1.3.4.2.2. Les NADPH oxydases et les duo-oxydase (DUOX)

Les NADPH oxydases (ou NOX) sont des complexes multi-protéiques. Ces enzymes sont dépendantes de molécule accepteur d'électrons tels que le NADPH ou de l'O<sub>2</sub>. Leur rôle consiste à transférer les électrons du NADPH intracellulaire vers l'oxygène extracellulaire à travers la membrane plasmique et entraîne la formation de ROS. Ce transfert d'électrons génère des superoxydes qui vont être rapidement transformés en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les NOX peuvent être localisées au sein de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique et dans le noyau. La structure moléculaire des NOX contient une sous-unité catalytique membranaire par lequel transitent les électrons. Ces électrons vont alors interagir avec les molécules acceptrices d'électrons et former les ROS. Les NOX ont été principalement découvert dans des cellules ayant une activité de phagocytose. Ce processus était limité à la simple élimination des cellules phagocytées par les macrophages (Klebanoff, 1980). Toutefois, la caractérisation de la famille des NOX a permis de révéler une localisation spécifique dans la plupart des tissus. La présence de NOX dans des cellules non phagocytaires reste à être élucidée. La famille des NOX comporte sept isoformes qui ont été découvert par homologie de séquence avec NOX2.



**Figure 15 : Activation des isoformes de NOX**

Les NADPH oxydase produisent des superoxydes à partir d'électron. De NOX1 à NOX5, la sous-unité P22phox régule ces enzymes. La production des superoxydes -à l'exception de NOX5 et des DUOX- NOX1, NOX2 et NOX3 requièrent respectivement le recrutement de NOXA1/ NOXO1, P67/P47/P40 et NOXA1/NOXO1 tandis que NOX5 et DUOX1/2 a besoin de l'ion  $Ca^{2+}$  pour fonctionner (Bedard and Krause, 2007).

Les isoformes NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2 présentent des domaines catalytiques (Figure 15). A l'exception de NOX5, chacune des isoformes est régulée par un ensemble des sous-unités régulatrices qui sont p22phox, p47phox, p67phox, NOXA1 et NOXO1. Les NOX se composent d'un domaine catalytique membranaire par lequel transitent les électrons et d'un domaine membranaire qui assure le site de liaison au NADPH et des FAD. La majorité des isoformes catalytiques (NOX1, NOX2, NOX3, et de NOX4) requiert l'association avec P22PHOX pour être fonctionnelle et stabilisée. Certaines isoformes comme NOX1, NOX2 et NOX4 nécessitent également le recrutement de la sous-unité régulatrice cytosolique. On distingue les sous-unités régulatrices qui ont un rôle d'organisation structurelle ou un rôle d'activation. Les sous-unités P47PHOX et NOXO1 sont des sous-unités organisatrices. Elles ont une très forte homologie et permettent l'assemblage des complexes pour P22PHOX. De plus, elles interagissent avec P67phox et NOXA1 (*NADPH oxidase activator 1*), les sous-unités activatrices pour les adresser à la membrane plasmique. Certains complexes oxydases (NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2) ne

nécessitent pas quant à eux de sous-unités régulatrice pour être fonctionnelle. Enfin, les sous-unités catalytiques NOX5, DUOX1 et DUOX2 fonctionnent de façon autonome car elles possèdent leurs propres systèmes de régulation (Bedard and Krause, 2007). Les NOX peuvent être activées par divers facteurs de croissance (notamment le VEGF et l'angiopoïétine 1) ainsi que par l'hypoxie et l'ischémie (Chanakira et al., 2015). Les NOX sont essentielles pour les cellules phagocytaires (tels que les cellules polynucléaires neutrophiles, macrophages) lors de l'infection par des pathogènes. En effet, au cours de la phagocytose, le métabolisme énergétique est augmenté et s'accompagne d'une production importante de ROS. Cette production de ROS va permettre de détruire le pathogène. Les NADPH oxydases (et plus particulièrement NOX2) sont indispensables dans la réponse aux infections microbiennes puisque des patients déficients pour cette enzyme ne sont pas capables de combattre efficacement les infections (Chanakira et al., 2015; Rada and Leto, 2008). Par ailleurs, d'autres NOX ont été identifiés au cours de la tumorigénèse (Ameziane-El-Hassani et al., 2015; Carvalho and Dupuy, 2013). Par exemple, NOX4, les DUOX -1 et -2 sont surexprimés dans les cellules thyroïdiennes. Lorsque ces cellules présentent une activité importante de NOX4 et des DUOX et qu'elles subissent des rayons ionisants, la production en excès de ROS entraîne des lésions de l'ADN et contribue à la mort de la cellule. Par ailleurs, d'autres NOX ont été identifiées pour stimuler la prolifération cellulaire, la mort cellulaire et les fonctions immunitaires. La plupart des travaux concernant la croissance tumorale tendent à démontrer que la production des ROS par les NOX pourraient également induire une inflammation chronique et être responsable de la prolifération cellulaire (Metzler et al., 2014). En effet, la surexpression des NOX dans différents types de cancer peut provenir de la variabilité génétique intrinsèque qui conditionne l'expression des NOX. En effet lorsque le stress oxydatif au sein de la cellule est déséquilibré, les processus physiologiques sont entravés et les cassures des brins d'ADN contribuent davantage à la désorganisation des mécanismes moléculaires. Par exemple, des travaux menés sur des fibroblastes et sur la lignée HeLa surexprimant l'isoforme NOX1 montre d'importantes lésions d'ADN accompagnées d'une production de ROS réalisée par NOX1. Cette surproduction provoque à son tour des lésions d'ADN qui contribuent à l'instabilité génomique (Chiera et al., 2008). Quant aux DUOX-1 ou DUOX-2 (pour *Dual oxydase*) ou bien ThOX (*Thyroid oxydase*), leur fonction consiste à l'élimination des pathogènes, à la synthèse d'hormone ainsi qu'à l'homéostasie des cellules pulmonaires. Cette enzyme interagit conjointement avec les sous-unités DUOXA1 et DUOXA2 (Dual oxidase maturation factor) pour conférer pleinement l'activité de l'enzyme. Toutefois, une mutation des DUOX ou DUOXA contribue aux phénomènes d'hypothyroïdisme ainsi qu'aux développements de la tumorigénèse, de la transition épithélio-mésenchymateuse et de l'invasion cellulaire. En effet, il a été observé qu'une mutation dirigée de DUOX-1 provoque une perte de l'e-cadherine. La perte de l'e-

cadherine est associée à une perte de l'adhésion sur la matrice cellulaire et contribue à la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme (Little et al., 2016). Différentes études ont montré qu'une absence d'activation des DUOX1 de façon prolongée empêche la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les mécanismes moléculaires sensibles à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne peuvent donc plus se déclencher comme par exemple l'activation des récepteurs du facteur de croissance épidermique, pour EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) responsable de la régénération des tissus (Heppner and van der Vliet, 2016) ou bien dans l'élimination des pathogènes par la production d'ion hypothiocyanite à partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rada and Leto, 2008).

#### 1.3.4.2.3. La caractérisation du NAPDH oxidase-5

Les études concernant NOX5 sont quant à elles un peu plus limitées du fait dans un premier temps de l'absence de NOX5 dans le génome murin et dans un second temps par le manque d'outils biologiques fiables pour étudier ce dernier. Cependant, certaines études montrent une influence de NOX5 dans la prolifération cellulaire ainsi que dans la mort cellulaire notamment lors du cancer de la prostate et de l'ovaire (Antony et al., 2013; Bedard and Krause, 2007; Huang et al., 2012). La protéine NOX5 a été décrite dans les testicules, le foie, les vaisseaux lymphatiques, le placenta, les ovaires, l'utérus, l'estomac et dans de nombreux tissus fœtaux. Cette enzyme a été découverte pour la première fois en 2001 par deux groupes (Cheng et al., 2001). Leurs travaux ont montré que le gène de *nox5* se situait sur le chromosome 15. Il existe à ce jour 3 isoformes de NOX5 (-alpha, -béta, - gamma) qui se distingue des autres NOX (1 à 4) par la présence d'une longue chaîne intracellulaire NH<sub>2</sub>-terminal et d'un domaine EF de liaison aux Ca<sup>2+</sup> (ou *EF-hand*). Cette protéine n'est pas glycosylée (Figure 15). A ce jour, la localisation de NOX5 dans la cellule reste à être élucidée. NOX5 n'a ni besoin de l'activité biologique de P22PHOX, ni de protéines chaperonnes et ni de sous-unité activatrice pour fonctionner. Néanmoins seule la présence du Ca<sup>2+</sup> est indispensable. En effet, la liaison du calcium dans son domaine provoque un changement de conformation qui active l'enzyme. Certaines études ont cherché à caractériser le rôle de NOX5 dans le développement du cancer et certaines d'entre-elles semblent relate le développement de certains adénocarcinomes de l'œsophage. Les travaux menés par Weyemi ont démontré que deux NOX (-4 et -5) sont responsable des lésions de l'ADN induit par les rayons. La déplétion génétique de ces deux NOX dans un modèle de fibroblaste primaire est corrélée à une réduction de lésion de l'ADN. Enfin d'autres études démontrent une relation entre la production des ROS par NOX5 et la prolifération cellulaire. En effet, l'inhibition génétique de NOX5 est corrélée avec une diminution de la prolifération. L'ensemble de ces données porte à croire que la production de ROS générées par les NOX pourrait participer à la prolifération ainsi qu'à l'invasion de certaines cellules cancéreuses

(Weyemi et al., 2015). Une partie de la population cellulaire issue du système immunitaire (telles que les macrophages ou encore les lymphocytes) peuvent favoriser la croissance tumorale en partie par la sécrétion de cytokines et de molécules co-stimulatrices (Fulton et al., 1996). Le niveau d'expression des NOX est donc crucial dans le développement d'un microenvironnement oxydatif nécessaire à la production de ROS et aux déclenchements des signaux de survie proangiogénique favorisant la croissance des tumeurs et la dissémination métastatique. L'étude des fonctions et de la régulation des NADPH oxydases notamment lors d'inflammation chronique associée au cancer constitue une approche importante pour la prévention de la cancérogénèse liée au stress oxydatif.

#### 1.3.4.2.4. Les peroxysomes

Les peroxysomes sont des vésicules lipidiques contenant plusieurs types d'hydrolases (tels que la catalase ou l'urate oxidase) capables de dégrader différents composants cellulaires (bactéries, protéines). Ces vésicules sont spécialisées dans toutes les réactions d'oxydations en présence d'O<sub>2</sub>. Les peroxysomes sont également le siège du métabolisme lipidique. Ces organelles peuvent générer des ROS et des RNS (*Reactive Nitrogen Species*). Paradoxalement, les peroxysomes participent au maintien de l'homéostasie rédox (Dröge, 2002). Une dérégulation des ROS peroxisomal provoque une altération des mécanismes moléculaires et aboutit aux pathologies humaines. De nombreux travaux se sont focalisés sur les mécanismes antioxydants des peroxysomes. Toutefois, des travaux ont révélé l'existence d'un facteur de régulation PPAR- $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) responsable du stress oxydatif. Ce facteur de transcription appartient à la superfamille des ligands activateurs des récepteurs nucléaires. Elle s'hétérodimérise avec des récepteurs aux rétinoïdes et provoque une prolifération des peroxysomes (Lee et al., 1995), une régulation de l'expression de gène associée au métabolisme lipidique et une répression de la réponse anti-inflammatoire. PPAR- $\alpha$  est également impliqué dans le contrôle de la production de ROS. En effet, PPAR- $\alpha$  peut activer des NOX. Cette activation va ainsi permettre l'élimination de l'infection microbienne. L'inhibition des NOX par DPI (*diphenyleneiodinium*) empêche la production des ROS tandis qu'un agoniste de PPAR- $\alpha$  augmente la production de ROS. L'agoniste PPAR- $\alpha$  induit l'activation des sous-unités P47PHOX, P67PHOX et GP91PHOX et P47PHOX membranaire. Ce modèle moléculaire été validé sur un modèle de macrophage déficiente pour chacune des unités (Teissier et al., 2004).

#### 1.3.4.2.5. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme principalement décrite au niveau de l'endothélium vasculaire, au niveau du cœur dans des patients âgés. Allopurinol est un isomère de structure de l'hypoxanthine qui agit comme inhibiteur compétitif de la xanthine oxydase et permet de protéger les cellules des lésions de l'ADN. Cette enzyme semble s'activer au cours d'une contraction musculaire et est également retrouvée lors d'une période d'ischémie et perfusion. Cette enzyme est également retrouvée dans certaines tumeurs et son activité semble être intervenir dans la tumorigénèse, la migration et l'invasion cellulaire. Il a été observé que l'inhibition de la cathepsine S induit l'autophagie et est corrélé à une régulation positive de la xanthine oxydase associée à une production en ROS « précoce » (Huang et al., 2013). Ces ROS détériore les mitochondries et déclenche une mort cellulaire dépendante des caspases. Ils ont également observé qu'à la suite des lésions au niveau de la mitochondrie, ils ont observé une libération de ROS « tardif ». La production de ROS par la Xanthine oxydase peut participer au déclenchement d'une mort cellulaire (Huang et al., 2015).

#### 1.3.4.2.6. La lipoxygénase

Le 5-lipoxygénase (5-LOX) est une enzyme qui catalyse l'oxydation des acides gras et un peroxylipide et intervient dans la voie de la lipoxygénase. Le principal substrat est l'acide arachidonique qui est catalysé en acide 5-hydroperoxyeicosatétraénoïque pour ainsi aboutir à la production de leukotriène. Les Leucotriènes appartiennent à la famille des eicosanoïdes et agissent comme facteurs pro-inflammatoires. Une activation incontrôlée de 5-LOX peut ainsi être responsable du déclenchement de différentes pathologies telles que le cancer, le psoriasis ou l'athérosclérose (Steele et al., 1999). Une étude a observé que le 5-LOX est joue un rôle dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses dans le cancer de la prostate. En effet, lorsque 5-LOX était inhibé, l'oncogène c-myc est augmenté (Sarveswaran et al., 2015). Une autre étude confirme l'importance de 5-LOX dans la progression tumorale. L'inhibition de 5-LOX par un agent pharmacologique, le zileuton, déclenche l'apoptose.

#### 1.3.4.3. Les stress oxydatifs exogènes

Les stress oxydatifs peuvent provenir de stimuli extérieurs (tels que des xénobiotiques et les ROS issus de l'irradiation). Une fois que ces facteurs pénètrent la cellule, ils vont définitivement endommagés les différents constituants cellulaires. Les rayonnements ionisants peuvent aussi générer une production de ROS par effet de radiolyse de l'H<sub>2</sub>O. Ces

ROS vont agir au niveau de différents processus ainsi qu'au niveau de l'ADN (B. Richardson and Harper, et al., 2015) et provoquer la mort de la cellule. Enfin, Grall et ses collaborateurs ont montré que des nanoparticules de diamant hydrogénées pouvaient également induire un stress oxydatif. En effet, ils ont observé au bout de 24h d'exposition, une augmentation du niveau de ROS intracellulaire. Cette augmentation est accompagnée de plusieurs lésions de l'ADN (Grall et al., 2015). Cependant, les mécanismes de productions de ROS n'ont pas été élucidés.

#### 1.3.5. Les processus de morts cellulaires déclenchés par les nanoparticules de gadolinium et de l'irradiation

La grande finalité du traitement radiothérapeutique potentialisé par les nanoparticules contenant des atomes de haut poids moléculaires (Fer, Argent, etc...) est d'accroître l'élimination des cellules cancéreuses radiorésistantes. A ce jour, la plupart des travaux portent sur la mesure de la radiosensibilité des traitements ionisants en étudiant notamment les conséquences sur l'ADN et la croissance tumorale. Des travaux pionniers portant sur les GdBN menés par Miladi et ses collaborateurs ont permis de montrer *in vitro* une radiosensibilisation des cellules souches cancéreuses SQ20B (carcinome de la sphère ORL, Oto-Rhino-Laryngée). Ces cellules cancéreuses sont connues pour être radiorésistantes du fait de leur faible fréquence de division cellulaire. Afin d'obtenir des clones radiorésistants, ils ont réalisé un tri cellulaire en sélectionnant des marqueurs spécifiques de cellules souches qui sont CD44<sup>+</sup>/ALDH<sup>élevé</sup>. Après traitement au GdBN combiné à l'irradiation, ils ont observé que ces cellules sont bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire qui est corrélé à une production de ROS et une augmentation de lésions de l'ADN. Une diminution du potentiel mitochondriale et une fragmentation nucléaire sont observées dans le cas présent. L'ensemble de ces signes morphologiques indique qu'elles meurent à la suite d'un processus de catastrophe mitotiques. Afin de corréliser ce processus d'élimination des cellules cancéreuses à celle de la régression tumorale, ils ont réalisé une xénogreffe de cellule souche de SQ20B au niveau du flanc de la souris. Après administration intra-tumorale de nanoparticules de gadolinium et irradiation ciblée à une dose de 10 Gy, ils ont apprécié les différences de croissance entre les différentes conditions expérimentales après sept semaines. Une régression tumorale significative est observée.

Un processus de fragmentation de l'ADN de ces cellules a été révélé grâce à une technique de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transfErase UTP Nick End Labelling*). Ce processus est corrélé à une diminution de la prolifération de cellule cancéreuse ainsi que de la régression tumorale (Miladi et al., 2015). Une autre étude réalisée sur un modèle murin portant des métastases de cellules murines B16F10 confirme l'effet anti-tumorale de la

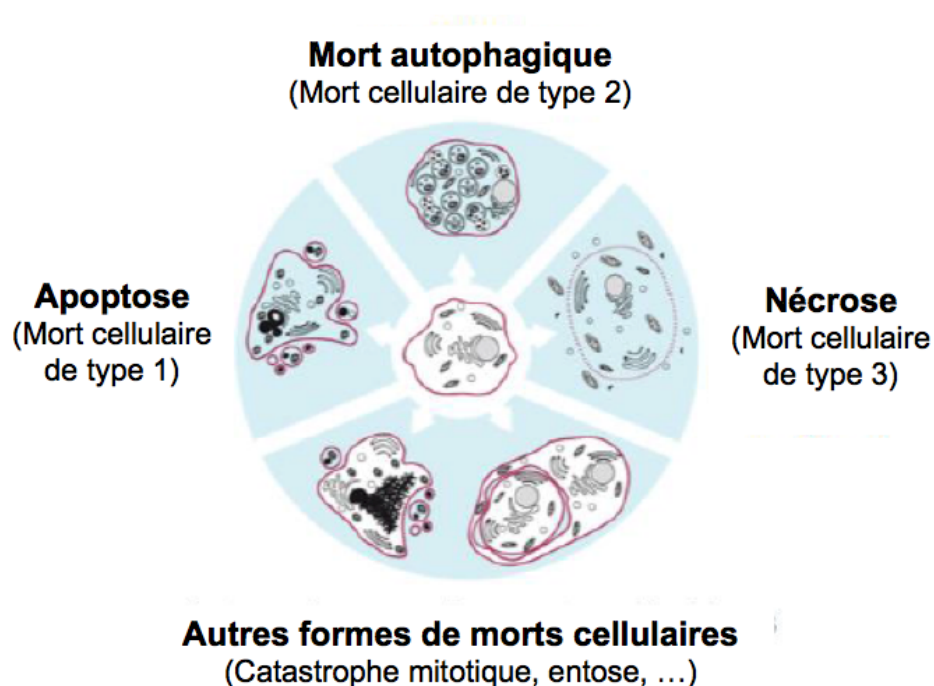


combinaison GdBN+IR (Kotb et al., 2016). L'ensemble de ces travaux *in vitro* et *in vivo* démontrent l'efficacité des nanoparticules à augmenter les effets de l'irradiation au niveau des tumeurs. Toutefois, les mécanismes responsables de la production de ROS et les processus de mort cellulaire impliqués restent à explorer.

## Chapitre 2 : Les processus d'élimination des cellules cancéreuses

### 2.1. Généralités

Comme expliqué dans le chapitre précédent, les travaux portant sur l'association des nanoparticules de gadolinium et des rayons ionisants ont permis de démontrer que cette stratégie favorise le développement de lésions d'ADN et précipite les cellules vers une mort mitotique. Ces études ont été corrélées avec des données pré-cliniques à partir de modèle murin C57BL/6 (Miladi et al., 2015). L'implication de ces processus létaux dans l'efficacité de la combinaison GdBN+IR n'a pas été encore étudiée. A ce jour, plus de seize formes de morts cellulaires ont été recensés (Galluzzi et al., 2012; Kroemer et al., 2005, 2009). L'apoptose (mort cellulaire de type 1), la mort autophagique (mort cellulaire de type 2) et la nécrose (mort cellulaire de type 3) sont définies comme étant des formes de morts cellulaires dites typiques (Figure 16). Les mécanismes d'éliminations cellulaires alternatives tels que les catastrophes mitotiques, la sénescence cellulaire ainsi que l'entose qui ne présentent peu ou pas de caractéristiques biochimiques et morphologiques des formes de morts cellulaires typiques sont classés dans un autre groupe et sont définis comme atypiques (Galluzzi 2012).



**Figure 16 : Classification des différentes formes de morts cellulaires.**

*La mort cellulaire typique regroupe l'apoptose (mort cellulaire de type 1), la mort autophagique (mort cellulaire de type 2), la nécrose (mort cellulaire de type 3) tandis que la mort atypique regroupe les autres formes de morts cellulaires (Entose, mort mitotique, sénescence cellulaire,..) (<http://www.universalis.fr/encyclopedie/morts-cellulaires/>)*

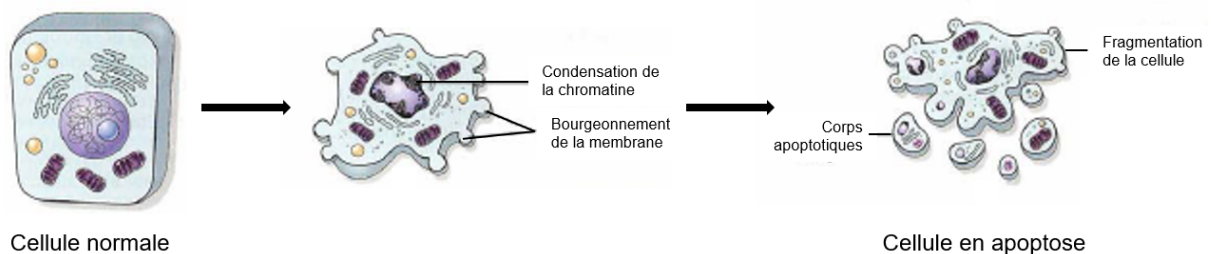
## 2.2. Les formes de morts cellulaires typiques

### 2.2.1. La mort cellulaire de type 1 : L'apoptose

L'apoptose est dérivée du mot grec « *apoptein* » qui signifie « Chute de » et décrit la chute des feuilles mortes en automne. Ce terme indique un processus physiologique génétiquement contrôlé qui aboutit à l'élimination des cellules sans endommager les cellules avoisinantes. Les cellules qui rentrent en état d'apoptose montrent des caractéristiques morphologiques et biochimiques bien précises.

#### 2.2.1.1. Morphologie et caractéristiques biochimiques de l'apoptose

Cette forme de mort cellulaire aboutit à l'autodestruction de la cellule en réponse à un stimulus. Au cours de ce processus létal, ces cellules perdent leur adhérence, se condensent, montrent des signes de pycnose nucléaire (ou caryolyse) et un contenu nucléaire fragmenté (la caryorrhexie) (Kerr et al., 1972; Rogalińska, 2002; Wyllie et al., 1981) (Figure 17). Des bourgeons commencent à se former autour de la cellule et des petites cellules nommées « corps apoptotiques » sont libérées. Ces cellules peuvent être internalisées par des cellules avoisinantes ayant une activité phagocytaire (les cellules épithéliales, les fibroblastes) (Häcker, 2000) (Fadok, 1999).



**Figure 17 : Morphologie d'une cellule en apoptose**

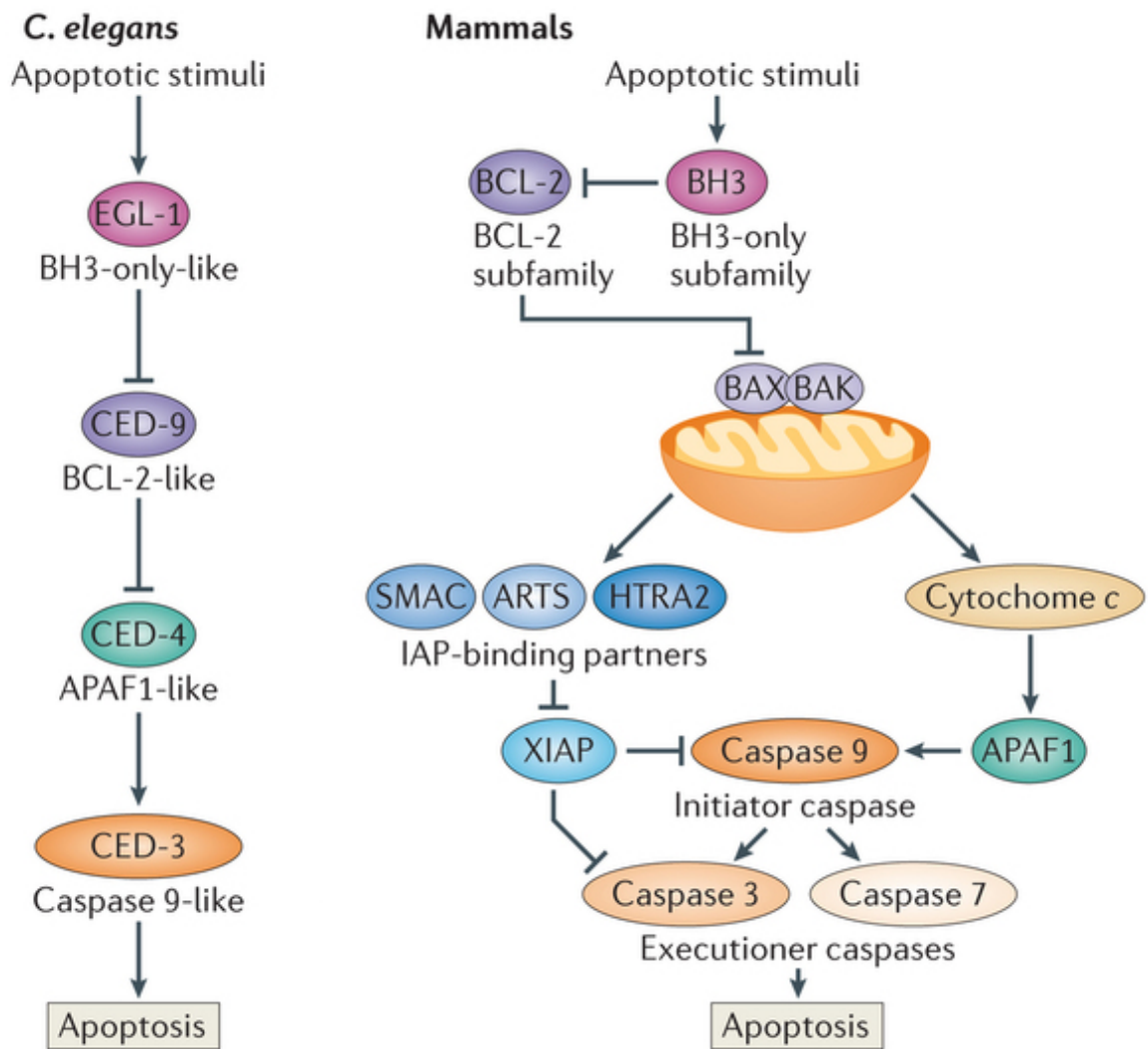
*Lorsqu'une cellule normale débute son processus d'apoptose, elle présente une condensation de la chromatine et un bourgeonnement au niveau de la membrane. A la fin de ce processus, la cellule se fragmente et forme des corps apoptotiques (Illustration provenant du blog de Sanjay).*

Toutes ces modifications morphologiques sont le résultat d'une coordination de plusieurs protéines initiatrices et effectrices de l'apoptose. Des études génétiques ont permis de révéler deux catégories de protéines conservées au cours de l'évolution qui sont (i) les protéines de la famille des BCL-2 et (ii) la famille des caspases. Les signaux de morts cellulaires décrivent plusieurs aspects phénotypiques qui sont généralement associée par :

- (1) Une activation des caspases. Ces caspases jouent un rôle crucial dans la dégradation des protéines de structures (Cohen, 1997; Nicholson and Thornberry, 1997)
- (2) Une exposition des phosphatidyl-sérines (PS) sur la surface de la membrane plasmide qui est un signal de reconnaissance et d'internalisation des cellules apoptotiques par des cellules ayant une activité phagocytaire (macrophages ou cellules avoisinantes) (Fadok et al., 1992)
- (3) Une perméabilisation de la membrane mitochondriale associée à une libération d'hydrolases et de facteurs pro-apoptotiques activateurs des caspases (Ferri and Kroemer, 2001; Joza et al., 2001; Kroemer et al., 2007).
- (4) Un clivage de l'ADN génomique au niveau des nucléosomes par des nucléases dépendantes des caspases (Arends et al., 1990) ou indépendantes des caspases (Li et al., 2001; Susin et al., 1999a).

#### 2.2.1.2. Identification des facteurs pro-apoptotiques

Tous les travaux menés sur des souches mutées d'un nématode, *Caenorhabditis elegans ced* (*ced* pour *C. elegans death*) ont été à l'origine des mécanismes de l'apoptose bien connue à ce jour. En effet, Hengartner et Hedgecock ont observé qu'au cours du développement embryonnaire de *C. elegans ced* un total de 131 cellules en état d'apoptose. C'est en 1983 que le fruit de leurs travaux a permis de révéler l'existence de deux catégories de gènes. Les gènes *ced-3* et *ced-4* comme essentiel à la mort cellulaire et *ced-9* comme gène essentiel à la survie cellulaire (Hedgecock et al., 1983),(Hengartner et al., 1992) (Figure 18). Des études d'interaction de protéine à protéine ont permis d'établir une boucle de régulation entre la protéine CED-3, CED-4 et CED-9. Un gain ou une perte de fonction de ces trois partenaires protéiques conditionne la survie ou la mort de la cellule (Figure 18, panneau à gauche).



Nature Reviews | [Molecular Cell Biology](#)

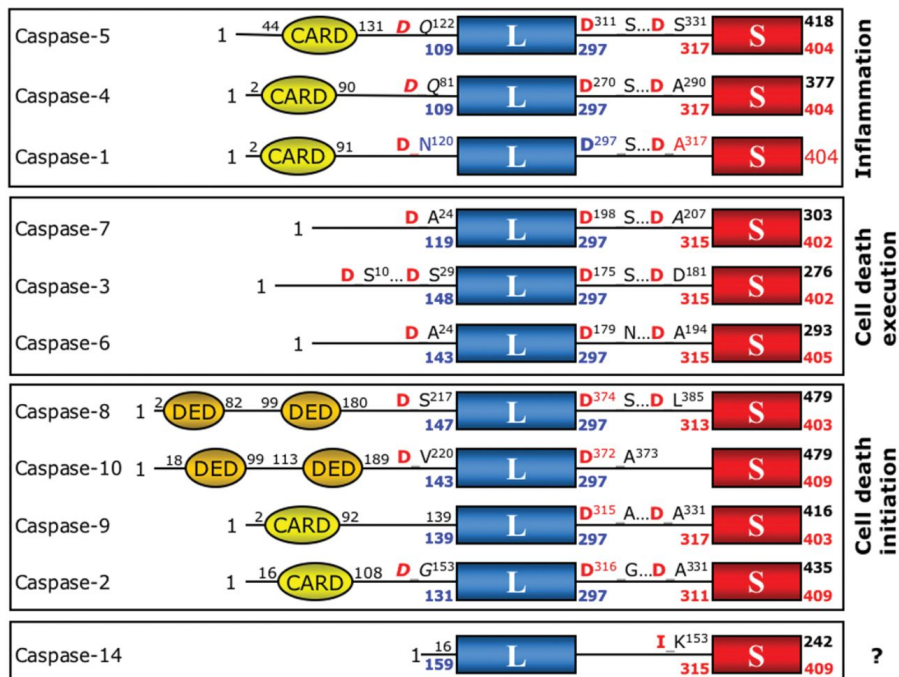
**Figure 18 : Mécanisme d'apoptose chez *C.elegans* *ced* par rapport aux cellules des mammifères**

Ce schéma montre les similitudes au niveau de la régulation de l'apoptose dans les cellules des mammifères et de *C. elegans*. A la suite d'un stimulus apoptotique, EGL-1 ou BH3 inhibent respectivement CED-9 ou BCL-2. Par conséquent, CED-4 ou APAF1 déclenchent respectivement CED-3 ou la caspase-9 et abouties à l'apoptose (Fuchs and Steller, 2015).

#### 2.2.1.2.1. Les protéases spécifiques des cystéinyl-aspartate (caspases)

Les protéases à cystéine (également connues sous le nom de caspases) ont été caractérisées chez les mammifères et présentent des homologies de séquence avec CED-3 de *C. elegans*. Chez les mammifères, la voie d'exécution de l'apoptose est plus complexe et engage plusieurs partenaires de protéines (Figure 18, panneau de droite). Les CASP se

localisent au niveau du compartiment cytosolique et sont sous la forme de proenzyme native composée d'un prodomaine NH2 terminal de taille variable, suivie d'une large sous-unité et une petite sous-unité terminale –COOH. Les caspases s'activent à la suite du clivage protéolytique entre la grande et la petite sous-unité et forme un hétéro-dimère. Cette cascade d'événement entraîne un réarrangement tridimensionnel qui confère à l'hétérodimère un site actif aux propriétés protéolytiques. Une fois activée, ces enzymes clivent leur substrat au niveau des résidus d'aspartate (Yuan et al., 1993). Toutes les caspases contiennent un prodomaine similaire suivi d'une petite et d'une grande sous-unité. Deux pro-peptides distincts ont été identifiés ; le domaine de recrutement des caspases (CARD) et les domaines effecteurs de la mort (DED). Ces domaines facilitent l'interaction avec les protéines qui contiennent les mêmes motifs (Taylor et al., 2008). Les caspases ont été identifiées au nombre de 14 et sont classées selon leurs activités biologiques (Figure 19). Les caspases effectrices (CASP3, 6 et 7) contiennent un petit prodomaine responsable des modifications biochimiques associées à l'apoptose. Les caspases initiatrices de l'apoptose (CASP2, 8, 9 et 10) sont responsables du déclenchement de l'apoptose. Elles contiennent toutes un grand prodomaine (CARD ou DED) et initient l'activation en cascade des caspases (Cohen, 1997). Les CASP1, 4, 5 ont été décrite pour agir dans le système inflammatoire tandis que la CASP12 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et est activée par les stress du RE (Nakagawa et al., 2000). La CASP12 présente la particularité d'être traduit sous deux formes. Une forme tronquée qui présente une activité catalytique inactive (CASP12S\*) alors que l'autre forme, présente une séquence longue (CASP12L\*) dont le rôle consiste à déclencher les mécanismes d'inflammation (Yeretssian et al., 2009). La CASP11 est quant à elle nécessaire à la régulation de l'apoptose et à la maturation des cytokines lorsque la circulation sanguine est fortement ralentie (Kang et al., 2002). La CASP-13 n'est pas retrouvée chez l'Homme et a été initialement décrite dans des gènes de bovins (Koenig et al., 2001). Enfin, la CASP-14 est très exprimée dans les tissus embryonnaires et joue donc un rôle dans le développement du fœtus (Hu et al., 1998).



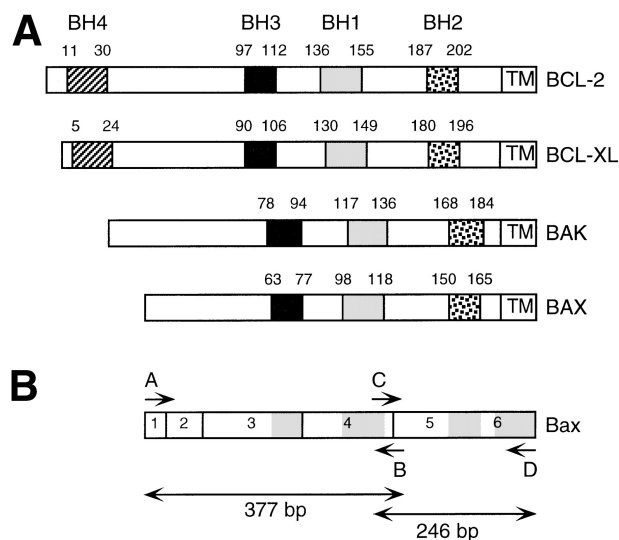
**Figure 19 : Classification des caspases en fonction de leur domaine**

La caspase 2, 8, 9 et 10 sont impliquées dans le déclenchement de l'apoptose La caspase 3, 6 et 7 sont impliquées dans l'exécution de la mort cellulaire. La caspase 1, 4 et 5 sont impliquées dans les processus d'inflammation (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

#### 2.2.1.2.2. Les protéines de la famille des Bcl-2

La protéine BCL-2 (B-cell lymphoma 2) est une protéine qui présente des homologies de séquences et de fonctions avec CED-4 (Horvitz et al., 1994) (Figure 20). Elle présente également la capacité d'inhiber l'apoptose (Adams and Cory, 2001). La protéine BCL2 joue donc un rôle clé dans la survie cellulaire chez l'Homme. Elle a la particularité d'agir comme proto-oncogène. En effet, La protéine BCL-2 a été découverte pour la première fois dans les lymphomes humains au niveau du locus chromosomique (14 ; 18). La caractérisation de cette protéine a permis d'identifier les protéines de la famille de BCL2 qui est composée de 20 autres protéines. Ces protéines contiennent jusqu'à quatre domaines homologues conservés (BH1, BH2, BH3 et BH4). Ces isoformes peuvent moduler le déclenchement de l'apoptose. Ces protéines sont classées selon trois sous-familles. On distingue la sous-famille de BCL-2 qui a une activité anti-apoptotique qui sont Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-W et BAG (*Bcl-2 Associated athanoGenes*) et contiennent les quatre domaines (BH1, 2, 3 4). La sous-famille de BCL2 ayant une activité pro-apoptotique se compose de BAX, BAK, et BOK. Elle contient un domaine moins bien conservé au niveau du premier domaine BH4. Et enfin la dernière sous-famille nommée domaine BH3 comprend BIK, HRK, BIM, BAD, BID, PUMA,

NOXA, et BMF (Figure 20). Le rôle des protéines BH3 consiste à intégrer et à transmettre des signaux de morts cellulaires en réponse à des stimuli. Au sein de ces domaines BH3, ces protéines interagissent avec d'autres protéines multi-domaines comme BAX ou BAK pour stimuler leur activité ou au contraire empêcher la mort des cellules (Giam et al., 2008). La balance entre les facteurs pro-apoptotiques et les facteurs anti-apoptotiques de la même famille de BCL-2 détermine la capacité des cellules à précipiter à mourir à la suite de signaux de stress cellulaire (Gross et al., 1999).



