



HAL
open science

Optimisation de la chimio-radiothérapie à base de gemcitabine par un inhibiteur de poly-ADP ribose polymérase dans les cancers du pancréas

Waïsse Waïssi

► **To cite this version:**

Waïsse Waïssi. Optimisation de la chimio-radiothérapie à base de gemcitabine par un inhibiteur de poly-ADP ribose polymérase dans les cancers du pancréas. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAJ127 . tel-04139304

HAL Id: tel-04139304

<https://theses.hal.science/tel-04139304>

Submitted on 23 Jun 2023

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Laboratoire de Radiobiologie, UMR 7178, Centre Paul Strauss

THÈSE présentée par :

Waisse WAÏSSI

soutenue le : **17 octobre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Optimisation de la chimioradiothérapie à base
de gemcitabine par un inhibiteur de poly(ADP-ribose)
polymérase dans les cancers du pancréas**

THÈSE dirigée par :

Pr Georges NOËL

PU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr Florence HUGUET

PU-PH, Sorbonne Université

Pr Gilles CRÉHANGE

PU-PH, Université de Bourgogne Franche-Comté

EXAMINATEUR :

Dr Frédérique MEGNIN-CHANET

CR, HDR, Institut Curie-Recherche

Invitée :

Dr Françoise DANTZER

DR, HDR, Université de Strasbourg

Encadrant :

Dr Hélène BURCKEL

Chercheuse, Université de Strasbourg

Remerciements :

Au **Professeur Georges NOËL**, qui m'a fait l'honneur d'encadrer cette thèse et qui m'a soutenu dans mon projet d'entreprendre un cursus scientifique. Veuillez accepter l'expression de mon plus profond respect.

Aux **Professeure Florence HUGUET, Professeur Gilles CREHANGE, Docteur Frédérique MEGNIN-CHANET et Docteur Françoise DANTZER** qui me font l'honneur de juger cette thèse.

Au **Docteur Hélène BURCKEL**, pour m'avoir accompagné durant ces 4 dernières années. Je te remercie pour ton soutien, ta rigueur et tes nombreuses relectures de ce manuscrit.

À Anaïs pour m'avoir enseigné les rudiments de la bioinformatique et pour avoir été ma «cheat sheet R» perso pendant ces 4 années. Je suis certain que nos chemins vont continuer à se croiser.

À Carole, la dernière arrivée, pour ton aide sur les dernières manips et ta bonne humeur.

À Christine avec qui j'ai partagé cette immense salle du labo durant 4 années, pour m'avoir enseigné les fondamentaux de l'extraction d'ARN, pour ta bonne humeur au quotidien.

À Sonia pour m'avoir rappelé que toutes les phrases ne commencent pas par « p***** » et ne finissent pas par « fais c**** », surtout depuis que j'ai une petite fille.

Aux étudiant(e)s que j'ai pu encadrer durant ces années et qui m'ont beaucoup aidé et appris : Agathe, Amira, Léa, Morgane, Lucie et Louis.

Au Dr Pierre Bischoff, pour nos discussions autour de l'autophagie et de la réponse immunitaire. Vous êtes un vrai puits de science.

À Inès, Mélanie et Sandra les drôles de dames de l'oncogénétique.

À Marc Rousseau et l'équipe du cyclotron pour leur aide durant les irradiations.

À Delphine Jarnet, Caroline Noblet et Maud Bronnec pour leur aide lors des irradiations au Novalis Tx.

Au Dr Jean-Christophe Amé, pour ton aide précieuse et tes conseils quand j'étais coincé sur les manips de PARylation.

Aux médecins oncologues et radiothérapeutes de la clinique St-Anne pour m'avoir accueilli avec beaucoup de bienveillance au sein des leurs.

Aux Kneckes : Amandine, Felix, Caroline, Cécile, Matthieu, Marina, Moreau, Nico, Seb, Romain, Sophie, William.

À Patricia et Jean-François pour votre gentillesse envers moi.

À mes Parents, pour leur amour et leur bienveillance.

À mes petits frères, Emran et Bellal.

À Marie et Abel.

À Bibi Jan.

À Adrien et Yvan, votre soutien moral durant cette thèse m'a aidé à aller jusqu'au bout. Vous avez toujours été de bons conseils même si je ne les ai pas toujours suivis (certains avec regrets, d'autres moins). Je sais que nous continuerons à nous voir régulièrement et à travailler ensemble même aux 4 coins de la France.

À Julie, pour ton amour inconditionnel et pour m'avoir soutenu pendant toutes mes années d'études, et ce n'est pas fini...

À Alexie pour m'avoir permis de te bercer au son des résultats de cette thèse mais surtout pour tes conseils durant les derniers jours, principalement à base de voyelles. Cette thèse t'est personnellement dédiée.

Liste des figures et tableaux

Liste des figures :

Figure 1 : Taux d'incidences standardisés estimés pour l'adénocarcinome canalaire pancréatique dans le monde en 2018.

Figure 2 : Taux de mortalité standardisés estimés pour l'adénocarcinome canalaire pancréatique dans le monde en 2018.

Figure 3 : Les voies de signalisation présentant des anomalies dans les PDAC.

Figure 4 : Modèle de progression génétique de l'adénocarcinome pancréatique.

Figure 5 : Évolution des lésions pancréatiques conduisant à l'adénocarcinome pancréatique.

Figure 6 : Prise en charge des adénocarcinomes pancréatiques opérables.

Figure 7 : Schéma de prise en charge des adénocarcinomes pancréatiques localement avancés.

Figure 8 : A : Distribution de dose d'un faisceau de photons et de protons en fonction de la profondeur des tissus sains et tumoraux et B : Superposition de plusieurs pics de Bragg pour obtenir un pic de Bragg étalé en fonction de la profondeur des tissus.

Figure 9 : Schéma de prise en charge des adénocarcinomes pancréatiques métastatiques.

Figure 10 : Effets directs et indirects des rayonnements ionisants provoquant des dommages à l'ADN.

Figure 11 : Dommages induits par les rayonnements ionisants et principales voies de réparation impliquées.

Figure 12 : Mécanisme de réparation par excision de base.

Figure 13 : Trois mécanismes de réparation des cassures double-brins : la recombinaison homologue (HR), la religation non-homologue (NHEJ) et la ligation alternative (Alt-NHEJ)

Figure 14 : Schématisation des différents mécanismes d'action de la gemcitabine.

Figure 15 : De la découverte de la PARylation à l'autorisation de mise sur le marché des inhibiteurs de PARP.

Figure 16 : Classification des 17 PARP et de la PARG.

Figure 17 : Rôle de la PARP dans la réponse aux dommages de l'ADN.

Figure 18 : Principe du ciblage de la PARylation dans les stratégies anticancéreuses.

Figure 19 : Mécanismes impliqués dans la radiosensibilisation par des PARPi.

Figure 20 : Schémas de traitement des souris nude NMRI avec l'olaparib et/ou la gemcitabine et/ou l'irradiation.

Figure 21 : Survie clonogénique (fractions de survie) des lignées cellulaires MIA PaCa-2, BxPC-3, AsPC-1 et PANC-1 en fonction de la concentration de talazoparib (10-1000 nM).

Figure 22 : Immunofluorescence anti-PAR des lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2 et PANC-1 après traitement par DMSO (contrôle), avec le talazoparib (100 nM) ou l'olaparib (1 μ M).

Figure 23 : Courbes de survie clonogénique des lignées cellulaires pancréatiques PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 et MIA PaCa-2 après irradiation et prétraitement par le DMSO, l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM).

Figure 24 : Expression des fractions nucléaires et chromatiniennes de la PARP-1 sur les lignées cellulaires PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 et MIA PaCa-2, en fonction du traitement : DMSO (D), olaparib (1 μ M) (O) et talazoparib (100 nM) (T).

Figure 25 : Pourcentage de cellules avec plus de 10 foci γ H2AX sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM).

Figure 26 : Pourcentage des cellules arrêtées en phase G2/M du cycle cellulaire sur les lignées cellulaires BxPC-3, MIA PaCa-2, AsPC-1 et PANC-1, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM).

Figure 27 : Pourcentage de cellules avec plus de 10 foci 53BP1 sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM).

Figure 28 : Pourcentage de cellules avec plus de 10 foci DNA-PKcs sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 3h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM).

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) des PDAC 8^{ème} édition.

Tableau 2 : Essais cliniques randomisés comparant la radiothérapie exclusive à la chimioradiothérapie.

Tableau 3 : Essais cliniques randomisés comparant la chimiothérapie exclusive à la chimioradiothérapie.

Tableau 4 : Principales mutations des lignées cellulaires pancréatiques.

Tableau 5 : Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence et le western-blot.