**Figure 20 : Les différents domaines composants BCL2.**

*BCL-2 est la séquence originelle. Lorsqu'elle est tronquée séquentiellement, elle forme BCL-XL, BAK et BAX. Chaque forme participe à la régulation positive ou négative de l'apoptose (Meijerink et al., 1998).*

### 2.2.1.3. Les voies de signalisation de l'apoptose

L'apoptose peut être déclenchée à la suite de l'activation de deux voies de signalisations distinctes. La première voie correspond à la voie extrinsèque et fait intervenir des signaux de morts cellulaires venant des récepteurs de mort. La voie intrinsèque est une seconde voie qui correspond à l'ensemble des signaux de morts cellulaires qui convergent vers la mitochondrie (Pei et al., 2003; Utz and Anderson, 2000). Ces deux mécanismes moléculaires convergent vers une voie de signalisation commune et activent en cascade les caspases. Elles aboutissent ainsi aux clivages de nombreuses protéines cellulaires (actine, tubuline) et permettent d'acquérir le phénotype caractéristique de l'apoptose. Ces deux voies de signalisation sont interconnectées (Igney and Krammer, 2002). Une troisième voie qui



implique les granzymes peuvent déclencher l'apoptose et est spécifique des lymphocytes T cytotoxiques (Kroemer et al., 1997). Il est ainsi important de préciser que :

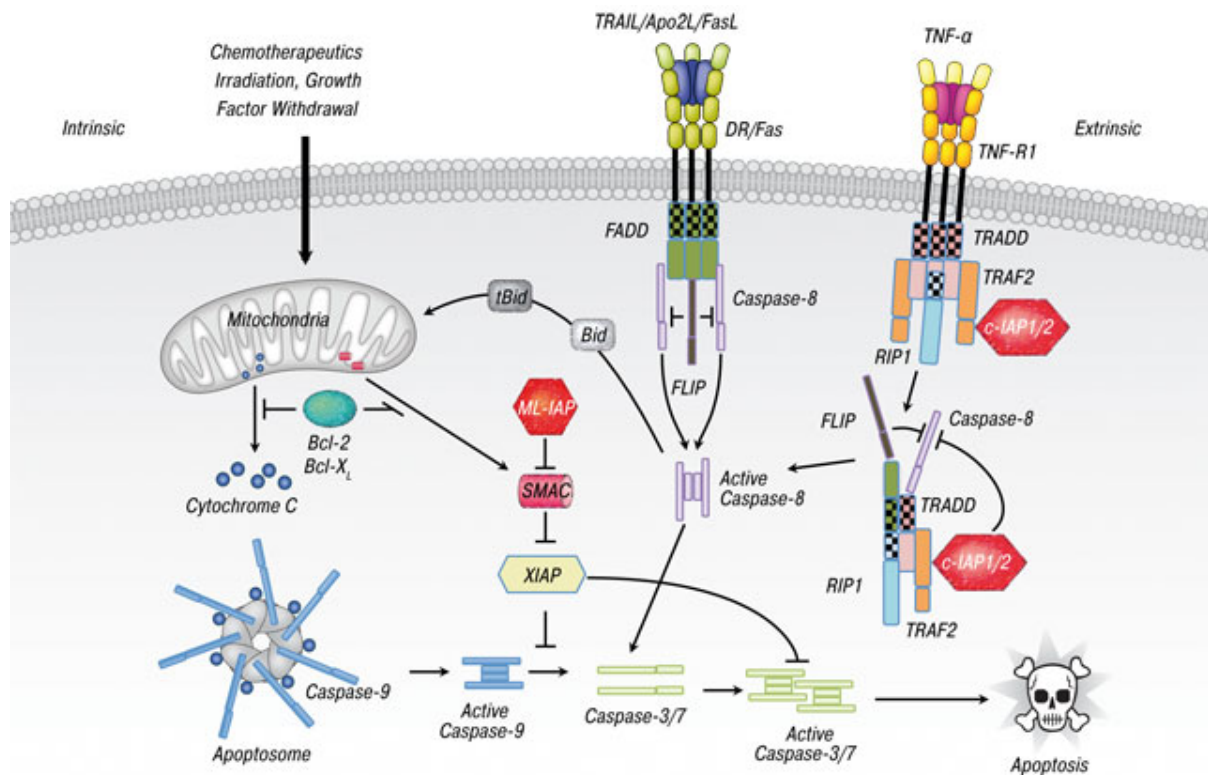
- (1) L'étape d'initiation/décision est hétérogène et dépend de la nature du signal d'initiation de la mort cellulaire. Suivant les signaux d'intégrations qui comprennent les signaux d'activation des caspases et des effecteurs de mort, la cellule peut être engagée ou non vers la phase d'exécution.
- (2) L'étape d'exécution/dégradation est un processus irréversible. En effet, au cours de cette étape, les facteurs apoptogènes sont libérés et dégradent de manière irréversible les structures cellulaires et aboutit à la formation de corps apoptotiques (Kroemer et al., 2007).

#### 2.2.1.3.1. L'étape d'initiation de la voie extrinsèque

L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose se fait en réponse à la fixation spécifique d'un ligand de mort à son récepteur. Les récepteurs dits de mort sont ancrés à la surface de la membrane. Ils appartiennent aux membres de la superfamille des récepteurs des TNF- $\alpha$  des récepteurs FAS/FAS-L, les récepteurs TNF (TNFR1 et TNFR2) et des récepteurs TRAIL DR4 et DR5 (*TNF related apoptosis inducing ligand*) (Locksley et al., 2001). Les récepteurs les plus largement étudiés sont (1) le récepteur de mort CD95 ou APO-1/Fas, (2) le récepteurs au TNF-1 (TNFRI), (2) *TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1* (TRAIL-R1), (3) *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2* (TRAIL-R2) et (4) et le complexe TRAMP/Apo-3/WSL-1/LARD (DR3) (Walczak and Krammer, 2000). Les ligands de la superfamille des TNF-R englobe le récepteur CD95-Ligand (CD95L/FasL), le TNF- $\alpha$  et le lymphotoxine- $\alpha$  qui se fixe à la fois sur les TNFRI, TRAIL et TWEAK (Chicheportiche et al., 1997; Lynch et al., 1999; Peter and Krammer, 1998; Rubio-Moscardo et al., 2005). Ces récepteurs transmembranaires sont composés d'un domaine extracellulaire riche en cystéine et d'un domaine intracellulaire comprenant environ 80 acides aminés. Le domaine cytoplasmique est composé d'un domaine de mort DED. Ce domaine joue le rôle d'intermédiaire entre les stimuli venant de la surface de la cellule et les voies de signalisation pro-apoptotique (Ashkenazi and Dixit, 1998).

Les voies de signalisations pro-apoptotiques induites par les autres membres de la sous-famille des récepteurs de mort suivent le même principe de base à savoir : (i) la fixation du ligand à son récepteur (tels que le CD95-CD95L ou le récepteur agoniste TRAIL), (ii) trimérisation du récepteur puis formation du complexe DISC *CD95 death-inducing signaling complex* (Kischkel et al., 1995), (iii) la liaison des protéines adaptatrices de la molécule

FADD au sein du complexe DISC (Walczak and Krammer, 2000), (iv) la liaison de la procaspase-8 et (v) le clivage de la procaspase-8 sous sa forme active. La CASP-8 se libère de son complexe DISC dans le cytoplasme sous la forme d'un tétramère (deux petites sous-unités et deux grandes sous-unités) (Muzio et al., 1996) et sert ainsi d'initiateur des caspases (Bodmer et al., 2000; Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000). La protéine inhibitrice (FLICE) régule négativement ces processus. Deux isoformes de FLIP, issus de l'épissage composent l'isoforme avec une longue séquence (FLIP<sub>L</sub>) et l'isoforme de courte séquence (FLIP<sub>S</sub>). Ces deux isoformes présentent une homologie de séquence pour la caspase-8 et la caspase-10 mais ne présentent pas de site catalytique. Ainsi, le recrutement de FLIP au niveau du complexe DISC peut ainsi être bloquée la caspase-8 ou de la caspase-10 et donc d'inhiber tout le processus d'exécution de l'apoptose (Hu et al., 1997; Krueger et al., 2001; Thome et al., 1997) (Figure 21). Il est également important de préciser que la proportion de caspase-8 présent au niveau du complexe DISC peut être insuffisante pour activer la caspase-3 (Scaffidi et al., 1998). Ainsi, la caspase-8 active la libération de l'agoniste BID (*BH3-interacting domain death*), et conduit à la formation de fragments perméabilisant de la mitochondrie également connue sous sa forme tronquée tBID. La protéine tBID est alors transférée vers la mitochondrie pour induire l'apoptose (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

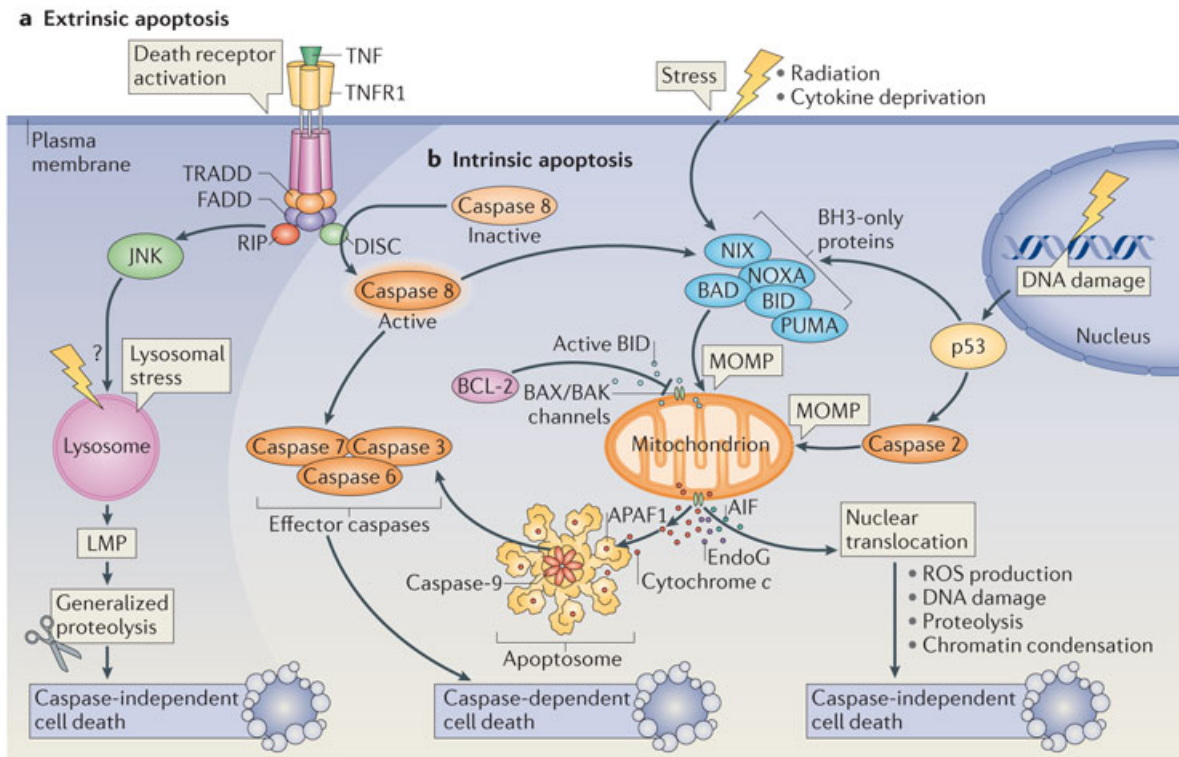


**Figure 21 : Mécanisme moléculaire de l'apoptose extrinsèque**

Le récepteur TRAIL/Apo2/FasL, le récepteur TNF- $\alpha$  sont les initiateurs de l'apoptose extrinsèque. Ces dernières activent la caspase-8 et agit directement la caspase-3 et 7 et aboutissent à l'apoptose. Elle tronque également Bid en tBid et forme des pores au niveau de la mitochondrie et active la voie intrinsèque. L'ensemble de ces signaux potentialise le signal d'apoptose (de Almagro and Vucic, 2012).

#### 2.2.1.3.2. L'étape d'initiation de la voie intrinsèque

Cette voie de signalisation est initiée par des stimuli externes tels que les rayons ionisants, les toxines, l'hypoxie, l'hyperthermie, les infections virales et les radicaux libres. Ces stimuli vont provoquer un déséquilibre en faveur des signaux pro-apoptotiques qui convergent vers la membrane mitochondriale. L'activation des facteurs pro-apoptotiques tels que BAX ou BAK (Tait and Green, 2010) va alors conduire à leurs dimérisation au niveau de la membrane externe mitochondriale pour aboutir à la formation de pore. Il y aura alors une transition de perméabilité mitochondriale (MPT) et une perte du potentiel mitochondrial (PPM) (Brenner and Grimm, 2006). Le processus est également connu sous le nom de perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) provoque la libération de composants apoptogènes tels que le cytochrome c, Smac/DIABLO et la protéase à sérine HtrA2/Omi (Du. et al, 2000) et AIF (*Apoptosis Induced Factor*) (Susin et al., 1999b) et les endonucléases G (Li et al., 2001) et CAD (Figure 22).



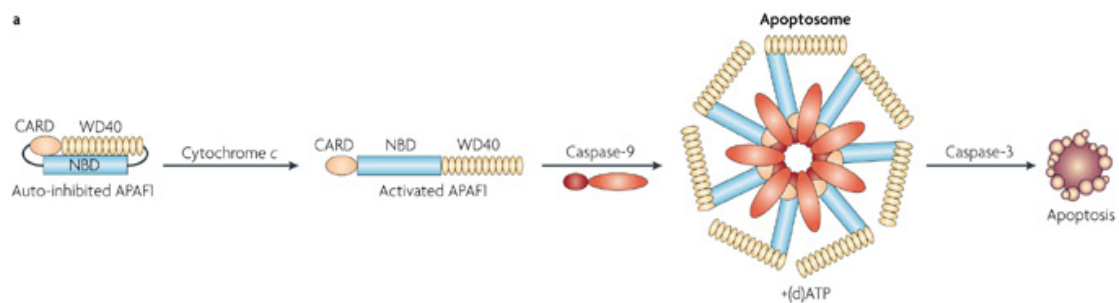
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

## Figure 22 : Mécanisme moléculaire de l'apoptose intrinsèque

A la suite d'un stimulus induit par une irradiation, des cytokines ou une carence nutritionnelle, ces stress déclenchent des protéines BH3-only (NIX, NOVA, BAD, BID PUMA) et provoquent une perte du potentiel mitochondriale. La mitochondrie libère des facteurs apoptogènes (AIF, APAF1, cytochrome c) qui contribuent à la formation de l'apoptosome suivi d'une mort apoptotique dépendante des caspases. Les endonucléases G, qui sont libérée de la mitochondrie, dégradent l'ADN et aboutit à une mort apoptotique indépendante des caspases (Mariño et al., 2014)

Une fois que les facteurs sont libérés, la mort de la cellule est alors définitivement engagée. La protéine APAF-1 est une protéine qui participe à initiation de l'apoptose. APAF-1 contient un domaine de fixation pour le cytochrome c (Figure 22). Ainsi, lorsque le cytochrome c est libéré dans le cytoplasme, il y aura une activation de APAF-1 en présence de déoxyadénosine 5'-triphosphate (ATP). APAF-1 va ainsi s'oligomériser et former un complexe activateur des caspases appelée d'apoptosome-APAF-1 (Cain et al., 2000) (Figure 23). La protéine APAF-1 va alors recruter la pro-caspase-9 au niveau du domaine de recrutement des caspases (CARD) (Yuan et al., 2011) et former le complexe APAF-1/CASP9. Ce complexe amplifie le signal d'activation des CASP9 et, qui à son tour, va activer des caspases effectrices (tels que la CASP3) et orchestrer collectivement le déclenchement de l'apoptose. Les autres protéines qui comprennent le facteur SMAC (*Second mitochondria-derived activator of caspase*) et DIABLO (*Direct IAP-associated*

*binding protein with low pI*) et Omi/HtrA2 (*High Temperature Requirement A2, mitochondrially-located serine protease*) vont moduler l'activité des IAPs et favoriser l'activation en cascade des caspases (Du et al., 2000; Suzuki et al., 2001). L'ensemble de ces mécanismes est dépendant de l'activation des caspases. Or, d'autres études ont montré que des facteurs apoptogènes tels que AIF ou de CAD peuvent déclencher l'apoptose de façon indépendante des caspases. La protéine AIF (pour Apoptosis-inducing factor) est une flavoprotéine localisé au niveau de la mitochondrie. En effet, au cours de la perméabilisation de la membrane mitochondriale, la protéine AIF est libérée dans le cytoplasme. La protéine AIF ainsi que l'endonucléase G sont transportées dans le noyau et provoquent une dégradation de la chromatine qui conduit à la mort de la cellule. Ce mécanisme n'active pas les caspases puisqu'une inhibition des caspases par un inhibiteur de large spectre des tel que le Z-VAD FMK n'empêche pas la mort de la cellule (Kroemer, et al. 2007) (Green and Kroemer, 2004). Il est tout de même important de préciser que le déclenchement de l'apoptose dépendante des caspases et l'apoptose indépendantes des caspases peuvent se produit en concomitance.



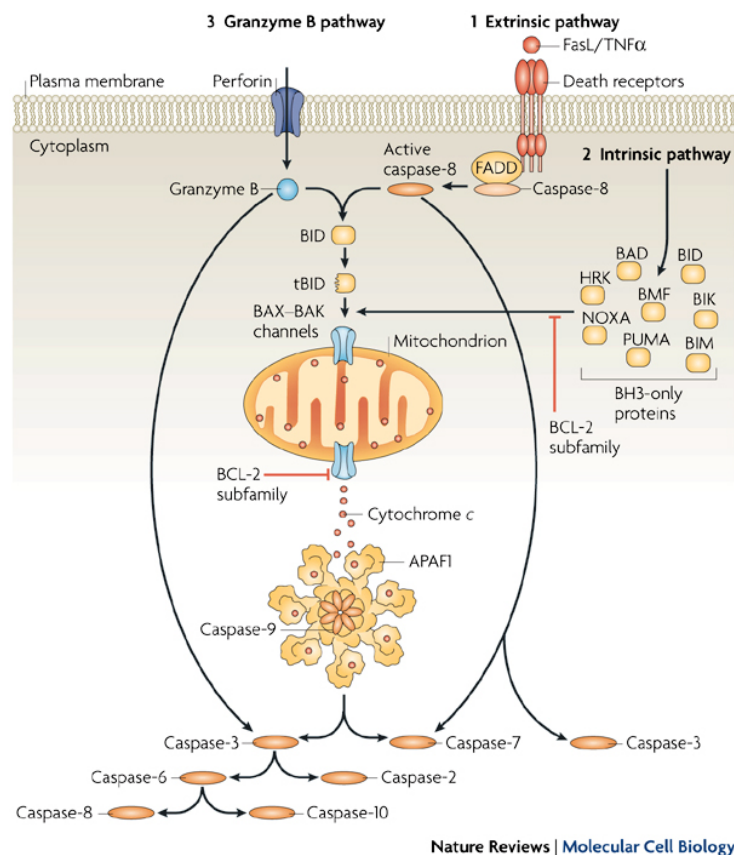
**Figure 23 : Mécanisme d'oligomérisation de APAF-1**

*La protéine APAF1 s'auto-inhibe. En présence de cytochrome c, APAF1 change de conformation au niveau de sa structure et forme une structure complexe appelé apoptosome avec la caspase-9. Cette dernière active la caspase-3 pour aboutir à l'apoptose de la cellule (Ting et al., 2008).*

### 2.2.1.3.3. La voie des Perforine/Granzyme

Les granzymes est une famille de protéases contenues dans les granules cytotoxiques du système immunitaire innée ou adaptatives des cellules NK (Natural Killer). Ces cellules contribuent à la réponse immunitaire en déclenchant la mort des cellules (Russell and Ley, 2002). Les lymphocytes cytotoxiques T (LCT) et les cellules NK peuvent détruire les cellules infectées par des virus ou des cellules cancéreuses en interagissant avec les récepteurs de morts (Lieberman, 2003). Une fois à proximité de ces cellules, elles libèrent des granules

cytolytiques (Griffiths and Isaaz, 1993). Ces granules contiennent plusieurs granzymes (tels que le granzyme A, B, H, K et M. Le Granzyme A (GzmA) et le granzyme B (GzmB) sont les plus abondantes et activent les voies de signalisation pro-apoptotique (Pardo et al., 2004). Les GzmA déclenchent une mort cellulaire indépendante des caspases (Zhang et al., 2001a, 2001b). Le GzmB clive les caspases (tels que la CASP6, CASP8, CASP9 et la CASP3) (Darmon et al., 1995), BID et ICAD (Barry and Bleackley, 2002; Casciola-Rosen et al., 2007; Russell and Ley, 2002). Les GzmH déclenchent une mort cellulaire indépendante des caspases. Cette mort se caractérise par une augmentation du niveau de ROS, une perte du potentiel mitochondriale, une condensation de la chromatine et une fragmentation nucléaire (Fellows et al., 2007) (Figure 24).



### Figure 24 : Mécanisme de la voie des Granzymes

Le granzyme B pénètre dans la cellule à travers la perforine et clive BID en tBID. tBID va alors induire une perméabilisation de la mitochondrie, activer l'apoptosome et déclencher le processus de l'apoptose. La granzyme B peut directement activer la caspase-3 indépendamment des signaux de mort qui convergent vers la mitochondrie (Taylor et al., 2008).

#### 2.2.1.3.4. L'étape commune de l'exécution de l'apoptose

La voie extrinsèque et intrinsèque convergent vers la phase d'exécution de l'apoptose. Cette phase se caractérise par une l'activation des effecteurs des caspases qui marque le début de la phase d'apoptose. A la suite de leurs activations, des endonucléases cytoplasmiques sont activées et dégradent le matériel génétique tandis que les protéases dégradent les protéines du cytosquelette telles que l'actine ou la tubuline, et les protéines au sein du noyau. (Figure 22) (Slee et al., 2001; Taylor et al., 2008). La CASP3, CASP6 et la CASP7 clivent plusieurs substrats (tels que des composants de l'actine et des protéines associées à l'actine (tels que la myosine, la spectrine, gelsoline et filamine) (Communal et al., 2002; Slee et al., 2001), des protéines du microtubules (tubuline, les protéines associées aux microtubule tau, la dynéine cytoplasmique, p150<sup>Glued</sup> (Lane et al., 2001), des filaments intermédiaires (vimentine, kératine, lamine nucléaire) (Morishima, 1999; Orth et al., 1996), des protéines du cytosquelette de la membrane plasmique (alpha-fodrine), les protéines nucléaires (NuMA et lamine) provoquent des déformations au niveau morphologiques et biochimiques de l'apoptose. Tandis que les protéines pro-apoptotiques, AIF, les endonucléase G sont transférées vers le compartiment nucléaires, dégradent l'ADN et provoquent une condensation chromatiniennne périphérique (Jozza et al., 2001; Lane et al., 2001).

#### 2.2.1.4. Le rôle physiologique et physiopathologique de l'apoptose

L'apoptose participe à des processus physiologiques aussi divers et variés que le développement de l'embryon, la formation du cerveau et l'établissement d'une immunité efficace. Ce phénomène est indispensable pour le maintien d'un équilibre homéostatique tissulaire ainsi qu'au bon fonctionnement de l'organisme (Elmore, 2007; Osborne, 1996). Une mort cellulaire excessive conduit au développement du diabète, des maladies neurodégénératives (comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson), des infections microbiennes et notamment le Syndrome de l'Immuno-Déficiennce Acquisse (SIDA) et contribue à l'émergence de nombreuses pathologies telles que l'infarctus, de l'ischémie et des maladies neurodégénératives. A l'opposé, l'incapacité des cellules à mourir explique l'émergence des cancers et des phénomènes de résistance de certaines tumeurs aux traitements chimio-thérapeutiques et radio-thérapeutiques. Au cours du développement embryonnaire, l'apoptose présente un important rôle dans la formation des organes et le remodelage des tissus (Penaloza et al., 2008). Par ailleurs, l'apoptose joue également un rôle dans le développement du système nerveux ainsi que le système immunitaire (Nijhawan et al., 2000; Opferman and Korsmeyer, 2003). L'apoptose des cellules hôtes lors d'infection

microbienne est une stratégie développée par la cellule hôte pour détruire le pathogène. La dérégulation de l'apoptose peut faire immerger le développement de maladie auto-immune telles que le syndrome de la prolifération incontrôlée des lymphocytes, le lupus érythémateux disséminés, la polyarthrite rhumatoïde et le cancer (Elmore, 2007).

### 2.2.2. La mort cellulaire de type 2 : la mort autophagique

Le terme d'autophagie provient du mot grec « *autos* » qui signifie soi-même et « *fageo* » qui signifie manger. L'autophagie est un mécanisme catabolique qui aboutit à la dégradation des protéines et d'organites non fonctionnels par des enzymes lysosomiales (tels que les cathepsines B ou hydrolases (Mizushima and Levine, 2010)). Les produits issus de cette dégradation sont recyclés pour la synthèse de nouvelles protéines, en énergie sous forme d'ATP ou en nouveaux organites. En réponse à un stress cellulaires comme l'absence de facteurs de croissance, un accroissement de l'activité cellulaire ou dans des conditions hypoxie, la cellule va activer le mécanisme d'autophagie afin de compenser les besoins énergétiques manquants ou la déficience de matières premières cellulaires. Ainsi, ce mécanisme participe à la longévité, l'homéostasie cellulaire et l'entretien des composants cellulaires. Ce mécanisme exerce une fonction de protection cellulaire qui assure la survie cellulaire dans plusieurs situations physiologiques ou physiopathologiques (tels que les processus différenciation cellulaire, le développement embryonnaire, du contrôle de la longévité, la tumorigénèse, lors de la survenue des maladies neurodégénératives, certaines formes de myopathies ainsi qu'au cours de la réponse immunitaire. Toutefois, d'autres travaux s'accordent à montrer qu'en réponse à des stimuli spécifiques, l'autophagie peut agir comme un mécanisme de mort cellulaire. Ce processus létal se classe au sein de la catégorie de forme de mort cellulaire de type II (Neufeld and Baehrecke, 2008), et se différencie de l'apoptose et de la nécrose par un ensemble de modifications morphologiques et biochimiques.

#### 2.2.2.1. Morphologie et caractéristiques biochimiques de l'autophagie

Il existe plusieurs types d'autophagie qui sont la macroautophagie, la microautophagie, et l'autophagie médiée par des protéines chaperonne (CMA). Ces différents mécanismes ont été classés selon leur modalité d'adressage des protéines à dégrader. La macroautophagie est un processus catabolique majoritairement utilisée par la cellule afin de dégrader les protéines ayant une demi-vie longue et des organelles endommagées. Ces métabolites pourront ainsi être utilisés par la cellule pour de futures réactions biologiques. On peut observer différents types d'autophagie en fonction de

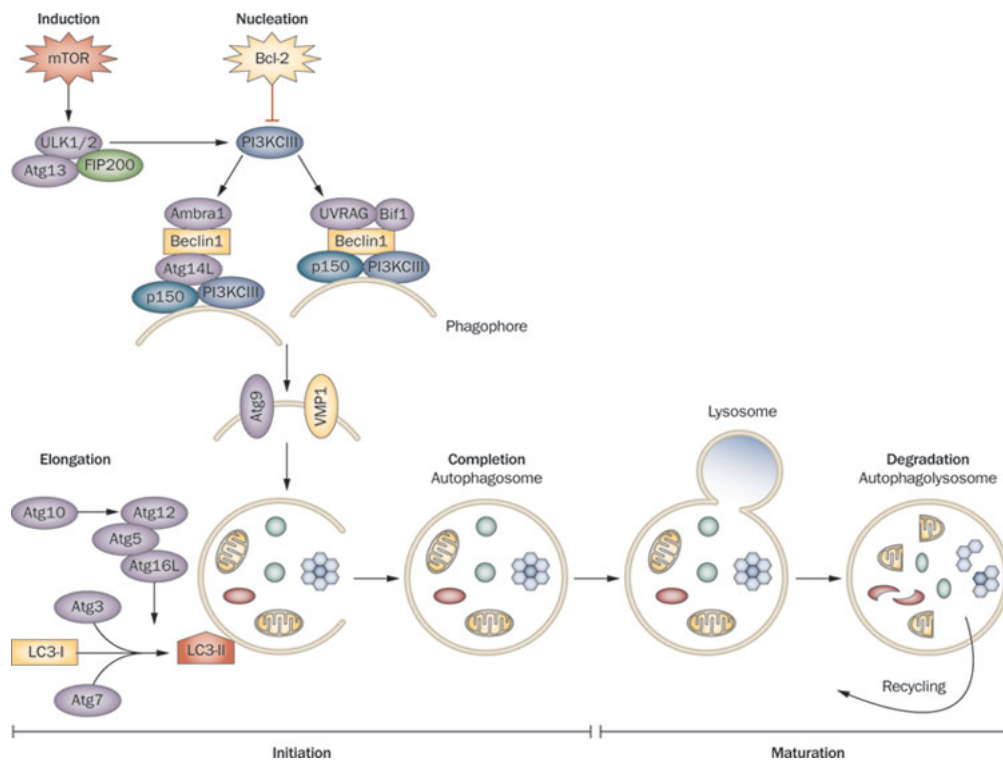


l'organelle ciblé, lorsqu'il s'agit de la mitochondrie on parlera de mitophagie (Kim et al., 2007), des ribosomes pour la ribophagie (Kraft et al., 2008), les peroxysomes pour la pexophagie (Dunn et al., 2005), du réticulum endoplasmique pour la réticulophagie (Bernales et al., 2007) et enfin du noyau pour la nucléophagie (Mijaljica and Devenish, 2013). Il a été clairement établi que le mécanisme de mort autophagique se déclenche lorsque la cellule présente une accumulation massive de vacuoles autophagiques. Ces cellules non apoptotiques montrent une légère fréquence d'internalisation par les cellules ayant une activité phagocytaire (Galluzzi et al., 2009).

#### 2.2.2.2. Les acteurs moléculaires de la régulation de l'autophagie

Le mécanisme moléculaire relatif à l'autophagie a été génétiquement bien décrit chez *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Plus de trente gènes relatifs à l'autophagie (*atg*) ont été recensés et sont relativement bien conservés entre la levure et les mammifères. Ces protéines participent aux différentes étapes qui constituent l'autophagie (Chen and Klionsky, 2011; He and Klionsky, 2009; Mortimore et al., 1983). Les protéines : ATG1-10, 12-14, 16-18, 29 et 31 sont les principales familles de protéines impliquées dans la formation et la maturation de l'autophagosome (Mizushima et al., 2011; Nakatogawa et al., 2009). Le processus de régulation de l'autophagie se résume en cinq étapes : (i) le déclenchement, (ii) la nucléation de l'autophagosome, (iii) l'expansion, (iv) la fusion avec les lysosomes et (v) la dégradation et le recyclage du métabolite (Figure 25). Le déclenchement de l'autophagie débute par un recrutement et une activation de nombreuses protéines de la famille des ATG (qui comprend ATG1, ATG13, ATG17, ATG29 et ATG31) (Cheong et al., 2008). La formation de la vacuole autophagique requiert dans un premier temps la nucléation d'une vésicule. Pour cela, il y a une activation de la phosphatidylinositol-3 kinase de classe III VPS34 (*Vacuolar protein sorting 34*), du complexe Beclin-1(BECN1)-ATG6, UVRAG, BIF-1, AMBRA-1 pour recruter les protéines et les lipides nécessaires à la formation de l'autophagosome (Kihara et al., 2001; Liang et al., 1999). Ensuite, les protéines BCN1 et ATG6 qui présentent tous les deux un domaine BH3. Ce domaine d'interaction avec un domaine récepteur de BH3 anti-apoptotique de la famille de BCL-2 comme BCL-2 et BCL-X<sub>L</sub>, (Sinha and Levine, 2008). Ainsi BCL-2 peut inhiber l'autophagie en interagissant et en séquestrant le complexe BCN1/ATG6. Il a été même montré que dans des conditions de stress métabolique, BCL2 est phosphorylée et provoque une dissociation de la protéine BECLINE-1 de son complexe pour ainsi stimuler l'autophagie. L'activation du complexe VSP34 déclenche la phosphorylation de la phosphatidylinositol 3-phosphate. Dans un second temps, il y a un allongement de la vésicule qui est réalisé par un système de conjugaison dépendant des ubiquitines. La première étape de conjugaison est réalisée par la formation

du complexe multimérique ATG12-ATG5-ATG16L (Mizushima, 1999). Ensuite, la seconde étape consiste à la lipidation du complexe ATG8-LC3 (*microtubule-associated protein Light Chain 3*) en LC3-II au niveau de la liaison phosphatidyl-éthanolamine (PE) (Hanada et al., 2007). A la suite de la maturation de ces vésicules et de la fusion des lysosomes, la vésicule est maturée par l'assemblage de plusieurs vacuoles de lysosomes. Il y aura alors une libération des composés catalytiques au sein de ces vacuoles qui sont appelées autophagolysosomes (Suzuki et al., 2007; Tanaka et al., 2000).



**Figure 25: Voie de signalisation de l'autophagie**

L'autophagie se compose de quatre étapes, l'induction, la nucléation, l'initiation et la maturation. L'induction se déclenche par l'activation de mTOR. La phase de nucléation débute et permet de former le phagophore. La phase d'initiation forme l'autophagosome par la lipidation de LC3-I en LC3-II. La phase de maturation se caractérise par une fusion de l'autophagosome avec les lysosomes et forme l'autophagolysosome. Cette dernière recycle les organites et les protéines (Janku et al., 2011).

### 2.2.2.3. Les mécanismes de l'autophagie

Les mécanismes moléculaires relatifs à l'autophagie contribuent à la survie cellulaire (Liang et al., 2007; Lum et al., 2005). Toutefois, une mort cellulaire associée à la mort autophagique a été décrit au cours du développement de la *Drosophila Melanogaster*. A

partir de ces travaux, Il a été démontré que l'apoptose pouvait contrôler l'autophagie (Berry and Baehrecke, 2007, 2008). Ces cellules présentent de nombreuses vacuoles autophagiques dans les cellules mourantes sur différents modèles cellulaires et conduit à leur auto-destruction (Scarlatti et al., 2009). Certaines stratégies thérapeutiques vise l'activation de l'autophagie dans des des cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose comme par exemple des cellules ayant un profil BAX/BAK ou caspases non fonctionnel. Pour cela, BCN1 et de ATG5 sont stimulées et de provoquent une accumulation de vacuole autophagique dans la cellule (Fazi et al., 2008; Grandér et al., 2009; Laane et al., 2009; Shimizu et al., 2004). La mort cellulaire autophagique est également retrouvée dans le cas de stress cellulaires déclenchés par une production importante d'espèce réactive de l'oxygène (ROS). En effet, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) exogène, le 2-méthoxyestradiol et les inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale peuvent déclencher une production excessive de ROS et précipite les cellules vers une mort autophagique. Cependant, il a été également révélé qu'en hypoxie (inférieures à 3% de l'O<sub>2</sub>), les cellules peuvent entrer dans un état de stase cellulaire au cours de la mitophagie et elle est associée à une réduction de l'activité métabolique. Cette adaptation permet de maintenir les principales fonctions cellulaires en contrôlant notamment la production de ROS. Lorsque les concentrations en oxygène sont très faibles (inférieure à 0,1% de O<sub>2</sub>), la cellule ne parvient plus à maintenir ces fonctions vitales et elle s'auto-élimine (Mazure et al., 2010).

#### 2.2.2.4. Aspects physiologiques de l'autophagie

La mort cellulaire autophagique a été initialement découverte lors de travaux menés sur le développement de la *Drosophila melanogaster* et par la suite caractérisée chez les mammifères. Au cours du développement de la Drosophile, des cellules de la glande salivaire sont éliminées. Pour cela, ces cellules expriment des gènes *atg* qui contrôlent positivement l'autophagie. Le déclenchement de ce mécanisme permet l'activation en cascade des caspases et provoquer une mort cellulaire similaire à l'apoptose. La surexpression de la kinase ATG1 peut également intervenir dans l'élimination de ces cellules associées à l'autophagie (Scott et al., 2007). Chez les mammifères, la mort autophagique est également été observée au cours du développement du corps jaune (*corpus luteum*) des follicules de De Graaf (Paavola, 1978), au niveau de la régression des glandes mammaires ou de la prostate (Helminen and Ericsson, 1971; Helminen et al., 1968). Les vacuoles autophagiques sont également retrouvées dans les cas de dégénérescence neuronale telles que la maladie de Parkinson ou de la maladie d'Alzheimer (Anglade et al., 1997; Nixon et al., 2005). La mort cellulaire autophagique est également retrouvée dans de nombreuses maladies d'origine cardiaques (comme par exemple au cours des épisodes d'ischémies ou

bien de la mort prématurée des myocytes) (Koike et al., 2008). L'autophagie peut également contribuer à la propagation d'infections virales en réalisant une cytolyse. Le virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1) peut déclencher l'apoptose des lymphocytes T différencié CD4<sup>+</sup> infectées ainsi que celle des cellules non infectées. L'apoptose de ces cellules contribue à la libération et à la propagation des virions nouvellement synthétisés. Un tel mécanisme contribue au développement du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). La caractérisation des protéines ATG6 et d'ATG7 dans les lymphocytes T infectées ont permis de définir le rôle centrale des protéines de l'autophagie associée à l'infection pour le VIH-1 dans l'initiation de l'apoptose (Espert et al., 2006).

### 2.2.3. La mort cellulaire de type 3 : La nécrose et la nécroptose

Contrairement au processus de l'apoptose ou de la mort autophagique, la nécrose a initialement été caractérisée comme étant un processus létal accidentel qui survient à la suite de la rupture de la membrane plasmique des cellules. L'intégralité du contenu intracellulaire est déversée dans le milieu extracellulaire. Ce processus de mort cellulaire cause une inflammation aigüe locale et produit une importante réponse immunitaire au sein de la zone lésée. Il s'agit d'un processus qui n'est pas régulé par la cellule (Golstein and Kroemer, 2007a) et ne présente pas les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose ou de l'autophagie (Kerr et al., 1972). Néanmoins, de nombreuses études tendent à démontrer que la nécrose peut être déclenchée par l'activation de récepteurs de morts, par la chromatolyse médiée par AIF (*Apoptosis-Induced Factor*) (Artus et al., 2010) ou par des lésions d'ADN suite à une alkylation des bases azotées (Zong et al., 2004). Ce phénomène a été caractérisé sous le nom de nécroptose (Edinger and Thompson, 2004).

#### 2.2.3.1. Morphologies et caractéristiques biochimiques de la nécrose

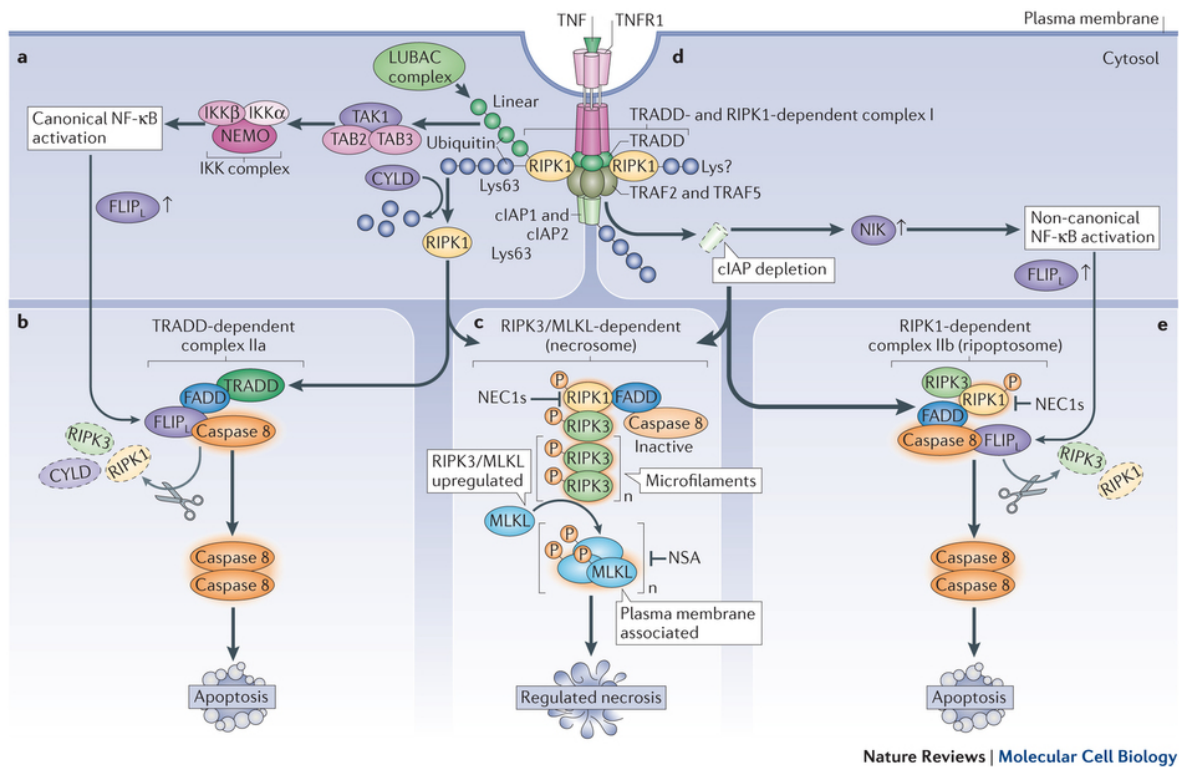
La nécrose ou la nécroptose sont caractérisées par une augmentation du volume de la cellule (oncoses), un gonflement des organelles, une perte de l'intégrité membranaire, une libération du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire (Majno and Joris, 1995). L'altération des mitochondries liée à une élévation de production de ROS, une perte du potentiel mitochondriale, des modifications structurales des lysosomales/nucléaires tels que l'activation importante de PARP-1, la dégradation des lipides et l'activation des protéases (calpaïnes et les cathépsine) sont également détectées au cours de ces processus (Golstein and Kroemer, 2007b; Kroemer et al., 2005).

#### 2.2.3.2. Les voies de signalisations de la nécrose et de la nécroptose

La mort cellulaire nécrotique est déclenchée suite à la fixation du ligand spécifique aux récepteurs de morts, le récepteur TNF-1R (*Tumor necrosis Facteur 1 Receptor*) et elle n'est pas dépendante des caspases (Vandenabeele et al., 2010). Dans certains modèles cellulaires, l'activation de ces récepteurs de mort déclenche le processus apoptotique plutôt que la nécrose. En revanche, lorsque la voie des caspases est bloquée par un pan-caspase comme le Z-vad fmk, le processus de nécrose est alors activé. RIP1 et RIP3 contiennent un domaine de mort DED, agit comme initiateur des voies de la nécroptose (Cho et al., 2009; Festjens et al., 2006; Zhang et al., 2009). D'autres facteurs pro-apoptotiques tels que les protéines de la famille de Bcl-2 (Hitomi et al., 2008), les ROS (Goossens et al., 1995), les ligases à ubiquitine E3 (He et al., 2009), la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) (Zong et al., 2004), la rupture membranaire des lysosomes (Boya and Kroemer, 2008), les complexes de transition des pores mitochondriaux (Nakagawa et al., 2005) et les hydrolases (Boya and Kroemer, 2008; Kroemer et al., 2007) peuvent déclencher la nécrose. A l'opposé, les inhibiteurs des caspases (Vercammen et al., 1998), les facteurs anti-apoptotiques et les enzymes dé-ubiquitinantes (Hitomi et al., 2008) empêchent l'initiation de la nécroptose.

#### 2.2.3.3. Les voies d'initiation de la nécroptose

La nécroptose est déclenchée par la fixation spécifique du ligand sur son récepteur de mort tels que CD95 et TNFR1, TNFR2, TRAILR1 et TRAILR2 (Laster et al., 1988; Vercammen et al., 1998) (Figure 26). Ces récepteurs activent généralement le mécanisme de l'apoptose. Il a été démontré qu'en présence d'inhibiteur des caspases, les cellules meurent selon un processus indépendant des caspases et qui présentent des signes morphologiques caractéristiques de la nécrose. Parmi les différents initiateurs de la nécroptose, la voie TNF- $\alpha$  /TNFR-  $\alpha$  été la plus décrite (Vandenabeele 2010). En effet, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence une régulation en aval du TNFR1 qui détermine la survie (par la formation du complexe I) ou la mort de la cellule (par la formation du complexe II) (Wilson et al., 2009). Le système ubiquitines/protéasome et les caspases initiateurs comme la caspase-8 sont les acteurs majeurs de la régulation de la nécroptose issu du TNFR1 et leur activation vont ainsi déterminer le devenir de la cellule (Vanden Berghe et al., 2010).



**Figure 26 : Voie de signalisation associée à la nécroptose**

L'activation du récepteur TNFR1 par le TNF peut induire trois voies, la voie TRADD, la voie RIPK3/MLKL ou RIPK1. Ces dernières activent la nécroptose ou l'apoptose (Berghe et al., 2014).

#### 2.2.3.3.1. La formation du complexe I

En absence de TNF-α, la sous-unité du TNFR1 (*Tumor Necrosis Factors Receptor 1*) s'assemble spontanément au niveau de la membrane plasmique pour former un récepteur en trois monomères. Une fois que le TNF-α se lie à son récepteur TNFR1, TNFR adopte une structure tridimensionnelle et favorise, au niveau du cytoplasme, le recrutement de plusieurs protéines comme TRADD (*TNFR Associated Death Domain*), RP1 (*Receptor-Interacting serine/threonine-protein kinase 1*), cIAP1 (*Cellular Inhibitor of Apoptosis I*), cIAP2, TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*) et TRAF5. Ce complexe protéique proximale situé au niveau de la membrane forme le complexe I TNFR1 (Micheau and Tschopp, 2003). La polyubiquitination de ces protéines participent à la régulation de l'activité de ce complexe (Wertz and Dixit, 2008). En effet la polyubiquitination de RP1 déclenche l'activation du complexe IKK (ikk-alpha et ikk-bêta) et de NEMO (*NF-κB Essential MOdulator*), et ce qui favorise l'activation le facteur nucléaire NF-κB. NF-κB NF-κB va se fixer sur son promoteur et favoriser l'expression de gène de survie. Le complexe I correspond ainsi des signaux de survie cellulaire (Vandenabeele et al., 2010).

#### 2.2.3.3.2. La formation du complexe II

En présence de TNF-  $\alpha$ , le ligand va se lier à son récepteur TNFR1 au sein du complexe I. Il y aura alors lieu une internalisation du complexe TNFR1R-TNF- $\alpha$  au sein du cytosol. Les différentes protéines qui composent le complexe sont alors modifiées et forme le complexe II. Ce complexe II est connu sous le nom de DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*), et se compose essentiellement de TRADD, FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*), RIP1 et la CASP8 (Micheau and Tschopp, 2003). Au sein même de ce complexe, la caspase 8 inactive RIP1 et RIP3 par un processus de clivage et déclenche le mécanisme d'apoptose (figure 26) (Wang et al., 2008). Néanmoins, le clivage de la caspase-8 par RIP3 conduit à une mort nécrotique (Feng et al., 2007).

#### 2.2.3.3.3. La formation du nécrosome

Le terme de nécrosome se définit comme étant un complexe qui se compose de la protéine RIP1 et de RIP3 qui stimule la nécroptose (Declercq et al., 2009; Vandenameele et al., 2010). La formation du nécrosome est finement régulée par l'ubiquitination au niveau de la lysine 530 et par la phosphorylation de RIP1 et de RIP3 au niveau de la sérine 227. RIP1 et RIP3 présente un domaine d'interaction en présence de TNF- $\alpha$  et est stabilisée en présence d'un simili de SMAC (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*) ou d'un inhibiteur des caspases (Cho et al., 2009; He et al., 2009). La nécrostatine-1, est une petite molécule qui bloque l'activité de RIP1 et empêche ainsi l'assemblage de RIP1 et de RIP3 (Cho 2009, et He 2009).

#### 2.2.3.4. L'exécution de la nécroptose

Le nécrosome est un complexe protéique qui connecte des récepteurs membranaires de mort aux transducteurs de signaux pro-inflammatoires, apoptotiques ou nécrotiques. La nécrose ainsi que la nécroptose partagent les mêmes signaux cellulaires telles que la production des ROS, l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, la perméabilisation de la membrane lysosomale et la perméabilisation de la membrane plasmique (Vanden Berghe et al., 2010). Il existe des voies alternatives pouvant contribuer à l'exécution de la nécroptose. (Figure 26). Cependant ces aspects ne seront pas développer dans ce manuscrit.

### 2.2.3.5. Le rôle physiologique de la nécrose et de la nécroptose

Comme l'apoptose, dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire, la nécrose permet l'élimination des cellules défectueuses. En effet, dans le développement des phalanges dans la phase de dissociation des doigts, l'élimination des cellules liant les phalanges peuvent mourir par nécrose (Chautan et al., 1999). La nécrose est également impliquée dans des processus physiologiques comme l'ovulation, la mort des chondrocytes au cours de la maturation des cartilages articulaires et le renouvellement des intestins (Festjens et al., 2006). De récentes études ont montré sur un modèle murin que la déplétion génétique de RIP3 ou MLKL (*Mixed Lineage Kinase domain-Like protein*) ou les principaux initiateurs de la nécroptose, n'affectent pas le développement ainsi que l'homéostasie cellulaire et tissulaire (Newton et al., 2004; Wu et al., 2013). Un excès de nécrose peut être en revanche détectés au cours de certaines maladies liées aux infections (bactériennes, virales, parasitaire), aux patients ayant subis une ischémie, au cours de la dégénérescence neuronale et dans les cas d'infarctus (Vanlangenakker et al., 2008). Les cellules nécrotiques peuvent être trouvées dans les infections causées par la bactérie *Shigella*, les infections au VIH-1, le virus de West Nile et par *Coxsackievirus B* (Vanlangenakker et al., 2008), dans le phénomène d'excitotoxicité dans les cellules neuronales ou par des agents chimiothérapeutiques (Chautan 1999). De nos jours, l'ensemble des travaux tend à montrer des connexions entre les trois principales formes de morts. Elles concernent un lien entre l'apoptose et la nécrose, l'apoptose avec l'autophagie et l'autophagie avec la nécrose. (Golstein and Kroemer, 2007b, 2007a; Lockshin and Zakeri, 2004; Maiuri et al., 2007; Shen and Codogno, 2012). La caractérisation des mécanismes moléculaires critiques communes de l'apoptose, de la nécrose et de l'autophagie vont ainsi permettre de contribuer à comprendre les interconnexions entre ces différentes formes de morts cellulaires. De plus ces travaux devraient également permettre une meilleure compréhension des maladies et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques liées aux maladies impliquant des processus létaux.

## 2.3. Les autres formes de morts cellulaires atypiques et la sénescence cellulaire

### 2.3.1. Généralités

Les processus létaux (tel que les catastrophes mitotiques, la sénescence cellulaire et l'entose) qui ne présentent pas ou partiellement les caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose, de l'autophagie ou des processus de nécroses sont classés dans les formes de morts cellulaires atypiques (Galluzzi et al., 2012). L'anoïkis (Reginato et al., 2003), la cornification (2005), l'entose (Overholtzer et al., 2007), la neurotoxicité (Orrenius et al., 2003), la catastrophe mitotique (Vakifahmetoglu et al., 2008), la nétose (Steinberg and

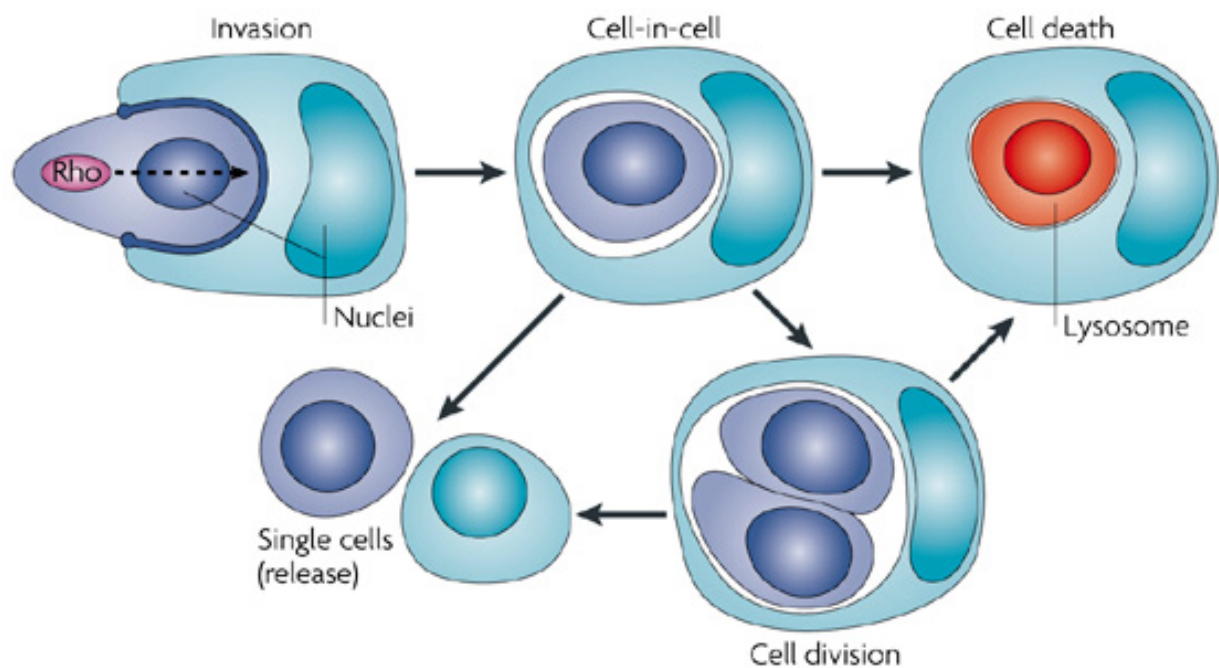


Grinstein, 2007), la paraptose (Sperandio et al., 2000), la parthanatos (David et al., 2009), la pyronécrose (Willingham et al., 2007), la pyroptose (Brennan and Cookson, 2000) et la dégénérescence de wallérienne (Raff et al., 2002) sont des processus de morts cellulaires atypiques. Les voies de signalisations relatives aux formes de morts cellulaires restent à être définies afin d'attribuer une fonction physiologique ou physiopathologique à ces processus biologiques. Nous associons également ce processus de sénescence impliqué dans l'arrêt de la prolifération des cellules et l'élimination de ces cellules défectueuses (Schmitt, 2003).

## 2.3.2. L'entose, le processus d'invasion cellulaire

### 2.3.2.1. Les aspects morphologiques et biochimiques de l'entose

L'« entose », du grec entos (« dedans ») appartient à la catégorie des formes de morts cellulaires atypiques et se caractérise par une internalisation d'une cellule vivante dans une autre cellule vivante (Figure 27). Comparée à la phagocytose principalement décrite dans les macrophages, l'entose ne nécessite pas d'exposition des phosphatidyl-sérines pour aboutir à un processus d'internalisation. Toutefois, ce processus requiert une interaction cellulaire qui fait intervenir des protéines membranaires telles que l'E-cadhérine. A la suite d'un processus d'invasion cellulaire, la cellule cible est dégradée par un processus lysosomal. Il a été également observé que la cellule internalisée pouvait se diviser au sein de la cellule hôte et être libérée de son hôte (Overholtzer et al., 2007). L'entose a été principalement détecté au niveau des cellules épithéliales humaines. Lorsque la cellule envahit la cellule hôte, une large vacuole est formée. Overholtzer et ses collaborateurs n'ont pas détecté le moindre signe de mort cellulaire au cours de l'internalisation de la cellule cible. En effet, aucune altération létale des mitochondries n'a été observée au cours de ce processus. De plus, la surexpression de la protéine BCL-2, l'inhibition des caspases (utilisant un inhibiteur à large spectre des caspases (Z-VAD fmk)) et l'insertion d'un recombinant de l'annexine-V ne réduit pas l'internalisation de la cellule vivante par une autre cellule vivante. Ces interactions peuvent intervenir à la suite d'internalisation des cellules normales ou entre cellules tumorales. On parlera alors d'interaction homotypique. Cependant ces processus peuvent également être observés à la suite de l'internalisation entre cellules tumorales (exemple les mélanomes) et les cellules du système immunitaire (tels que les lymphocytes) et aboutir à l'élimination des cellules du système immunitaire. Ce processus est aussi initié par des interactions hétérotypiques (Overholtzer and Brugge, 2008).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 27 : Structure de cellule dans une cellule : l'invasion cellulaire**

*La cellule envahit la cellule hôte après l'activation de RhoA et forme une structure de cellule dans une cellule. La cellule internalisée peut être dégradée par les lysosomes, se libérer de sa cellule hôte ou se diviser dans la cellule hôte (Overholtzer and Brugge, 2008).*

### 2.3.2.2. Les voies initiatrices de l'entose

Le processus d'internalisation de la cellule cible nécessite une coopération entre l'actine, la myosine, les cadhérines et l'eitrine. La polymérisation de l'actine ainsi que la myosine joue un rôle crucial dans le modelage du cytosquelette et donc de l'internalisation de la cellule cible. Des études menées par Overholtzer ont montré que la protéine Rho GTPases est nécessaire dans l'entose. Les protéines ROCK-1 et ROCK-2 (*RhO-assoCiated protein Kinase-1, -2*) qui sont des protéines effectrices des RhoA GTPases contribue à l'internalisation de la cellule cible. En effet l'inhibition de ROCK-1 et ROCK-2 par des agents pharmacologiques comme le Y27632 ou par des siRNA de ROCK-1 et de ROCK-2 inhibent les mécanismes d'internalisation de la cellule. Il a également été montré que les jonctions formées entre les deux cellules sont requises dans l'invasion de la cellule. Ainsi il a été montré que l'E-cadherine ou la P-cadhérine, la  $\beta$ -caténine et RhoA sont recrutées au niveau de la zone de contact entre les deux cellules (Sun et al., 2014). Le blocage de l'E-cadhérine ou de la P-cadhérine par un anticorps antagoniste réduit l'invasion cellulaire et démontre que

la formation de jonction adhérente est nécessaire dans le processus d'invasion cellulaire (Overholtzer et al., 2007). Ce phénomène peut également être observé dans plusieurs types cellulaires aussi bien dans des tissus sains que dans les tissus pathologiques. Selon le type cellulaire, ils existent différentes combinaisons d'interactions cellules à cellules et les conséquences biologiques sont encore partiellement connues et restent à être déterminés.

### 2.3.2.3. Les conséquences de l'entose

#### 2.3.2.3.1. Conséquences au niveau de la cellule hôte

Des travaux menés par Krajcovic et ses collaborateurs ont démontré que l'internalisation d'une cellule par une autre cellule peut provoquer une instabilité génomique liée à une altération de la cytokinèse de la cellule hôte et contribue à la formation de cellules aneuploïdes. De plus, l'absence de cytokinèse et l'inhibition de la ségrégation des chromosomes contribuent à l'instabilité chromosomique de ces cellules. Dans des adénocarcinomes mammaires, les cellules entotiques présentent également plusieurs noyaux dites cellules multi-nuclées. Des observations en vidéomicroscopie en temps réel montrent que la cellule hôte ne peut plus se diviser et ceci est reliée à un défaut de formation de l'anneau contractile de myosine (Krajcovic and Overholtzer, 2012; Krajcovic et al., 2011). D'autres travaux menés par Wang et ses collaborateurs complètent cette étude en montrant la capacité de certaines tumeurs à internaliser des cellules NK et de provoquer l'aneuploïde de la cellule hôte (Wang et al., 2009). En conclusion, l'entose est un mécanisme biologique qui pourrait contribuer également à la génération de l'aneuploïdie.

#### 2.3.2.3.2. Conséquences au niveau de la cellule cible

Une fois que la cellule cible est internalisée par sa cellule hôte, elle peut être libérée ou bien dégradé selon un processus de mort lysosomale (Overholtzer et al., 2007). Le mécanisme de libération de la cellule reste inconnu et les voies de signalisation impliquée dans ce processus restent ainsi à être déterminées. Les travaux menés par Overholtzer et ses collaborateurs ont suivi la cellule cible en utilisant un vidéomicroscopie à fluorescence et ont permis de révéler que la cellule cible peut également se diviser. A la suite de leurs divisions, certaines cellules peuvent être libérées mais une majorité entre elles meurt au sein de la cellule hôte. Les processus de mort cellulaire a été partiellement caractérisé (Overholtzer, 2011). Ce processus est également connue sous le nom de cannibalisme cellulaire ou empéripolèse (Overholtzer and Brugge, 2008). La cellule internalisée meurt selon un processus biologique impliquant des lysosomes (Overholtzer et al., 2007). Les lysosomes sont des vacuoles contenant des enzymes ayant une activité catabolique. Ces enzymes participent à la dégradation des substrats intracellulaires et extracellulaires. Il a été

recensé plus de 40 types d'enzyme de la famille des glycosidases, des protéases, des phosphatases, des sulfatases et des lipases. Ces enzymes sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique et sont modifiées au niveau de l'appareil de Golgi et sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme par exemple la réparation de la membrane plasmique, l'endocytose, la phagocytose, l'exocytose, l'autophagie et la mort cellulaire lysosomale). Elles participent également dans d'autres réponses biologiques telles que la réponse immunitaire contre les pathogènes ou dans la cancérogénèse. Par ailleurs, les lysosomes jouent un rôle critique dans la présentation antigénique du complexe CMH de classe II, la mort cellulaire par la dégradation médiée par les cathepsine contribue à l'homéostasie du cholestérol. Les protéines lysosomales (LAMP) régulent divers processus de dégradation comme la macro-autophagie et l'autophagie par l'intermédiaire des protéines chaperonnes (Lubke et al 2009). Les protéines LAMP sont également impliquées dans le transport des hydrolases néo-synthétisés vers les lysosomes LIMP2 (*lysosomal integral membrane protein 2*) et sont adressées vers la membrane lysosomale comme les complexes V-type H<sup>+</sup>-ATPases et les canaux chloriques CLC7). (Lübke et al., 2009; Saftig and Klumperman, 2009). Après internalisation, la cellule hôte dégrade la cellule cible selon un processus de mort lysosomale. Le recrutement des lysosomes vers les cellules internalisées peut être observé en utilisant des anticorps anti-LAMP1 (*lysosomal-associated membrane protein-1*) ainsi qu'une sonde fluorescente en rouge lysotracker®, qui marque les compartiments acides dans des cellules vivantes. En microscopie à fluorescence, on peut observer un encerclement de lysosomes autour de la cellule cible. Une inhibition pharmacologique de l'activité de ces enzymes comme par exemple la cathepsines B, réduit la dégradation de la cellule internalisée, confirmant le rôle majeur de la cathepsine B dans la dégradation de la cellule cible. La grande majorité des cellules cibles présente des altérations nucléaires (telles que la dégradation de l'ADN révélée par la technique TUNEL) et n'est pas associées à un clivage de la caspase-3 (Overholtzer et al., 2007). Le travail mené par Wang et ses collaborateurs démontrent que la plupart des cellules NK internalisées dans les cellules tumorales meurent à travers un programme de mort cellulaire qui requiert l'activation de la caspase-3 suggérant que le clivage de la caspase-3 peut cependant être requise pour déclencher une mort cellulaire dite non autonome (Chen et al., 2009). Récemment, il a été démontré que la machinerie de l'autophagie peut également contribuer à la mort de la cellule internalisée. Les vacuoles encerclent la cellule internalisée et recrute la protéine LC3 au niveau de la vacuole par l'intermédiaire d'un mécanisme contrôlé par les protéines ATG5, ATG7 et VPS34. Les vacuoles entotiques LC3 ciblées contribuent aux recrutements des lysosomes et à la dégradation des cellules internalisées. Les cellules internalisées entrent dans un état de macroautophagie afin de survivre au sein de la vacuole entotique (Florey et al., 2011). L'inhibition de la machinerie autophagique de la cellule

internalisée conduit à la mort de la cellule par une voie apoptotique. En conclusion, les cellules cibles sont éliminées selon un processus de mort qui nécessite l'intervention de la machinerie de l'autophagie.

#### 2.3.2.4. Rôles physiologiques et physiopathologiques de l'entose

L'internalisation d'une cellule vivante par une autre cellule vivante a été observée aussi bien dans différentes situations physiologiques et physiopathologiques. En 1945, Liebman a observé une dégénérescence des lymphocytes dans les gamètes femelles de Salamandre (*Triturus Viridescens*) suggérant que les lymphocytes apporteraient des nutriments à la cellule hôte (Liebman, 1945). Cette hypothèse suppose que l'internalisation de lymphocytes permettrait de compenser les carences nutritionnelles de la cellule hôte. Ce phénomène dites de cellule dans une cellule peut être retrouvées au niveau d'autres types cellulaire tels que les fibroblastes, les cellules thymique (Ioachim, 1965) et dans des cellules cancéreuses. Il y a été également proposé que l'entose pourrait présenter une forme de protection contre les stress extracellulaires (Nishie et al., 2006). Par opposition, ce mécanisme peut contribuer à l'élimination de la cellule hôte par la cellule cible. La mort de la cellule hôte a été observée *in vitro* au niveau des cellules de la moelle osseuse ou bien au niveau des fibroblastes. Une irradiation sub-létale de la souris provoque également le phénomène d'internalisation des cellules, cette fois-ci dans la moelle osseuse par les mégacaryocytes (Bobik and Dabrowski, 1995). De plus il a été également révélé que l'invasion des neutrophiles dans les mégacaryocytes ainsi que l'internalisation des lymphocytes au niveau des cellules thyroïdiennes pourrait déclencher la mort de la cellule hôte (Sinkovics, 1962).

##### 2.3.2.4.1. Rôles physiologiques de l'entose

Les structures de cellule dans une cellule ont été détectées au niveau de différentes espèces et de nombreux tissus. Carman et Spring ont observé la capacité des cellules issues de l'épithélium mésenchymateux, des cellules neurales et des cellules hématopoïétiques à internaliser des leucocytes ou des cellules hématopoïétiques. Ces leucocytes expriment à leur surface l'intégrine LFA1 (*Leukocyte function associated protein-1*) et qui peut interagir avec ICAM-1 (*Intracellular-adhesion molecule-1*) qui est présent à la surface des cellules endothéliales. L'interaction de LFA1 et de ICAM-1 permet aux leucocytes de traverser la couche épithéliale. Ce processus est appelé « la diapédèse ». Dans certains cas particulier, ces cellules épithéliales pouvaient internaliser une fraction du cytoplasme des leucocytes (Carman and Springer, 2008). Philp et ses collaborateurs ont

retrouvé des interactions hétéro-typiques entre les thymocytes et les cellules nourricières thymiques (Philp et al., 1993). D'un point de vue physiologique, les cellules nourricières thymiques protègent les thymocytes de la mort cellulaire (Pezzano et al., 1995) et participent dans leur propre maturation en présentant le complexe CMH I et II après internalisation. La détection de mort cellulaire à l'intérieur des cellules nourricières thymiques indique que durant la présentation antigénique, ces cellules nourricières thymiques peuvent être détruites par les thymocytes. Les cellules dendritiques folliculaires peuvent également internalisées les lymphocytes B pour empêcher l'apoptose et ainsi permettre la maturation en présentant des antigènes. Ainsi l'internalisation de la cellule vivante favoriserait la différenciation ou la maturation de différents types cellulaires (Tsunoda et al., 1997, 2000).

Ils existent différents récepteurs cellulaires distincts (comme par exemple des cellules hépatiques humaines internalisent des lymphocytes ayant le fragment Fc à la surface de la membrane comme les cellules NK) peuvent être nécessaire à l'internalisation d'une cellule cible (Reid et al., 1979). La fréquence de l'internalisation des leucocytes à l'intérieure des mégacaryocytes peut également être augmentée par une surexpression d'ICAM-1 au niveau des mégacaryocytes mais aussi de LFA1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*) du côté des leucocytes. L'inhibition de LFA1 par un anticorps bloquant anti-LFA1 *in vivo* (Tanaka et al., 1997) bloque le processus d'internalisation cellulaire. L'expression de LFA1 à la surface sur les cellules lymphocytaires B et d'ICAM-1 sur des cellules dendrites folliculaires peut moduler l'internalisation des cellules lymphocytaires B (Lindhout et al., 1994). Les conséquences de ces processus biologiques restent à être élucidées.

Ces structures cellulaires peuvent également être retrouvées au niveau des cellules cancéreuses tels que les mélanomes métastatiques, les carcinomes pulmonaires et les carcinomes des glandes mammaires (Lugini et al., 2006). Différentes études ont observé des interactions hétérotypes entre des cellules des mélanomes et des lymphocytes T. Cette interaction nécessite l'eitrine, une protéine du cytosquelette (Fais, 2007; Lugini et al., 2006). Par ailleurs, des structures homotypiques observées à la suite d'interactions sont ensuite détectées au sein des tumeurs (avec une fréquence comprise entre 1% et 2%). De telles structures ont été initialement décrites au niveau des biopsies de carcinome pulmonaire à petites cellules (SCCL). L'internalisation cellulaire conduit à la mort de la cellule internalisées et requièrent des facteurs présents dans le sérum humain qui ne sont pas encore connu à ce jour (Brouwer et al., 1984). Il a été proposé que ces structures cellulaires soient associées à une inhibition de la croissance tumorale. Depuis plusieurs années, de nombreux pathologistes ont observé des morphologies atypiques caractérisées par une large

vacuole contenant une autre cellule au niveau des frottis de carcinome pancréatique (Silverman et al., 1988). Les travaux menés par Cano et ses collaborateurs ont révélé l'existence d'une structure de cellule dans une cellule au niveau d'adénome pancréatique. Par ailleurs, les biopsies d'adénomes pancréatiques qui révèlent des structures de cellules entotiques sont corrélées avec un faible taux de métastase suggérant ainsi qu'il s'agit d'un facteur limitant l'agressivité d'une tumeur. *In vitro*, ce processus biologique aboutit à la mort des cellules cancéreuses pancréatiques (Cano et al., 2012). Les travaux menés par Overholtzer et ses collaborateurs ont révélé également que l'internalisation d'une cellule vivante par une autre cellule vivante peut aboutir à une mort entotique lors de la co-culture homotypique de cellules cancéreuses. (Overholtzer et al., 2007).

#### 2.3.2.4.2. Rôle de l'entose dans le processus physiopathologique

Parallèlement à ces travaux, il a été également démontré que l'internalisation d'une cellule vivante par une autre cellule vivante pouvait favoriser la tumorigénèse. En effet, il a été révélé que des cellules issues de mélanome étaient capable d'internaliser les cellules immunitaires afin de survivre dans son environnement (Lugini et al., 2006). Ce processus a également été retrouvé dans d'autres tissus et notamment au niveau de la moelle osseuse (Sahebekhitiari and Tavassoli, 1976). La présence de neutrophile dans la vacuole des mégacaryocytes a été décrite dans différentes conditions pathologiques comme par exemple la myélofibrose idiopathique chronique (Schmitt et al., 2002a) et dans le syndrome des plaquettes grises (Loubser and Donovan, 1991). Récemment, il a également été proposé que l'internalisation d'une cellule vivante par une autre cellule vivante puisse aboutir à une augmentation de l'instabilité génomique de la cellule hôte en causant une altération de la cytokinèse favorisant l'aneuploïdies de ces cellules. Les cellules aneuploïdes présentent un nombre anomal de chromosomique. L'observation de cellules cancéreuses mammaires grâce à la vidéomicroscopie en temps réel a permis de révéler la présence de noyau multinuclée au niveau de la cellule hôte. Ce processus s'explique par le fait que les cellules hôtes stoppent leur division cellulaire en altérant la cytokinèse. La forte corrélation entre l'existence de cellules hôtes multinuclées observées au niveau de la cellule cible *in vitro* ainsi que l'existence de cellules hôtes multinuclées dans des tumeurs humaines *in vivo* pourrait déclencher le processus au niveau de la tumeur (Krajcovic and Overholtzer, 2012; Krajcovic et al., 2011). Il a également été révélé que l'internalisation de cellule NK par les cellules cancéreuses pouvait également favoriser ce processus (Wang et al., 2009). Ainsi, il semblerait que dans certains tissus, l'entose pourrait également contribuer à la génération de cellules aneuploïdes.

Contrairement à l'entose, le cannibalisme cellulaire est un processus biologique pour lequel la cellule hôte (la cellule cannibale) internalise une cellule vivante également définie comme étant la cellule cible. Ce mécanisme suppose également que le stress cellulaire doit intervenir au niveau de la cellule cannibale pour déclencher le signal d'internalisation ainsi qu'une interaction avec les cellules voisines. A la suite de l'internalisation de la cellule cible, les cellules cannibales déploient ses lysosomes autour de la cellule cible et conduit à son élimination. Les mécanismes moléculaires et cellulaires du cannibalisme cellulaire n'ont pas été clairement définis à l'heure actuelle et les conséquences physiologiques doivent être explorées.

### 2.3.3. La sénescence cellulaire

Le terme de sénescence est dérivé du mot latin « *senex* », qui signifie « vieillissement » ou « âge avancé ». Il ne s'agit pas d'une mort cellulaire comme on pourrait l'observer par rapport à l'apoptose, la nécrose ou bien la mort autophagique. Ces cellules sont vivantes et métaboliquement actives. Toutefois, la sénescence est un programme physiologique qui est caractéristique d'un arrêt du cycle cellulaire définitif (Campisi et al. 2007). Ce phénomène a été découvert en 1965 par Hayflick et Moorhead à partir de culture primaire de fibroblastes humaines *in vitro* qui, après un certain nombre de cycle de division s'arrêtent de se diviser sans déclencher un programme de mort cellulaire. La notion de sénescence dite « répliquative » caractérise ce phénomène. En clinique, la majorité des traitements thérapeutiques anticancéreux tels que l'étoposide ou le mitoxantrone (Ewald, et al., 2010) déclenche un programme de sénescence cellulaire responsable de la régression tumorale (Dimri, 2005; Stepień et al., 2007). Ces traitements provoquent de nombreuses lésions de l'ADN qui activent des gènes suppresseurs de tumeurs et en particulier TP53 (*Tumor Protein 53*).

#### 2.3.3.1. Les aspects morphologiques et biochimiques de la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire présente une morphologie typique. Comparé aux autres formes de morts cellulaires typiques ou atypiques, la sénescence cellulaire ne présente pas de marqueur biologique absolu mais un ensemble de marqueurs biologiques qui sont (Rodier and Campisi, 2011) :

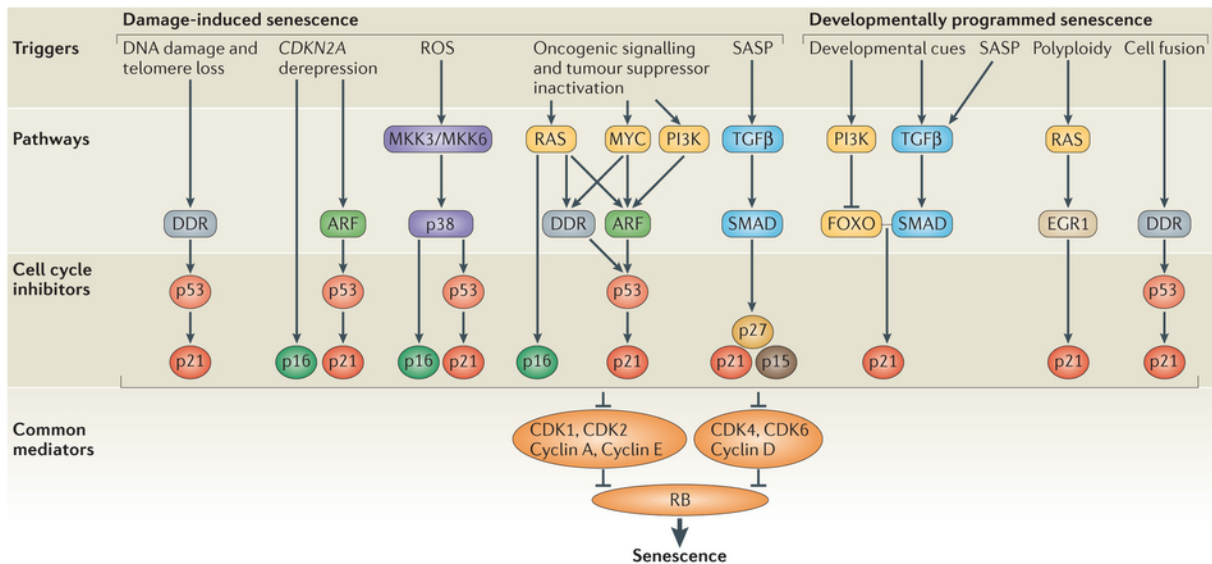
- une augmentation du volume cytoplasmique (Hayflick, 1965),
- une réponse aux lésions de l'ADN caractérisée par une accumulation de foyers nucléaires présentant la forme phosphorylée sur la sérine 135 de l'histone H2AX (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004),



- une accumulation de foyers d'hétérochromatine associée à la sénescence également connu sous le nom de *senescence associated heterochromatin foci* (SAHF) (Narita et al., 2003)
- une expression de la cycline D et E (Shelton et al., 1999; Stein and Dulić, 1995),
- un arrêt définitif de la croissance cellulaire (Stein et al., 1999) accompagné d'une augmentation de l'expression de différents gènes qui codent pour les protéines de la matrice extracellulaire et du cycle cellulaire (P16 et P21<sup>WAF1/Cip1/SDI-1</sup>),
- une expression de la  $\beta$ -galactosidase (à pH=6) (SA  $\beta$ -galactosidase) qui reflète l'accumulation des lysosomes (Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006),
- un phénotype sécrétoire de cytokines ayant une activité autocrine ou paracrine également connu sous le terme de *senescence associated secretory phenotype* (SASP).