Tableau 6 : Pourcentage de cellules positives pour γ H2AX (> 10 foci/cellule) sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM).

Tableau 7 : Pourcentage de cellules positives pour 53BP1 (> 10 foci/cellule) sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM).

Liste des abréviations

5-FU	5-fluorouracile
53BP1	<i>Tumor suppressor p53-binding protein 1</i>
ADEX	<i>Aberrantly differentiated endocrin exocrin</i>
A-NHEJ	<i>Alternative-end joining (ligation alternative)</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADPr	Adénosine diphosphate ribose
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	<i>American Type Cell Collection</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 mutated</i>
BER	<i>Base excision repair</i> (réparation par excision de base)
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
CA19-9	<i>Carbohydrate antigen 19-9</i> (Antigène Carbohydrate19-9)
CDKN2A	<i>Cyclin dependant kinase inhibitor 2A</i>
C-NHEJ	<i>Canonical pathways of non-homologous end joining</i> (jonction non homologue Classique)
CSB	Cassure simple brin
CDB	Cassure double brin
CRT	Chimioradiothérapie
CT	Chimiothérapie
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DCK	Déoxycytidine kinase

DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Milieu de Eagle modifié par Dulbecco)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNAPKcs	<i>DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i>
FRANCIM	Registre français des cancers
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
GLOBOCAN	<i>Global cancer observatory</i>
GTP	Guanosine triphosphate
GTPase	Guanosine triphosphatase
Gy	Gray
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HR	<i>Hazard ratio</i> (Risque relatif)
HR	<i>Homologous recombination</i> (Recombinaison homologue)
HRD	Homologous recombination defect (déficit en recombinaison homologue)
IC95%	Intervalle de confiance à 95%
IP	Iodure de propidium
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MEK	<i>MAP/ERK kinase</i>
MGMT	<i>Methyl guanosine methyl transferase</i>
MMC	Mitomycine C
MRE11	<i>Meiotic recombination 11 homolog 1</i>
MRN	MRE11-Rad50-Nbs1
NAD+	Nicotinamide adénine dinucléotide
OAR	Organe à risque

OMS	Organisation mondiale de la santé
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PARPi	<i>PARP inhibitor</i> (inhibiteur de PARP)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampon phosphate salin)
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> (adénocarcinome canalaire pancréatique)
PFA	Paraformaldéhyde
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i> (Polyfluorure de vinylidène)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Radiothérapie
SBRT	<i>Stereotactic Body Radiotherapy</i> (Radiothérapie stéréotaxique extracrânienne)
SEER	<i>Surveillance, epidemiology and end result</i>
SER	<i>Standard enhancement ratio</i>
SMAD4	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
SMF	Streptozotocine, Mitomycine-C, 5-FU
SVF	Sérum de veau fœtal
TBS	Tris-buffered saline
TCGA	<i>The cancer genome atlas</i>
TDM	Tomodensitométrie
TEL	Transfert d'énergie linéique
XRCC1/4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1/4</i>

Sommaire

PARTIE I : Introduction.....	1
1. L'adénocarcinome canalaire pancréatique	2
1.1. Épidémiologie.....	2
1.2. Incidence et mortalité	2
1.3. Facteurs de risques	4
1.4. Altérations génétiques dans les PDAC	5
1.4.1. KRAS.....	5
1.4.2. CDKN2A.....	6
1.4.3. SMAD4.....	6
1.4.4. TP53.....	6
1.4.5. Apport de l'analyse multi-omics dans la caractérisation moléculaire des PDAC.....	7
1.5. Diagnostic et bilan pré-thérapeutique	10
1.5.1. Clinique	10
1.5.2. Biologie	10
1.5.3. Imagerie	10
1.5.3.1. Tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne.....	10
1.5.3.2. Imagerie par résonance magnétique.....	11
1.5.3.3. Echoendoscopie	11
1.5.4. Diagnostic anatomopathologique	11
1.6. Classification TNM	12
1.7. Traitement	13
1.7.1. Prise en charge des PDAC au stade localisé	13
1.7.2. Prise en charge des PDAC localement avancés	15
1.7.3. Apport des techniques innovantes d'irradiation dans la prise en charge pré- opératoire des PDAC	19
1.7.3.1. La radiothérapie stéréotaxique	19
1.7.3.2. La protonthérapie	20
1.7.4. Prise en charge au stade métastatique	21
1.7.4.1. Première ligne	21

1.7.4.2. Deuxième ligne	22
2. Rationnel biologique de la chimioradiothérapie à base de gemcitabine	24
2.1. Les rayonnements ionisants induisent des dommages à l'ADN	24
2.1.1. Réparation des mésappariements de bases	26
2.1.2. Réparation des cassures simple brin	27
2.1.3. Réparation des cassures double brin	27
2.1.3.1. Recombinaison homologue	27
2.1.3.2. La religature non homologue (c-NHEJ)	28
2.1.3.3. Ligature alternative	28
2.2. La gemcitabine est un agent radiosensibilisant	29
3. La Poly(ADP-ribosylation)	30
3.1. Synthèse du Poly(ADP-ribose)	30
3.2. Superfamille des PARP	31
3.3. Rôle de la PARylation dans la réponse aux dommages de l'ADN	34
3.4. Les inhibiteurs de PARP	36
3.4.1. Traitement en monothérapie : principe de létalité synthétique	36
3.4.2. Combinaisons avec des chimiothérapies	38
3.4.3. Combinaisons avec la radiothérapie	39
PARTIE II : Objectifs de la thèse	41
PARTIE III : Matériels et méthodes	43
1. Les lignées cellulaires pancréatiques	44
2. La culture cellulaire	45
3. Schémas de traitement des analyses <i>in vitro</i>	45
4. Traitements pharmacologiques	45
4.1. Gemcitabine	45
4.2. Inhibiteurs de PARP	46
5. Procédures d'irradiation <i>in vitro</i>	46
6. Test de viabilité cellulaire	46
7. La survie clonogénique	47
8. Co-marquage cycle cellulaire/ γ H2Ax	48

9. Évaluation de la mort cellulaire	48
9.1. Apoptose	48
9.2. Autophagie	49
10. Immunofluorescence	49
11. Piégeage de la PARP-1	51
12. Études <i>in vivo</i>	52
12.1. Xénogreffe des tumeurs sur souris nude NMRI	52
12.2. Groupes de traitement	52
12.3. Traitement par la gemcitabine et/ou l'olaparib	53
12.4. Irradiation <i>in vivo</i>	53
12.5. Évaluation de la croissance tumorale	54
12.6. Extraction et qualification de l'ARN	54
13. Analyse RNA-Seq	54
14. Analyses statistiques	55
PARTIE IV : Revue systématique de la littérature de la radiosensibilisation par des inhibiteurs de voies de réparation de l'ADN dans les cancers du pancréas	56
Résumé PARTIE IV	57
PARTIE V : Évaluation <i>in vitro</i> de la radiosensibilisation par l'olaparib et/ou la gemcitabine de quatre lignées cellulaires d'adénocarcinomes pancréatiques	73
Résumé PARTIE V	74
PARTIE VI : Évaluation <i>in vivo de</i> la radiosensibilisation par l'olaparib et/ou la gemcitabine après irradiation photon ou proton et analyse transcriptomique	98
Résumé PARTIE VI	99
PARTIE VII : Comparaison de la radiosensibilisation par deux inhibiteurs de PARP : rôle du piégeage de la PARP	125
PARTIE VIII : Conclusions générales et perspectives	138
Références	143

PARTIE I

Introduction

PARTIE I : Introduction

1. L'adénocarcinome canalaire pancréatique

1.1. Épidémiologie

Avec environ 460 000 nouveaux cas par an, les données GLOBOCAN 2018 montrent que l'adénocarcinome canalaire du pancréas (PDAC) est le 11^{ème} cancer le plus fréquent dans le monde. En 2018, il est à l'origine d'environ 430 000 décès par an dans le monde [1].

1.2. Incidence et Mortalité

Les données issues des registres du réseau FRANCIM permettent d'estimer l'incidence des PDAC en France. En 2012, en France, l'incidence estimée du PDAC était de 11 662 nouveaux cas avec un ratio homme/femme d'environ 1,5 [2]. En 2018, l'incidence estimée du PDAC était de 14 184 nouveaux cas [3]. Il se situe au 8^{ème} rang des cancers chez l'homme et au 6^{ème} rang chez la femme [4]. L'incidence standardisée est plus importante chez l'homme (5,5/100 000) que chez la femme (4/100 000). De plus, l'incidence augmente avec l'âge indépendamment du sexe. En effet, le pic d'incidence est plus important après 70 ans. Dans le monde, l'incidence du PDAC varie selon les régions (Figure 1). Le taux d'incidence standardisé selon l'âge est le plus important en Europe (7,7/100 000 habitants) et en Amérique du Nord (7,6/100 000 habitants) et le plus bas en Afrique (2,2/100 000 habitants). Ces différences géographiques peuvent être expliquées d'une part par des différences d'exposition à des facteurs environnementaux en fonction des pays, mais aussi par une sous-estimation dans les pays en voie de développement du fait de l'absence d'outils diagnostics adéquats. Enfin, la qualité des registres des cancers varie selon les pays, ce qui peut aussi expliquer ces différences.

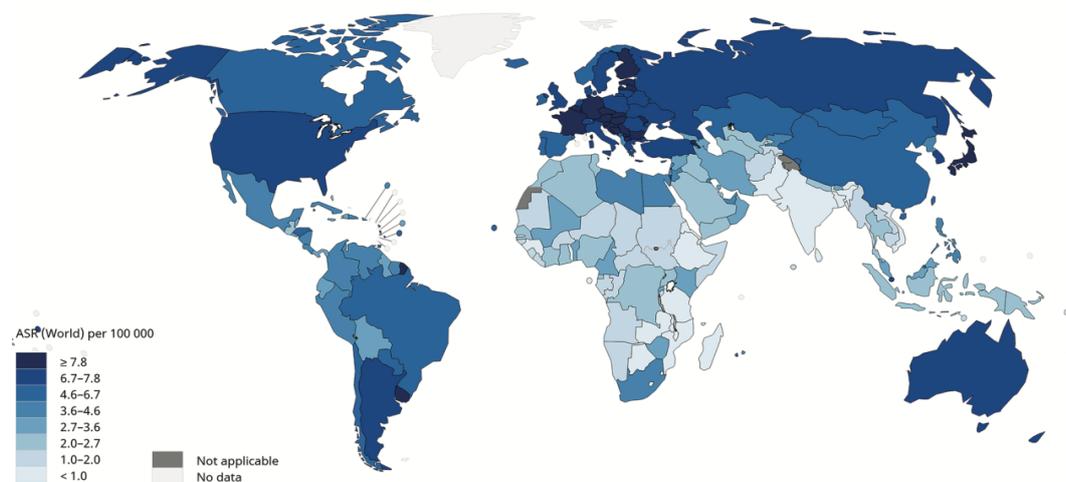


Figure 1 : Taux d'incidences standardisés estimés pour l'adénocarcinome canalaire pancréatique dans le monde en 2018 [5].

Il existe une grande disparité géographique concernant la mortalité par PDAC dans le monde. En effet, en 2018, le taux de mortalité standardisé le plus important se situait en Europe (7,3-7,6/100 000), alors que le taux le plus faible était retrouvé en Afrique (1,4-2,1/100 000). Le PDAC est un des cancers avec le pronostic le plus défavorable. Avec un taux de mortalité standardisé de 4,1 pour 100 000, la mortalité par PDAC est similaire à son incidence (4,2 pour 100 000 personnes) [6].

Durant les dernières années, une augmentation de l'incidence et de la mortalité par PDAC a été observée et ceci indépendamment du sexe, comme le souligne l'analyse de la base de données SEER [7]. Selon l'OMS, il faut s'attendre à une augmentation mondiale de l'incidence de 77,7% et de la mortalité de 79,9% pour la période 2018-2040.

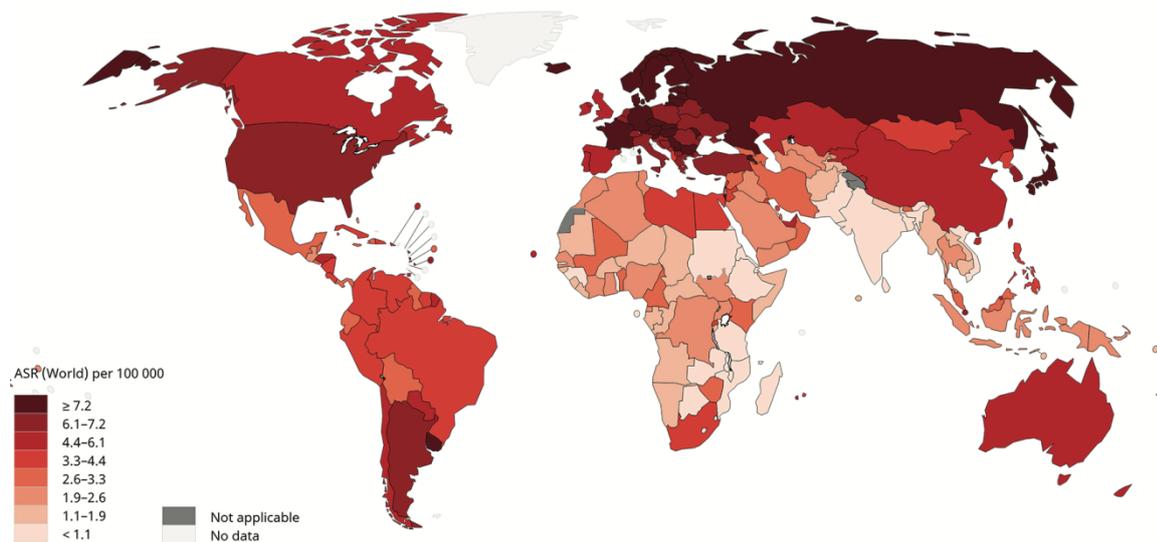


Figure 2 : Taux de mortalité standardisés estimés pour l'adénocarcinome canalaire pancréatique dans le monde en 2018 [5].

Dans le monde, entre 2014 et 2018, la survie globale à 5 ans de l'adénocarcinome canalaire pancréatique, tout stade confondu, a augmenté de 6 à 9%. En France, entre 2005 et 2010, la survie nette à 5 ans était de 8% avec une nette différence selon l'âge (19% chez les patients de moins de 55 ans et 4% chez ceux de plus de 75 ans) [4]. De plus, cette survie varie en fonction du stade au diagnostic avec une survie à 5 ans d'environ 32% pour les patients présentant un cancer localisé et opérable, 12% pour les patients présentant un cancer localement avancé inopérable et de 4% pour les patients métastatiques au moment du diagnostic [8].

1.3. Facteurs de risques

Parmi les facteurs de risque établis, l'âge et le sexe masculin sont retrouvés. Les autres facteurs de risque du PDAC sont assez mal connus.

Le tabac est reconnu comme un facteur de risque majeur [9]. En effet, une analyse combinée de 12 études cas-témoin, ayant inclus 6 507 cas et 12 890 témoins, a montré une multiplication du risque par 2,2 (IC95% : 1,7-2,8) de développer un PDAC chez les patients fumeurs comparativement aux patients non-fumeurs [10]. De plus, ce risque augmente avec le nombre de cigarettes et la durée de l'intoxication tabagique. Enfin, il a été montré que chez les anciens fumeurs, le risque de PDAC était équivalent à celui de la population des non-fumeurs à partir de 20 ans après l'arrêt du tabagisme.

Parmi les facteurs de risque avérés, la pancréatite chronique quelle que soit sa cause, augmente le risque de développer un adénocarcinome du pancréas. En effet, une analyse combinée de dix études cas-témoins portant sur plus de 15 000 patients, a mis en évidence une augmentation du risque de PDAC chez les patients aux antécédents de pancréatite chronique de plus de 2 ans avant le diagnostic de cancer (Odds-ratio = 2,71; IC95% : 1,96-3,74) [11].

Le rôle de l'alcool a longtemps été un sujet débattu comme facteur de risque de PDAC et ceci indépendamment de son rôle démontré comme facteur de risque de pancréatite chronique. Récemment, une analyse combinée de 10 études cas-témoins a montré le rôle d'une consommation importante d'alcool (≥ 9 verres/jour) comme facteur de risque de PDAC (Odds-ratio = 1,65; IC95% : 1,2-2,2) et ceci indépendamment des antécédents de pancréatite chronique [12]. D'autres études ont montré l'impact du mode de vie dans la carcinogénèse pancréatique et notamment de l'alimentation et de l'exercice physique [13,14].

De manière générale, l'obésité est associée à une augmentation du risque de nombreux cancers parmi lesquels le PDAC. Une étude a mis en évidence d'une part que le surpoids (IMC : 25-29,9 kg/m²) et l'obésité (IMC ≥ 30 kg/m²) étaient associés à une augmentation du risque de développer un PDAC, mais aussi que l'obésité au moment du diagnostic était un facteur péjoratif en ce qui concerne la survie globale.