#### 2.3.3.2. Les mécanismes moléculaires associés à la sénescence cellulaire

Il existent différents signaux cellulaires tels que le raccourcissement des télomères, l'activation des oncogènes comme HRAS<sup>G12V</sup>, la perte de PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), l'activation de l'oncogène c-MYC ou bien certains traitements initiateurs du programme de sénescence cellulaire (Munoz-espin et al. , 2014) (Figure 28). Une grande majorité de ces signaux convergent tous vers TP53 (*Tumor Protein 53*).



### Figure 28 : Mécanismes moléculaires de la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire peut être déclenchée par des lésions (perte de l'activité des télomérases, une activation de la CDKN2A, les ROS, des signaux oncogéniques) ou bien par d'autres facteurs (les facteurs provenant de SASP, la polyploïdie, les phénomènes de fusion cellulaire, les stress environnementaux). Chaque signal active leur voie spécifique et converge vers l'activation de P21 et provoque un arrêt du cycle définitif caractéristique de la sénescence cellulaire (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

#### 2.3.3.2.1. Rôle de TP53 sur le déclenchement de la sénescence

Les cellules peuvent entrer dans un programme de sénescence lorsqu'un niveau critique de lésions d'ADN est atteint (Di Leonardo et al., 1994; Parrinello et al., 2003). Suite à cela, l'activation de la kinase ATM par autophosphorylation au niveau de la sérine 1981 transactive le gène suppresseur de tumeur TP53 (Jacobs and de Lange, 2004; Stein et al., 1999). L'une des fonctions essentielles du facteur de transcription TP53 est de préserver l'intégrité du génome. Pour cela, TP53 va à son tour transactiver P21<sup>WAF1</sup>. P21<sup>WAF1</sup> va alors inhiber le signal d'exportation de la cycline D1 vers le cytoplasme et donc d'empêcher la progression du cycle cellulaire (Beauséjour et al., 2003). Cette réponse est réversible une fois que les lésions parviennent à être réparées. Ainsi le facteur de transcription TP53 sera pris en charge par l'ubiquitine ligase E3 humaine (HDM2). Cette ubiquitinase va assembler une succession d'ubiquitine au niveau de la protéine cible et constitue un signal d'adressage de dégradation (Brown 1997). Dans le cas où la cellule ne parvient pas à réparer ces lésions d'ADN, le mécanisme de répression du cycle cellulaire est maintenu. Dans un

contexte pathologique pour lequel TP53 est rendue non fonctionnel (par mutation ou inhibition), le déclenchement du programme de sénescence cellulaire est bloqué et pourrait contribuer à la progression tumorale (te Poele et al., 2002; Roberson et al., 2005; Schmitt et al., 2002b).

#### 2.3.3.2.2. La voie de signalisation dépendante de la protéine P16<sup>INK4A</sup>/RB

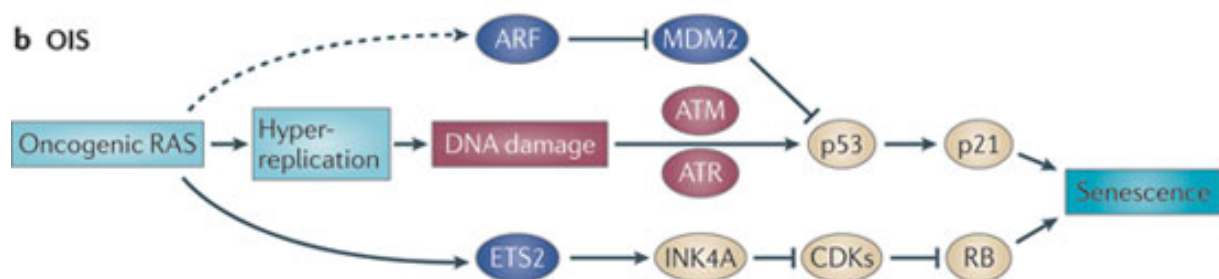
Plusieurs études s'accordent à montrer que le déclenchement de la sénescence cellulaire peut également être prise en charge par la protéine P16<sup>INK4A</sup> et la protéine RB (*Retinoblastoma*) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Michaloglou et al., 2005; Olsen et al., 2002). La protéine P16<sup>INKA</sup> et P21<sup>WAF1</sup> sont des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines et sont responsables du maintien de la faible phosphorylation de RB. Cette hypophosphorylation de RB correspond à la forme active de la protéine et permet de contrôler négativement la transcription du gène de prolifération cellulaire, E2F. Une inhibition de ce facteur empêche la progression du cycle cellulaire et donc la sénescence cellulaire (Sherr and McCormick, 2002). Ce mécanisme se déclenche suivant la nature du stimulus. Dans le cas d'un stress oxydatif, les ROS vont induire une activation des kinases MKK3 (*MAP kinase kinase 1* ou *MAP3K3*) et MKK6 (*MAP kinase kinase 6* ou *MAP2K6*) et qui vont à leur tour induire une phosphorylation de la MAPK-P38 (*Mitogen Associated Protein Kinase*), la transactivation de TP53 ainsi que de la protéine P16<sup>INK4A</sup> (Figure 28). Le raccourcissement ou la dégradation prématurée des télomères peut également activer la voie TP53 et P16<sup>INKA</sup>/RB (Smogorzewska and de Lange, 2002). L'oncogène RAS emprunte également la même voie en activant deux facteurs de transcription ETS1 et ETS2 (*v-ets erythroblastosis virus E26 homolog -1, -2*) (Ohtani et al., 2001). La combinaison de ces signaux déclenchée par RAS contribue à la formation d'aberrations génomiques qui activent les voies de réparation de l'ADN et la sénescence cellulaire (Aird et al., 2013). En modulant positivement l'expression génétique de P16<sup>INKA</sup>/RB, le programme de sénescence cellulaire peut-être engagé. De façon assez surprenante, lorsque P16<sup>INKA</sup> ou RB (*Retinoblastoma*) sont inhibées, et ce, suite à l'activation du programme de sénescence cellulaire, il a été constaté une absence de rétablissement de la progression du cycle cellulaire. Ainsi, l'activation de P16<sup>INKA</sup> et de RB joue un rôle important dans l'engagement définitif de la sénescence cellulaire. Il est également important de préciser que la voie P16<sup>INKA</sup>/Rb est davantage sollicitée que la voie de signalisation dépendante de TP53 et de P21<sup>WAF1</sup> (Beauséjour et al., 2003; Jacobs and de Lange, 2004; Stein et al., 1999).

### 2.3.3.3. Les mécanismes de déclenchement de la sénescence cellulaire

De nos jours, plusieurs types de stress cellulaires ont été identifiés pour leur capacité à déclencher le phénomène de sénescence cellulaire.

#### 2.3.3.3.1. La sénescence réplivative

Les télomères sont situés à l'extrémité de l'ADN et se composent d'une séquence d'ADN répétée. Au cours de la division cellulaire un composant à base d'ARN appelé *Terc* (*Telomerase RNA component*) sert de matrice pour les télomères lors de la réplication. Toutefois, l'activité de la télomérase est diminuée au cours des divisions et cela entraîne un raccourcissement des télomères (d'Adda di Fagagna et al., 2004) (Figure 29)(Hayflick, 1965). Lorsque ces télomères atteignent un seuil critique, un signal similaire à des cassures doubles brins (DSB) est alors déclenché. La cellule stoppe sa division et cela se caractérise par une augmentation de l'expression des kinases inhibitrices dépendantes des cyclines (CDKIs). Ce processus aboutit à l'accumulation de nombreuses lésions de l'ADN au niveau des foyers nucléaires appelés foyers associés à la sénescence (SDF). Ces foci correspondent à une phosphorylation de l'histone H2AX au niveau de la sérine 139 ( $\gamma$ -H2AX). En présence de  $\gamma$ -H2AX, le mécanisme de réparation aux lésions de l'ADN est activée en présence de ATR et de ATM en amont de TP53 (Hemann et al., 2001). Ce processus va activer la voie P16<sup>INK4A</sup> et de RB et ainsi aboutir au déclenchement de la sénescence de type « réplivative ».

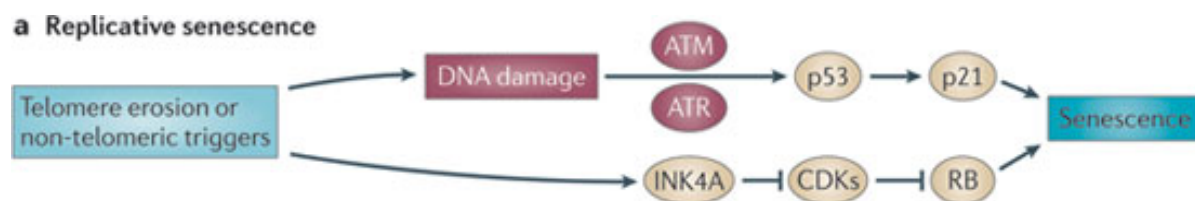


**Figure 29 : La sénescence réplivative**

La sénescence réplivative est activée par l'oncogène RAS. Cette dernière active ARF et inhibe MDM2 tandis que ETS2 active INK4A, RB et inhibe CDKs. Comme RB est activée et P53 n'est pas réprimée, l'hyper-réplication déclenchée par RAS entraîne des lésions de l'ADN qui activent P53 et P21 et aboutit à la sénescence cellulaire (Nardella et al., 2011).

### 2.3.3.3.2. La sénescence induite par les oncogènes

La sénescence induite par les oncogènes (OIS) a été initialement décrites comme empêchant la transformation des cellules. Dans le cas où le proto-oncogène  $RAS^{G12V}$  est surexprimé, la OIS est activée (Figure 30). Les cellules rentrent ainsi dans un état d'hyperprolifération et d'hyper-réplication de l'ADN qui va déclencher une activation des mécanismes de DDR spécifique du cycle cellulaire en phase S. Bien que la DDR soit déclenchée par un mécanisme différent de la sénescence répliquative, des voies de signalisations communes favorisent le développement de foci de type « SDF ». Cette OIS ne peut pas être activée lorsqu'il n'y a pas de signaux relatifs aux DDR ou bien que ATM est déficiente. Ainsi, TP53 représente un effecteur majeur dans l'OIS car TP53 transactive des gènes cibles comme *CDKN1A* (codant pour *p21*). Parallèlement à ce processus, des voies de signalisations impliquant la protéine ARF ainsi que la protéine EST2 peuvent être initiée et aboutir à la suite de l'inactivation de la protéine MDM2 ou de l'activation de la protéine INK4A au déclenchement de la sénescence cellulaire. Ces mécanismes ont été validés aussi bien dans des modèles murins *in vivo* et qu'*in vitro*. La sénescence induite représente une première réponse cellulaire oncosuppressive.



**Figure 30 : La sénescence induite par les oncogènes**

*Le raccourcissement des télomères active les mécanismes de réponse aux lésions de l'ADN (ATM ou ATR) ainsi que de RB et aboutit à la sénescence cellulaire (Nardella et al., 2011).*

### 2.3.3.3.3. La sénescence induite par la perte de PTEN (PICS)

La sénescence induite par la perte de PTEN (*Phosphatase and TENsin Homolog 1*) est également connue sous le terme de PICS (*PTEN loss-induced cellular senescence*) (Figure 31). Ce processus se distingue des autres formes de sénescence cellulaire car il ne présente pas les caractéristiques des mécanismes cellulaires associées à l'OIS ainsi qu'une DDR. En effet, la PICS, peut apparaître dans les cellules qui ont été traité par l'aphidicoline, un inhibiteur qui bloque les cellules en phase S et empêche la réplication de l'ADN. La perte de PTEN va entraîner une activation de la voie de mTOR (*Mammalian target of rapamycin*)

et déclencher l'activation de TP53. L'activation de mTOR augmente le niveau de TP53 et de INK4A. Ainsi, cela entraîne une déstabilisation des cyclosomes APC/C (*CDH1-containing anaphase-promoting complex*) et une accumulation de ETS2. Cette surexpression de TP53 est indépendante de ARF car l'inactivation de la protéine ARF sur le locus *Cdkn2a* ne modifie pas le niveau d'expression de TP53 et n'est pas corrélée avec une diminution de la progression tumorale. Par ailleurs, TP53 agit comme facteur de transcription de P21<sup>WAF1</sup> ce qui entraînera un arrêt du cycle cellulaire et conduit à la sénescence cellulaire. Enfin, des études ont montré que l'inactivation génétique double de *Tp53* et de *Pten* dans des modèles murins réduit l'agressivité des tumeurs et diminue la croissance tumorale. Des stratégies thérapeutiques anticancéreuses ciblant spécifiquement PTEN peuvent être un traitement de choix.



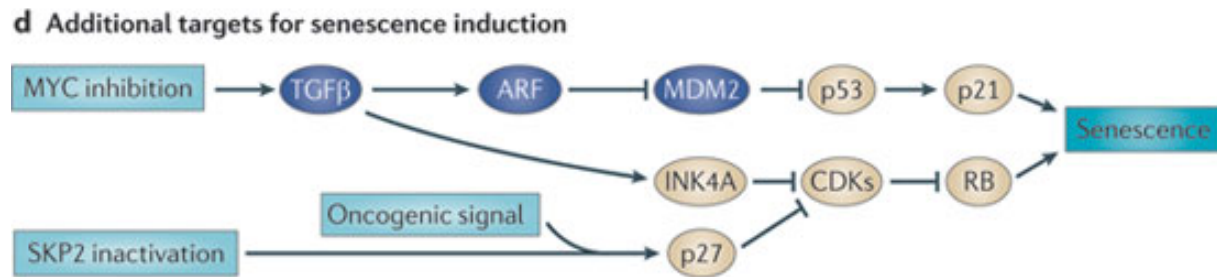
**Figure 31 : La sénescence induite par la perte de PTEN**

La perte de *PTEN* active *P53* ainsi que *mTOR* et inhibe également *APC*. Cette dernière active *P53*, *P21* et *RB* et aboutit à la sénescence cellulaire (Nardella et al., 2011).

#### 2.3.3.3.4. La sénescence induite par les stress oxydatives

Les mitochondries sont décrites comme étant un organe responsable de la production d'énergie sous la forme d'ATP. Elle tire son énergie grâce au déroulement de la glycolyse et du cycle de Krebs. Toutefois, ces composés génèrent de nombreux résidus oxygénés. Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont toxiques pour la cellule. Un mécanisme d'oxydo-réduction ou « redox » permet d'établir un équilibre chimique d'espèce oxydant au sein de la cellule. Les stress oxydatifs peuvent être d'origine endogène (provoquées par la production de ROS par l'intermédiaire des NAPDH oxydase (NOX) ou par la chaîne respiratoire ou bien d'origine exogène (comme à la suite du traitement avec l'éthanol, le Tert-butyl hydroperoxide, le peroxyde d'hydrogène, les rayons ionisants et les rayons ultraviolets). Si le taux en ROS est trop important, ces dernières vont altérer les activités biologiques des protéines, de l'ADN génomique et des organites. Les mécanismes de DDR dépendants des voies de TP53/P21<sup>WAF1</sup> ou TP53/16<sup>INKA1</sup>/pRB sont alors activés à la suite de ces processus (Figure 32). Les cellules vont rentrer dans un état dit de sénescence prématurée ou plus communément appelé SISP (*Stress-induced premature senescence*)

(Wang, et al., 2013). Ce phénomène peut être inhibé, en employant des antioxydants (tels que la vitamine C ou N-acétylcystéine (NAC)) vont permettre de réduire l'activation de la réponse aux DDR et permettre à la cellule de progresser dans son cycle.



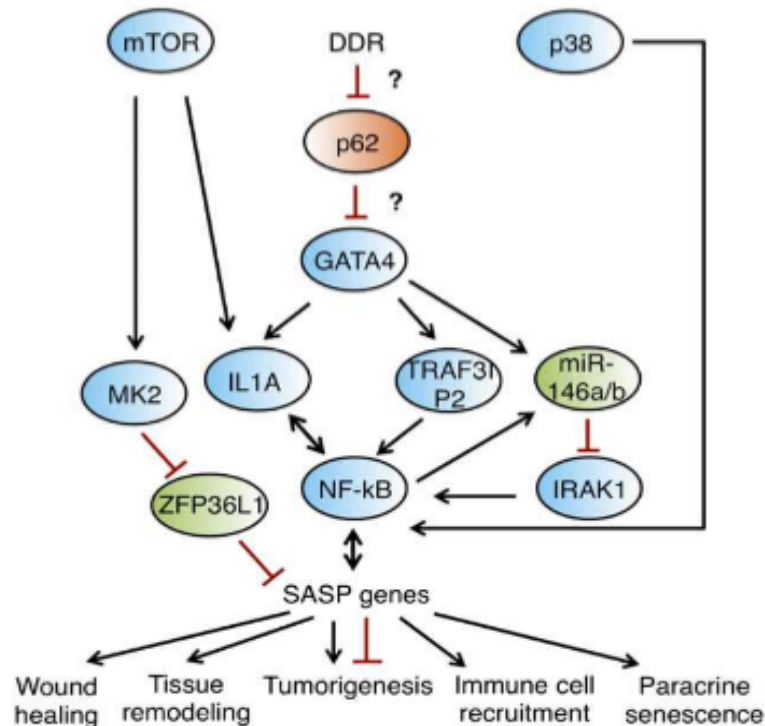
**Figure 32 : La sénescence induite par d'autres stress cellulaires**

L'inhibition de MYC induit TGFβ suivi de ARF et de INK4A et aboutit à l'activation de P21 et de RB. L'inactivation de SKP2 ou des signaux oncogéniques agissent également sur P27 pour inhiber CDKs et donc activer RB. L'ensemble de ces signaux provoque une sénescence cellulaire (Nardella et al., 2011).

#### 2.3.3.4. Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence cellulaire

A la suite du déclenchement de la sénescence cellulaire, il a été constaté que ces cellules présentent un pouvoir sécrétoire (Coppé et al., 2008). Les facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire par les cellules sénescents sont appelés SASP (pour *senescence-associated secretory phenotype*) (Campisi et al., 2011; Collado et al., 2007). On peut distinguer trois types de facteurs libérés qui sont des facteurs pro-inflammatoires, des facteurs de croissance et des protéases (comme la collagénase). Les facteurs pro-inflammatoires permettent d'attirer les cellules du système immunitaire inné et favorisent l'élimination des cellules sénescents des tissus lésés. Les facteurs de croissance vont permettre la régénération des tissus. Les collagénases ou bien des métallo-protéases (MMP-1) sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Certains auteurs ont montré que ces MMPs permettent de limiter les phénomènes de fibrose (Giannandrea, 2014). Tandis que d'autres travaux soulignent le rôle de ces MMPs à rendre la tumeur accessible aux cellules immunitaires. La nature exacte de ces SASP est dépendante du type tissulaire ainsi que de son microenvironnement. Les facteurs provenant des SASP sont notamment libérés à la suite de l'activation du facteur de *NF-κB* (*Nuclear Factor of kappa light*) ou de C/EBPβ. Il a été aussi révélé que libération de l'interleukine 1-α stimule de façon autocrine l'activation du facteur de transcription *NF-κB* ainsi qu'une augmentation du potentiel sécrétoire des cellules sénescents (Bhaumik et al., 2009) (Figure 33). Paradoxalement, Il a été observé dans différentes situations physiopathologiques que la

persistance de SASP participe à la dissémination des tumeurs au sein du tissu et aussi à la production de métastase.



**Figure 33 : La régulation des SASP**

Dans les étapes tardives de la sénescence cellulaire, les cellules peuvent exprimer des gènes spécifiques de SASP (Senescence-associated secretory phenotype). Ces SASP participent à la régénération tissulaire, au remodelage du tissu, au recrutement des cellules du système immunitaire ou à une induction paracrine de la sénescence cellulaire. Dans certains cas, la libération des SASP favorisent la tumorigénèse (Lujambio, 2016).

#### 2.3.3.4.1. Rôle bénéfique des SASP sur les tissus

Le caractère sécrétoire des cellules sénescents participe à l'homéostasie tissulaire ainsi qu'à l'élimination des cellules cancéreuses. En effet, ces cellules sénescents peuvent libérées de l'interleukine -6, -8 et MCP-1 et favorisent le déclenchement de la sénescence cellulaire des cellules adjacentes ainsi que le maintien de l'état de sénescence cellulaire. Le déclenchement d'un tel processus marque le début de l'initiation de l'élimination des cellules sénescents par le système immunitaire innée et favorise la régénération du tissu. Par exemple, les cellules sénescents sécrètent de l'interleukine-1 $\alpha$ . Cette cytokine peut agir de façon autocrine (soi-même) et peut également de façon paracrine (à un autre partenaire). La sécrétion intercellulaire de l'interleukine-1 $\alpha$  peut potentialiser la réponse inflammatoire en

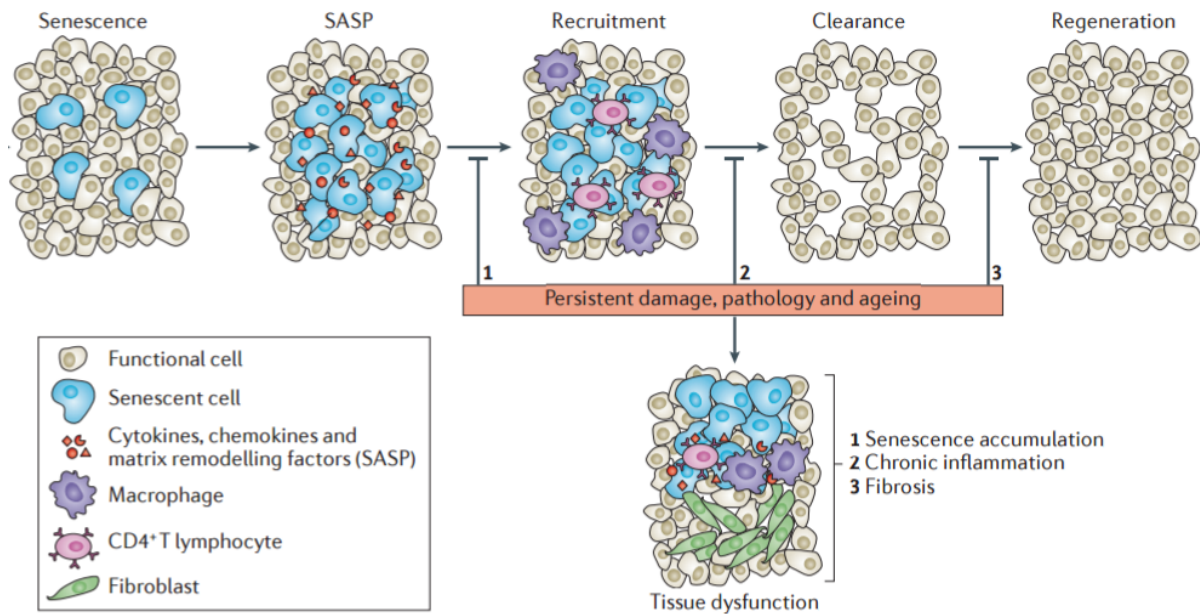


activant des gènes favorisant la libération de facteur immunologique tel que le ligand NKG2D (pour *Natural-Killer Group 2, member D*). Ce ligand va se fixer sur le récepteur membranaire NKG2D-R des cellules NK et déclenche une libération de cytokine inflammatoire tel que l'interféron  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ). Le déclenchement de cette réponse inflammatoire dépend du stimulus responsable du déclenchement de la sénescence cellulaire. En effet, il a été révélé que la sénescence cellulaire déclenchée par l'activation de l'oncogène RASv12 permettait la libération de facteurs pro-inflammatoires tels que l'interleukine-7, une cytokine impliquée dans la prolifération des leucocytes.

#### 2.3.3.4.2. Rôle néfaste des SASP sur les tissus

A l'opposé, il a été également révélé que les cellules sénescents pouvaient également favoriser la tumorigénèse et l'agressivité des tumeurs *in vivo* (Figure 34). Ces effets ont notamment été retrouvés au niveau de cancer du sein, de la peau, de la prostate, du pancréas et de la sphère ORL. Dans ces contextes tissulaires, la libération des SASP semble favoriser la prolifération des cellules épithéliales. Dans certains cas du cancer du sein, les cellules tumorales sénescents peuvent sécréter le facteur GRO- $\alpha$  et stimuler de façon paracrine la prolifération des cellules voisines. Par ailleurs, ces cellules sont capables de sécréter des métalloprotéinases tel que la collagénase (MMP-3). En condition physiologique, ces MMP vont permettre de limiter les phénomènes de fibrose cellulaire en dégradant la matrice extracellulaire. Toutefois, il a été constaté que la présence de processus inflammatoire qui pouvait être délétères sur les tissus. En effet il a été proposé qu'elle favorise une meilleure accessibilité des cellules aux signaux mitotiques ainsi qu'au chimio-attractants (Liu et al. 2007). Ainsi le potentiel d'agressivité de la tumeur semble augmenter en présence de ces facteurs et en plus de favoriser la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. Par exemple, les cellules sénescents peuvent sécréter le VEGF (*Vascular Epithelial Growth Factor*). Lorsque VEGF se fixe spécifiquement à son récepteur (VEGFR), il y aura alors une néo-angiogénèse en faveur de la tumeur. Parallèlement à ce phénomène, l'interleukine-1 peut également augmenter le potentiel d'adhésion des cellules cancéreuses au niveau des vaisseaux sanguins (Orr et al., 2001). La libération d'interféron  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ), de TNF- $\alpha$ , l'interleukine-1 $\alpha$ , ou l'interleukine-1b par des cellules du système immunitaire va déclencher un phénomène de maturation des cellules mésenchymateuses (MSC). Ces cellules sont connues pour contrôler négativement les cellules du système immunitaire (Ghannam et al., 2010). Par ailleurs l'interleukine 6 et 8 (Il-6 ou Il-8 contribuent à développer un caractère invasive des cellules tumorales car elles agissent de façon paracrine (Coppé et al, 2008). C'est pour l'ensemble de ces raisons que l'accumulation de

cellules sénescents au sein du tissu qui favorise le développement d'une inflammation chronique et participe au processus physiopathologique.



**Figure 34 : Rôle physiologique et physiopathologiques de la sénescence cellulaire**

*Les cellules sénescents libèrent des SASP dans le microenvironnement. Cette libération attire les cellules du système immunitaire (macrophage ou lymphocyte CD4+ et éliminent les cellules défectueuses ainsi que les cellules sénescents. La population saine recolonise le tissu sain. Lorsque les lésions sont persistantes dans le cadre du vieillissement ou dans certaines pathologies, les cellules sénescents s'accumulent, provoquent une inflammation chronique et une fibrose (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).*

#### 2.3.3.5. Aspects physiologiques et physiopathologiques de la sénescence cellulaire

D'un point de vue physiologique, la sénescence cellulaire a été proposée comme étant un programme long et complexe qui vise à éliminer les cellules génétiquement instables de l'organisme. Ces cellules avertissent, à travers la sécrétion de SASP, les cellules voisines au sein du microenvironnement pour favoriser leur élimination. Toutefois, il a été constaté une accumulation des cellules sénescents. Une augmentation de l'activité endogène de la  $\beta$ -galactosidase a été détectée au niveau de l'épithélium d'individus âgés (Dimri et al., 1995). Les travaux pionniers de Hayflick ont permis de retrouver une relation entre le programme de sénescence et les phénomènes de vieillissement (Hayflick, 1965). Par la suite, il a été montré sur des modèles murins, que les oncogènes (tels que Rasv12 ou BRAFV600E) ou une baisse d'activité des télomérases déclenchent une sénescence cellulaire et permettent aussi de lutter contre la croissance de tumeurs (Braig et al., 2005;

Chen et al., 2005; Collado et al., 2005, 2007; Michaloglou et al., 2005). D'autres travaux ont identifié des signatures biologiques pré-cancéreuses ou anti-cancéreuses de la sénescence cellulaire aussi bien chez l'homme que dans des modèles murins (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005; Collado et al., 2005). Suivant les caractéristiques de ces signatures biologiques, la cellule cancéreuse peut adopter un phénotype particulier et échapper à l'état de sénescence cellulaire (Chen et al., 2005; Cosme-Blanco et al., 2007; Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Les cellules cancéreuses qui présentent des mutations de TP53 ou P16<sup>INKA</sup> sont connues pour être des cellules résistantes à mort cellulaire de façon autonome. Ces dernières sont également incapables de rentrer en sénescence. Une persistance de ces cellules au sein d'une tumeur affecte négativement le comportement des cellules voisines du microenvironnement participe à l'agressivité de la tumeur. Il a été constaté que la sécrétion d'interleukine-6 (IL-6) et d'interleukine-8 (IL-8) stimulent la tumorigénèse et contribuent à l'envahissement du tissu (Coppé et al., 2010). L'IL6 ou l'IL-8 peuvent également favoriser l'émergence de cellules malignes cancéreuses et notamment lorsqu'elles expriment certains oncogènes mutés tels que RAS<sup>V12</sup> (Ancrile et al., 2007; Sparmann and Bar-Sagi, 2004). Ces résultats sont à nuancer car ces interleukines sont bénéfiques durant les premières phases d'élimination des cellules cancéreuses. En revanche, une sécrétion incontrôlée des SASP peut déclencher une inflammation chronique, une stimulation de la croissance tumorale ainsi qu'une transformation des cellules saines en cellules sénescents. Ce processus favorise le développement de diverses pathologies. (Foreman and Tang, 2003; Minamino and Komuro, 2002, 2002). Des cellules sénescents persistantes ont ainsi été retrouvées au cours du développement de la maladie de Parkinson ou de la maladie d'Alzheimer (Campisi, 2005; Rodier and Campisi, 2011).

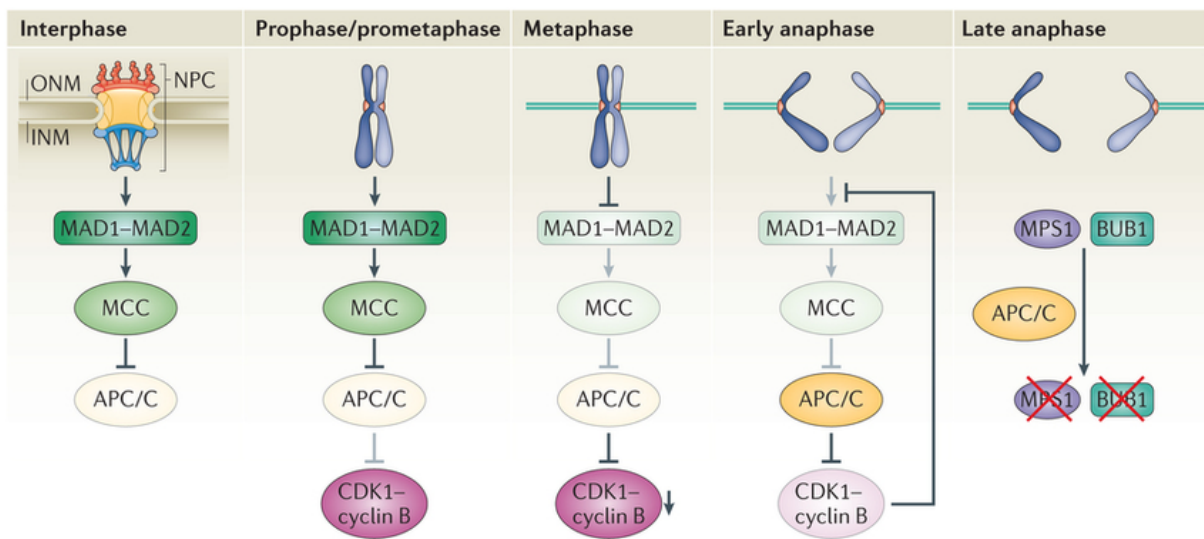
#### 2.3.4. La catastrophe mitotique

La mitose est un processus qui se distingue de quatre étapes, la prophase, la métaphase qui inclut également la prométaphase), l'anaphase, la télophase et aboutit à la cytotélerèse. Les rayons ionisants ou aux agents chimiothérapeutiques sont responsable de nombreuses lésions d'ADN et active des point de contrôle au niveau des différentes phases du cycle cellulaire. Lorsque le système de réparation de l'ADN ne suffit plus à rétablir un niveau acceptable de lésions d'ADN, les cellules déclenchent un programme de mort cellulaire ou bien de provoquer une catastrophe mitotique. Ce phénomène est responsable de la formation de cellules polyploïdes (cellules présentant un matériel génétique supérieur à 4N ou plus). Certaines cellules peuvent progresser dans le cycle cellulaire et peuvent former des cellules aneuploïdes. Dans ces deux situations, si ces aberrations chromosomiques ne

sont pas viables, les cellules peuvent ainsi mourir selon un processus de mort mitotique s'apparentant à de l'apoptose ou de la nécrose ou rentrer dans un état de sénescence cellulaire

#### 2.3.4.1. Déroulement de la mitose

Le passage de la phase G2 vers la phase de mitose est un processus biologique qui est finement régulé par un ensemble de protéines (Figure 35). Au cours de la phase G2, MYT1 (*Myelin transcription factor 1*) phosphoryle CDK1 au niveau de la thréonine 14 ainsi que la WEE1 (*WEE1 G2 checkpoint kinase*) au niveau de la tyrosine 15. Cette phosphorylation bloque le passage en phase M. Ainsi, la déphosphorylation par des phosphatases (de la famille de Cdc25) conduit à l'activation de CDK1. La cycline B1 forme un complexe avec CDK1 et CDK1/cycline B1 est transféré dans le noyau. Le complexe va alors induire une condensation de la chromatine, une perméabilisation de la membrane nucléaire et un réarrangement du cytosquelette. APC (*Anaphase-promoting complex*) est une ubiquitine ligase qui est inhibée au cours de la prophase. MAD1-MAD2 (*Mitotic spindle assembly checkpoint -1/-2*) et MCC (*Mitotic checkpoint complex*) sont un ensemble de protéines de point de contrôle qui régule négativement APC/C. Lorsque les fuseaux mitotiques se lient au niveau du centromère, ces dernières sont inhibées, ce qui active APC/C. APC/C va alors ubiquitiner CDK1/Cycline B et induire leur dégradation. Ce point de contrôle est essentiel dans le contrôle de la ségrégation des chromatides. Dans les phases tardives de l'anaphase, l'activité de APC/C dégrade les protéines de point de contrôle de l'anaphase tardive qui sont BUB1 (*Budding uninhibited by benzimidazole 1*) et MPS1 (*monopolar spindle protein 1*) (London and Biggins, 2014) et autorise le passage à l'étape suivante. La télophase est la dernière phase de la mitose, la membrane nucléaire se reconstitue, les chromosomes forment à nouveau la chromatine, le nucléole réapparaît et forment enfin deux cellules filles.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

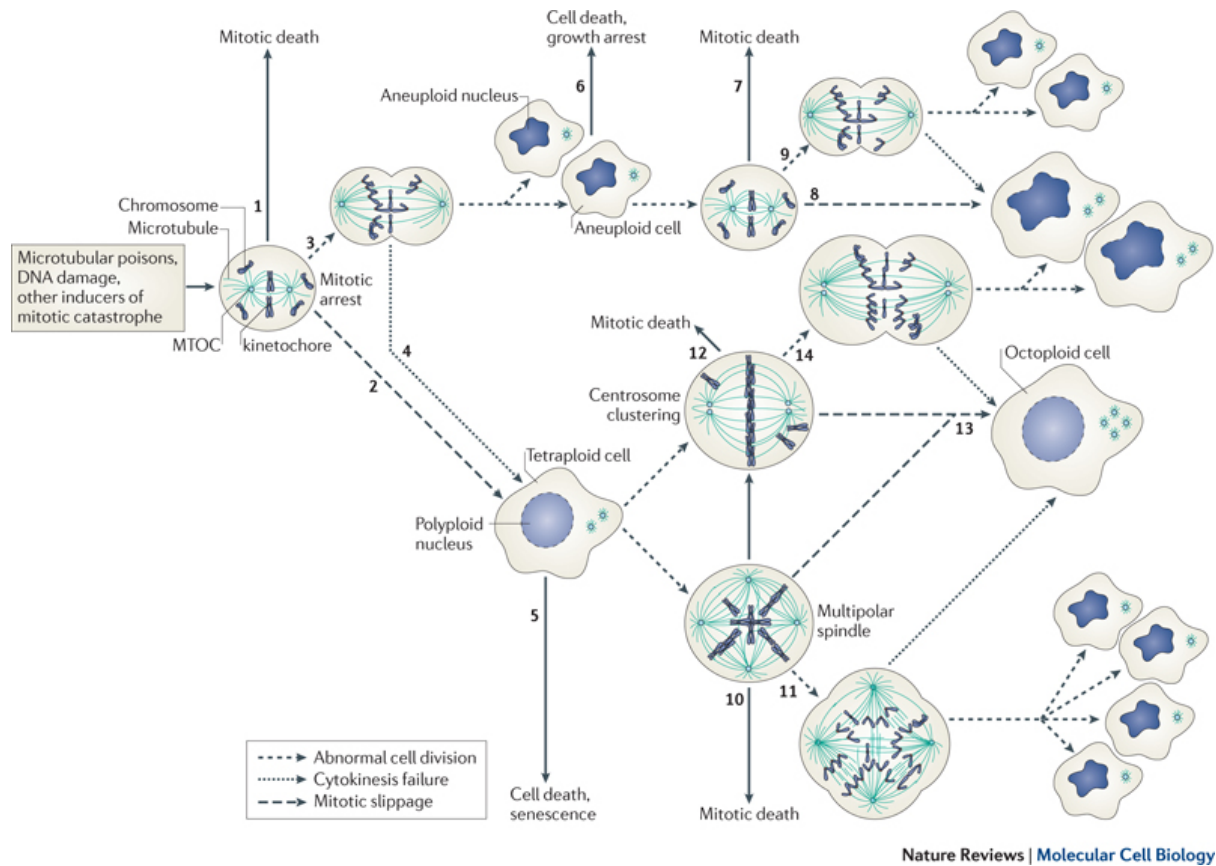
### Figure 35 : Déroulement des différentes étapes de la mitose

L'interphase, le complexe ONM, NPC et INM active les protéines de contrôle MAD1-MAD2 et MCC pour inhiber APC/C. Au cours de la prophase/prométaphase, CDK1/Cycline est transloqué dans le noyau. La métaphase se caractérise par une dégradation de CDK1/CyclinB. Au cours de l'anaphase (précoce ou tardive), les protéines de point de contrôle (MPS1 et BUB1) sont ubiquitinées et dégradées (London and Biggins, 2014)

#### 2.3.4.2. Déclenchement de la catastrophe mitotique

Ce processus biologique est une forme de mort cellulaire s'apparentant à de l'apoptose, la nécrose ou bien la mort autophagique en cours ou à la fin la mitose. En effet, une déplétion du facteur anti-apoptotique BCL-2 est corrélée à une diminution partielle de la mort par apoptose (Castedo and Kroemer, 2004a) mais favorise l'émergence de cellules polyploïdes. La protéine P53 peut contrôler négativement l'expression de Cdk1, la cycline B1 et stimule la transcription de P21, GADD45 (*The growth arrest DNA damage*) et 14-3-3 $\sigma$ . Ainsi, les cellules qui présentent des catastrophes mitotiques peuvent mourir selon un processus d'apoptose dépendante de P53 (Taylor and Stark, 2001). Certains cas, la catastrophe mitotique ne requiert pas l'activation de P53. Il a été observé que l'inactivation de CHK2 dans les syncytia (issus d'une fusion de deux cellules), la caspase-2 peut être activée. Cette dernière induit une perméabilisation de la membrane mitochondriale et active la caspase-3 et ainsi induire une mort dite « métaphasique » dépendante des caspases (Castedo and Kroemer, 2004b). Des anomalies liées à une

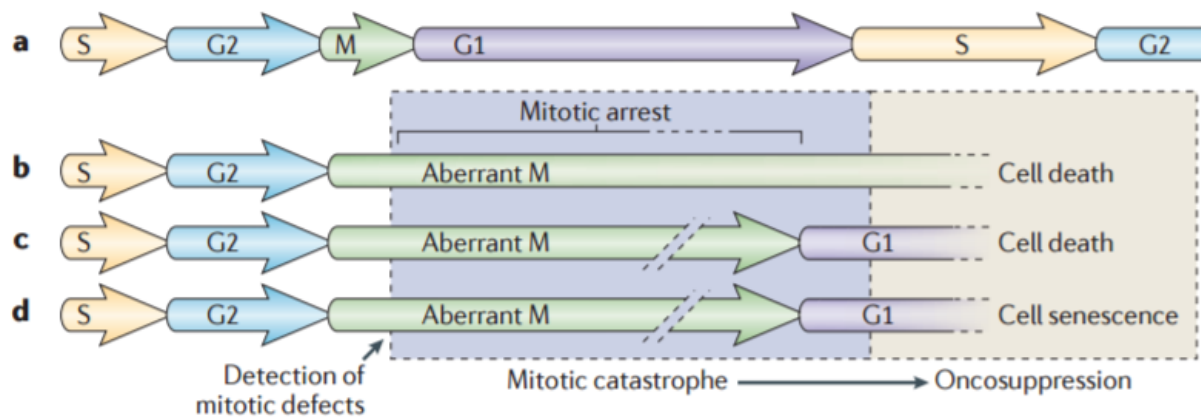
inactivation de CHK2 ou de APC peut conduire à la formation de cellules polyploïdes ou bien à de l'aneuploïdies (Figure 36).