Les PDAC héréditaires concernent environ 10% des adénocarcinomes pancréatiques [15]. Schématiquement, il faut distinguer les cancers s'intégrant dans un syndrome génétique déterminé (15%) et ceux survenant dans un contexte d'agrégation familiale non syndromique (85%). Dans la première population de patients, des syndromes liés à une mutation génétique identifiée à transmission autosomique dominante sont retrouvés, tel que des mutations de

BRCA1/2, des mutations dans la voie de réparation des mésappariements (syndrome de Lynch), ou encore le mélanome familial multiple (CDKN2A/p16). *A contrario*, les PDAC non syndromiques sont définis par la présence d'au moins deux cas chez les apparentés du premier degré sans qu'aucune mutation spécifique ne soit identifiée. Le risque relatif varie de 4 à 32 selon le nombre d'apparentés atteints [2].

1.4. Altérations génétiques dans les PDAC

Plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs sont fréquemment mutés dans les adénocarcinomes pancréatiques. Ces mutations sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation parmi lesquelles les quatre plus fréquentes concernent la voie RAS (KRAS), la voie du TGF- β (SMAD4), le cycle cellulaire (CDKN2A) et l'intégration des dommages à l'ADN (TP53) (Figure 3).

1.4.1. KRAS

L'oncogène KRAS est fréquemment muté dans les adénocarcinomes pancréatiques [16]. Cette mutation apparaît précocement dans la carcinogénèse pancréatique [17,18]. Il s'agit d'une mutation ponctuelle portant majoritairement sur le codon 12 dans plus de 80% des cas (principalement les mutations G12D, G12V et G12A). Cette mutation supprime l'activité GTPase de la protéine et ainsi empêche l'hydrolyse du GTP, ce qui induit qu'elle reste constamment sous sa forme activée [19]. Ceci engendre une sur-activation des protéines d'aval (RAF, MEK) à l'origine de phénomènes de prolifération et d'invasion non contrôlés de la cellule cancéreuse pancréatique.

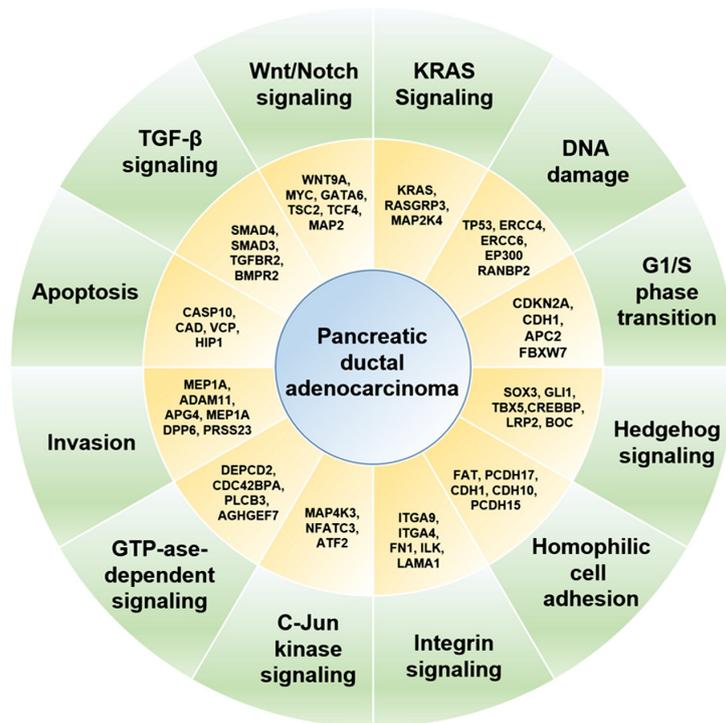


Figure 3 : Les voies de signalisation présentant des anomalies dans les PDAC (d'après Fokas et al.) [18].

1.4.2. CDKN2A

La deuxième modification génique fréquemment observée dans les lésions précancéreuses telles que les néoplasies intra-épithéliales est l'inactivation du gène suppresseur de tumeur CDKN2A, principalement par délétion homozygote [20]. Le gène CDKN2A code pour une protéine p16 qui permet le contrôle du passage en G1/S.

1.4.3. SMAD4

SMAD4 est un gène suppresseur de tumeur inactivé dans plus de 50% des adénocarcinomes du pancréas, soit par mutation d'un allèle associée à une délétion de l'autre allèle, soit par délétion homozygote [21]. La protéine SMAD4 est impliquée dans la translocation du signal depuis le récepteur des ligands du TGF- β vers le noyau et agit comme cofacteur de transcription. Des études récentes ainsi qu'une méta-analyse ont montré que les mutations/délétions de SMAD4 étaient associées à un pronostic défavorable et particulièrement en cas de présence d'une atteinte ganglionnaire et métastatique [22].

1.4.4. TP53

Le gène suppresseur de tumeur TP53 est muté dans environ 50% des adénocarcinomes pancréatiques. Cette mutation apparaît plus tardivement dans la carcinogénèse pancréatique [23].

Comme présentée dans les figures 4 et 5, c'est l'accumulation de mutations successives au sein des cellules pancréatiques qui conduit à l'apparition de lésions précancéreuses (PanIN1-3). Ainsi, comme mentionné précédemment, ce sont les mutations de KRAS qui apparaissent le plus précocement et ceci dès le stade PanIN-1. Par la suite, l'inactivation de CDKN2A puis de TP53 induit l'évolution vers des stades de PanIN plus avancés. Puis les mutations de SMAD4 apparaissent plus tardivement. Parallèlement à cela, il existe de nombreuses anomalies épigénétiques et des altérations dans l'expression d'ARN non codants [24].

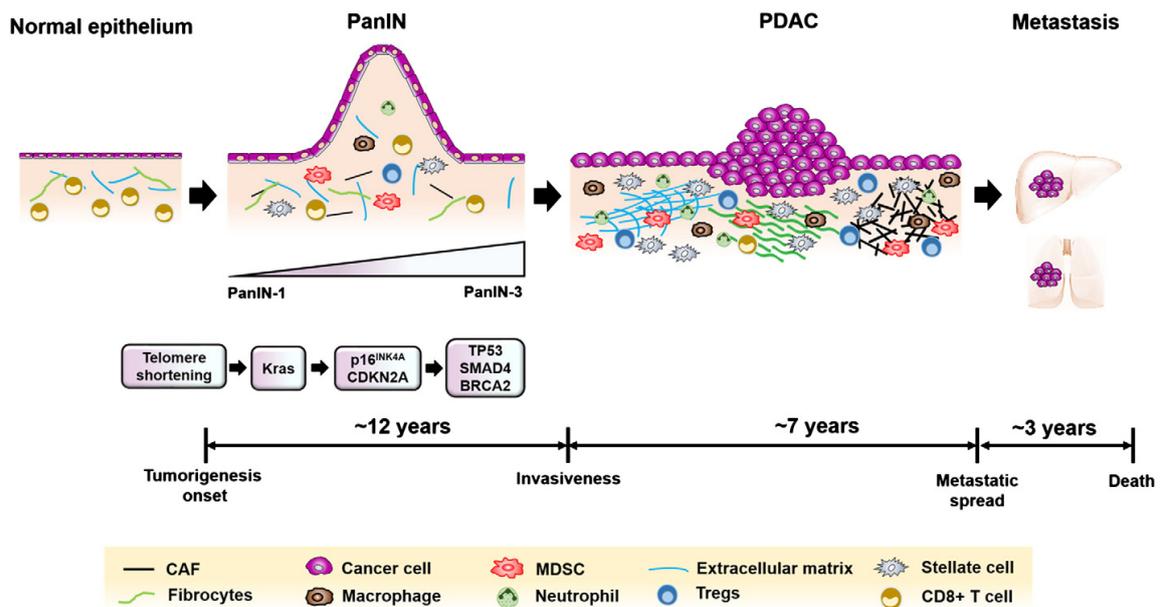


Figure 4 : Modèle de progression génétique de l'adénocarcinome pancréatique (d'après Fokas et al.) [18].

1.4.5. Apport de l'analyse multi-omics dans la caractérisation moléculaire des PDAC

Les analyses par puces à ADN ont permis, dans certains types de cancers, une meilleure classification par sous-typage moléculaire et ainsi de séparer les patients avec des pronostics différents [25]. Cependant, compte tenu du nombre défini de gènes exploré, leur intérêt est parfois limité. Les techniques de séquençage de nouvelle génération, *Next Generation Sequencing* (NGS), permettent l'exploration de l'ensemble des gènes de manière non supervisée. Depuis l'avènement des techniques de séquençage haut débit, de nombreuses études se sont intéressées à la compréhension des altérations moléculaires retrouvées dans les PDAC [20,26,27].

Comme décrit précédemment, de nombreux oncogènes tel que KRAS et des gènes suppresseurs

de tumeurs tels que CDKN2A, P53 et SMAD4 ont été retrouvés mutés de façon précoce dans la carcinogénèse pancréatique. En plus de ces quatre principaux gènes, il existe 24 autres gènes avec une fréquence mutationnelle supérieure à 3,5% [28]. Ceci met en évidence la grande hétérogénéité génétique des PDAC.

A partir des données de séquençage du génome entier de 100 PDAC, Waddell *et al.* ont proposé une classification en 4 groupes selon une approche basée sur la caractérisation des variations de structures des chromosomes [20] :

- Un groupe stable (20 %) présentant un faible nombre d'événements génomiques (≤ 50) et une aneuploïdie suggérant des anomalies dans la mitose.
- Un groupe instable (14%) présentant plus de 200 événements génomiques.
- Un groupe réarrangement intermédiaire (36%) avec un nombre d'événements génomiques compris entre 50 et 200, correspondants à des dégâts chromosomiques récurrents.
- Un groupe présentant un profil génomique localement réarrangé (30%) avec gain/amplification de gènes (1–2 % des cas) et des réarrangements de type de chromothripsie.

Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence des anomalies dans les voies de réparation de l'ADN dans la population de patients du « groupe instable » chez lesquels, une instabilité chromosomique majeure (réarrangements chromosomiques, amplifications et délétions) était trouvée [20]. Le niveau de complexité de ces anomalies chromosomiques a été corrélé à la réponse au cisplatine, agent endommageant l'ADN [20]. Les auteurs ont montré que 71% de ces tumeurs avec un profil instable présentaient des anomalies dans la voie de recombinaison homologe (signature HRD ou BRCAness). En effet, le profil BRCAness est défini comme un défaut de réparation par la voie de recombinaison homologe dû, soit à une mutation de BRCA1/2, soit à un autre gène impliqué dans cette réparation. Ces données ont été corroborées plus récemment par Connor *et al.* qui ont mis en évidence, après séquençage du génome complet de 148 tumeurs pancréatiques, la présence d'une signature de type BRCAness chez 12% des patients [29]. Les auteurs ont montré que ces tumeurs semblaient présenter une majoration de l'infiltrat inflammatoire intratumoral, les rendant possiblement sensibles aux immunothérapies.

D'autres auteurs se sont intéressés aux profils d'expression des ARN dans les cancers pancréatiques [27,30–32]. Tout d'abord, Collison *et al.* ont identifié 3 sous-types de PDAC basés sur une analyse transcriptomique de 27 tumeurs [32] :

- Le sous-type « classique » exprimant des gènes associés à la différenciation épithéliale, de bon pronostic.
- Le sous-type « exocrine-like » exprimant les gènes en rapport avec une différenciation exocrine, de pronostic intermédiaire.
- Le sous-type « quasi-mésenchymal » exprimant de nombreux gènes de la transition épithélio-mésenchymateuse, de mauvais pronostic.

L'analyse transcriptomique faite par Moffit *et al.* retrouvait particulièrement 2 sous-types moléculaires dont un de pronostic défavorable : le sous-type «basal-like» avec une survie globale médiane de 19 mois vs 11 mois pour le sous-type «classique» (HR = 1,89; IC95% : 1,19-3,02) [31].

Plus récemment, Bailey *et al.* ont proposé une classification en 4 sous-types à partir d'une étude transcriptomique sur 96 tumeurs pancréatiques [27]:

- Le sous-type « squameux » est caractérisé par l'expression de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie et dans l'inflammation.
- Le sous-type « progéniteur pancréatique », caractérisé par un réseau transcriptionnel impliqué dans le développement des cellules dérivées des cellules progénitrices embryonnaires. Il se rapproche en partie des PDAC dits «classiques».
- Le sous-type « *aberrantly differentiated endocrin exocrin (ADEX)* », équivalent au sous-type « exocrine-like », caractérisé par l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules acinaires.
- Le sous-type « immunogénique », associé à la présence d'un infiltrat immunitaire riche en lymphocytes. Ce sous-type surexprime également les molécules de surface membranaires telles que CTLA-4 et PD-1, suggérant l'intérêt des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire.

Cependant, une analyse récente du consortium *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* a ajusté les résultats en fonction de la richesse des échantillons en cellules tumorales et a montré que les sous-types « ADEX » et « immunogénique » n'étaient retrouvés que dans des échantillons pauvres en cellules tumorales, suspectant ainsi une contamination par des cellules pancréatiques normales ou des cellules du système immunitaire [24].

Le transcriptome est défini par l'ensemble des transcrits d'une cellule, qu'ils soient codants ou non-codants. L'analyse du transcriptome par des méthodes de séquençage haut débit a permis l'acquisition de données d'expression de gènes à l'échelle pangénomique de la même façon que les approches antérieures utilisant des puces à ADN. Son principal avantage est aussi de permettre la mise en évidence de nouveaux transcrits, tels que des variants d'épissage ou encore

des transcrits alternatifs [33]. Enfin, l'analyse transcriptomique a aussi pu permettre d'identifier des ARN non codants, tels que des miRNA ou lncRNA associés à la progression tumorale ou au pronostic [24].

1.5. Diagnostic et bilan pré-thérapeutique

1.5.1. Clinique

Cliniquement, les PDAC sont longtemps asymptomatiques, ce qui engendre un retard de diagnostic. De plus, les premiers signes cliniques de la maladie sont très souvent aspécifiques avec une altération de l'état général, une anorexie et une asthénie. Environ 70 à 80% des adénocarcinomes pancréatiques concernent la tête du pancréas et sont plus rapidement symptomatiques que ceux situés dans la queue du pancréas [34]. En effet, un ictère peut apparaître précocement du fait de la compression de la voie biliaire principale par la tumeur. La douleur est le plus souvent intense, classiquement épigastrique, transfixiante, due à l'envahissement du plexus coeliaque par la tumeur et nécessite une prise en charge par des antalgiques de palier 3. D'autres signes cliniques apparaissent plus tardivement tels qu'une ascite en rapport avec une carcinose péritonéale.

1.5.2. Biologie

Sur le plan biologique, une cholestase non spécifique peut être observée avec élévation de la bilirubine conjuguée, des phosphatases alcalines et de la gamma-glutamyl transpeptidase (γ GT). Les anomalies du bilan hépatique telles que la cytolyse sont le plus souvent associées à la présence de métastases hépatiques. Dans ce cas, une élévation du dosage sérique du CA19-9 est observée chez plus de 80% des patients. Cependant, sa spécificité est faible et elle n'a pas de valeur diagnostique [35]. Elle doit être interprétée avec précaution, et ceci notamment en présence d'une cholestase, d'une pancréatite chronique ou d'une cirrhose associée.

1.5.3. Imagerie

1.5.3.1. Tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne

Bien que l'échographie abdominale soit souvent l'examen de première intention en cas de suspicion de PDAC, elle reste dépendante de l'opérateur et évalue mal les lésions pancréatiques, du fait de l'interposition de gaz et parfois de la corpulence des patients [36]. Ce sont le plus souvent des signes indirects qui orientent le diagnostic : dilatation de la voie biliaire principale,

des voies biliaires intrahépatiques, dilatation du canal de Wirsung, voire métastases hépatiques ou présence d'ascites. Ainsi, une fois un PDAC suspecté, la tomodensitométrie thoraco-abdomino-pelvienne en coupe fine avec injection de produit de contraste est l'examen de choix dans le bilan [37]. Elle met en évidence un syndrome de masse tumorale intra-pancréatique avec une lésion le plus souvent spontanément hypodense mais parfois isodense. Après injection de produit de contraste iodé, la glande normale se rehausse au temps parenchymateux, alors la tumeur apparaît faiblement hypodense. Cette technique permet de rechercher des signes indirects tels qu'une dilatation des voies biliaires, une dilatation du canal pancréatique, mais aussi parfois une atrophie du parenchyme en amont. De plus, elle permet de rechercher des lésions secondaires à distance (foie, poumon et carcinose péritonéale). Au-delà de la stadification initiale, cet examen permet aussi d'évaluer le degré d'atteinte vasculaire et ainsi le potentiel de extirpabilité tumorale.

1.5.3.2. Imagerie par résonance magnétique

Le principal avantage de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) pancréatique est sa meilleure sensibilité pour les tumeurs pancréatiques de petites tailles ou isodenses à la tomodensitométrie (TDM) [38]. De plus, les séquences de diffusion permettent de rechercher des localisations secondaires hépatiques infracentimétriques [39]. Au-delà de ces considérations, ses performances sont proches de celle d'une TDM multicoupe. C'est pour ces raisons que l'IRM n'est pas recommandée en première intention dans le diagnostic et le bilan pré-thérapeutique des tumeurs pancréatiques [39].