**Figure 36: Les différentes morphologies résultant d'une division cellulaire anormale**

(1) Les agents induisant les anomalies chromosomiques déclenchent un arrêt de la mitose et conduit à une mort mitotique. Lorsque les cellules présentant des aberrations chromosomiques parviennent à se diviser elles génèrent (3) des cellules aneuploïdes qui peuvent mourir selon (6) mort mitotique ou (8,9) bien progresser dans le cycle cellulaire. Toutefois, un échec de la mitose génère (5) des cellules tétraploïdes ou bien (13,14) des cellules octoploïdes. Lorsque les cellules tétraploïdes présentent (10) des fuseaux mitotiques multipolaires et continue de progresser dans le cycle cellulaire, elles peuvent alors générer jusqu'à 4 cellules ou un échec de la cytokinèse produit des cellules octoploïdes (Vitale et al., 2011).

La catastrophe mitotique peut également être responsable du déclenchement de la sénescence cellulaire lorsque ces cellules présentent des signes d'arrêt en phase G1, une expression de la B-galactosidase associée à la sénescence et une diminution de l'activité des télomérases (Eom et al., 2005) (Figure 37). Ainsi, la catastrophe mitotique semble cohabiter étroitement avec l'apoptose, la nécrose, la mort autophagique ou la sénescence cellulaire dans l'élimination des cellules cancéreuses.



**Figure 37 : Schéma comparatif de différents types de catastrophe mitotique**

(a) Les cellules saines progressent normalement dans le cycle cellulaire en passant par la phase G1, S, G2, M. (b) Les cellules présentant des défauts de mitoses ne peuvent pas progresser en phase de mitose (M) et active un mécanisme moléculaire conduisant à sa propre destruction également appelée « mort mitotique ». (c) Les cellules défectueuses peuvent passer la phase de mitose mais (d) les anomalies chromosomiques précipitent les cellules à leur propre mort ou bien (d) à la sénescence cellulaire. Ces différents mécanismes contribuent à l'élimination des cellules cancéreuses (Eom et al., 2005).

## **Objectifs**

Ce travail de thèse a été motivé par l'émergence des nanosciences et des nanobiotechnologies. Cette discipline est portée par l'intérêt de nombreux chercheurs à développer de nouveaux composés capables de cibler spécifiquement les cellules tumorales et de les éliminer. Les travaux menés par le professeur Tillement et ses collaborateurs ont montré que l'utilisation de nanoparticules à base d'atome de haut poids moléculaire (tels que le gadolinium ou l'or) augmente la sensibilité des cellules tumorales aux rayonnements ionisants et provoque leur mort (Miladi, et al. 2015). Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'élimination des cellules cancéreuses restent encore à être élucidés. Le projet de thèse rentre dans l'axe de recherche relatif aux nouvelles biotechnologies. Le programme de recherche que j'ai développé au cours de mes travaux de thèse a consisté à définir les mécanismes moléculaires impliqués dans l'élimination des cellules cancéreuses à la suite de la combinaison de la radiothérapie avec des nanoparticules de Gadolinium. Nous avons tout au cours de ces travaux de recherche à répondre à deux questions :

**1) Quelles sont les programmes cellulaires létaux déclenchés par le traitement combinant les nanoparticules de gadolinium et la radiothérapie ?**

**2) Quels sont les signaux de morts cellulaires impliqués dans ces processus létaux ?**



## Article scientifique

# Gadolinium-based nanoparticles enhances senescence and non-cell autonomous death elicited by ionizing radiation

Frédéric Law<sup>1-4</sup>, Haithem Dakhli<sup>1-4</sup>, Awatef Allouch<sup>1-4</sup>, Laurent Voisin<sup>1-4</sup>, Dorine De Jong<sup>1-4</sup>, Maxime Thoreau<sup>1-4</sup>, David M. Ojcius<sup>5</sup>, Nazanine Modjtahedi<sup>2-4</sup>, Eric Deutsch<sup>2-4</sup>, Olivier Tillement<sup>6</sup> and Jean-Luc Perfettini<sup>1-4</sup>

<sup>1</sup> Cell death and Aging team, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France;

<sup>2</sup> Laboratory of Molecular Radiotherapy, INSERM U1030, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France;

<sup>3</sup> Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France;

<sup>4</sup> Université Paris Sud - Paris Saclay, 114 rue Edouard Vaillant, F-94805 Villejuif, France;

<sup>5</sup> Department of Biomedical Sciences, University of the Pacific, School of Dentistry, 155 Fifth Street, San Francisco, California 94103.;

<sup>6</sup> CNRS UMR5306, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Institut Lumière Matière, F-69622, Villeurbanne, France.

Subheadings: Antitumor mechanisms elicited by the combination of gadolinium-based nanoparticles with ionizing radiation

Keywords: Gadolinium-based nanoparticles, IR, senescence, cell death

Contact: **Dr. Jean-Luc PERFETTINI**  
Cell death and Aging team  
Laboratory of Molecular Radiotherapy, INSERM U1030  
Gustave Roussy, Pavillon de Recherche 1  
114 rue Edouard Vaillant  
F-94805 Villejuif, France  
Tel. 33-1-42 11 54 24  
Fax 33-1-42 11 66 65  
e-mail: [perfettini@orange.fr](mailto:perfettini@orange.fr)

## Abbreviations:

CAD, cell-autonomous death; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; CMTMR, 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino) tetramethylrhodamine; DCF, 2,7-dichlorohydro fluorescein; DiOC<sub>6</sub>(3),3'-dihexyloxycarbocyanine iodide; H2DCFDA, 2,7-dichlorohydro fluorescein diacetate;  $\gamma$ R, gamma-ionizing radiation; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GdBN, gadolinium-based nanoparticles; Gy, gray; PI, propidium iodide; IR, ionizing radiation; MLC2, myosinlight chain 2; MLC2S19\*, myosin light chain 2 phosphorylated on serine 19; MnTBAP, Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin Chloride; NAC, N-acetyl cysteine; NCAD, non-cell-autonomous death; NOX, NADPH oxidase; ROCK1, rho-associated protein kinase 1; ROS, reactive oxygen species; SA- $\beta$ -Gal, senescence-associated  $\beta$ -galactosidase; siRNA, small interfering RNA; SASP, senescence-associated secretory phenotypes; SOD, superoxide dismutase; Z-VAD-fmk; benzyloxycarboxyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone.

52 **Abstract**

53 Although the combination of heavy-metal-based nanoparticles with ionizing radiation  
54 is extensively studied for cancer treatment, biological mechanisms involved in the  
55 tumor response are poorly understood. Here we show that the combination of  
56 gadolinium-containing nanoparticles with ionizing radiation induces an increased  
57 expression of the cyclin-dependent kinase p21 and triggers the senescence of  
58 irradiated cancer cells. Moreover, we reveal that these irradiated cancer cells engulf  
59 neighboring cells through the activation of ROCK1 kinase and lead to the degradation  
60 of internalized cells, thus highlighting the fact that the combination of gadolinium-  
61 containing nanoparticles with ionizing radiation impairs the proliferation of cancer  
62 cells by simultaneously inducing the senescence and the cannibalism of irradiated  
63 cancer cells. Interestingly, we demonstrate that the induction of these both cellular  
64 processes requires a NADPH oxidase 5 (NOX5)-dependent ROS production and the  
65 transcriptional activation of tumor suppressor protein p53. Altogether, our results  
66 reveal that the combination of gadolinium-based nanoparticles with ionizing radiation  
67 may enhance the effectiveness of radiotherapy through the simultaneous induction of  
68 cellular cannibalism and senescence of irradiated cells.

69

70

## 71 **Introduction**

72 The radiation therapy (also known as radiotherapy) is one of the most used anti-tumor  
73 strategies. More than half of all patients with cancer are treated with ionizing  
74 radiation (IR) alone or in combination with surgery or chemotherapy <sup>1</sup>. Recent  
75 progresses realized in medical physics (with the development of low/high energy  
76 radiation, the implementation of mono-, hypo- or hyper-fractionation schedule and the  
77 diversification of dose rates used) and the development of innovative medical  
78 technologies (such as the 3D-conformational radiotherapy (3D-CRT), the intensity  
79 modulated radiation therapy (IMRT), the stereotactic radiosurgery (SRS)) and the  
80 functional imaging)) contribute to better deliver the efficient doses of radiation on  
81 tumors whilst sparing surrounding healthy tissues, which is the most convenient side  
82 effect of radiation therapy <sup>2</sup>. Several applications of nanomedicine (such as  
83 radioisotope-labeled or metallic nanoparticles) have been developed to improve this  
84 therapeutic index by using nanomaterials as contrast agents to better deliver the  
85 radiation doses into tumor sites and/or as radiosensitizers, to enhance the dose  
86 deposition in tumors and reduce irradiation-related side-effects <sup>3, 4, 5, 6, 7</sup>. Considering  
87 that the radiation dose absorbed by any tissues is related to the square of relative  
88 atomic number ( $Z^2$ ) of the material (where  $Z$  is the atomic number) <sup>8</sup>, metallic  
89 nanoparticles containing high- $Z$  atoms (such as gold or gadolinium) have been  
90 extensively investigated for their potential to improve radiotherapy. Under exposure  
91 to ionizing radiations, heavy-metal based nanoparticles produce photon and Auger  
92 electrons that improve the total dose rate deposition into the tumors, induce the  
93 production of reactive oxygen species (ROS) and cause cellular damages on many  
94 tumors (including melanoma, glioblastoma, breast and lung carcinomas) <sup>9, 10, 11</sup>.  
95 Despite the fact that several preclinical animal models revealed the ability of the

96 combination of heavy-metal based nanoparticles with ionizing radiation to reduce  
97 tumor growth, cellular and molecular mechanisms involved in the tumor regression  
98 remain poorly understood.

99

100 During the course of radiotherapy, the exposure of tumor tissues to IR aims to prevent  
101 the proliferation of cancer cells by inducing lethal damages either directly on  
102 irradiated cancer cells or indirectly, through bystander effects on non-irradiated  
103 cancer cells. Although that cell-autonomous death modalities (such as apoptosis,  
104 necrosis and mitotic death) and senescence have been separately detected in response  
105 to ionizing radiation, their relative contribution to the effectiveness of radiotherapy is  
106 still controversial <sup>12</sup>. Hence, yet unknown mechanisms responsible for the  
107 radiotherapy effectiveness remain to be identified. Recently, we revealed that  
108 simultaneously to the induction of typical cell-autonomous death (CAD) modalities  
109 (such as the apoptotic demise or the mitotic death of irradiated cancer cells), ionizing  
110 radiation also triggers the execution of non-cell-autonomous death (NCAD) modality  
111 known as cellular cannibalism. Thus, after ionizing irradiation, we demonstrated that  
112 irradiated cells are able to internalize alive neighboring cancer cells. Once  
113 internalized, engulfed cells are eliminated through a caspase-dependent death <sup>13,14</sup>. In  
114 addition, we revealed that this process leads to the induction of the senescence of  
115 cannibal cells. We termed this non-cell autonomous program of senescence,  
116 “entescence” and demonstrated that the induction of entescence impairs the  
117 proliferation of a fraction of irradiated cancer cells and thus, contributes the tumor  
118 suppression elicited by ionizing radiation <sup>13</sup>. Altogether, these studies highlighted the  
119 fact that non-cell autonomous death modality (such as cellular cannibalism) and

120 cellular senescence are two interlinked processes that may contribute to the  
121 effectiveness of radiotherapy.

122

123 In this study, we explored the ability of the combination of gadolinium-based  
124 nanoparticles (GdBN) with ionizing radiation to induce both cellular senescence and  
125 the death through non-cell-autonomous mechanisms. We revealed that the irradiation  
126 of cancer cells in presence of GdBN enhances the ability of irradiated cancer cells to  
127 undergo senescence. In parallel, we observed that irradiated cancer cells also exhibit  
128 cannibalistic activity and eliminate after live cell engulfment, both irradiated and non-  
129 irradiated neighboring cancer cells. Finally, we deciphered signaling pathways that  
130 are involved in the biological effects elicited by the irradiation of cancer cells in  
131 presence of GdBN and revealed that after an irradiation in presence of GdBN, the  
132 proliferation of cancer cells may be impaired by both senescence and cellular  
133 cannibalism inductions.

134

135

## 136 **Results**

### 137 *The combination of gadolinium-based nanoparticles with ionizing radiation* 138 *induces cellular senescence*

139 As we previously reported<sup>13,14</sup>, cancer cells are eliminated after ionizing radiation  
140 through distinct lethal modalities (including NCAD or CAD deaths) that may be  
141 induced simultaneously to cellular senescence. To determine the biological effects of  
142 the irradiation of cancer cells in presence of gadolinium-based nanoparticles, we first  
143 analyzed the ability of this treatment to induce the senescence of cancer cells. Thus,  
144 human colorectal HCT116 cells were pre-treated with 1.2 mM of gadolinium-based  
145 nanoparticles (GdBN) during 1 hour and then, irradiated with one single dose of 6 Gy  
146 X-rays (XR). After 2 days, the cytoplasmic senescence-associated  $\beta$ -galactosidase  
147 (SA- $\beta$ -Gal) activity, the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor protein  
148 p21 and the cell cycle progression of treated HCT116 cells were analyzed. We  
149 detected a significant increase of the frequency of SA- $\beta$ -Gal<sup>+</sup> cells after the treatment  
150 of HCT116 cells with XR, as compare to control, and also paid a particular attention  
151 to the fact that the combination of GdBN+XR significantly increases the number of  
152 SA- $\beta$ -Gal<sup>+</sup> cells detected after treatment with XR (Figures 1a and 1b). These results,  
153 which were confirmed by detecting the increased expression of p21 by fluorescence  
154 microscopy (Figures 1c and 1d) and by western blot (Figure 1e), demonstrate that the  
155 combination of gadolinium-containing particles with ionizing radiation sensitizes  
156 cancer cells to the induction of senescence after XR. In parallel, we also analyzed  
157 using flow cytometry the cell cycle distribution of HCT116 cells that have been  
158 irradiated with 6 Gy alone or in combination with 1.2 mM GdBN and cultivated  
159 during 24 and 48 hours. As compared to control HCT116 cells, a significant  
160 accumulation in G2/M phase of HCT116 cells that have been treated with XR alone

161 or with GdBN+XR was detected after 24 hours, but not after 48 hours of incubation  
162 (Figures 1f-1h). These results are consistent with the significant increase of p21  
163 expression that we detected after the association of XR with GdBN (Figures 1d and  
164 1e). Considering that the transcription factor p53 may cause through the control of  
165 p21 expression, a prolonged G2 arrest during the induction of cellular senescence<sup>15</sup>,  
166<sup>16</sup>, HCT116 cells that are wild-type ( $p53^{+/+}$ ), mutated or/and transcriptionally  
167 inactivated for p53 ( $p53^{R248W/+}$  or  $p53^{R248W/-}$ ) have been irradiated with 6 Gy alone or  
168 in combination with 1.2 mM GdBN and analyzed after 48 hours for p21 expression  
169 and SA- $\beta$ -Gal activity. As predicted, we observed that p21 expression (Figure 1f) and  
170 SA- $\beta$ -Gal activity (Figure 1g) were significantly reduced after XR and GdBN+XR  
171 treatments, indicating that the transcriptional activity of p53 is required for both XR-  
172 or XR+GdBN-induced cellular senescence. Altogether, these results demonstrate that  
173 the irradiation of cancer cells in presence of gadolinium-containing nanoparticles  
174 favors the elimination of irradiated cancer cells through the induction of cellular  
175 senescence.

176

177 ***The gadolinium-based nanoparticles favors the cellular cannibalism of irradiated***  
178 ***cancer cells***

179 To further identify lethal processes that are induced by the combined treatment of  
180 cancer cells with GdBN and XR, we determined the ability of this treatment to induce  
181 cell-autonomous and non-cell autonomous deaths. In this context, as previously  
182 described<sup>13, 14</sup>, we first performed co-cultures between untreated HCT116 cells that  
183 have been labeled with 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)  
184 tetramethylrhodamine (CMTMR, red) fluorescent vital probe and isogenic HCT116  
185 cells that have been labeled with 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA,



186 green) fluorescent vital probe, and irradiated with different doses in presence (or in  
187 absence) of indicated concentrations of GdBN. After 24 hours of co-culture, cell fates  
188 of CMFDA<sup>+</sup> cells and CMTMR<sup>+</sup> cells were analyzed for cell engulfment. Confocal  
189 analysis showed that during co-cultures of irradiated (XR) or GdBN+XR-treated  
190 CMTMR<sup>+</sup> HCT116 cells with untreated CMFDA<sup>+</sup> HCT116 cells (Figure 2b), cell  
191 engulfment was detected. This process occurred in dose dependent manner (Figure 2c)  
192 and is also observed when cancer cells were irradiated with  $\gamma$ -irradiation (Figure 2d).  
193 To further characterize the biological mechanisms involved in the cellular  
194 engulfment, we examined the ability of these treatments to induce either cellular  
195 invasion or cellular cannibalism mechanisms. Using fluorescence microscopy, we  
196 observed that irradiated (XR) and GdBN+XR-treated CMTMR<sup>+</sup> HCT116 cells  
197 internalized neighboring (CMFDA<sup>+</sup> or CMTMR<sup>+</sup>) HCT116 cells independently of the  
198 treatment that they received (Figure 2e). We noticed a significant increase of the  
199 cannibalistic activity of GdBN+XR-treated cells as compared to irradiated cells,  
200 revealing the combined treatment of cancer cells with GdBN and XR increases the  
201 ability of irradiated cells to exhibit cannibalistic activity. In parallel to these  
202 experiments, we also evaluated the ability of irradiated cells to simultaneously  
203 undergo other CAD modalities (such as apoptosis and necrosis). By analyzing the  
204 permeabilization of mitochondrial membranes and plasma membranes of treated cells  
205 (through the simultaneous detection of 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide and  
206 propidium iodide (DiOC<sub>6</sub>(3)/IP) stainings by flow cytometry), we observed that the  
207 cellular cannibalism that we detected in response to XR or GdBN+XR treatment was  
208 induced in absence of significant induction of apoptosis or necrosis (Figure 2f-2j).  
209 Altogether, these results underline the fact that the cellular cannibalism of irradiated

210 cells can be enhanced after the treatment of cancer cells with gadolinium-containing  
211 nanoparticles.

212

213 ***The activation of ROCK1 kinase is required for the live cell engulfment detected***  
214 ***after GdBN+XR treatment***

215 To precise the molecular mechanisms involved in the cellular cannibalism that we  
216 described above, we then studied the signaling pathways that are associated with the  
217 live cell engulfment of neighboring cancer cells. We first revealed that the cellular  
218 engulfment that was observed after XR or GdBN+XR treatment, occurred in absence  
219 of cell death induction (as revealed by the absence of pro-apoptotic cleavage of  
220 caspase-3 after XR or GdBN+XR treatment (Figure 3a)) and was not inhibited by  
221 pan-caspase inhibitor, Z-VAD-fmk (Figure 3c), indicating that this process is  
222 independent of the apoptotic uptake of dying cells and allows the internalization of  
223 live cancer cells. In addition, we showed that the treatment of HCT116 cells with  
224 GdBN, XR, or the combined treatment with GdBN and XR activated the kinase  
225 ROCK1 (as revealed by the phosphorylation of myosin light chain 2 on serine 19  
226 (MLC2S19\*)) (Figure 3b). We observed the significant increased phosphorylation  
227 MLC2S19\* after the irradiation of cancer cells in presence or in absence of GdBN  
228 (Figure 3c), indicating that the activation of ROCK1 may be required for the  
229 engulfment of neighboring cancer cells detected after GdBN+XR treatment. To  
230 determine the contribution of the ROCK-1 dependent signaling pathway during XR-  
231 or GdBN+XR-mediated cellular engulfment, we then added the pharmacological  
232 inhibitor of ROCK1 (Y27632) to the co-cultures of HCT116 cells that have been  
233 irradiated with 6 Gy in presence (or in absence) of 1.2 mM GdBN and determined the  
234 frequency of cellular cannibalism after 24 hours of co-culture. We observed that the

235 pharmacological inhibition of ROCK1 by Y27632 (as revealed in Figure 3b) inhibited  
236 the cellular cannibalism detected after 6 Gy irradiation alone and after the irradiation  
237 of HCT116 cells in presence of 1.2 mM GdBN (Figure 3c), revealing that the  
238 biological activity of ROCK1 is required for the cellular cannibalism that is detected  
239 after XR or GdBN+XR treatment. We then better defined the contribution of the  
240 kinase ROCK1 on GdBN+XR-elicited cellular cannibalism by depleting ROCK1 with  
241 two specific small interfering RNA (siRNA) on either engulfed (target) cells or on  
242 engulfing (cannibal) cells. We observed that the depletion of ROCK1 on both  
243 interacting cells reduced the frequency of cellular cannibalism detected after XR or  
244 GdBN+XR treatment (Figures 3d and 3e), indicating that the kinase ROCK1 plays a  
245 central role in both engulfed target cells and engulfing cannibal cells during the  
246 induction of GdBN+XR-mediated cellular cannibalism.

247

248 *The degradation of engulfed cells positively correlates with the senescence of*  
249 *cannibal cells*

250 To determine the fate of both engulfed cells and cannibal cells detected after XR or  
251 GdBN+XR treatment, we detected through fluorescence microscopy, the presence of  
252 chromatin condensation and nuclear fragmentation in the nuclei of engulfed HCT116  
253 cells observed after 24 hour co-culture of HCT116 cells that were irradiated with 6  
254 Gy in presence (or in absence) of 1.2 mM GdBN was determined. We observed that  
255 all engulfed cells detected after the irradiation alone or after the irradiation of cancer  
256 cells in presence of GdBN, exhibited signs of target cell degradation (Figures 4a and  
257 4d). Interestingly, we demonstrated that the pan-caspase inhibitor inhibitor, Z-VAD-  
258 fmk failed to repress target cell degradation (Figure 4d), indicating that the activation  
259 of caspases is not required for the execution of the cellular cannibalism elicited by the

260 X-rays radiation or its combination with GdBN. In addition, we also revealed that  
261 XR- or GdBN+XR-elicited cannibal cells exhibited an increase of p21 expression  
262 (Figures 4b and 4e) and SA- $\beta$ -Gal<sup>+</sup> activity (Figures 4c and 4f), indicating that after  
263 XR- or GdBN+XR treatment, cannibal cells may undergo entescence or alternatively,  
264 that single senescent cells may internalize neighboring cells. To determine whether  
265 the induction of entescence or the activation of cannibalistic activity of senescent cells  
266 is associated with the cannibalistic activity detected after XR or GdBN+XR  
267 treatment, we determined the frequency of single cells and cannibal cells that showed  
268 SA- $\beta$ -Gal<sup>+</sup> activity after XR or GdBN+XR treatment. We observed that the vast  
269 majority of SA- $\beta$ -Gal<sup>+</sup> cells are single cells (Figure 4g), suggesting that cellular  
270 cannibalism seems to occur after the induction of cell-autonomous senescence of  
271 cancer cells that have been treated with XR or GdBN+XR.

272

273 ***GdBN+XR mediated senescence and cellular cannibalism are controlled by a***  
274 ***NADPH oxidase 5 (NOX5)-dependent ROS production***

275 Considering that the reactive oxygen species (ROS) production is one of the major  
276 cellular stresses involved in the induction of senescence after ionizing radiation<sup>17</sup>, we  
277 analyzed the ROS production after XR and GdBN+XR treatments. By detecting with  
278 fluorescence microscopy the conversion of the non-fluorescent dye 2,7-dichlorohydro  
279 fluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) into fluorescent 2,7-dichlorohydro fluorescein  
280 (DCF), we determined the ability of single cells and cannibal cells obtained after XR  
281 or GdBN+XR treatment to generate ROS. We observed that these treatments induced  
282 the production of ROS in both single and cannibal cells (Figures 5a and 5b).  
283 Moreover, we revealed that the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) and the  
284 superoxide dismutase (SOD) mimetic Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) (MnTBAP),

285 which are known to blunt the ROS production <sup>18</sup>, reduced the cellular senescence (as  
286 revealed by the detection of p21 expression (Figure 5c)) that is detected after the  
287 treatment of HCT116 cells with XR alone or with the GdBN+XR combination. These  
288 results demonstrated that the ROS production plays a key role for the induction of the  
289 senescence and the cellular cannibalism associated with XR and GdBN+XR  
290 treatments.

291

292 To determine whether the NADPH oxidases (NOX), which are the major intracellular  
293 sources of ROS production, may regulate these processes <sup>19, 20</sup>, we determined  
294 whether the NADPH oxidase 5 (NOX5) – a NADPH oxidase that has been involved  
295 in the death of irradiated human human primay fibroblasts <sup>21</sup> – may participate to the  
296 production of ROS. Thus, we evaluatied the effects of NOX5 depletion on the ROS  
297 production, the p21 expression, the SA- $\beta$ -Galactosidase activity and the cellular  
298 cannibalism that are detected after the treatment of HCT116 cells with XR or  
299 GdBN+XR (Figures 5a-5h). We demonstrated that the depletion of NOX5 with  
300 specific small interfering RNA blunted the ROS production (Figures 5d and 5e),  
301 reduced the p21 expression (Figure 5f) and the SA- $\beta$ -Gal<sup>+</sup> activity (Figure 5g) and  
302 impaired the cellular cannibalism (Figure 5h) detected after XR and GdBN+XR  
303 treatments. Altogether, these results indicate that the NOX5-dependent ROS  
304 production is required for the induction of senescence and cellular cannibalism  
305 detected after the treatment of cancer cells with XR or GdBN+XR treatments.

306

## 307 **Discussion**

308 The emergence of nanotechnologies in the treatment of health diseases aims to  
309 modify the currently used anti-cancer therapies <sup>22</sup>. In cancer radiotherapy, the  
310 enhancement of radiosensitization by metallic nanoparticles (such as gold-, silver or  
311 gadolinium-based nanoparticles) has been studied for several decades <sup>8,23</sup>. Despite the  
312 fact that numerous *in vitro* and *in vivo* preclinical studies demonstrated the ability of  
313 nanoparticles containing high-Z atoms to act as radiosensitizers in cancer treatment,  
314 the cellular processes and the molecular mechanisms underlying the ability of these  
315 nanoparticles to improve radiotherapy have been poorly studied.

316

317 In this paper, we show that the *in vitro* treatment of cancer cells with gadolinium-  
318 based nanoparticles (GdBN) induced the senescence of irradiated cells. Cellular  
319 senescence is a critical barrier for cancer development that impairs the proliferation of  
320 aged or cancer cells through non-cell autonomous and cell-autonomous mechanisms  
321 <sup>24</sup>. This tumor suppressive mechanism can be elicited by several stress signals (such  
322 as oncogenic, replicative or oxidative stresses) <sup>24</sup> and may require the p53  
323 transcriptional activity <sup>25,26,27</sup>, the induction of cyclin-dependent kinase inhibitors p21  
324 or p16<sup>INK4a</sup> <sup>28</sup>, the activation of the transcriptional regulator Rb <sup>29</sup> or of the tumor  
325 suppressor protein ARF <sup>30</sup>. Despite the fact that radio- and chemotherapies have been  
326 extensively studied for their ability to induce cellular senescence <sup>31</sup>, the therapeutic  
327 induction of cellular senescence is still controversial and the related mechanisms  
328 remain partially characterized. Here, we found that the irradiation of cancer cells in  
329 presence of GdBN induced the up-regulated expression of p21 and increased the  
330 endogenous SA- $\beta$ -Galactosidase activity. We also revealed that the cancer cells that  
331 are defective for the transcriptional activation of p53 did not undergo senescence

332 under these circumstances, indicating that the cellular senescence detected after the  
333 treatment of cancer cells with XR or XR+GdBN requires the transcriptional activity  
334 of p53. Interestingly, we observed that the gadolinium-containing nanoparticles  
335 significantly enhanced the ability of irradiated cells to undergo cellular senescence,  
336 revealing that the nanoparticles that contain gadolinium sensitized cancer cells to  
337 ionizing radiation by inducing the cellular senescence.

338

339 In this study, we also demonstrate that concomitantly to the induction of senescence,  
340 the treatment of cancer cells with GdBN+XR combination stimulated the cannibalistic  
341 activity of irradiated cancer cells. Accordingly to our previous studies <sup>13, 14</sup>, we  
342 observed that the irradiation of cancer cells in presence of GdBN sensitized cancer  
343 cells to the induction of non-cell-autonomous death modality. This atypical lethal  
344 process started with the engulfment of a live cancer cells by irradiated cancer cells  
345 and led to degradation of engulfed cancer cells. In addition, we demonstrated that the  
346 activation of ROCK1 in both engulfed target cancer cells and irradiated cancer cells is  
347 required to induce XR- or XR+GdBN-mediated cellular cannibalism. We also  
348 revealed that the live cell engulfment and the killing of internalized cancer cells can  
349 still occur when caspases are inactivated, indicated that this atypical cell death  
350 modality may be triggered in cancer cells that are resistant to apoptosis and escape to  
351 cancer treatments. These results confirm our previously published works <sup>13, 14</sup>,  
352 revealing that XR- and XR+GdBN-elicited senescence and cellular cannibalism are  
353 two-interlinked and tightly regulated processes, but also highlight the ability of  
354 gadolinium-containing nanoparticles to act as radiosensitizers by inducing the  
355 senescence and the cellular cannibalism of irradiated cancer cells.

356

357 Considering that ROS production is the major cellular response to ionizing radiation  
358 <sup>32</sup>, we also determined the contribution of ROS-elicited signaling pathway to the  
359 induction of GdBN+XR-elicited senescence and cellular cannibalism and revealed  
360 that the irradiation of cancer cells in presence of gadolinium-containing nanoparticles  
361 significantly increased the ability of cancer cells to produce ROS after exposure to  
362 ionizing radiation. Moreover, we also demonstrated that the NADPH oxidase NOX5,  
363 which is calcium-dependent proton channel of the NOX family <sup>33</sup>, is required for the  
364 induction of senescence and cellular cannibalism after XR or GdBN+XR treatment.  
365 Considering the central role of NOX5 in the induction of both senescence and cellular  
366 cannibalism after GdBN+IXR treatment, further characterization of the molecular  
367 mechanism involved in the regulation of NOX5-dependent biological activity is  
368 needed to better understand the biological processes elicited in response to the  
369 irradiation of cancer cells in presence of gadolinium-containing nanoparticles.

370

371 All the above described processes - senescence, cellular cannibalism and ROS  
372 production - may act directly on irradiated cancer cells (through cell-autonomous  
373 mechanisms), but also indirectly, on neighboring (stromal or cancer) cells by eliciting  
374 non-cell autonomous processes (such as senescence-associated secretory phenotypes  
375 (SASP) <sup>34</sup>. Hence, the biological consequences on the immune system of the  
376 irradiation of cancer cells in presence of GdBN remain to be determined and the  
377 ability of the GdBN+XR treatment to enhance anti-tumor immune response elicited  
378 by ionizing radiation needs to be evaluated. Altogether, our results pointed out two  
379 new cellular mechanisms - the senescence and the cellular cannibalism that are  
380 induced by the irradiation of cancer cells in presence of gadolinium-based  
381 nanoparticles and contribute to the improvement of the therapeutic index of the



382 radiotherapy. Further investigations are needed to better evaluate the contribution of  
383 these both cellular processes to the tumor response detected after the irradiation of  
384 cancer cells in presence of gadolinium-based nanoparticles.

385

## 386 **Materials and Methods**

### 387 **Cells, reagents and Gadolinium-based nanoparticles**

388 Colorectal carcinoma ( $p53^{+/+}$ ,  $p53^{R248W/+}$  and  $p53^{R248/-}$ ) HCT116 cells were maintained  
389 in McCoy's 5A medium (Life Technology) supplemented with 10% heat-inactivated  
390 fetal bovine serum (Hyclutec GmbH), 2mM L-glutamine and 100 IU/mL penicillin-  
391 streptomycin (Life technology). Human colon carcinoma mutant HCT116  $p53^{R248W/-}$ ,  
392  $p53^{R248W/+}$  and HCT116  $p53^{+/+}$  were obtained from Dr. Christophe Bourdon. The  
393 benzyloxycarboxyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD-fmk) was  
394 obtained from Bachem. The ROCK1 inhibitor (Y27632) and the N-acetyl-cysteine  
395 (NAC) were from Sigma and the Manganese (III)-tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin  
396 (MnTBAP) from Merck chemicals. Gadolinium-based Nanoparticle (GdBN) were  
397 obtained from Nano-H S.A.S.

398

### 399 **RNA –mediated interference**

400 The small interfering RNAs (siRNAs) specific for ROCK1 (siRNA-1 ROCK1: 5'  
401 GCC GCC GGG ACC CAA CUA U 3'; siRNA-2 ROCK1: 5' GGA AUC CAG UUG  
402 AAU ACA A 3') and control siRNA (siRNA-1 Co.:5' GCC GGU AUG CCG GUU  
403 AAG U 3') were obtained from Sigma. The SMARTpool siGENOME NOX5 siRNA  
404 (siRNA NOX5) (D-010195-05) contains 4 siRNA (siRNA-1 : 5' GGA GCA AGG  
405 UGU UCC AGA A 3'; siRNA-2: 5' CUA UAG ACC UGG UGA CUA C 3' ;  
406 siRNA-3 : 5' GCU UAU GGG CUA CGU GGU A 3' and siRNA-4: 5' CCU UCU  
407 UUG CAG AGC GAU U 3'). The control siGENOME Non-Targeting siRNA  
408 (indicated as siRNA-2 Co.) is a pool of four on-target plus non-targeting siRNAs (D-  
409 001206-13-05). SMARTpool siGENOME NOX5 siRNA and siGENOME Non-  
410 Targeting siRNA Pool #1 were purchased from Dharmacon. For RNA interference,

411 HCT116 cells were seeded ( $5.0 \times 10^5$  cells/2 mL/well in 6-well plate) 48 hours before  
412 siRNAs transfection. Then, cells were transfected with 10 nM siRNAs using  
413 Lipofectamine RNAi max (#13778150, Life technologies) according to the  
414 manufacturer's instructions and incubated at 37°C for 24h before subsequent  
415 experiments.

416

#### 417 **Irradiation**

418 HCT116 cells were seeded in 6-well plates and incubated at 37°C during 1 hour with  
419 indicated concentrations of GdBN. Then, cells were irradiated with X-ray irradiator (1  
420 Gy/min, 200 keV, 15 mA, 2 mm copper thickness, X-RAD 320, Precision X-Ray) or  
421 with gamma-ray irradiator (IBL-637, Cs<sup>137</sup>, 1Gy/min, gamma CIS-BioInternational,  
422 IBA, Saclay, France). Cells were harvested at indicated time points after irradiation  
423 for subsequent experiments.