1.5.3.3. Echoendoscopie

Le principal intérêt de l'échoendoscopie est de permettre le diagnostic et le bilan d'extension, en particulier pour les tumeurs céphaliques. Elle peut procéder à des biopsies écho-guidées si besoin. Elle permet aussi d'apprécier les rapports de la masse avec les axes vasculaires, notamment les vaisseaux mésentériques supérieurs, avec une sensibilité de 80% [40]. Bien que cet examen soit informatif, il reste opérateur-dépendant.

1.5.4. Diagnostic anatomopathologique

Le diagnostic anatomopathologique doit impérativement être obtenu avant de commencer le traitement [39]. Le site le plus accessible à la biopsie doit être préféré. C'est particulièrement le cas des métastases hépatiques. En cas de biopsie pancréatique, la biopsie par voie écho-

endoscopique doit être préférée à la biopsie par voie pariétale [41]. Une biopsie positive permet de confirmer le diagnostic d'adénocarcinome pancréatique et ainsi d'éliminer les diagnostics différentiels. Au contraire, une biopsie négative ne permet pas d'éliminer le diagnostic d'adénocarcinome pancréatique et nécessite de reprendre les explorations avec de nouvelles biopsies principalement par voie échographique.

Bien qu'il existe différents types de cancers du pancréas, ce travail de thèse va s'intéresser à la forme la plus fréquente, présent dans 85% des cas : l'adénocarcinome pancréatique issu des cellules exocrines du pancréas [5]. Ce type de cancer provient de la progression de lésions situées au niveau des canaux pancréatiques (Figure 5) [42]. Ses capacités d'invasion lui confèrent un fort potentiel métastatique [43]. Les autres types de cancers pancréatiques sont issus des cellules endocrines du pancréas et forme la famille des cancers du pancréas neuroendocrine.

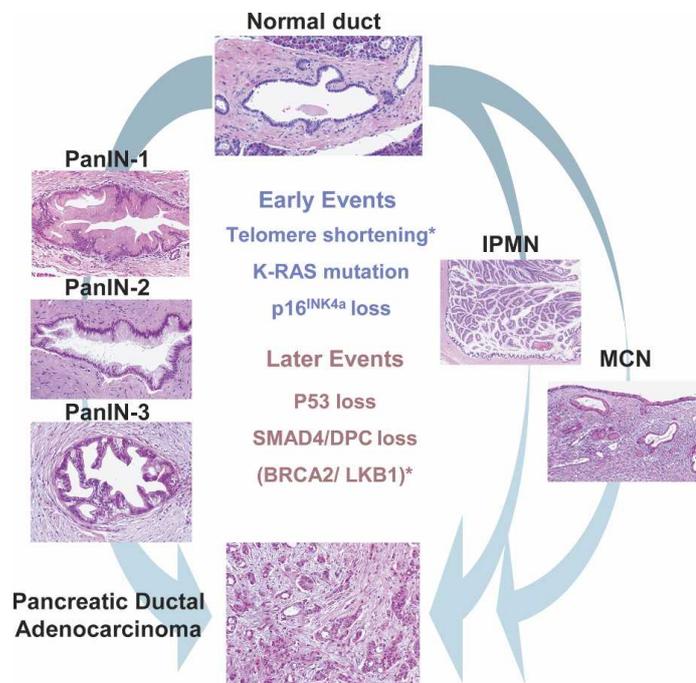


Figure 5 : Évolution des lésions pancréatiques conduisant à l'adénocarcinome pancréatique [44].

1.6. Classification TNM

Comme dans la plupart des tumeurs solides, il existe une classification TNM des carcinomes pancréatiques (Tableau 1). Cette classification a été réactualisée en 2017 (8^{ème} édition) [45]. La définition des adénopathies régionales n'est pas la même selon que la tumeur se situe au niveau de la tête, du corps ou de la queue du pancréas.

Primary tumor (T)		Regional lymph nodes (N)		Distant metastases (M)	
T1	Maximum tumor diameter ≤ 2 cm	N0	No regional lymph node metastasis	M0	No distant métastasis
T2	Maximum tumor diameter > 2 cm but ≤ 4 cm	N1	Metastasis in 1–3 regional lymph nodes	M1	Distant metastasis
T3	Maximum tumor diameter > 4 cm	N2	Metastasis in ≥ 4 regional lymph nodes		
T4	Tumor involves the celiac axis or the superior mesenteric artery (unresectable primary tumor)				
Stage					
Stage 1A		T1	N0	M0	
Stage 1B		T2	N0	M0	
Stage 2A		T3	N0	M0	
Stage 2B		T1–T3	N1	M0	
Stage 3		Any T	N2	M0	
		T4	Any N		
Stage 4		Any T	Any N	M1	

Tableau 1 : Classification TNM (Tumor, Node, Metastasis) des PDAC 8^{ème} édition [45].

En pratique, la classification thérapeutique des adénocarcinomes pancréatiques dépend de la l’extirpabilité de la tumeur et de la présence ou non de métastase. Ainsi, les tumeurs sont classées en cancers extirpable, à la limite de l’extirpable (borderline), localement avancé ou métastatique [39].

1.7. Traitement

Compte tenu de l’absence de symptomatologie au stade précoce, le PDAC est souvent diagnostiqué tardivement, si bien qu’au moment du diagnostic, seuls 20% des patients présentent une tumeur localisée sans métastase à distance. Par ailleurs, 50% des patients sont diagnostiqués initialement au stade métastatique et 30% des patients se présentent avec une tumeur localement avancée non métastatique. La prise en charge thérapeutique va dépendre du stade de la maladie.

1.7.1. Prise en charge thérapeutique des PDAC au stade localisé

La chirurgie est le traitement de référence des PDAC localisés [46]. Cependant, une majorité des patients (50-86%) vont présenter des rechutes locales, intra-péritonéales et/ou métastatiques (hépatique) et ceci du fait de la présence de micrométastases dès le stade précoce de la maladie [47]. Ainsi, les stratégies thérapeutiques adjuvantes et néoadjuvantes telles que la chimiothérapie (CT) ou la chimioradiothérapie (CRT) peuvent se justifier. Cependant, d’après les recommandations publiées récemment, les patients présentant un PDAC localisé et opérable, doivent bénéficier d’un traitement chirurgical en première intention suivi d’une CT adjuvante (Figure 6). Une alternative est de faire une chimiothérapie néoadjuvante dans le cadre d’un essai clinique.

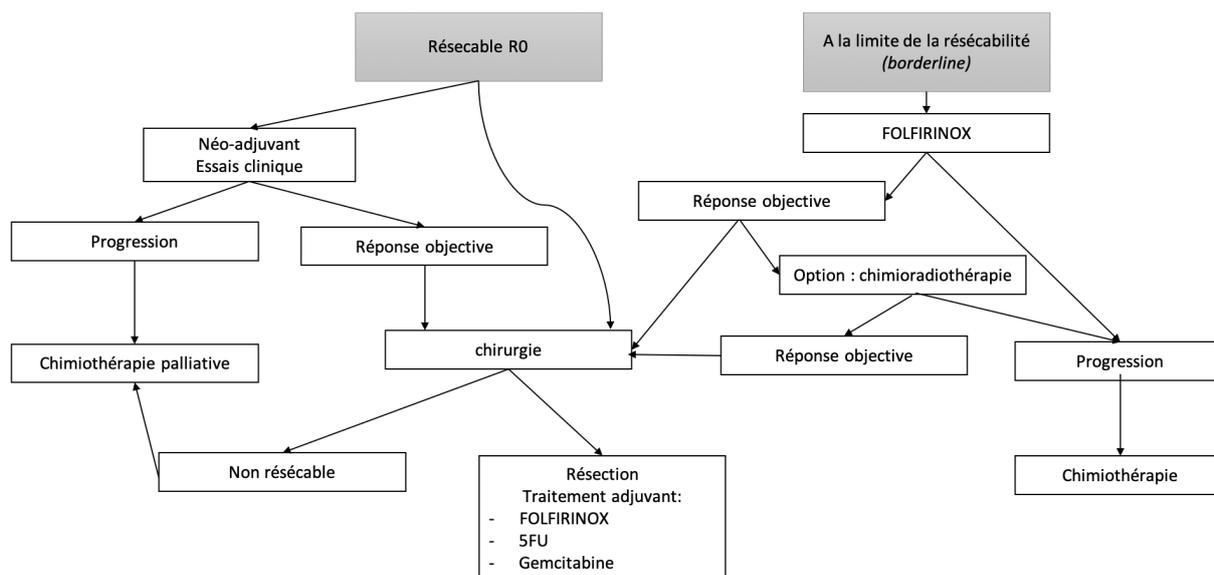


Figure 6 : Prise en charge des adénocarcinomes pancréatiques opérables (adapté de Neuzillet et al.) [39].

De nombreuses études ont évalué l'utilisation de CT adjuvante après traitement chirurgical et ont montré une amélioration de la survie, comparativement à l'absence de traitement. L'essai CONKO-001 a comparé le traitement par gemcitabine comparativement au placebo et a mis en évidence une amélioration de la survie sans maladie (13,4 vs 6,9 mois) [48]. Cette différence est retrouvée dans l'ensemble des sous-groupe (R1 et/ou N+). L'actualisation des résultats avec un suivi médian de 136 mois a montré une amélioration de la survie globale (22,8 vs 20,2 mois; HR=0,76 IC95% : 0,61-0,95 ; P=0,01) avec le traitement adjuvant par gemcitabine [49]. L'essai ESPAC-3 a mis en évidence une survie globale comparable entre les bras CT adjuvante par gemcitabine et 5-fluorouracile (5-FU) (23,6 vs 23,0 mois), mais avec un taux d'effets indésirables plus important dans le bras 5-FU (14% vs 7,5% ; P<0,001) [50]. Plus récemment, l'essai ESPAC-4 a randomisé 730 patients entre un traitement adjuvant par gemcitabine en monothérapie et une bithérapie par gemcitabine et capécitabine. Les investigateurs ont pu montrer un bénéfice en survie globale dans la population de patients traitée par la bithérapie (28 vs 25,5 mois HR=0,83; IC95% : 0,68-0,98 ; P=0,032), faisant de cette bithérapie une nouvelle option thérapeutique dans le traitement adjuvant après résection chirurgicale [51]. L'adjonction d'une radiothérapie concomitante à une chimiothérapie adjuvante a été évaluée dans plusieurs essais cliniques randomisés mais l'interprétation est actuellement difficile compte tenu de l'utilisation d'anciennes techniques d'irradiations [52,53]. L'essai thérapeutique le plus récent est l'essai RTOG 9704 comparant l'ajout d'une CT adjuvante par

gemcitabine ou 5-FU à une CRT adjuvante par 5-FU. La dose totale de l'irradiation était de 50,4 Gy en 28 fractions de 1,8 Gy, 5 jours par semaine. Les auteurs n'ont pas trouvé de différences statistiquement significatives en survie globale dans le groupe gemcitabine, comparativement au groupe 5-FU [54]. Cependant le design de cette étude dont le but était de comparer deux schémas de CT adjuvantes ne permet pas d'évaluer l'intérêt d'une CRT adjuvante à une résection chirurgicale. L'essai randomisé de phase III ESPAC-1 avait pour objectif d'évaluer l'apport d'une CRT adjuvante à base de 5-FU, comparativement à une CT adjuvante exclusive [55]. Cet essai a mis en évidence une diminution de la survie globale dans le bras CRT comparativement au bras CT (15,9 vs 20,1 ; $P=0,05$), suggérant un effet délétère de la CRT adjuvante. Cependant, cette étude présentait certaines limitations, telles qu'une irradiation faite selon des modalités anciennes (2D et 3D) et une absence de contrôle qualité de la radiothérapie. Ainsi, jusqu'à une publication récente, seule une CT à base de gemcitabine ou 5-FU en traitement adjuvant des PDAC réséqués pouvait se justifier sans qu'un bénéfice par rapport à une CRT soit démontré.

Récemment, Conoy *et al.* ont publié les résultats d'un essai clinique randomisé de phase III comparant une CT adjuvante par gemcitabine (1000 mg/m²; J1,J8,J15; J1=J28) à une CT par FOLFIRINOX modifié (Irinotecan: 150 mg/m²; Oxaliplatine: 85 mg/m²; 5-FU: 2400 mg/m²; Leucovorin: 400 mg/m², J1=J15) sur une durée de 6 mois [56]. Avec un suivi médian de 33,6 mois, le schéma FOLFIRINOX améliorait de manière significative la durée de survie sans maladie (HR=0,58; IC95%=0,46-0,73 $P<0,001$) et la survie globale (HR=0,64; IC95%=0,48-0,86; $P=0,003$). Ainsi, après un traitement chirurgical pour les patients en bon état général (OMS0-1), le schéma FOLFIRINOX modifié serait préférable à la gemcitabine [57]. L'étude de phase II PRODIGE 44-PANDAS, actuellement en cours, comparant une CT d'induction par FOLFIRINOX suivie ou non d'une CRT avant la chirurgie chez les patients présentant un adénocarcinome à la limite de l'extirpable, devrait permettre d'apporter des arguments en faveur d'un traitement néo-adjuvant.

A partir de l'ensemble de ces données, des recommandations ont été formulé récemment et sont présentée de manière schématique dans la figure 6.

1.7.2. Prise en charge des PDAC localement avancés

Environ 30% des patients se présentent avec un PDAC localement avancé, c'est-à-dire non extirpable mais ne présentant pas de métastases à distance. Plusieurs essais randomisés ont évalué le bénéfice de la CRT comparativement à la CT ou à la radiothérapie seule (RT) [58].

Trois essais randomisés ont montré l'intérêt d'une CRT comparativement à une RT exclusive (Tableau 2). Tout d'abord, un essai de la Mayo Clinic a randomisé 64 patients entre une RT exclusive (35-40 Gy) et une CRT selon les mêmes modalités de radiothérapie associée à une CT par 5-FU. Les auteurs ont mis en évidence un bénéfice en survie globale en faveur du bras de chimioradiothérapie (10,3 vs 6,3 mois) [59]. Par la suite, le «*Gastrointestinal Tumor Study Group*» (GITSG) a comparé trois modalités, une RT exclusive de 60 Gy en «*split course*», une CRT selon les mêmes modalités de radiothérapie et une chimiothérapie par 5-FU et une CRT à 40 Gy en «*split course*» avec une chimiothérapie par 5-FU. Le bras de traitement RT seule a dû être cloturé prématurément compte tenu de la différence majeure de survie globale à un an comparativement aux bras CRT (10 vs 40 %) [60]. Plus récemment, le «*Eastern Cooperative Oncology Group*» a publié les résultats de l'essai randomisé ECOG-8282 comparant une RT exclusive (59,4 Gy) et une CRT concomitante associant 5-FU et mitomycine-C. Les auteurs ont montré l'absence de différence significative en terme de survie globale entre le bras RT (7,1 mois) et CRT (8,4 mois) [61].

Etude	Traitement	Nombre de patients	Récidive locale	Survie sans maladie	Survie globale
Mayo Clinic 1969	RT (35-40 Gy) + placebo	32	NR	NR	6,3 mois
	RT (35-40 Gy) + 5-FU	32			10,3 mois
GITSG 1981	RT (60 Gy)	25	24%	2,9 mois	5,3 mois
	RT (40 Gy) + 5-FU	83	26%	7,0 mois	9,7 mois
	RT (60 Gy) + 5-FU	86	27%	7,6 mois	9,3 mois
ECOG 2005	RT (59,4 Gy)	49	NR	5,0 mois	7,1 mois
	RT (59,4 Gy) + 5-FU + MMC	55		5,1 mois	8,4 mois

Tableau 2 : Essais cliniques randomisés comparant la radiothérapie exclusive à la chimioradiothérapie. RT : radiothérapie exclusive, 5-FU : 5-fluorouracile, MMC : mitomycine C, NR : non renseigné.

Par la suite de nombreuses études se sont intéressées d'une part à la comparaison de la CRT avec la CT exclusive et d'autre part à la comparaison entre différents régimes de CRT (Tableau 3) [62–65]. Une méta-analyse récente d'essais cliniques prospectifs a mis en évidence que

l'ajout d'une CRT après une CT d'induction n'améliorait pas la survie globale à 1 an, comparativement à une CT exclusive [66]. Cependant des essais randomisés récents ont pu montrer un bénéfice en contrôle local de l'association CRT comparativement à la CT exclusive [67]. Concernant les schémas de CT associées, plusieurs méta-analyses ont comparé les CT à base de 5-FU ou gemcitabine et ont conclu pour certaines à un bénéfice de l'association avec la gemcitabine et pour d'autres à une équivalence [68,69]. Toutefois, l'ensemble de ces études vont dans le sens d'une augmentation de la toxicité digestive et hématologique, en défaveur de la gemcitabine comparativement au 5-FU. La CT exclusive est une option thérapeutique dans les PDAC localement avancés. Les poly-chimiothérapies actuellement utilisés pour les patients métastatiques (FOLFIRINOX, gemcitabine et nab-paclitaxel) pourraient permettre d'augmenter les taux de réponses et d'améliorer la survie globale [70].