424

#### 425 **Immunofluorescence and flow cytometry**

426 Cellular cannibalism was determined as previously described<sup>13</sup>. Briefly, treated cells  
427 were stained with 10 μM of 5-(and-6)-(((4-  
428 Chloromethyl)Benzoyl)Amino)Tetramethylrhodamine (Cell Tracker Orange  
429 CMTMR, Invitrogen) and untreated cells were stained with 10 μM of 5-  
430 chloromethylfluorescein diacetate (Cell tracker Green CMFDA, Invitrogen). Cells  
431 are then co-cultured for the indicated time, in presence of the pharmacological  
432 inhibitor of ROCK, Y27632 (30μM, TOCRIS) or the pan-caspase inhibitor, zVAD-  
433 fmk (100 μM, Calbiochem). For specific subcellular staining of the cyclin-dependent  
434 kinase inhibitor p21 on single and cannibal cells, cells were fixed in 4%  
435 paraformaldehyde/ phosphate-buffered saline (PBS) for 10 minutes, permeabilized in

436 0,3% Triton X-100 (Sigma) in PBS and incubated with 5% FCS-PBS for 1 hour.  
437 Rabbit antibody against human p21 (form Cell Signaling Technology, #2947) was  
438 used for immunodetection in PBS containing 1 mg/ml BSA and revealed with goat  
439 anti-rabbit IgG conjugated to Alexa 488 fluorochrome from Invitrogen. Cells were  
440 counterstained with Hoechst 33342 (Invitrogen) and analyzed by fluorescent confocal  
441 microscopy on a Zeiss LSM510 or by fluorescent microscopy on a LEICA DMI8  
442 using a 63× objective. To detect the induction of cell death by flow cytometry, cells  
443 were stained with 3,3'-dihexyloxacarbocyanine, DIOC<sub>6</sub>(3) at 40 nM and propidium  
444 iodide at 2 µg/mL (Invitrogen, Molecular probes, OR, USA) for 30 min at 37°C and  
445 5% CO<sub>2</sub>. Cytofluorometric determinations were carried out on Guava EasyCyte  
446 (Millipore EMD) and data were analyzed by means with Incyte software (Millipore).  
447 Cell cycle distributions were assessed with 10µg/ml of Hoechst 33342 (Invitrogen), as  
448 previously described <sup>14</sup>. Cell fluorescence was quantified using LSR II™ flow  
449 cytometer (Becton-Dickinson). Fluorescence histograms were analyzed with Kaluza  
450 software version 1.5.

451

#### 452 **Detection of senescence associated β-galactosidase**

453 At the indicated time, cells were fixed and stained using the senescence β-  
454 galactosidase staining kit (Cell signaling technologies) as previously described <sup>13</sup>.

455

#### 456 **Immunoblotting**

457 Total cell lysates were prepared in lysis buffer (0,1% NP40 ; 200 mM HEPES ; 100  
458 mM KCl ; 1 mM EDTA ; 1% Glycerol final concentration) supplemented with  
459 proteases and phosphatases inhibitors cocktail (EDTA-free inhibitors, Roche-  
460 diagnostics, Meylan, France). Protein extracts were quantified using the Bradford

461 assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Protein extracts (20-40  $\mu\text{g}$ ) were  
462 run onto 4-12% NuPAGE Bis-tris gel (Invitrogen) and transferred onto nitrocellulose  
463 membrane at 4°C. After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with  
464 primary antibodies according to the manufacturer's instructions: p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (Cell  
465 signaling #2947); NOX-5 (Abcam #191010); cleaved caspase-3 (Cell signaling  
466 #9664); MLC2S19\* (Cell signaling #3671) or MLC2 (Cell signaling #8505).  
467 Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit (Southern  
468 Biotechnology) antibodies were then incubated during 1 hour and revealed with the  
469 enhanced chemiluminescence prime detection (Amersham, GE-Healthcare) using  
470 direct chemiluminescence image scanning (G :BOX Syngene). GAPDH (#MAB374,  
471 EMD Millipore) was used as loading control.

472

#### 473 **Detection of ROS production.**

474 Cells were seeded on cover glass dishes (World Precision Instruments). Intracellular  
475 ROS levels were evaluated using the fluorescent probe (2,7-dichloro-hydro-fluorescein  
476 diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Cells  
477 were counterstained with Hoechst 33342 (Invitrogen) and analyzed by fluorescent  
478 microscopy (Leica DMI8 using a 63x objective).

479

#### 480 **Statistical analysis**

481 No statistical method was used to predetermine the sample size. Statistical  
482 significances were determined using the one-way ANOVA test. Statistically  
483 significant values are reported in figure legends. All experiments were independently  
484 performed at least three times. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. GraphPad Prism  
485 version 6.0b (GraphPad Software) was employed to perform statistical analysis.

486

487 **Acknowledgements**

488 This work was supported by funds from Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-  
489 IBHU-0001, ANR-10-LABX33 and ANR-11-IDEX-003-01), Electricité de France,  
490 Fondation Gustave Roussy, Institut National du Cancer (INCA 9414), Cancéropôle  
491 Ile de France, NATIXIS, SIDACTION and the French National Agency for Research  
492 on AIDS and viral Hepatitis (ANRSH) (to J-L.P.). F.L. is recipient of PhD fellowship  
493 from CIFRE and ANRT. L.V. and A.A. are recipient of a post-doctoral fellowship  
494 from INCA and ANRSH. D.D. is recipient of PhD fellowship from Fondation  
495 Philantropia Lombard Odier. H. D. and M. T. are supported by the Laboratory of  
496 Excellence LERMIT with a grant from ANR (ANR-10-LABX-33) under the program  
497 "Investissements d'Avenir" ANR-11-IDEX-0003-01. We gratefully acknowledge Y.  
498 Lecluse and S. Salome-Desnoulez for technical support.

499

500 **Author Contributions**

501 F.L., L.V., A.A., H.D., D.D. and M.T. performed experiments. J-L.P. designed the

502 study. F.L. and J-L.P analyzed the results, assembled the figures and wrote the paper.

503 F.L. performed statistical analysis. F.L., D.M.O., N.M., E.D. and O.T. provided

504 advices and edited the paper.

505

506

507 **Competing Financial Interests**

508 The authors declare no competing financial interests.

509



510 **References**

511 1. Schae D, McBride WH. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating  
512 cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2015, **12**(9): 527-540.

513

514 2. Beasley M, Driver D, Dobbs HJ. Complications of radiotherapy: improving the  
515 therapeutic index. *Cancer Imaging* 2005, **5**: 78-84.

516

517 3. Hainfeld JF, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN, Adams DJ, Smilowitz HM.  
518 Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold  
519 nanoparticles within tumour regions. *Br J Radiol* 2011, **84**(1002): 526-533.

520

521 4. Dorsey JF, Sun L, Joh DY, Witztum A, Kao GD, Alonso-Basanta M, *et al.* Gold  
522 nanoparticles in radiation research: potential applications for imaging and  
523 radiosensitization. *Transl Cancer Res* 2013, **2**(4): 280-291.

524

525 5. Taupin F, Flaender M, Delorme R, Brochard T, Mayol JF, Arnaud J, *et al.*  
526 Gadolinium nanoparticles and contrast agent as radiation sensitizers. *Phys Med Biol*  
527 2015, **60**(11): 4449-4464.

528

529 6. McQuaid HN, Muir MF, Taggart LE, McMahon SJ, Coulter JA, Hyland WB, *et al.*  
530 Imaging and radiation effects of gold nanoparticles in tumour cells. *Sci Rep* 2016, **6**:  
531 19442.

532

- 533 7. Zhu J, Zhao L, Cheng Y, Xiong Z, Tang Y, Shen M, *et al.* Radionuclide (131)I-  
534 labeled multifunctional dendrimers for targeted SPECT imaging and radiotherapy of  
535 tumors. *Nanoscale* 2015, **7**(43): 18169-18178.
- 536
- 537 8. Mi Y, Shao Z, Vang J, Kaidar-Person O, Wang AZ. Application of nanotechnology  
538 to cancer radiotherapy. *Cancer Nanotechnol* 2016, **7**(1): 11.
- 539
- 540 9. Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Brauer-Krisch E, Bouchet A, *et al.* Toward  
541 an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles.  
542 *ACS Nano* 2011, **5**(12): 9566-9574.
- 543
- 544 10. Dufort S, Bianchi A, Henry M, Lux F, Le Duc G, Josserand V, *et al.*  
545 Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor  
546 imaging and radiosensitization. *Small* 2015, **11**(2): 215-221.
- 547
- 548 11. Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance  
549 radiotherapy in mice. *Phys Med Biol* 2004, **49**(18): N309-315.
- 550
- 551 12. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol*  
552 2010, **31**(4): 363-372.
- 553
- 554 13. Raza SQ, Martins I, Voisin L, Dakhli H, Paoletti A, Law F, *et al.* Entescence, a  
555 senescence program initiated by cellular cannibalism
- 556

- 557 14. Martins I, Raza SQ, Voisin L, Dakhli H, Allouch A, Law F, *et al.* Anticancer  
558 chemotherapy and radiotherapy trigger both non-cell-autonomous and cell-  
559 autonomous deaths  
560
- 561 15. Gire V, Dulic V. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle* 2015, **14**(3):  
562 297-304.  
563
- 564 16. Baus F, Gire V, Fisher D, Piette J, Dulic V. Permanent cell cycle exit in G2 phase  
565 after DNA damage in normal human fibroblasts. *EMBO J* 2003, **22**(15): 3992-4002.  
566
- 567 17. Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res* 2008, **314**(9): 1918-  
568 1922.  
569
- 570 18. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-  
571 acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**(1): 6-20.  
572
- 573 19. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*  
574 2004, **4**(3): 181-189.  
575
- 576 20. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative  
577 stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug*  
578 *Discov* 2011, **10**(6): 453-471.  
579
- 580 21. Weyemi U, Redon CE, Aziz T, Choudhuri R, Maeda D, Parekh PR, *et al.*  
581 Inactivation of NADPH oxidases NOX4 and NOX5 protects human primary

582 fibroblasts from ionizing radiation-induced DNA damage. *Radiat Res* 2015, **183**(3):  
583 262-270.

584

585 22. Gmeiner WH, Ghosh S. Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnol Rev*  
586 2015, **3**(2): 111-122.

587

588 23. Kobayashi K, Usami N, Porcel E, Lacombe S, Le Sech C. Enhancement of  
589 radiation effect by heavy elements. *Mutat Res* 2010, **704**(1-3): 123-131.

590

591 24. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*  
592 2007, **130**(2): 223-233.

593

594 25. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, *et al.*  
595 Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver  
596 carcinomas. *Nature* 2007, **445**(7128): 656-660.

597

598 26. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, *et al.*  
599 Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 2007,  
600 **445**(7128): 661-665.

601

602 27. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, *et al.* Crucial role of  
603 p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis.  
604 *Nature* 2005, **436**(7051): 725-730.

605

606 28. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. Differential roles for cyclin-  
607 dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and  
608 differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999, **19**(3): 2109-2117.  
609

610 29. Futreal PA, Barrett JC. Failure of senescent cells to phosphorylate the RB protein.  
611 *Oncogene* 1991, **6**(7): 1109-1113.  
612

613 30. Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA. Genes involved in senescence  
614 and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* 2000, **12**(6): 705-709.  
615

616 31. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in  
617 cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010, **102**(20): 1536-1546.  
618

619 32. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen  
620 and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003, **22**(37):  
621 5734-5754.  
622

623 33. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases:  
624 physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007, **87**(1): 245-313.  
625

626 34. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated  
627 secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010, **5**:  
628 99-118.  
629

630

## 631 **Legends to Figures**

632 **Figure 1** Gadolinium based nanoparticles sensitize cancer cells to ionizing radiation-  
633 elicited senescence. (a,b) Micrographs and frequencies of SA- $\beta$ -Gal activity observed  
634 after the irradiation of HCT116 cells with 6 Gray X-rays (XR) in presence (or in  
635 absence) of 1.2 mM gadolinium-based nanoparticles (GdBN+XR) are shown after 48  
636 hours of treatment (scale bar = 10  $\mu$ m) (n=3). (c,d) Confocal micrographs and  
637 frequencies of p21 are also shown (scale bar = 10  $\mu$ m) (n=3). (e) Immunoblot  
638 detection of p21 expression after 24-hour treatment is shown. GAPDH is used as  
639 loading control. Immunoblots are representative of 3 independent experiments. (f-h)  
640 Cell cycle distribution of HCT116 cells that have been irradiated with 6 grays of  
641 X-rays (XR) in presence (or in absence) of 1.2 mM GdBN has been analyzed after 24  
642 or 48 hours of culture. Quantitative data of cell cycle analysis are shown (means  $\pm$   
643 SEM, n = 3). (i) Immunoblot detection of p21 expression on  $p53^{+/+}$ ,  $p53^{R248W/+}$  and  
644  $p53^{R248W/-}$  HCT116 cells that have been irradiated with 6 Gray X-rays (XR) in  
645 presence (or in absence) of 1.2mM gadolinium-based nanoparticles and analyzed after  
646 24 hours. GAPDH is used as loading control. Immunoblots are representative of 3  
647 independent experiments. (j) Frequencies of SA- $\beta$ -Gal activity detected after the  
648 irradiation of  $p53^{+/+}$ ,  $p53^{R248W/+}$  and  $p53^{R248W/-}$  HCT116 cells with 6 Gray X-rays (XR)  
649 in presence (or in absence) of 1.2 mM gadolinium-based nanoparticles (GdBN+XR).  
650 The measurement of SA- $\beta$ -Gal activity was performed 48 hours after the irradiation  
651 (means  $\pm$  SEM, n = 3). Statistical significances are shown. \* represents  $p<0.05$ , \*\*  
652  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$  and \*\*\*\*  $p<0.0001$ .

653

654 **Figure 2** Detection of GdBN+XR–elicited non-cell autonomous death modalities by  
655 confocal fluorescence microscopy. (a) Experimental procedure used to detect cellular  
656 cannibalism after the treatment of human colon carcinoma HCT116 cells with XR or  
657 GdBN+XR. (b,c) Micrographs and frequencies of cannibal cells detected by confocal  
658 fluorescent microscopy after 24 hour co-culture of untreated (green) CMFDA-labeled  
659 HCT116 cells with (red) CMTMR-labeled HCT116 cells that have been irradiated  
660 with different doses of X-rays in presence (or in absence) of indicated concentrations  
661 of gadolinium-based nanoparticles (GdBN) are shown. Representative confocal  
662 images of cannibal cells are shown in (b) (scale bar = 10  $\mu$ m). Frequencies of cannibal  
663 cells are in (c) (mean  $\pm$  SEM, n = 3). (d) Frequencies of cannibal cells detected by  
664 confocal fluorescent microscopy after 24 hour co-culture of untreated (green)  
665 CMFDA-labeled HCT116 cells with (red) CMTMR-labeled HCT116 cells that have  
666 been irradiated with 6 Grays of X-rays (XR) or 6 Grays of  $\gamma$ -rays ( $\gamma$ R) in presence (or  
667 in absence) of 1.2 mM GdBN are shown. (e) Frequencies of cannibal cells showing  
668 R(G), R(R), G(R) or G(G) have been determined and shown (means  $\pm$  SEM, n = 3).  
669 (f-j) Human colon carcinoma HCT116 cells were left untreated (control) (f), treated  
670 with 1.2mM GdBN (g), irradiated with 6 Grays of X-rays (XR) (h) of irradiated with  
671 irradiated with 6 Grays of X-rays in presence of 1.2mM GdBN (GdBN+XR) and co-  
672 stained after 24 hours with DiOC<sub>6</sub>(3) and propidium iodide (PI) for the assessment of  
673 apoptosis and necrosis-associated parameters. Representative dot plots are shown in  
674 (f-i) and quantitative data are shown in (j). (mean  $\pm$  SEM, n = 3). Statistical  
675 significances are shown. \* represents p<0.05, \*\*\* p<0.001 and \*\*\*\* p<0.0001.  
676

677 **Figure 3** The activation of ROCK1 is required for XR- and GdBN+XR-mediated  
678 cellular cannibalism. (a) Representative immunoblot of the proteolytic cleavage of

679 caspase-3 (CASP3a) detected after the irradiation of human colon carcinoma HCT116  
680 cells with 6 Grays of X-rays (XR) in presence (or in absence) of 1.2mM GdBN is  
681 shown. Immunoblots were performed 24 hours after the treatment. GAPDH was used  
682 as a loading control (n=3). (b) Representative immunoblots of MLC2 or MLC2S19\*  
683 of human colon carcinoma HCT116 cells that have been irradiated with 6 Grays of X-  
684 rays (XR), in presence (or in absence) of 1.2mM GdBN and cultivated 24 hours after  
685 the treatment, with 30  $\mu$ M of Y27632 during 24 hours are shown. GAPDH was used  
686 as a loading control (n=3). (c) The percentage of cannibal cells was determined by  
687 confocal microscopy after 24h-homotypic culture of control, XR- or GdBN+XR-  
688 treated HCT116 cells in the absence or presence of 30  $\mu$ M of Y27632 or 100  $\mu$ M of  
689 Z-VAD-fmk (n=3). (d) Percentages of cannibal cells detected after 24-hour  
690 heterotypic culture of ROCK1 depleted, control, XR- or GdBN+XR-treated HCT116  
691 cells (and control cells) with target HCT116 cells (mean  $\pm$  SEM, n = 3). (e)  
692 Percentages of cannibal cells detected after 24-hour heterotypic culture of control,  
693 XR- or GdBN+XR-treated HCT116 cells with target HCT116 cells that have been  
694 depleted or not for ROCK1 (mean  $\pm$  SEM, n = 3). (f) Representative immunoblot of  
695 48-hour ROCK1 depletion in control, XR- and GdBN+XR-treated HCT116 cells is  
696 shown. GAPDH was used as a loading control (n=3). Statistical significances are  
697 shown. \* represents  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  and \*\*\*\* or  $\delta\delta\delta\delta$   $p < 0.0001$ .

698

699 **Figure 4** Detection of the engulfed cell degradation and the senescence in cannibal  
700 cells observed after the combined GdBN+XR treatment. (a-c) Representative  
701 micrographs and frequencies of target cell degradation (a,d), p21 expression (b,e) and  
702 SA- $\beta$ -Gal<sup>+</sup> activity (a, c,f and g) detected in single cells and on cannibal cells after 48  
703 hour-homotypic culture of control, XR- or GdBN+XR-treated HCT116 cells in the



704 the presence (or in the absence ) of 100  $\mu$ M of Z-VAD-fmk are shown. Before co-  
705 culture, treated cells were labeled with (red) CMTMR probe. Arrows indicate target  
706 cell degradation (a), p21 expression and SA-b-Gal activity in cannibal cells (c) (scale  
707 bar = 10  $\mu$ m). Frequencies in (d-g) are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 3). Statistical  
708 significances are indicated. \* represents  $p < 0.05$ , \*\* or  $\delta\delta$   $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  and  
709 \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . In Figure 4g,  $\delta\delta$  shows statistical significance between XR-treated  
710 cannibal cells and GdBN+XR-treated cannibal cells.

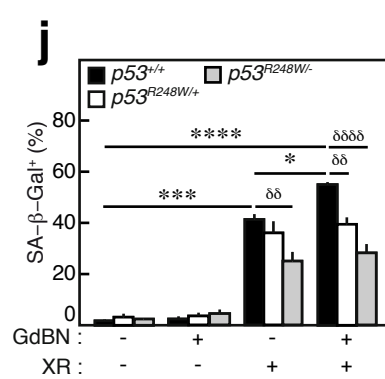
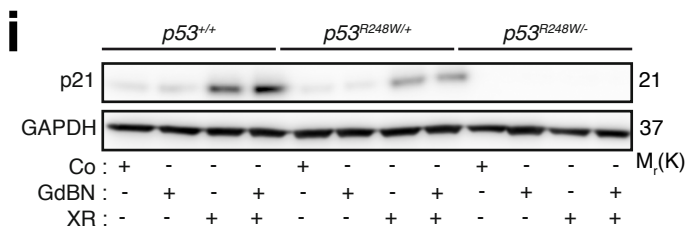
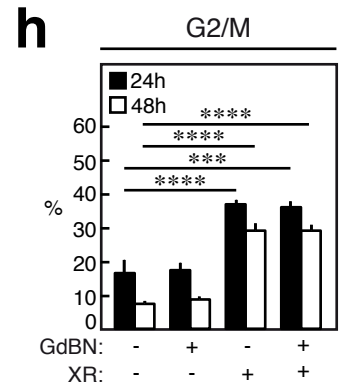
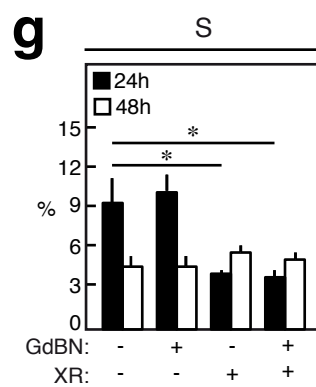
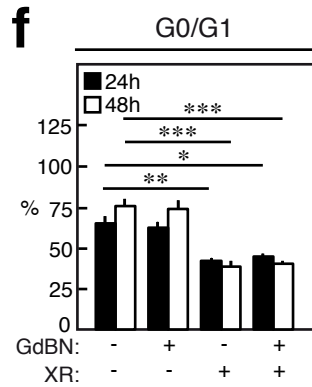
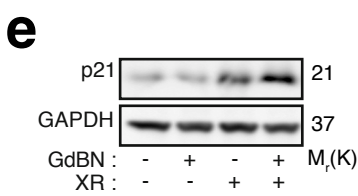
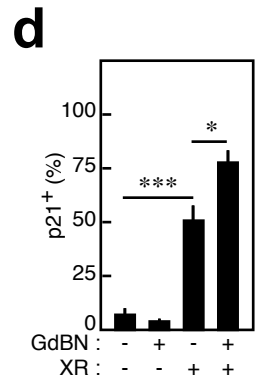
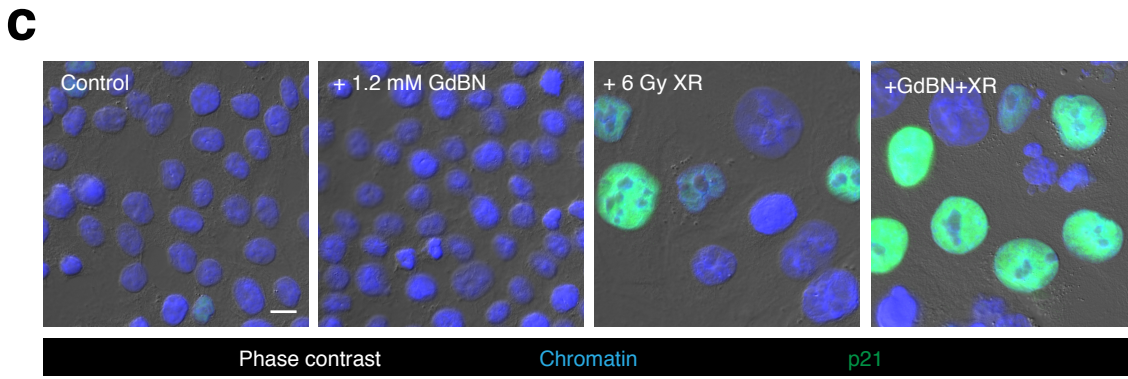
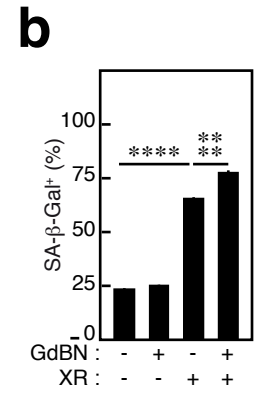
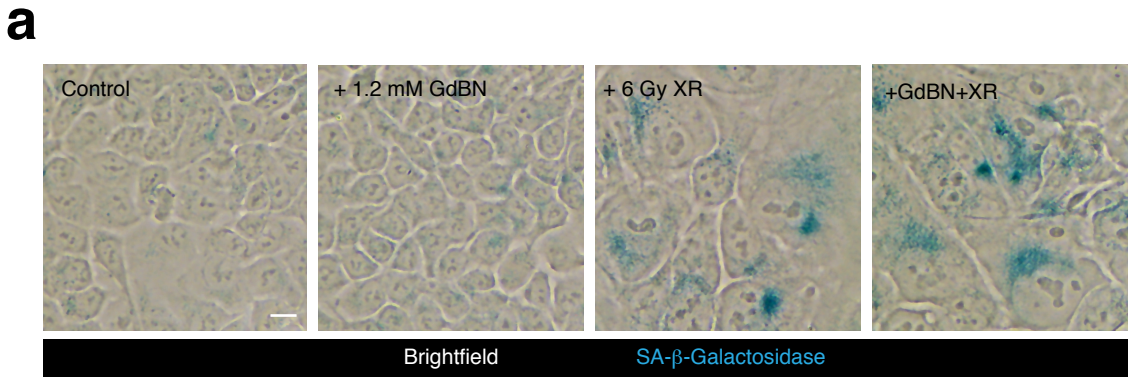
711  
712 **Figure 5** GdBN+XR-elicited senescence and the cellular cannibalism require a  
713 NADPH oxidase 5 (NOX5)-dependent ROS production. (a) Representative  
714 micrographs and frequencies of single cells and cannibal cells showing ROS  
715 production after the 24 hour co-culture of untreated HCT116 cells with HCT116 cells  
716 that have been irradiated with 6 Gy of X-rays in presence (or in absence) of 1.2 mM  
717 GdBN are shown. The ROS production is revealed as in (a) by the detection of the  
718 conversion of non-fluorescent H2DCFDA probe into green fluorescent DCF<sup>+</sup> probe  
719 using fluorescent microscopy (scale bar = 10  $\mu$ m). Frequencies of single cells and  
720 cannibal cells that exhibited a DCF<sup>+</sup> staining are in (b) (mean  $\pm$  SEM, n = 3). (c)  
721 Effects of 10  $\mu$ M of MnTBAP and 100  $\mu$ M of NAC on p21 expression detected after  
722 the treatment of HCT116 cells with 1.2 mM GdBN, 6 Gy XR or GdBN+XR were  
723 determined using immunoblots. Representative immunoblots of 3 independent  
724 experiments are shown. GAPDH is used as loading control. (d) Validation of NOX5  
725 knockdown after 48-hour transfection of a pool of specific siRNAs. Representative  
726 immunoblots of 3 independent experiments are shown. GAPDH is used as loading  
727 control. (e-h) Effects of NOX5 depletion on the ROS production (e), the p21  
728 expression (f), the SA- $\beta$ -Gal activity (g) and cellular cannibalism detected after 24 or

729 48 hour co-culture of untreated HCT116 cells with HCT116 cells that have been  
730 irradiated (or not) with 6 Gy of X-rays in presence (or in absence) of 1.2 mM GdBN  
731 were determined by fluorescent microscopy or brightfield microscopy. The  
732 frequencies of single cells and/or cannibal cells showing a ROS production (DCF+), a  
733 p21 expression, a SA-b-Gal+ activity and cannibalistic activity are shown (mean  $\pm$   
734 SEM, n = 3). (i) Effects of NOX5 depletion on the cellular cannibalism detected after  
735 24 hour co-culture of untreated HCT116 cells with  $p53^{+/+}$ ,  $p53^{R248W/+}$  or  $p53^{R248W/-}$   
736 HCT116 cells that have been irradiated (or not) with 6 Gy of X-rays in presence (or in  
737 absence) of 1.2 mM GdBN were determined by fluorescent microscopy. The  
738 frequencies of single cells and/or cannibal cells are shown (mean  $\pm$  SEM, n = 3).  
739 Statistical significances are indicated. \* represents  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$   
740 and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

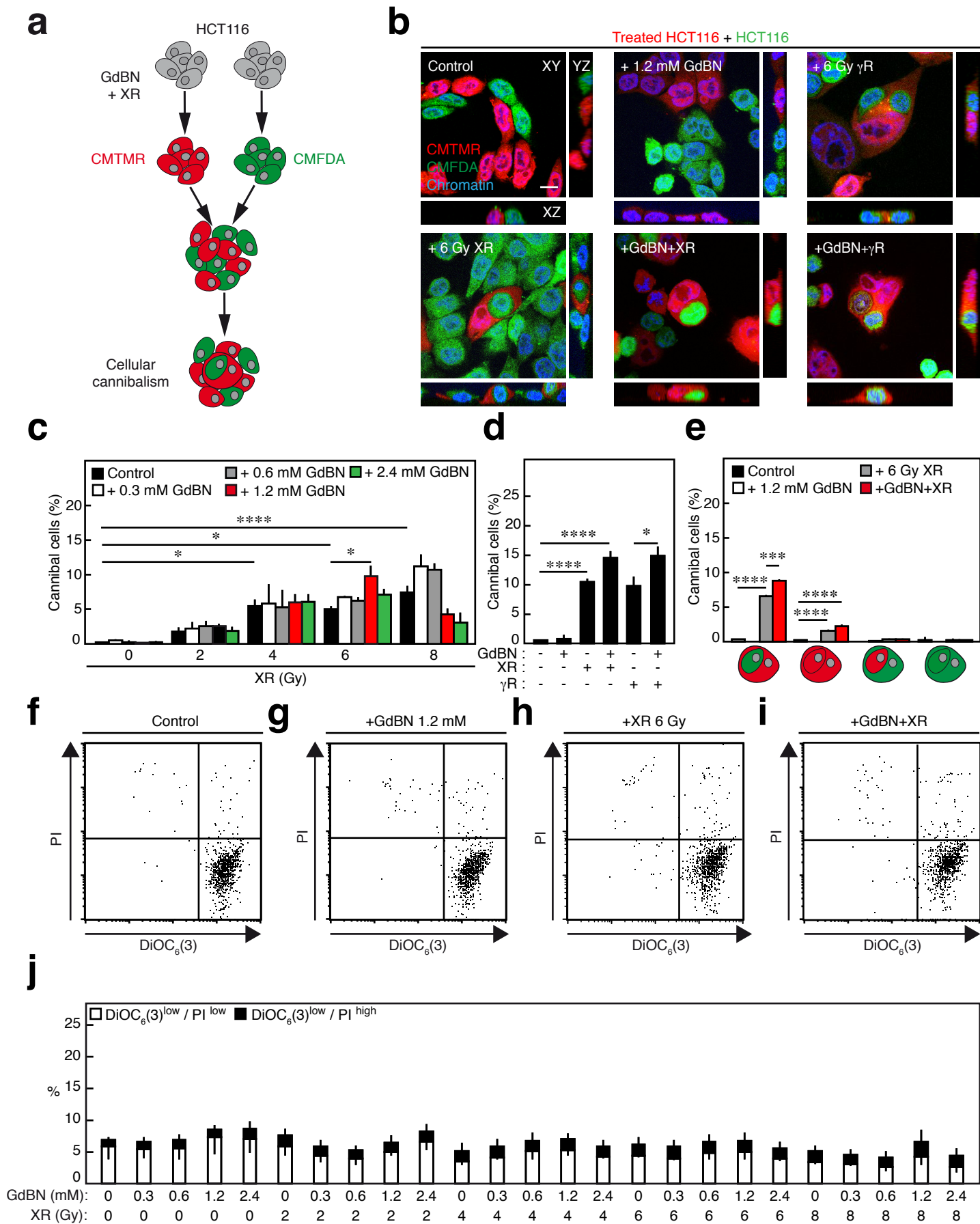
741

742

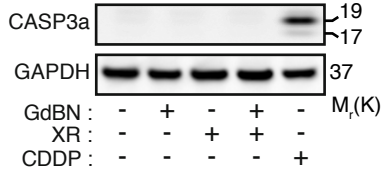
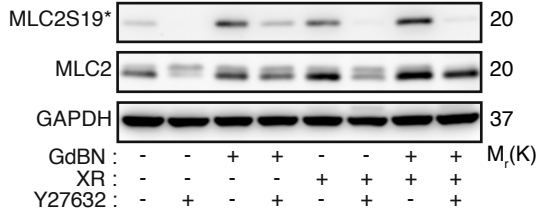
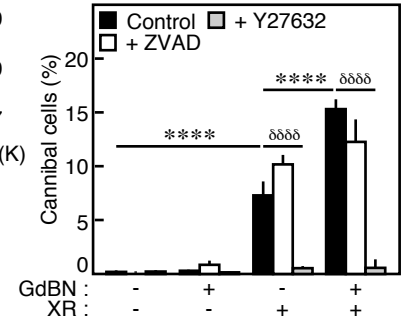
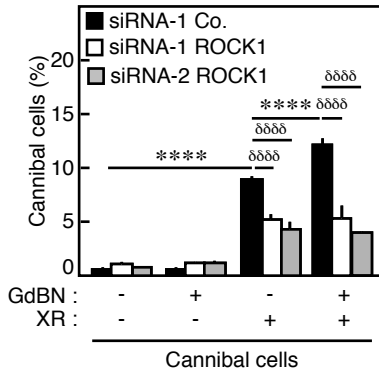
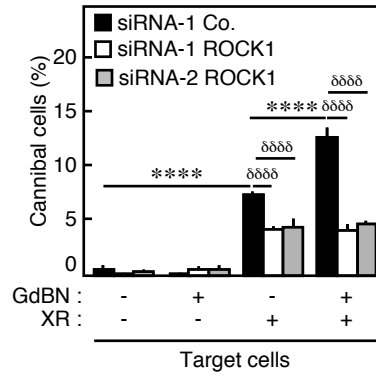
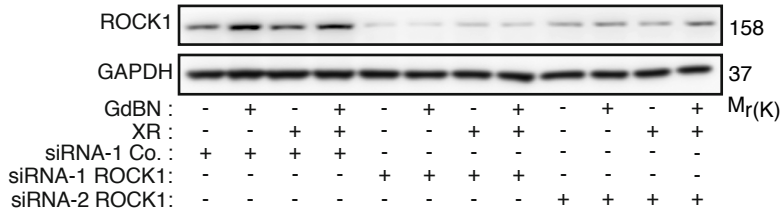
743

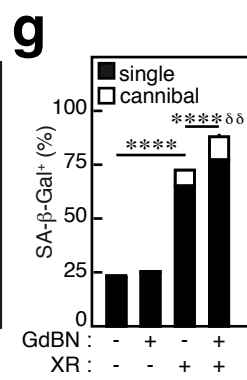
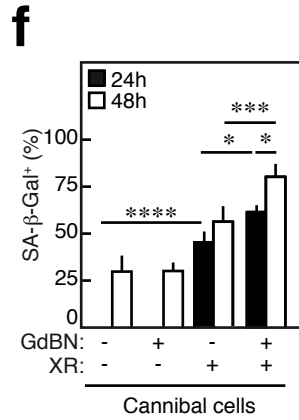
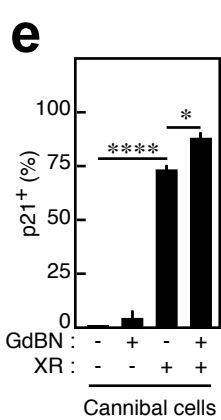
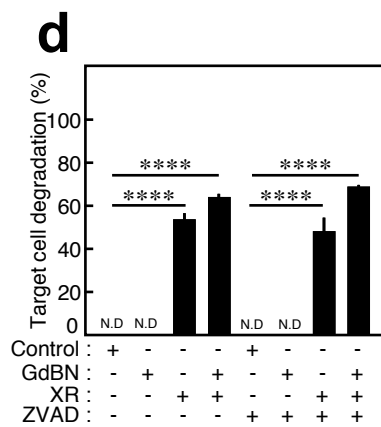
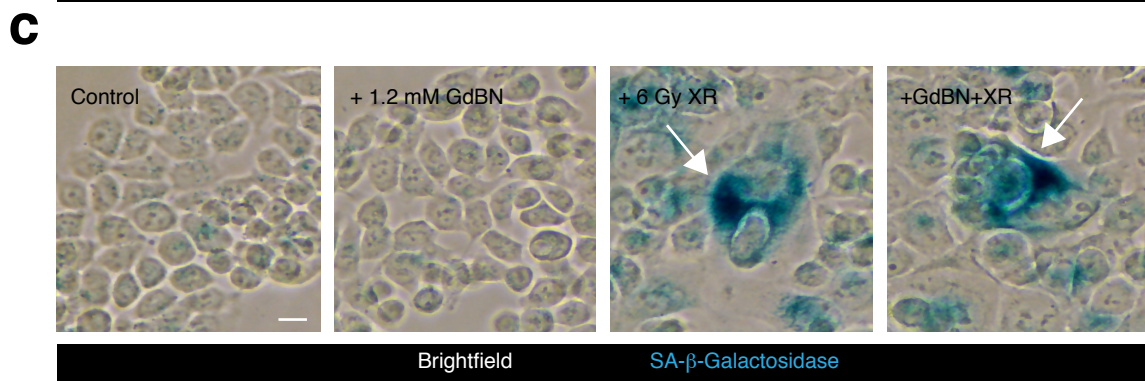
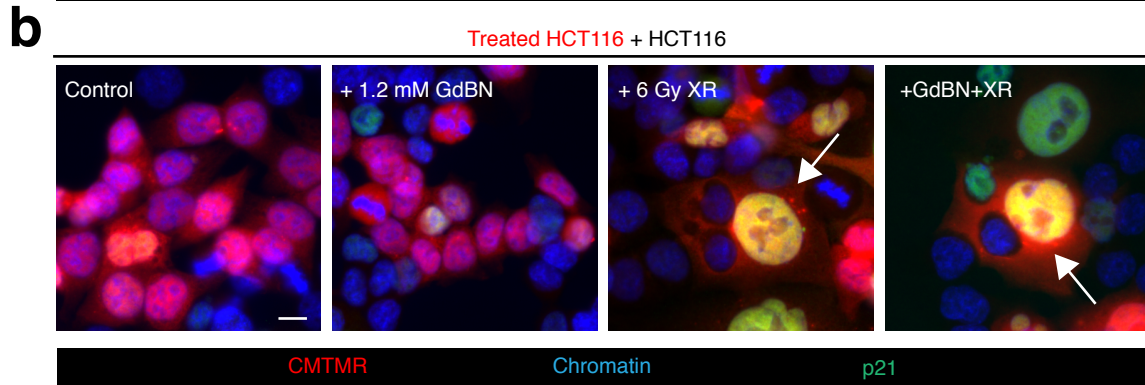
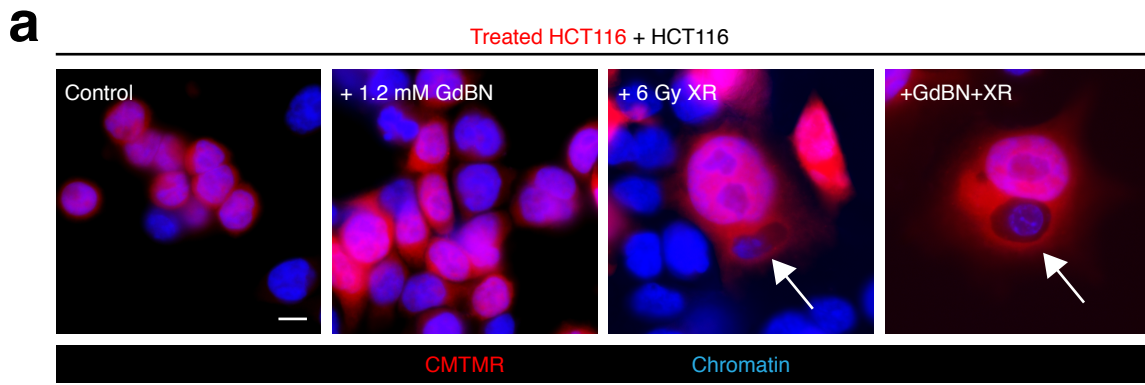


**LAW#1**

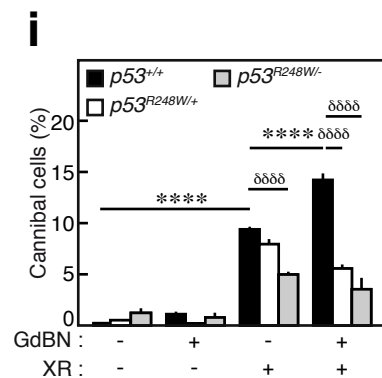
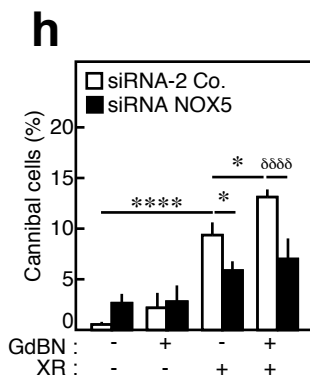
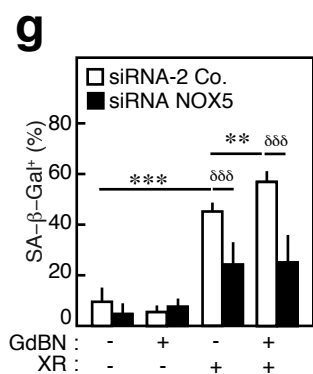
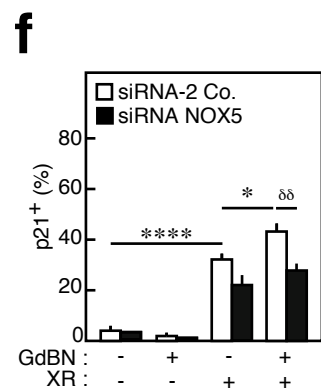
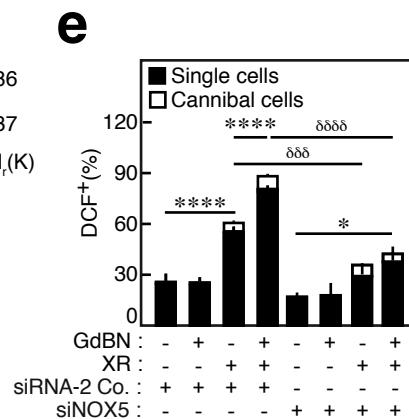
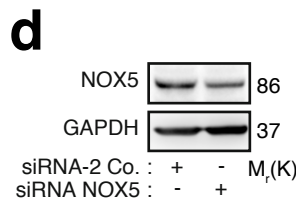
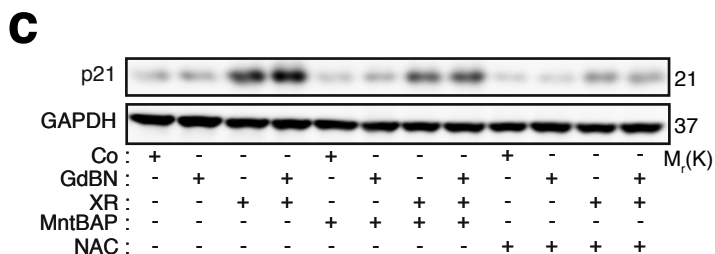
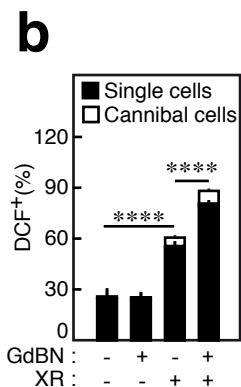
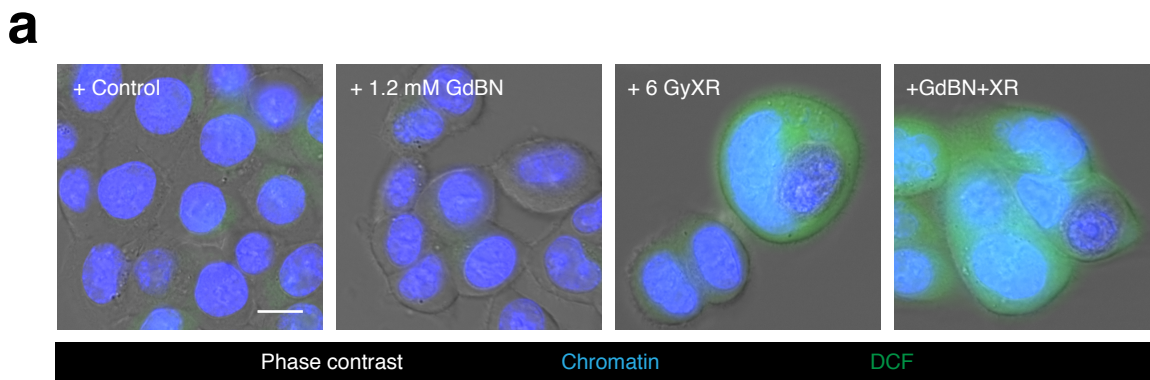


**LAW#2**

**a****b****c****d****e****f****LAW#3**



**LAW#4**



**LAW#5**

## Discussions Scientifiques

### 1. La combinaison GdBN et IR déclenche une sénescence cellulaire.

Les études pré-cliniques réalisées sur les nanoparticules de gadolinium (GdBN) combinée à l'irradiation (IR) ont prouvé leur efficacité sur la régression tumorale dans plusieurs modèles murins. Il a été proposé que cette régression tumorale pouvait être expliquée par le déclenchement d'un processus de catastrophe mitotique (Miladi et al., 2015). Cependant comme nous l'avons révélé lors de récents travaux, la radiothérapie comme d'autres stratégies thérapeutiques anti-cancéreux telles que la cisplatine peuvent déclencher de façon simultanée différents processus létaux. Lors de nos travaux de recherche sur les HCT116 (carcinome colorectal), nous n'avons pas observé de mort cellulaire associée à une perte du potentiel mitochondriale observée par une diminution de l'intensité de fluorescence de la sonde fluorescente DIOC<sub>6</sub>(3). De plus, il y a une absence de perméabilisation de la membrane plasmique étudiée grâce à l'incorporation de l'iodure de propidium au sein de la cellule, ce qui signifie que ces cellules ne sont pas nécrosées (Figure LAW#1-j). Ces résultats ont également été confirmés par l'absence de clivage du facteur pro-apoptotique de la caspase-3 (Figure LAW#3-a). En revanche, nous avons observé en microscopie photonique la présence de cellules qui présente un cytoplasme étalé et un volume nucléaire augmenté. De plus, nous avons également révélé une augmentation de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase endogène (Figure LAW#1-a) et de l'expression de la protéine P21 suggérant que la combinaison GdBN+IR pouvait déclencher la sénescence des cellules irradiées. Dans le chapitre 2 sur la mort cellulaire, nous avons vu que la sénescence cellulaire pouvait être déclenchée selon plusieurs mécanismes. Dans le cas présent, nous avons cherché à comprendre les mécanismes de déclenchement de la sénescence cellulaire. En radiothérapie, les rayons ionisants sont capables de produire des dérivés oxygénés (ou ROS) qui agissent à la fois sur l'ADN et causant des cassures doubles brins (DSB) ou bien d'oxyder des protéines afin de les rendre non fonctionnelles. Dans cette optique, nous avons cherché à déterminer l'effet de la combinaison des GdBN+IR sur la production des ROS. Nous avons observé qu'à la suite du traitement, il y avait une augmentation du nombre de cellule produisant des ROS, et ce, par l'intermédiation de l'oxydation de la sonde cytosolique H2DCFDA (2', 7'-dichloro-dihydro-fluorescéine di-acétate) en un composé fluorescent, le DCF (2,7-dichloro-fluorescéine) (Figure LAW#5-b). Cette production de ROS peut être la cause de l'activation des NADPH oxydase (NOX), une augmentation de l'activité métabolique, une augmentation de l'activité mitochondriale ; ou bien de façon exogène par des effets photoélectriques issus de l'irradiation. Nous avons émis l'hypothèse que cette



production de ROS en excès est générée par les NOX. Nous avons donc réalisé une inhibition génétique de NOX5 par l'intermédiaire de SiRNA spécifique. Nous avons observé que l'inhibition de NOX5 est corrélée avec une diminution du niveau de ROS (Figure LAW#5e). En revanche, l'inhibition de NOX5 dans les traitements seuls (GdBN ou IR) ne modifie pas le niveau de ROS. Ces résultats démontrent que le traitement GdBN+IR semble nécessiter l'activité de NOX5 pour produire des ROS. Afin d'évaluer le rôle du stress oxydatif dans le déclenchement de la sénescence cellulaire, nous avons inhibé la production de ROS (en ciblant spécifiquement NOX5 ou bien inhiber les ROS par des antioxydants tels que le N-acétyl-cystéine (NAC) et de l'acide 4-benzoïque-manganèse-tetrakis-porphyrine (MntBAP) et avons étudié l'effet de ces stratégies sur la sénescence cellulaire (en déclenchant la SA- $\beta$ -galactosidase et l'expression de la protéine P21) (Figure LAW#1-c). Nos travaux ont ainsi révélé que la protéine NOX5 est impliquée dans la production de ROS et le déclenchement de la sénescence observé à la suite de la combinaison GdBN+IR. Il serait également intéressant de caractériser la contribution des autres membres de la famille des NOX tels que les NOX -1 ; -2 ; -3 ; -4 dans la production des ROS et dans le déclenchement de la sénescence cellulaire. Contrairement aux autres membres de la famille des NOX, NOX5 est une enzyme particulière qui ne dispose pas de sous-unité régulatrice. Elle requiert tout de même la présence d'ion de calcium pour fonctionner.

La sénescence cellulaire est un phénomène à double tranchant puisqu'elle peut être à la fois anti-tumorale ou bien pro-tumorale (Figure 34). Afin de positionner notre modèle cellulaire, il serait ainsi intéressant de caractériser le phénotype sécrétoire associé à la sénescence cellulaire ou SASP (*Secretory Associated-Senescence phenotype*). En effet, les cellules sénescents peuvent libérer des facteurs inflammatoires tels que l'interleukine-6, l'interleukine-8 et des chimiokines. Ces dernières sont responsables de l'activité anti-tumorale (Coppé et al., 2008) car elles permettent le recrutement des cellules immunitaires tels que les macrophages ou les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au sein du compartiment tumoral. Ces cellules vont ainsi éliminer les cellules tumorales alors que les cellules saines pourront restructurer le tissu. A l'opposé, les MMP (*Matrix Metalloproteinase*) sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et pourrait ainsi favoriser la dissémination des cellules tumorales. Ces facteurs pro- et anti-tumorales ont une activité paracrine et autocrine et pourraient agir sur la population cellulaire avoisinante. On s'attendra ainsi à observer un potentiel phénotype sécrétoire de ces types de facteurs. La détermination de la nature de ces dernières, nous permettra ainsi de mieux comprendre l'influence de ces facteurs sur l'évolution de la tumeur. Conformément aux résultats encourageants obtenus dans des modèles murins, nous nous attendons ainsi à obtenir une augmentation de facteurs anti-tumoraux tels que Il-6 ou Il-8.

## 2. La combinaison GdBN+IR déclenche le cannibalisme cellulaire

De manière assez surprenante, une co-culture homotypique entre des cellules sénescents et des cellules cancéreuses non traitées déclenche un phénomène de cellule dans une cellule. Afin de différencier le phénomène d'invasion cellulaire (entose) décrit par Overholtzer et le phénomène de cannibalisme cellulaire, la population traitée à différentes doses de GdBN et IR puis marquée par une sonde cytosolique fluorescente en rouge (CMTMR) et la population non traitée est marquée par une sonde cytosolique fluorescente en vert (CMFDA) puis remise en suspension afin de faciliter les interactions cellule à cellule. Dans ce cas présent, nous avons observé que ce sont celles qui sont traitées qui internalisent (ou de façon plus familière, cannibalisent) les cellules non marquées, dites « cibles ». Le traitement GdBN+IR déclenche donc un processus de cannibalisme cellulaire (Figure LAW#2-b), apparenter à un modèle dit de « Pac - man » et non un processus d'entose.

Dans un premier temps nous avons donc cherché à valider que ce processus cellulaire pouvait être contrôlé par des chaînes légères des myosines (MLC2) qui sont responsables du réarrangement du cytosquelette. Lors de la co-culture, nous avons additionné dans le milieu de culture un antagoniste de ROCK1 et de ROCK2, le Y27632. Nous avons observé que le blocage de ROCK1 et de ROCK2 empêche la déformation de la membrane plasmique et donc l'internalisation de la cellule cible par la cellule cannibale (Figure LAW#3-b). Par ailleurs, l'inhibition génétique de ROCK1 par deux isoformes de SiRNA dans les cellules cannibales ou dans les cellules cibles empêchent le processus de cannibalisme cellulaire (Figure LAW#3d-e). Ces résultats montrent donc que le réarrangement du cytosquelette par la phosphorylation de MLC2 par ROCK1 des deux partenaires est indispensable dans ce processus. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que la cellule cannibale ne peut pas internaliser la cellule cible à cause des contraintes mécaniques et structurelles. Dans un second temps, conformément à la description des travaux de Overholtzer, ce processus ne correspond pas à de la phagocytose. En effet, la phagocytose se déclenche après avoir reconnu des résidus de phosphatidyl-sérine au niveau de la surface des cellules mourantes. Pour vérifier que notre modèle cellulaire ne correspond pas à de la phagocytose mais à du cannibalisme cellulaire, nous avons additionné dans la co-culture un inhibiteur de large spectre des caspases, le Z-VAD fmk. Cet antagoniste va empêcher l'activation de l'apoptose, il n'y aura donc pas d'exposition des résidus de phosphatidyl-sérine. Nos expériences montrent une fréquence de cannibalisme cellulaire inchangée en présence Z-VAD fmk. Ces résultats nous permettent de confirmer que ce processus ne correspond pas à de la phagocytose mais à une internalisation de

cellule tumorale vivante par une autre cellule tumorale vivante (Figure LAW#3-c). Dans notre laboratoire, nous avons montré que ces cellules cannibales n'étaient pas capables de proliférer comparées aux cellules cibles. Des marquages immunofluorescence de P21 dans ces deux populations montrent une augmentation significative dans les cellules cannibales. Ce phénotype n'est pas retrouvé dans les cellules cibles. Ainsi, il est probable que le processus d'internalisation de la cellule cible provoque un arrêt de prolifération et pourrait être responsable de la part de l'effet anti-tumorale.

Par ailleurs, nous avons été étonné d'observer qu'à partir de la dose de 1,2 mM de GdBN et à partir de 8 Gy, une fréquence de cannibalisme cellulaire qui tend à la diminution. Cette diminution n'est pas assimilée à une mort cellulaire qui a été validé par un test de mortalité utilisant le Dioc6(3) et l'iodure de propidium. Cette inhibition du cannibalisme cellulaire est, à ce jour, non expliquées. Nous pouvons toutefois émettre l'hypothèse qu'une accumulation de GdBN dans la cellule provoque un blocage des activités biologiques. Ainsi, les signaux conduisant au déclenchement du cannibalisme cellulaire pourraient être brouillés.

### **3. Les cellules sénescents sont cannibales**

La combinaison des nanoparticules de gadolinium avec l'irradiation induit à la fois une augmentation de la fréquence de cellule cannibale mais également à une augmentation de la fréquence de cellule sénescence. Nous avons observé que ces deux processus cellulaires présentent un niveau de P21 qui est augmenté. Nous avons donc émis l'hypothèse d'une possible relation entre ces deux phénomènes pour lequel les cellules sénescents devenaient cannibales ou bien que les cellules cannibales devenaient sénescents. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons bloqué le déclenchement du programme de sénescence cellulaire en employant des inhibiteurs à large spectre des ROS (MntBAP et NAC). Ces inhibiteurs vont permettre d'empêcher les stress oxydatifs endogène (NOX) et exogène (Irradiation) puis nous avons quantifié la fréquence de cellule cannibale. Les résultats nous ont permis de démontrer que l'inhibition de la sénescence cellulaire induite par un stress oxydatif diminue la fréquence de cellule cannibale. De façon surprenante cette transformation cellulaire confère à la cellule la capacité de manger les cellules avoisinantes. L'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, P21 étant contrôlé par le facteur de transcription P53, nous avons décidé d'approfondir ce mécanisme en employant un modèle cellulaire original. L'équipe du Pr. Jean-Christophe Bourdon à l'Université de Dundee nous a gracieusement offert une série de lignée cellulaire HCT116 présentant une combinaison d'allèle mutée dominant négatif de la protéine TP53 au niveau

du résidu 248 appelé « TP53<sup>R248W/+</sup> » et d'une allèle génétiquement invalide appelée « TP53<sup>R248W/-</sup> ». La lignée sauvage exprimant pleinement TP53 est notée « TP53<sup>+/+</sup> ». Suite à un stimulus, cette série de lignée cellulaire a la particularité d'exprimer P21 en fonction de l'activité de TP53. Comme une des allèles de TP53 est mutée, la transcription de P21 sera moindre. Dans notre cas présent, il s'agit d'un modèle de choix car l'irradiation induit des lésions de l'ADN qui active TP53 qui va à son tour transcrire P21, et aboutir à un arrêt de prolifération cellulaire caractéristique de la sénescence cellulaire. Grâce à ce modèle cellulaire, nous pourrions ainsi étudier l'impact de la combinaison des nanoparticules de gadolinium sur la sénescence cellulaire ainsi que sur le cannibalisme cellulaire. Les expériences ont révélé que le traitement GdBN+IR est insensible dans l'augmentation de l'expression de P21 de la lignée HCT116 TP53<sup>R248W/+</sup> (1 allèle mutée, 1 allèle saine) par rapport à HCT116 P53<sup>+/+</sup> (2 allèles saines) et HCT116 P53<sup>R248W/+</sup> (1 allèle mutée/ 1 allèle saine) par rapport à HCT116 TP53<sup>R248W/-</sup> (1 allèle mutée et 1 allèle invalide) (Figure LAW#1-i). Cette diminution est également accompagnée d'une diminution de la β-galactosidase associée à la sénescence cellulaire (Figure LAW#1-j). Dans ces mêmes conditions, nous observé que l'absence de sénescence cellulaire était accompagné d'une diminution de cannibalisme cellulaire (Figure LAW#5-i). Ces résultats démontrent que le traitement GdBN+IR accentue les signaux de sénescence cellulaire et expliquerait l'augmentation de la fréquence de cellule cannibale dans la culture. Pour valider ce modèle, il serait ainsi intéressant d'inhiber le cannibalisme cellulaire par le Y27632, de traiter avec la combinaison GdBN+IR, de réaliser une co-culture puis d'observer la fréquence de cellule sénescence. A la suite de ces expériences, nous attendons à observer une fréquence inchangée de cellules sénescence car le cannibalisme cellulaire semble être activé lorsque la cellule est dans l'état de sénescence cellulaire. La caractérisation d'un tel modèle cellulaire permettrait de montrer que ce mécanisme d'élimination des cellules tumorales pourrait contribuer à la régression tumorale. Pour valider l'importance de ce mécanisme cellulaire, il serait ainsi intéressant de réaliser des coupes de tumeurs dans des souris immunodéficientes pour lequel une tumeur a été xénogreffée puis traitée avec les GdBN avec l'irradiation. Un marquage de la protéine P21 sur des frottis tissulaire nous permettrait d'apprécier la proportion de cellule cannibale ainsi que la proportion de cellule sénescence.

#### **4. Les cellules sénescence cannibales dégradent la cellule cible**

Afin de caractériser le devenir des cellules cibles internalisées, nous avons marqué l'ADN par le Hoechst 334232. Nous avons observé que les cellules internalisées présentaient une fragmentation nucléaire ainsi qu'une diminution du marquage nucléaire qui

est caractéristique d'une cellule mourante(Figure LAW#4-b). Cette mort cellulaire s'apparente à une mort cellulaire indépendante de l'apoptose (absence de clivage de la procaspase-3). Pour affirmer un tel processus, nous avons inhibé les caspases par le Z-VAD fmk mais nous n'avons pas observé de différence significative de mort cellulaire ainsi qu'une absence d'activation de la caspase-3 dans la cellule internalisée. Ces résultats démontrent que la cellule ne meurt pas selon un processus d'apoptose mais probablement par un processus de dégradation lysosomale. Cette hypothèse devrait suivre le même sens que les travaux de Wang et ses collaborateurs. En effet, ils ont démontré dans des cellules cancéreuses des glandes mammaires les MCF-7 que la cellule cannibale dégrade la cellule cible par un processus lysosomale (Wang et al., 2016). Dans notre modèle cellulaire, il est nécessaire de réaliser un marquage de LAMP2 (*Lysosomal associated membrane protein-2*) ou une inhibition des enzymes protéolytiques qui permettrait de confirmer l'existence d'un tel mécanisme de dégradation. Ce qui est également intéressant de réaliser, c'est un marquage dit de TUNEL. Cette technique permet de marquer les extrémités terminales de l'ADN qui est spécifique de la fragmentation nucléaire. On s'attendrait ainsi à observer la présence d'un marquage positive qui confirme une dégradation cellulaire. Afin de comprendre les mécanismes déclenchant la dégradation des cellules internalisée, les travaux réalisés par Florey ont permis de mettre en évidence une activation de la machinerie autophagique qui se caractérise par une lipitation de LC3-I en LC3-II ainsi qu'une activation d'ATG5/ATG7 (Florey et al., 2011). En effet, ils ont observé la formation d'un autophagosome qui serait responsable de l'élimination de la cellule internalisée. Nous n'avons pas été en mesure de détecter la présence de tel marqueur par des marquages d'immunofluorescence de LC3-II. Il serait ainsi préférable de développer un modèle cellulaire pour lequel LC3 est couplée avec un fluorophore vert, la GFP. Grâce à ce modèle nous pourrions ainsi suivre en temps réel l'activation de la machinerie autophagique. En tout cas, la caractérisation des modalités de dégradation de la cellule est intéressante car si le traitement GdBN+IR favorise l'émergence de cellule sénescence ainsi que la fréquence de cellule cannibale, ces cellules cannibales pourront d'une quelque conque façon éliminer les cellules avoisinantes. Ces doubles effets pourraient être l'une des autres activités responsables de la régression tumorale. Il est également important de préciser que les tumeurs parasitent une partie de la zone saine, ces cellules sénescences cannibales pourraient potentiellement internalisées les autres cellules et avoir un effet néfaste. Ainsi nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que les cellules cannibales déclenchées par le traitement GdBN+IR pourraient internaliser d'autres cellules non cancéreuses et avoir des conséquences négatives pour l'organisme. Toutefois, il est également important de préciser que le phénomène de cannibalisme cellulaire est retrouvé dans le développement embryonnaire. Au côté de l'apoptose, de la nécrose ou de la mort autophagique, le cannibalisme semble s'apparenter à un processus physiologique

permettant au bon fonctionnement des processus biologiques. Il serait ainsi intéressant de comprendre les conséquences physiologiques ou physiopathologiques qu'elle engendrait.

## 5. Un mécanisme s'apparentant à la phagocytose ?

Dans la littérature, en réponse à un pathogène (PAMPs pour *Pathogens Associated Molecular Patterns*) ou un signal de danger (DAMPs pour *Damage Associated Molecular Patterns*), une réaction inflammatoire est alors activée par la production de ROS réalisée par les NOX. Ces ROS sont indispensables dans la dégradation des pathogènes. Le facteur de transcription PPAR peut déclencher une poussée respiratoire caractérisée par une augmentation du métabolisme énergétique et une diminution du niveau de glutathion responsable de la détoxification des espèces oxydantes. L'accumulation de ROS intracellulaire va permettre d'éliminer la cellule phagocytée. Les cellules cannibales sont douées d'une activité d'internalisation et elle semble s'apparenter à un mécanisme de dégradation lysosomal suite à la phagocytose retrouvée dans les macrophages. Les travaux réalisés par Luchette ont montré que ces nanoparticules s'accumulent préférentiellement au niveau du peroxyosome. La présence de GdBN dans les compartiments lysosomales ainsi que la présence d'une ou plusieurs cellules internalisées dites « parasites » pourraient induire une réponse inflammatoire qui se caractérise par une augmentation de ROS. Nos expériences ont permis de valider une augmentation globale de la production de ROS. Toutefois, la présence de nanoparticule sans irradiation ne conduit pas à la production de ROS. Ce qui signifie que ces nanoparticules ont besoin d'être activé par l'irradiation. Ainsi, pour distinguer ces deux phénomènes, nous proposons de déterminer la part de production de ROS générée par la combinaison GdBN+IR en comparant l'intensité de fluorescence au niveau de la cellule cannibale par rapport à la cellule simple. Nous pourrions ainsi discriminer la part de production de ROS en présence de la cellule cible. Enfin, pour déterminer la part de la production de ROS par les nanoparticules activées par l'irradiation, il faudrait cette fois-ci comparée l'intensité de fluorescence entre les cellules irradiées et les cellules traitées par la combinaison GdBN+IR. On s'attend à observer une augmentation du niveau de ROS dans les cellules simple GdBN+IR par rapport à la cellule irradiée. Si ces résultats s'avèrent être confirmés, il est ainsi intéressant d'étudier le rôle du facteur de transcription PPAR  $\alpha$  dans la stimulation du métabolisme énergétique ainsi que la production des ROS par les NOX. PPAR  $\alpha$  ne se résume pas qu'à la régulation du métabolisme énergétique mais elle est également responsable de la prolifération des peroxyosomes. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la présence des GdBN activées par l'IR pourrait stimuler la production de peroxyosomes et donc augmenter le métabolisme énergétique. Pour confirmer ces

hypothèses, l'inhibition génétique de PPAR par des SiRNA permettrait d'apprécier les conséquences sur la prolifération des peroxysomes et la production des ROS sur la dégradation des cellules cibles. L'ensemble de ces expériences permettraient ainsi de mieux comprendre les mécanismes de dégradation de la cellule cible ainsi que les conséquences anti-tumorales.

## **6. La combinaison GdBN+IR peut déclencher une réponse anti-tumorale**

La sénescence cellulaire ainsi que le cannibalisme cellulaire emprunte des voies s'approchant de l'apoptose comme le facteur de transcription TP53 ou bien de l'autophagie comme la formation de l'autophagosome. Ces signaux anti-tumoraux favorisent l'émergence de cellules sénescents. Ces cellules sénescents sont douées d'une activité cannibalistique qui est favorable de la régression tumorale. Il serait ainsi intéressant de pouvoir greffer des cellules traitées par la combinaison GdBN+IR dans un modèle murin en comparaison avec l'irradiation seule. Nous nous attendons ainsi à observer une différence de croissance tumorale entre ces deux conditions. Par ailleurs, ce mécanisme moléculaire doit être étendu sur d'autres lignées cellulaires tumorales d'origine humaine. La caractérisation d'un tel mécanisme sur d'autres tissus ou lignées cellulaires permettraient de confirmer l'importance de ce mécanisme d'une part et d'autre part de démontrer que le traitement GdBN+IR déclenche un processus inédit permettant à l'élimination des cellules cancéreuses. Par ailleurs, il est également important de préciser qu'un traitement de type chimiothérapeutique ou radiothérapeutique peut déclencher plusieurs formes de mort cellulaire. De nombreuses données scientifiques s'intéressent à un seul mécanisme de mort. Toutefois, il est tout à fait envisageable qu'un traitement peut induire plusieurs formes de morts cellulaires et certaines entre-elles peuvent influencer l'une par rapport à l'autre. Pour répondre en partie à cette hypothèse, les travaux menés par Isabelle Martins au sein de notre laboratoire, a développé une technique originale criblant à haut débit plusieurs marqueurs biologiques caractéristique de la forme de mort cellulaire. Les échantillons à analyser sont passés dans un cytomètre en flux couplé avec une caméra. Contrairement à la cytométrie en flux classique qui permet de suivre l'intensité de la fluorescence, cette technique permet d'apprécier en temps réel la morphologie de la cellule ainsi que la localisation subcellulaire des protéines. Ainsi, il sera désormais possible de déterminer au sein même d'une population cellulaire donnée, la proportion des formes de mort cellulaire. Dans le contexte du traitement combinant les nanoparticules de gadolinium ainsi que la radiothérapie, cette technique pourrait nous permettre de comprendre globalement les processus de mort cellulaire qu'elle déclenche.

Cette technique pourrait également être intéressante pour prédire l'efficacité d'un traitement à partir de biopsie de patient.

Enfin une étude en clinique de phase I est, à ce jour, en cours de réalisation. Dans la mesure du possible, il serait intéressant de pouvoir récupérer une biopsie de patients traités par les GdBN+IR en comparaison avec les patients ayant seulement reçus le traitement radiothérapeutique. Nous nous attendons ainsi à observer une activité SA  $\beta$ -gal positive associée à un marquage P21 positive. Nous pourrions également réaliser un marquage immunohistochimique permettant la détection de macrophage ou de lymphocyte CD4<sup>+</sup> afin d'apprécier la proportion d'infiltration de cellules immunitaires. Si nous parviendrons à observer de telle différence, nous pourrions ainsi utiliser ces marqueurs biologiques afin de prédire l'efficacité du traitement.

## **7. Contexte pratique de l'utilisation des nanoparticules de gadolinium et de la radiothérapie dans le traitement des cancers**

Compte-tenu des résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse, les mécanismes moléculaires et cellulaires déclenchés par la combinaison des nanoparticules de gadolinium et de la radiothérapie favorise l'accumulation de cellules sénescents et de cellules cannibales. Pour ainsi confirmer l'effet radiosensibilisant de ces nanoparticules, il pourrait être intéressant de court-circuiter la voie de signalisation déclenchée par la combinaison GdBN+IR. Comme décrit précédemment, la voie de signalisation est déclenchée par une activation du NADPH oxydase 5 et génère des espèces réactives de l'oxygène. Ces ROS peuvent ainsi potentiellement induire des lésions au niveau des constituants cellulaires (membrane cellulaire, ADN,...). Pour mettre en pratique cette stratégie expérimentale, il pourrait être ainsi intéressant de greffer des cellules HCT116 déficientes pour NOX5 (une lignée cellulaire transgénique exprimant un shRNA de NOX5 qui conduit à la destruction de l'ARN messager de NOX5) dans des souris immunocompétentes. Nous pourrions ainsi apprécier l'importance de l'activation de NOX5 par la combinaison des GdBN+IR. Parallèlement à ces travaux, il serait également intéressant d'étudier la fraction de cellules sénescents et de cellules cannibales. De ce fait, nous pourrions ainsi valider les modalités de morts cellulaires déclenchées par ce traitement.

Il est également important de préciser que le gène *p53* est exprimé en réponse aux traitements combinant les GdBN+IR. Dans la littérature, le gène *p53* est muté dans la plupart des cancers et la réponse anti-tumorale induite peut alors être compromise. Ainsi, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que ce traitement ne puisse pas fonctionner. Toutefois,

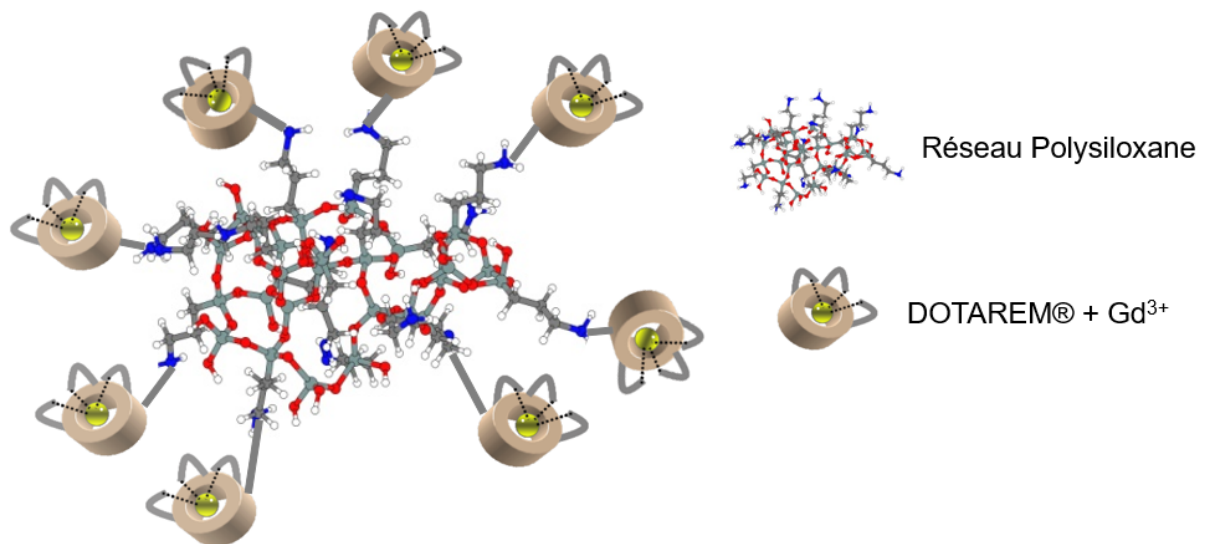


certaines études ont démontré que le stroma « tumorales » (contenant des fibroblastes sains, cellules immunitaires, cellules de l'endothélium) peut augmenter une réponse à la chimiothérapie ainsi que de la radiothérapie (Burdelya et al., 2006). En effet, ces cellules étant saines peuvent exprimer un gène *p53* « sain ». Ainsi, les agents chimiothérapeutiques ou la radiothérapeutique peuvent exercer un effet anti-angiogénique, c'est-à-dire, empêcher le processus de croissance des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur. Compte-tenu de ces travaux, nous pourrions ainsi émettre l'hypothèse que le traitement combinant les GdBN+IR pourrait stimuler le pouvoir anti-angiogénique des cellules du stroma. Si une telle hypothèse pourrait être confirmée, la combinaison GdBN+IR pourrait ainsi exercer deux fonctions : (i) asphyxier les cellules tumorales en leur privant d'oxygène et d'élément nutritif provenant des vaisseaux sanguins néo-synthétisés et (ii) déclencher plusieurs formes de mort cellulaire simultanées associées à une sénescence cellulaire, à du cannibalisme cellulaire ou à une mort mitotique associée de la catastrophe mitotique.

## Annexe

### Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules de gadolinium

Les nanoparticules de gadolinium, AgulX® ( $Gd_{10}Si_{20}C_{200}O_{150}H_x$ ) sont des objets sphérique d'une taille comprise entre 2 nm et 4 nm et d'un poids moléculaire compris entre 5 à 10 kDa. A la fin de la synthèse de la nanoparticule de gadolinium, un contrôle qualité au niveau de sa taille est réalisée microscopie électronique à transmission à haute résolution (METHR). Ces nanoparticules présentent à leur surface des groupements fonctionnels. Ces nanoparticules de gadolinium sont principalement composées de silice et des plusieurs complexes cycliques DOTAGA qui chélate le gadolinium. Des études toxicologiques ont permis de valider l'innocuité de l'agent chélatant et donc d'une autorisation de mise sur le marché américain sous le nom commercial DOTAREM® (Guerbert) (Mignot et al., 2013)



**Figure A1 : Représentation chimique de la nanoparticule de gadolinium**

La structure chimique de la nanoparticule est composé d'un réseau de polysiloxane et de DOTAREM qui chélate le Gd<sup>3+</sup>.

## Références Bibliographiques

- Adams, J.M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 61–66.
- de Almagro, M.C., and Vucic, D. (2012). The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp. Oncol.* *34*, 200–211.
- Ameziane-EI-Hassani, R., Talbot, M., de Souza Dos Santos, M.C., Al Ghuzlan, A., Hartl, D., Bidart, J.-M., De Deken, X., Miot, F., Diallo, I., de Vathaire, F., et al. (2015). NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 5051–5056.
- Ancrile, B., Lim, K.-H., and Counter, C.M. (2007). Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev.* *21*, 1714–1719.
- Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., and Agid, Y. (1997). Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* *12*, 25–31.
- Antony, S., Wu, Y., Hewitt, S.M., Anver, M.R., Butcher, D., Jiang, G., Meitzler, J.L., Liu, H., Juhasz, A., Lu, J., et al. (2013). Characterization of NADPH oxidase 5 expression in human tumors and tumor cell lines with a novel mouse monoclonal antibody. *Free Radic. Biol. Med.* *65*, 497–508.
- Arends, M.J., Morris, R.G., and Wyllie, A.H. (1990). Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* *136*, 593–608.
- Artus, C., Boujrad, H., Bouharrou, A., Brunelle, M.-N., Hoos, S., Yuste, V.J., Lenormand, P., Rousselle, J.-C., Namane, A., England, P., et al. (2010). AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J.* *29*, 1585–1599.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* *281*, 1305–1308.
- Azad, M.B., Chen, Y., Henson, E.S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S.J., and Gibson, S.B. (2008). Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* *4*, 195–204.
- B. Richardson, R., and Harper, M.-E. (2015). Mitochondrial stress controls the radiosensitivity of the oxygen effect: Implications for radiotherapy. *Oncotarget*.
- Baby, S.M., Roy, A., and Lahiri, S. (2005). Role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha in the rat carotid body glomus cells. *Histochem. Cell Biol.* *124*, 69–76.
- Baeuerle, P.A., and Baltimore, D. (1996). NF-kappa B: ten years after. *Cell* *87*, 13–20.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499–506.
- Barry, M., and Bleackley, R.C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 401–409.
- Baskar, R., Lee, K.A., Yeo, R., and Yeoh, K.-W. (2012). *Cancer and Radiation Therapy*:

Current Advances and Future Directions. *Int. J. Med. Sci.* **9**, 193–199.

Beauséjour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222.

Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313.

Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenameele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 135–147.

Bernales, S., Schuck, S., and Walter, P. (2007). ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* **3**, 285–287.

Berry, D.L., and Baehrecke, E.H. (2007). Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* **131**, 1137–1148.

Berry, D.L., and Baehrecke, E.H. (2008). Autophagy functions in programmed cell death. *Autophagy* **4**, 359–360.

Bianchi, A., Dufort, S., Lux, F., Fortin, P.-Y., Tassali, N., Tillement, O., Coll, J.-L., and Crémillieux, Y. (2014). Targeting and in vivo imaging of non-small-cell lung cancer using nebulized multimodal contrast agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9247–9252.

Bianchi, A., Moncelet, D., Lux, F., Plissonneau, M., Rizzitelli, S., Ribot, E.J., Tassali, N., Bouchaud, V., Tillement, O., Voisin, P., et al. (2015). Orotracheal administration of contrast agents: a new protocol for brain tumor targeting. *NMR Biomed.* **28**, 738–746.

Billaud, M. (2012). [Intratumor heterogeneity, a Darwinian stumbling block towards personalized medicine?]. *Med. Sci. MS* **28**, 1116–1119.

Bobik, R., and Dabrowski, Z. (1995). Emperipolesis of marrow cells within megakaryocytes in the bone marrow of sublethally irradiated mice. *Ann. Hematol.* **70**, 91–95.

Bodmer, J.L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschoop, J. (2000). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat. Cell Biol.* **2**, 241–243.

Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**, 6434–6451.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H.F.M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660–665.

Brennan, M.A., and Cookson, B.T. (2000). *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol. Microbiol.* **38**, 31–40.

Brenner, C., and Grimm, S. (2006). The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* **25**, 4744–4756.

Bristow, R.G., and Hill, R.P. (2008). Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 180–192.

Brouwer, M., de Ley, L., Feltkamp, C.A., Elema, J., and Jongasma, A.P. (1984). Serum-dependent “cannibalism” and autodestruction in cultures of human small cell carcinoma of

the lung. *Cancer Res.* *44*, 2947–2951.

Burdelya, L.G., Komarova, E.A., Hill, J.E., Browder, T., Tararova, N.D., Mavrakis, L., DiCorleto, P.E., Folkman, J., and Gudkov, A.V. (2006). Inhibition of p53 response in tumor stroma improves efficacy of anticancer treatment by increasing antiangiogenic effects of chemotherapy and radiotherapy in mice. *Cancer Res.* *66*, 9356–9361.

Butterworth, K.T., Wyer, J.A., Brennan-Fournet, M., Latimer, C.J., Shah, M.B., Currell, F.J., and Hirst, D.G. (2008). Variation of strand break yield for plasmid DNA irradiated with high-Z metal nanoparticles. *Radiat. Res.* *170*, 381–387.

Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., and Cohen, G.M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J. Biol. Chem.* *275*, 6067–6070.

Campisi, J. (2005). Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! *Mech. Ageing Dev.* *126*, 51–58.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 729–740.

Campisi, J., Andersen, J.K., Kapahi, P., and Melov, S. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin. Cancer Biol.* *21*, 354–359.

Cano, C.E., Sandí, M.J., Hamidi, T., Calvo, E.L., Turrini, O., Bartholin, L., Loncle, C., Secq, V., Garcia, S., Lomberk, G., et al. (2012). Homotypic cell cannibalism, a cell-death process regulated by the nuclear protein 1, opposes to metastasis in pancreatic cancer: Cell cannibalism and metastasis. *EMBO Mol. Med.* *4*, 964–979.

Carman, C.V., and Springer, T.A. (2008). Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 533–540.

Carvalho, D.P., and Dupuy, C. (2013). Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. *Eur. Thyroid J.* *2*, 160–167.

Casciola-Rosen, L., Garcia-Calvo, M., Bull, H.G., Becker, J.W., Hines, T., Thornberry, N.A., and Rosen, A. (2007). Mouse and human granzyme B have distinct tetrapeptide specificities and abilities to recruit the bid pathway. *J. Biol. Chem.* *282*, 4545–4552.

Castedo, M., and Kroemer, G. (2004a). La catastrophe mitotique: un cas particulier d'apoptose. *J. Société Biol.* *198*, 97–103.

Castedo, M., and Kroemer, G. (2004b). [Mitotic catastrophe: a special case of apoptosis]. *J. Soc. Biol.* *198*, 97–103.

Chanakira, A., Kir, D., Barke, R.A., Santilli, S.M., Ramakrishnan, S., and Roy, S. (2015). Hypoxia Differentially Regulates Arterial and Venous Smooth Muscle Cell Migration. *PLoS One* *10*, e0138587.

Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P., and Golstein, P. (1999). Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr. Biol.* *9*, 967–970.

Chen, Y., and Klionsky, D.J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* *124*, 161–170.

Chen, K., Kirber, M.T., Xiao, H., Yang, Y., and Keane, J.F. (2008). Regulation of ROS

signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J. Cell Biol.* *181*, 1129–1139.

Chen, T.-Y., Chi, K.-H., Wang, J.-S., Chien, C.-L., and Lin, W.-W. (2009). Reactive oxygen species are involved in FasL-induced caspase-independent cell death and inflammatory responses. *Free Radic. Biol. Med.* *46*, 643–655.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* *436*, 725–730.

Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E.G., and Lambeth, J.D. (2001). Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* *269*, 131–140.

Cheong, H., Nair, U., Geng, J., and Klionsky, D.J. (2008). The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *19*, 668–681.

Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., and Browning, J.L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* *272*, 32401–32410.

Chiera, F., Meccia, E., Degan, P., Aquilina, G., Pietraforte, D., Minetti, M., Lambeth, D., and Bignami, M. (2008). Overexpression of human NOX1 complex induces genome instability in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* *44*, 332–342.

Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M., and Chan, F.K.-M. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* *137*, 1112–1123.

Cohen, G.M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* *326* (Pt 1), 1–16.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* *436*, 642.

Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* *130*, 223–233.

Communal, C., Sumandea, M., de Tombe, P., Narula, J., Solaro, R.J., and Hajjar, R.J. (2002). Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 6252–6256.

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

Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Krtolica, A., Beauséjour, C.M., Parrinello, S., Hodgson, J.G., Chin, K., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2010). A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* *5*, e9188.

Cosme-Blanco, W., Shen, M.-F., Lazar, A.J.F., Pathak, S., Lozano, G., Multani, A.S., and Chang, S. (2007). Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep.* *8*, 497–503.

Darmon, A.J., Nicholson, D.W., and Bleackley, R.C. (1995). Activation of the apoptotic

protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377, 446–448.

David, K.K., Andrabi, S.A., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 1116–1128.

Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2009). RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell* 138, 229–232.

Devulapally, R., and Paulmurugan, R. (2014). Polymer nanoparticles for drug and small silencing RNA delivery to treat cancers of different phenotypes. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 6, 40–60.

Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540–2551.

Dimri, G.P. (2005). What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell* 7, 505–512.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363–9367.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33–42.

Dufort, S., Bianchi, A., Henry, M., Lux, F., Le Duc, G., Josserand, V., Louis, C., Perriat, P., Crémillieux, Y., Tillement, O., et al. (2015). Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization. *Small Weinheim, Bergstr. Ger.* 11, 215–221.

Dunn, W.A., Cregg, J.M., Kiel, J.A.K.W., van der Klei, I.J., Oku, M., Sakai, Y., Sibirny, A.A., Stasyk, O.V., and Veenhuis, M. (2005). Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy* 1, 75–83.

Edinger, A.L., and Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 663–669.

Ekholm, S.V., and Reed, S.I. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 676–684.

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

Eom, Y.-W., Kim, M.A., Park, S.S., Goo, M.J., Kwon, H.J., Sohn, S., Kim, W.-H., Yoon, G., and Choi, K.S. (2005). Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 24, 4765–4777.

Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., Codogno, P., and Biard-Piechaczyk, M. (2006). Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* 116, 2161–2172.

Ewing, D. (1998). The oxygen fixation hypothesis: a reevaluation. *Am. J. Clin. Oncol.* 21,

355–361.

Fadok, V.A. (1999). Clearance: the last and often forgotten stage of apoptosis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4, 203–211.

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 148, 2207–2216.

d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.

d'Adda di Fagagna, F., Teo, S.-H., and Jackson, S.P. (2004). Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev.* 18, 1781–1799.

Fais, S. (2007). Cannibalism: a way to feed on metastatic tumors. *Cancer Lett.* 258, 155–164.

Fazi, B., Bursch, W., Fimia, G.M., Nardacci, R., Piacentini, M., Di Sano, F., and Piredda, L. (2008). Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy* 4, 435–441.

Fellows, E., Gil-Parrado, S., Jenne, D.E., and Kurschus, F.C. (2007). Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. *Blood* 110, 544–552.

Feng, S., Yang, Y., Mei, Y., Ma, L., Zhu, D., Hoti, N., Castanares, M., and Wu, M. (2007). Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell. Signal.* 19, 2056–2067.

Ferri, K.F., and Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, E255-263.

Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2006). Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 1371–1387.

Florey, O., Kim, S.E., Sandoval, C.P., Haynes, C.M., and Overholtzer, M. (2011). Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.* 13, 1335–1343.

Foreman, K.E., and Tang, J. (2003). Molecular mechanisms of replicative senescence in endothelial cells. *Exp. Gerontol.* 38, 1251–1257.

Fuchs, Y., and Steller, H. (2015). Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 329–344.

Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 384, 201–232.

Fulton, S.A., Johnsen, J.M., Wolf, S.F., Sieburth, D.S., and Boom, W.H. (1996). Interleukin-12 production by human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*: role of phagocytosis. *Infect. Immun.* 64, 2523–2531.

Galluzzi, L., Blomgren, K., and Kroemer, G. (2009). Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 481–494.



- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* *19*, 107–120.
- Giam, M., Huang, D.C.S., and Bouillet, P. (2008). BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* *27 Suppl 1*, S128-136.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007a). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 37–43.
- Golstein, P., and Kroemer, G. (2007b). A multiplicity of cell death pathways. Symposium on apoptotic and non-apoptotic cell death pathways. *EMBO Rep.* *8*, 829–833.
- Goodarzi, A.A., Jonnalagadda, J.C., Douglas, P., Young, D., Ye, R., Moorhead, G.B.G., Lees-Miller, S.P., and Khanna, K.K. (2004). Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. *EMBO J.* *23*, 4451–4461.
- Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., and Fiers, W. (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8115–8119.
- Grall, R., Girard, H., Saad, L., Petit, T., Gesset, C., Combis-Schlumberger, M., Paget, V., Delic, J., Arnault, J.-C., and Chevillard, S. (2015). Impairing the radioresistance of cancer cells by hydrogenated nanodiamonds. *Biomaterials* *61*, 290–298.
- Grandér, D., Kharaziha, P., Laane, E., Pokrovskaja, K., and Panaretakis, T. (2009). Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. *Autophagy* *5*, 1198–1200.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* *305*, 626–629.
- Griffiths, G.M., and Isaaz, S. (1993). Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J. Cell Biol.* *120*, 885–896.
- Gross, A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* *13*, 1899–1911.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* *301*, 5–17.
- Haigler, H.T., McKanna, J.A., and Cohen, S. (1979). Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* *83*, 82–90.
- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 37298–37302.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* *37*, 614–636.
- He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 67–93.

- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., and Wang, X. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 137, 1100–1111.
- Hedgecock, E.M., Sulston, J.E., and Thomson, J.N. (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220, 1277–1279.
- Helminen, H.J., and Ericsson, J.L. (1971). Ultrastructural studies on prostatic involution in the rat. Mechanism of autophagy in epithelial cells, with special reference to the rough-surfaced endoplasmic reticulum. *J. Ultrastruct. Res.* 36, 708–724.
- Helminen, H.J., Ericsson, J.L., and Orrenius, S. (1968). Studies on mammary gland involution. IV. Histochemical and biochemical observations on alterations in lysosomes and lysosomal enzymes. *J. Ultrastruct. Res.* 25, 240–252.
- Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y., and Greider, C.W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107, 67–77.
- Hengartner, M.O., Ellis, R.E., and Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494–499.
- Heppner, D.E., and van der Vliet, A. (2016). Redox-dependent regulation of epidermal growth factor receptor signaling. *Redox Biol.* 8, 24–27.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* 14, 501–513.
- Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J., and Yuan, J. (2008). Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135, 1311–1323.
- Horvitz, H.R., Shaham, S., and Hengartner, M.O. (1994). The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59, 377–385.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., and Dixit, V.M. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17255–17257.
- Hu, S., Snipas, S.J., Vincenz, C., Salvesen, G., and Dixit, V.M. (1998). Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J. Biol. Chem.* 273, 29648–29653.
- Huang, C.-C., Chen, K.-L., Cheung, C.H.A., and Chang, J.-Y. (2013). Autophagy induced by cathepsin S inhibition induces early ROS production, oxidative DNA damage, and cell death via xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 1473–1486.
- Huang, C.-C., Lee, C.-C., Lin, H.-H., Chen, M.-C., Lin, C.-C., and Chang, J.-Y. (2015). Autophagy-Regulated ROS from Xanthine Oxidase Acts as an Early Effector for Triggering Late Mitochondria-Dependent Apoptosis in Cathepsin S-Targeted Tumor Cells. *PLOS ONE* 10, e0128045.
- Huang, W.-C., Li, X., Liu, J., Lin, J., and Chung, L.W.K. (2012). Activation of androgen receptor, lipogenesis, and oxidative stress converged by SREBP-1 is responsible for regulating growth and progression of prostate cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 10, 133–142.

- Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 277–288.
- Ioachim, H.L. (1965). Emperipolesis of lymphoid cells in mixed cultures. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 14, 1784–1794.
- Jacobs, J.J.L., and de Lange, T. (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol. CB* 14, 2302–2308.
- Janku, F., McConkey, D.J., Hong, D.S., and Kurzrock, R. (2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 528–539.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549–554.
- Kang, S.J., Wang, S., Kuida, K., and Yuan, J. (2002). Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ.* 9, 1115–1125.
- Kelley, M.R., Logsdon, D., and Fishel, M.L. (2014). Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncol.* 10, 1215–1237.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2001). Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 152, 519–530.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* 462, 245–253.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611–620.
- Klebanoff, S.J. (1980). Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.* 93, 480–489.
- Koenig, U., Eckhart, L., and Tschachler, E. (2001). Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1150–1154.
- Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., et al. (2008). Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am. J. Pathol.* 172, 454–469.
- Kotb, S., Detappe, A., Lux, F., Appaix, F., Barbier, E.L., Tran, V.-L., Plissonneau, M., Gehan, H., Lefranc, F., Rodriguez-Lafrasse, C., et al. (2016). Gadolinium-Based Nanoparticles and Radiation Therapy for Multiple Brain Melanoma Metastases: Proof of Concept before Phase I Trial. *Theranostics* 6, 418–427.

- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.* *10*, 602–610.
- Krajcovic, M., and Overholtzer, M. (2012). Mechanisms of ploidy increase in human cancers: a new role for cell cannibalism. *Cancer Res.* *72*, 1596–1601.
- Krajcovic, M., Johnson, N.B., Sun, Q., Normand, G., Hoover, N., Yao, E., Richardson, A.L., King, R.W., Cibas, E.S., Schnitt, S.J., et al. (2011). A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nat. Cell Biol.* *13*, 324–330.
- Kroemer, G., Zamzami, N., and Susin, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* *18*, 44–51.
- Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., et al. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* *12 Suppl 2*, 1463–1467.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* *87*, 99–163.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* *16*, 3–11.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P.H., and Kirchhoff, S. (2001). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 8247–8254.
- Kwatra, D., Venugopal, A., and Anant, S. (2013). Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Transl. Cancer Res.*
- Laane, E., Tamm, K.P., Buentke, E., Ito, K., Kharaziha, P., Khahariza, P., Oscarsson, J., Corcoran, M., Björklund, A.-C., Hultenby, K., et al. (2009). Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ.* *16*, 1018–1029.
- Lane, J.D., Vergnolle, M.A., Woodman, P.G., and Allan, V.J. (2001). Apoptotic cleavage of cytoplasmic dynein intermediate chain and p150(Glued) stops dynein-dependent membrane motility. *J. Cell Biol.* *153*, 1415–1426.
- Laster, S.M., Wood, J.G., and Gooding, L.R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *141*, 2629–2634.
- Le Duc, G., Miladi, I., Alric, C., Mowat, P., Bräuer-Krisch, E., Bouchet, A., Khalil, E., Billotey, C., Janier, M., Lux, F., et al. (2011). Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS Nano* *5*, 9566–9574.
- Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* *304*, 93–96.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* *5*, 187–195.
- Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero,

- P.M., Westphal, H., and Gonzalez, F.J. (1995). Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3012–3022.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* *94*, 491–501.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95–99.
- Liang, J., Shao, S.H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D.J., Gutterman, J.U., Walker, C.L., et al. (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat. Cell Biol.* *9*, 218–224.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* *402*, 672–676.
- Lieberman, J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 361–370.
- Liebman, E. (1945). The function of leucocytes in the growth and regression of the egg of *triturus viridescens*. *Am. J. Anat.* *77*, 273–291.
- Lindhout, E., Lakeman, A., Mevissen, M.L., and de Groot, C. (1994). Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J. Exp. Med.* *179*, 1173–1184.
- Littbrand, B., and Revesz, L. (1964). RECOVERY FROM X-RAY INJURY AND THE EFFECT OF OXYGEN. *Nature* *203*, 889–891.
- Little, A.C., Sham, D., Hristova, M., Danyal, K., Heppner, D.E., Bauer, R.A., Sipse, L.M., Habibovic, A., and van der Vliet, A. (2016). DUOX1 silencing in lung cancer promotes EMT, cancer stem cell characteristics and invasive properties. *Oncogenesis* *5*, e261.
- Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2405–2419.
- Locksley, R.M., Killeen, N., and Lenardo, M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487–501.
- London, N., and Biggins, S. (2014). Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 736–748.
- Loubser, P.G., and Donovan, W.H. (1991). Diagnostic spinal anaesthesia in chronic spinal cord injury pain. *Paraplegia* *29*, 25–36.
- Lübke, T., Lobel, P., and Sleat, D.E. (2009). Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 625–635.
- Luchette, M., Korideck, H., Makrigiorgos, M., Tillement, O., and Berbeco, R. (2014). Radiation dose enhancement of gadolinium-based AGuIX nanoparticles on HeLa cells. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *10*, 1751–1755.
- Lugini, L., Matarrese, P., Tinari, A., Lozupone, F., Federici, C., Iessi, E., Gentile, M., Luciani, F., Parmiani, G., Rivoltini, L., et al. (2006). Cannibalism of live lymphocytes by human

metastatic but not primary melanoma cells. *Cancer Res.* **66**, 3629–3638.

Lujambio, A. (2016). To clear, or not to clear (senescent cells)? That is the question: Clearance of senescent cells. *BioEssays* **38**, S56–S64.

Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**, 237–248.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481–490.

Lux, F., Mignot, A., Mowat, P., Louis, C., Dufort, S., Bernhard, C., Denat, F., Boschetti, F., Brunet, C., Antoine, R., et al. (2011). Ultrasmall Rigid Particles as Multimodal Probes for Medical Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 12299–12303.

Lux, F., Detappe, A., Dufort, S., Sancey, L., Louis, C., Carme, S., and Tillement, O. (2015). [Ultrasmall nanoparticles for radiotherapy: AGuIX]. *Cancer Radiothérapie J. Société Fr. Radiothérapie Oncol.* **19**, 508–514.

Lynch, C.N., Wang, Y.C., Lund, J.K., Chen, Y.W., Leal, J.A., and Wiley, S.R. (1999). TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 8455–8459.

Ma, Y., Galluzzi, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2013). Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* **39**, 211–227.

Maeda, H. (2012). Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. *J. Controlled Release* **164**, 138–144.

Maggiorella, L., Barouch, G., Devaux, C., Pottier, A., Deutsch, E., Bourhis, J., Borghi, E., and Levy, L. (2012). Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncol. Lond. Engl.* **8**, 1167–1181.

Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuåsen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425–1429.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 741–752.

Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**, 3–15.

Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 81–94.

Meijerink, J.P., Mensink, E.J., Wang, K., Sedlak, T.W., Slöetjes, A.W., de Witte, T., Waksman, G., and Korsmeyer, S.J. (1998). Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* **91**, 2991–2997.

Metzler, K.D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., and Papayannopoulos, V. (2014). A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* **8**, 883–896.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005).

BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720–724.

Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.

Mignot, A., Truillet, C., Lux, F., Sancey, L., Louis, C., Denat, F., Boschetti, F., Bocher, L., Gloter, A., Stéphan, O., et al. (2013). A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional Gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 19, 6122–6136.

Mijaljica, D., and Devenish, R.J. (2013). Nucleophagy at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 4325–4330.

Miladi, I., Aloy, M.-T., Armandy, E., Mowat, P., Kryza, D., Magné, N., Tillement, O., Lux, F., Billotey, C., Janier, M., et al. (2015). Combining ultrasmall gadolinium-based nanoparticles with photon irradiation overcomes radioresistance of head and neck squamous cell carcinoma. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 247–257.

Milane, L., Duan, Z., and Amiji, M. (2011). Pharmacokinetics and biodistribution of Ionidamine/paclitaxel loaded, EGFR-targeted nanoparticles in an orthotopic animal model of multi-drug resistant breast cancer. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 7, 435–444.

Minamino, T., and Komuro, I. (2002). Role of telomere in endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 537–543.

Mizushima, N., and Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 12, 823–830.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107–132.

Morishima, N. (1999). Changes in nuclear morphology during apoptosis correlate with vimentin cleavage by different caspases located either upstream or downstream of Bcl-2 action. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 4, 401–414.

Mortimore, G.E., Hutson, N.J., and Surmacz, C.A. (1983). Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 2179–2183.

Muñoz-Espín, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 482–496.

Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., et al. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817–827.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98–103.

Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652–658.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in

- autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 458–467.
- Nardella, C., Clohessy, J.G., Alimonti, A., and Pandolfi, P.P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 503–511.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* *113*, 703–716.
- Neufeld, T.P., and Baehrecke, E.H. (2008). Eating on the fly: function and regulation of autophagy during cell growth, survival and death in *Drosophila*. *Autophagy* *4*, 557–562.
- Newton, K., Sun, X., and Dixit, V.M. (2004). Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 1464–1469.
- Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 299–306.
- Nijhawan, D., Honarpour, N., and Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *23*, 73–87.
- Nishie, M., Mori, F., Houzen, H., Yamaguchi, J., Jensen, P.H., and Wakabayashi, K. (2006). Oligodendrocytes within astrocytes (“emperipolesis”) in the cerebral white matter in hepatic and hypoglycemic encephalopathy. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* *26*, 62–65.
- Nixon, R.A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W.H., Peterhoff, C., Cataldo, A., and Cuervo, A.M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 113–122.
- Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* *409*, 1067–1070.
- Olsen, C.L., Gardie, B., Yaswen, P., and Stampfer, M.R. (2002). Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion. *Oncogene* *21*, 6328–6339.
- Opferman, J.T., and Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* *4*, 410–415.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 552–565.
- Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Garg, M., Froelich, C.J., and Dixit, V.M. (1996). The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J. Biol. Chem.* *271*, 16443–16446.
- Osborne, B.A. (1996). Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* *8*, 245–254.
- Overholtzer, M. (2011). Michael Overholtzer: answering existential questions on entosis. *J. Cell Biol.* *195*, 924–925.
- Overholtzer, M., and Brugge, J.S. (2008). The cell biology of cell-in-cell structures. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 796–809.
- Overholtzer, M., Mailleux, A.A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S.J., King, R.W.,



- Cibas, E.S., and Brugge, J.S. (2007). A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 131, 966–979.
- Paavola, L.G. (1978). The corpus luteum of the guinea pig. III. Cytochemical studies on the Golgi complex and GERL during normal postpartum regression of luteal cells, emphasizing the origin of lysosomes and autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 79, 59–73.
- Pardo, J., Bosque, A., Brehm, R., Wallich, R., Naval, J., Müllbacher, A., Anel, A., and Simon, M.M. (2004). Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J. Cell Biol.* 167, 457–468.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 5, 741–747.
- Pei, X.-Y., Dai, Y., and Grant, S. (2003). The proteasome inhibitor bortezomib promotes mitochondrial injury and apoptosis induced by the small molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 in multiple myeloma cells. *Leukemia* 17, 2036–2045.
- Penaloza, C., Orlanski, S., Ye, Y., Entezari-Zaher, T., Javdan, M., and Zakeri, Z. (2008). Cell death in mammalian development. *Curr. Pharm. Des.* 14, 184–196.
- Peter, M.E., and Krammer, P.H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 545–551.
- Pezzano, M., Li, Y., Philp, D., Omene, C., Cantey, M., Saunders, G., and Guyden, J.C. (1995). Thymic nurse cell rescue of early CD4+CD8+ thymocytes from apoptosis. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 41, 1099–1111.
- Philp, D., Pezzano, M., Li, Y., Omene, C., Boto, W., and Guyden, J. (1993). The binding, internalization, and release of thymocytes by thymic nurse cells. *Cell. Immunol.* 148, 301–315.
- Piktel, E., Niemirowicz, K., Wątek, M., Wollny, T., Deptuła, P., and Bucki, R. (2016). Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. *J. Nanobiotechnology* 14, 39.
- Plissonneau, M., Pansieri, J., Heinrich-Balard, L., Morfin, J.-F., Stransky-Heilkron, N., Rivory, P., Mowat, P., Dumoulin, M., Cohen, R., Allémann, É., et al. (2016). Gd-nanoparticles functionalization with specific peptides for  $\beta$ -amyloid plaques targeting. *J. Nanobiotechnology* 14.
- te Poele, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 62, 1876–1883.
- Porcel, E., Tillement, O., Lux, F., Mowat, P., Usami, N., Kobayashi, K., Furusawa, Y., Le Sech, C., Li, S., and Lacombe, S. (2014). Gadolinium-based nanoparticles to improve the hadrontherapy performances. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 10, 1601–1608.
- Racoosin, E.L., and Swanson, J.A. (1989). Macrophage colony-stimulating factor (rM-CSF) stimulates pinocytosis in bone marrow-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 170, 1635–1648.
- Rada, B., and Leto, T.L. (2008). Oxidative Innate Immune Defenses by Nox/Duox Family NADPH Oxidases. In *Contributions to Microbiology*, A. Egesten, A. Schmidt, and H. Herwald, eds. (Basel: KARGER), pp. 164–187.

- Raff, M.C., Whitmore, A.V., and Finn, J.T. (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science* 296, 868–871.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., and Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res. Int.* 2014, 761264.
- Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat. Cell Biol.* 5, 733–740.
- Reid, F.M., Sandilands, G.P., Gray, K.G., and Anderson, J.R. (1979). Lymphocyte emperipolesis revisited. II. Further characterization of the lymphocyte subpopulation involved. *Immunology* 36, 367–372.
- Rima, W., Sancey, L., Aloy, M.-T., Armandy, E., Alcantara, G.B., Epicier, T., Malchère, A., Joly-Pottuz, L., Mowat, P., Lux, F., et al. (2013). Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. *Biomaterials* 34, 181–195.
- Roberson, R.S., Kussick, S.J., Vallieres, E., Chen, S.-Y.J., and Wu, D.Y. (2005). Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* 65, 2795–2803.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* 192, 547–556.
- Rogalińska, M. (2002). Alterations in cell nuclei during apoptosis. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7, 995–1018.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J.I., Schilhabel, M., et al. (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106, 3214–3222.
- Russell, J.H., and Ley, T.J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 323–370.
- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 623–635.
- Sahebkhithiari, H.A., and Tavassoli, M. (1976). Marrow cell uptake by megakaryocytes in routine bone marrow smears during blood loss. *Scand. J. Haematol.* 16, 13–17.
- Sarveswaran, S., Chakraborty, D., Chitale, D., Sears, R., and Ghosh, J. (2015). Inhibition of 5-lipoxygenase selectively triggers disruption of c-Myc signaling in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 290, 4994–5006.
- Sayan, M., and Mossman, B.T. (2016). The NLRP3 inflammasome in pathogenic particle and fibre-associated lung inflammation and diseases. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 51.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675–1687.
- Scarlatti, F., Granata, R., Meijer, A.J., and Codogno, P. (2009). Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ.* 16, 12–20.

- Schmitt, C.A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 286–295.
- Schmitt, A., Drouin, A., Massé, J.-M., Guichard, J., Shagraoui, H., and Cramer, E.M. (2002a). Polymorphonuclear neutrophil and megakaryocyte mutual involvement in myelofibrosis pathogenesis. *Leuk. Lymphoma* 43, 719–724.
- Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M., and Lowe, S.W. (2002b). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109, 335–346.
- Scott, R.C., Juhász, G., and Neufeld, T.P. (2007). Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol. CB* 17, 1–11.
- Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., and Funk, W.D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol. CB* 9, 939–945.
- Shen, H.-M., and Codogno, P. (2012). Autophagy is a survival force via suppression of necrotic cell death. *Exp. Cell Res.* 318, 1304–1308.
- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.
- Shi, Y., Zhou, M., Zhang, J., and Lu, W. (2015). Preparation and cellular targeting study of VEGF-conjugated PLGA nanoparticles. *J. Microencapsul.* 32, 699–704.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* 6, 1221–1228.
- Silverman, J.F., Dabbs, D.J., Finley, J.L., and Geisinger, K.R. (1988). Fine-needle aspiration biopsy of pleomorphic (giant cell) carcinoma of the pancreas. Cytologic, immunocytochemical, and ultrastructural findings. *Am. J. Clin. Pathol.* 89, 714–720.
- Sinha, S., and Levine, B. (2008). The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S137-148.
- Sinkovics, J.G. (1962). Intracellular lymphocytes in leukaemia. *Nature* 196, 80–81.
- Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 7320–7326.
- Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 21, 4338–4348.
- Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 447–458.
- Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D.E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14376–14381.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12, 599–609.
- Steele, V.E., Holmes, C.A., Hawk, E.T., Kopelovich, L., Lubet, R.A., Crowell, J.A., Sigman, C.C., and Kelloff, G.J. (1999). Lipoxigenase inhibitors as potential cancer chemopreventives.

- Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *8*, 467–483.
- Stein, G.H., and Dulić, V. (1995). Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *17*, 537–543.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2109–2117.
- Steinberg, B.E., and Grinstein, S. (2007). Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2007*, pe11.
- Stepień, A., Izdebska, M., and Grzanka, A. (2007). [The types of cell death]. *Postępy Hig. Med. Dośw. Online* *61*, 420–428.
- Sulli, G., Di Micco, R., and di Fagagna, F. d'Adda (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 709–720.
- Sun, Q., Cibas, E.S., Huang, H., Hodgson, L., and Overholtzer, M. (2014a). Induction of entosis by epithelial cadherin expression. *Cell Res.* *24*, 1288–1298.
- Sun, T., Zhang, Y.S., Pang, B., Hyun, D.C., Yang, M., and Xia, Y. (2014b). Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* n/a-n/a.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prévost, M.C., Alzari, P.M., and Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* *189*, 381–394.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* *397*, 441–446.
- Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *12*, 209–218.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* *8*, 613–621.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 621–632.
- Tanaka, M., Aze, Y., and Fujita, T. (1997). Adhesion molecule LFA-1/ICAM-1 influences on LPS-induced megakaryocytic emperipolesis in the rat bone marrow. *Vet. Pathol.* *34*, 463–466.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* *406*, 902–906.
- Tassali, N., Bianchi, A., Lux, F., Raffard, G., Sanchez, S., Tillement, O., and Crémillieux, Y. (2016). MR imaging, targeting and characterization of pulmonary fibrosis using intra-tracheal administration of gadolinium-based nanoparticles: MR Imaging and Characterization of Pulmonary Fibrosis. *Contrast Media Mol. Imaging* *11*, 396–404.

- Taylor, W.R., and Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803–1815.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231–241.
- Teissier, E., Nohara, A., Chinetti, G., Paumelle, R., Cariou, B., Fruchart, J.-C., Brandes, R.P., Shah, A., and Staels, B. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-alpha activation properties. *Circ. Res.* 95, 1174–1182.
- Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L1005-1028.
- Thiels, E., and Klann, E. (2002). Hippocampal memory and plasticity in superoxide dismutase mutant mice. *Physiol. Behav.* 77, 601–605.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schröter, M., et al. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517–521.
- Ting, J.P.-Y., Willingham, S.B., and Bergstralh, D.T. (2008). NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 372–379.
- Toulany, M., Mihatsch, J., Holler, M., Chaachouay, H., and Rodemann, H.P. (2014). Cisplatin-mediated radiosensitization of non-small cell lung cancer cells is stimulated by ATM inhibition. *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* 111, 228–236.
- Tsunoda, R., Bosseloir, A., Onozaki, K., Heinen, E., Miyake, K., Okamura, H., Suzuki, K., Fujita, T., Simar, L.J., and Sugai, N. (1997). Human follicular dendritic cells in vitro and follicular dendritic-cell-like cells. *Cell Tissue Res.* 288, 381–389.
- Tsunoda, R., Heinen, E., and Sugai, N. (2000). Follicular dendritic cells in vitro modulate the expression of Fas and Bcl-2 on germinal center B cells. *Cell Tissue Res.* 299, 395–402.
- Tubiana, M., Averbek, D., Bourguignon, M., Bhourhis, J., Cassiman, J., Cosset, J., Favaudon, V., Gardès-Albert, M., Girinski, T., Gourmelon, P., et al. (2010). *Radiobiologie : Radiothérapie et radioprotection, bases fondamentales, 3ième édition (Hermann/Médecine).*
- Utz, P.J., and Anderson, P. (2000). Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ.* 7, 589–602.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., and Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ.* 15, 1153–1162.
- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C.J., Brunk, U.T., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 17, 922–930.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., and Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 700–714.
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T., Krysko, D.V., Festjens, N., and Vandenabeele, P. (2008). Molecular mechanisms and pathophysiology of necrotic cell death. *Curr. Mol. Med.* 8, 207–220.

- Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., and Vandenamele, P. (1998). Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.* *188*, 919–930.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., and Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 385–392.
- Walczak, H., and Krammer, P.H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp. Cell Res.* *256*, 58–66.
- Wang, L., Du, F., and Wang, X. (2008). TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* *133*, 693–703.
- Wang, S., Guo, Z., Xia, P., Liu, T., Wang, J., Li, S., Sun, L., Lu, J., Wen, Q., Zhou, M., et al. (2009). Internalization of NK cells into tumor cells requires ezrin and leads to programmed cell-in-cell death. *Cell Res.* *19*, 1350–1362.
- Wertz, I.E., and Dixit, V.M. (2008). Ubiquitin-mediated regulation of TNFR1 signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* *19*, 313–324.
- Weyemi, U., Redon, C.E., Aziz, T., Choudhuri, R., Maeda, D., Parekh, P.R., Bonner, M.Y., Arbiser, J.L., and Bonner, W.M. (2015). Inactivation of NADPH Oxidases NOX4 and NOX5 Protects Human Primary Fibroblasts from Ionizing Radiation-Induced DNA Damage. *Radiat. Res.* *183*, 262–270.
- Willingham, S.B., Bergstralh, D.T., O'Connor, W., Morrison, A.C., Taxman, D.J., Duncan, J.A., Barnoy, S., Venkatesan, M.M., Flavell, R.A., Deshmukh, M., et al. (2007). Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* *2*, 147–159.
- Wilson, N.S., Dixit, V., and Ashkenazi, A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* *10*, 348–355.
- Wu, J., Huang, Z., Ren, J., Zhang, Z., He, P., Li, Y., Ma, J., Chen, W., Zhang, Y., Zhou, X., et al. (2013). MIK1 knockout mice demonstrate the indispensable role of MIK1 in necroptosis. *Cell Res.* *23*, 994–1006.
- Wyllie, A.H., Beattie, G.J., and Hargreaves, A.D. (1981). Chromatin changes in apoptosis. *Histochem. J.* *13*, 681–692.
- Yeretssian, G., Doiron, K., Shao, W., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Nicholson, D.W., and Saleh, M. (2009). Gender differences in expression of the human caspase-12 long variant determines susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 9016–9020.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., and Horvitz, H.R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* *75*, 641–652.
- Yuan, S., Yu, X., Asara, J.M., Heuser, J.E., Ludtke, S.J., and Akey, C.W. (2011). The holo-apoptosome: activation of procaspase-9 and interactions with caspase-3. *Struct. Lond. Engl.* *19*, 1084–1096.
- Yue, Z., Lisdat, F., Parak, W.J., Hickey, S.G., Tu, L., Sabir, N., Dorfs, D., and Bigall, N.C. (2013). Quantum-dot-based photoelectrochemical sensors for chemical and biological detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* *5*, 2800–2814.

- Zhang, D., Beresford, P.J., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (2001a). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 5746–5751.
- Zhang, D., Pasternack, M.S., Beresford, P.J., Wagner, L., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (2001b). Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J. Biol. Chem.* **276**, 3683–3690.
- Zhang, D.-W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.-J., Lin, S.-C., Dong, M.-Q., and Han, J. (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* **325**, 332–336.
- Zheng, Y., and Sanche, L. (2009). Gold nanoparticles enhance DNA damage induced by anti-cancer drugs and radiation. *Radiat. Res.* **172**, 114–119.
- Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433–439.
- Zhuang, J., Zhang, J., Willers, H., Wang, H., Chung, J.H., van Gent, D.C., Hallahan, D.E., Powell, S.N., and Xia, F. (2006). Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining. *Cancer Res.* **66**, 1401–1408.
- Zong, W.-X., Ditsworth, D., Bauer, D.E., Wang, Z.-Q., and Thompson, C.B. (2004). Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* **18**, 1272–1282.

**Titre :** Effet de la combinaison des nanoparticules de gadolinium et de la radiothérapie sur l'élimination des cellules tumorales

**Mots clés :** Nanoparticules, Gadolinium, Radiothérapie, Cancer, Morts cellulaires

**Résumé :** L'arrivée des nanobiotechnologies en oncologie apporte un nouveau souffle dans le traitement des cancers. Les travaux réalisés par Olivier Tillement et ses collaborateurs ont permis de montrer que les nanoparticules de gadolinium (GdBN) sont capables d'augmenter d'une part la qualité d'imagerie par résonance magnétique (IRM) mais également d'augmenter les effets des rayonnements ionisants (IR) sur les tumeurs. Des études pré-cliniques sur des tumeurs de glioblastome greffées sur des souris C57BL/6 ont permis de révéler la capacité de la combinaison GdBN+IR à favoriser une régression tumorale. Néanmoins, les processus de morts cellulaires sont partiellement connus.

Nos résultats ont permis de démontrer que ce traitement produit un stress oxydatif généré par le NADPH oxydase 5 (NOX-5). Ce stress oxydatif déclenche un arrêt de prolifération dépend de la protéine P21 puis aboutit au déclenchement de la sénescence cellulaire et d'un processus de cannibalisme cellulaire. Nous avons révélé que le cannibalisme cellulaire aboutit à l'élimination de cellules internalisées. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous a permis de révéler que la combinaison des GdBN et de l'irradiation contribue à l'élimination de cellules cancéreuses en déclenchant à la fois la sénescence cellulaire et un mécanisme original de mort cellulaire, le cannibalisme cellulaire.

**Title :** Effect of combination of gadolinium based-nanoparticle and radiotherapy on cancer cells elimination

**Keywords :** Nanoparticles, Gadolinium, Radiotherapy, Cancer, Cell death

**Abstract :** The nanobiotechnology give a new approach in the fight against cancer. Olivier Tillement and his colleagues have demonstrated that the Gadolinium-Based Nanoparticle (GdBN) can improve Magnetic Resonance Imaging (MRI) and increase radiotherapy effect. Pre-clinical studies show that combination of GdBN and irradiation on C57BL/6 mice xenograft with glioblastoma model is associated with tumor regression. However, the characterization of molecular and cellular must be elucidated. Our results show that GdBN and irradiation generate oxidative stress mediated by NADPH oxidase-5 (NOX-5).

This oxidative stress trigger cell cycle arrest and lead to cellular senescence. Surprisingly, these senescent cells are able to internalize neighboring cells and eliminate them. All of these results suggests that the combination of GdBN and irradiation promote both senescent and an original mechanism that eliminate neighboring tumor cells