Dans les années 1980, deux essais cliniques (GITSG 1988 et ECOG 1985) ont comparé la CRT à la CT exclusive pour les patients présentant un adénocarcinome pancréatique localement avancé. Seul l'essai du GITSG a montré un bénéfice en ce qui concerne la survie globale, au prix d'une toxicité plus importante dans le groupe chimioradiothérapie. Cependant ces essais ont été conduit avant l'ère de la gemcitabine. Ainsi, plus récemment, l'essai de la FFCD/SFRO a évalué une CT exclusive par gemcitabine à une CRT à base de 5-FU et cisplatine avec une dose de RT de 60 Gy suivi d'une CT adjuvante par gemcitabine [63]. Cent dix-neuf patients ont été randomisées et l'étude a mis en évidence une augmentation de la survie globale dans le groupe gemcitabine comparativement au groupe CRT (survie médiane 13 mois vs 8,6 mois; P=0.03). Il est important de noter que du fait d'une toxicité plus importante en cours de la CRT, seulement 42,4% des patients ont pu recevoir plus de 75% de la dose de CT ou de RT. De plus, dans le groupe CRT, le nombre de cures de gemcitabine en maintenance était statistiquement plus faible (6 vs 10) comparativement au groupe sans RT. Enfin, la dose cumulée de gemcitabine était aussi plus faible dans le groupe avec RT comparativement au groupe de CT seule (6845 vs 15000 mg/m²). Ces données pourraient expliquer la différence observée entre les deux groupes de traitement.

Etude	Traitement	Nombre de patients	Récidive locale	Survie sans maladie	Survie globale	
GITSG 1988	RT (54 Gy) + 5-FU puis SMF	22	45%	NR	9,7 mois	P<0,02
	SMF	21	48%		7,4 mois	
ECOG 1985	RT (40 Gy) + 5-FU puis 5-FU	47	32%	NR	8,3 mois	NS
	5-FU	44	32%		8,2 mois	
FFCD/SFRO 2008	RT (60 Gy) + 5-FU + CDDP puis Gem	59	64%	NR	8,6 mois	P=0,03
	Gem	60	72%		13 mois	
ECOG 2011	RT (50,4 Gy) + Gem puis Gem	34	12%	6,3 mois	11 mois	P=0,017
	Gem	37	30%	6,1 mois	9,2 mois	

Tableau 3 : Essais cliniques randomisés comparant la chimiothérapie exclusive à la chimioradiothérapie. RT : radiothérapie, 5-FU : 5-fluorouracile, SMF : Streptozotocine, Mitomycine C et 5-FU, CDDP : cisplatine, Gem : Gemcitabine.

Plus récemment, les approches basées sur la CT d'induction suivie d'une CRT ont été évaluées. Il est notable que la CRT ne peut être proposée qu'en absence de progression tumorale. Cette approche permet de sélectionner les patients qui ne présenteront pas d'évolution métastatique en cours de CT d'induction et qui pourront potentiellement bénéficier d'une intensification locorégionale avec une chimioradiothérapie. Cette stratégie thérapeutique a été évaluée par l'essai clinique randomisé de phase III LAP07 [67]. Cet essai randomisait dans un premier temps 442 patients entre un traitement d'induction par gemcitabine ou gemcitabine et erlotinib. Puis, parmi les patients n'ayant pas progressé sous le traitement d'induction, une deuxième randomisation avait lieu entre une CRT (54 Gy et capécitabine) ou la même CT que durant la phase d'induction. Le critère de jugement principal était la survie globale à partir de la première randomisation. Avec un suivi médian de 36 mois, la survie médiane n'était significativement pas différente entre le bras CRT et CT (15,2 vs 16,5 mois ; HR=1,03 ; IC95% : 0,79-1,34; P=0,83). Cependant, les patients qui avaient reçu une CRT présentaient une diminution significative du risque de récurrence locale (32%) comparativement à ceux qui avaient reçu une CT exclusive (46% ; P=0,03). Une des limitations de cet essai est lié au fait que son *design* avait été fait avant l'ère du FOLFIRINOX (5-FU, Oxaliplatine, Irinotecan). En effet, les essais de phase III PRODIGE-4/ACCORD-11 et MPACT effectués par la suite, ont montré la

supériorité respectivement du schéma FOLFIRINOX et du nab-paclitaxel pour les patients présentant un PDAC localement avancé ou métastatique [71,72].

A partir de l'ensemble de ces données, des recommandations ont été formulées récemment et sont présentées de manière schématique dans la figure 7.

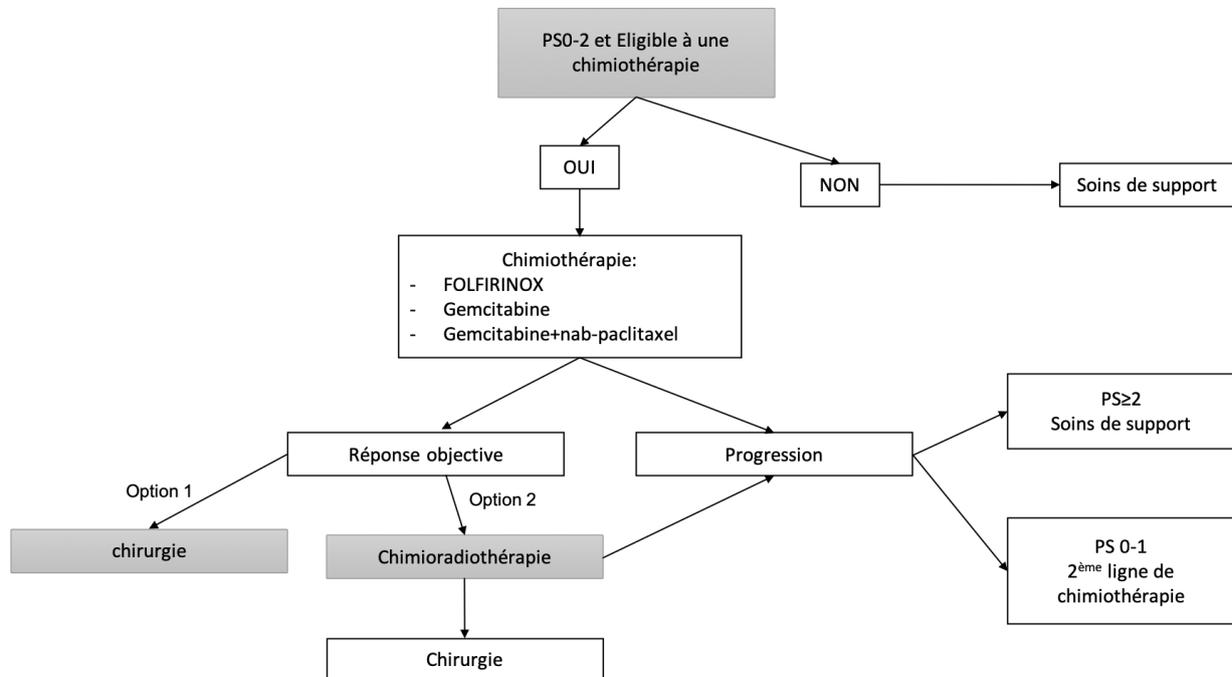


Figure 7 : Schéma de prise en charge des adénocarcinomes pancréatiques localement avancés adapté de Neuzillet et al. [39].

1.7.3. Apport des techniques innovantes d'irradiation dans la prise en charge préopératoire des PDAC

Il est notable que les adénocarcinomes pancréatiques présentent une radiorésistance intrinsèque. Plusieurs possibilités permettent de contourner cette problématique: la radiothérapie stéréotaxique (SBRT) et la protonthérapie.

1.7.3.1. La radiothérapie stéréotaxique

La SBRT a pour objectif d'augmenter la dose par fraction et ainsi d'augmenter l'équivalence biologique. Une revue systématique de la littérature avec analyse combinée a permis de montrer une bonne tolérance du traitement (10% toxicité de grade 3) mais aussi une survie médiane comparable aux essais de CRT concomitante d'environ 17 mois. Toutefois, une grande hétérogénéité des fractionnements et des étalements utilisés est notable [73].

1.7.3.2. La protonthérapie

Contrairement à la RT par photons, la protonthérapie possède l'avantage balistique lié au pic de Bragg. En effet, les protons déposent peu d'énergie en début de parcours mais un maximum en fin de parcours avec une chute de l'énergie rapide, expliquant la protection des organes qui sont au-delà du pic de Bragg [74]. De plus, la protonthérapie a montré une augmentation de l'efficacité biologique comparativement aux photons, principalement lié au transfert d'énergie linéique (TEL), correspondant à l'énergie déposée par les particules par unité de distance ($\text{keV}/\mu\text{m}$) [75]. La figure 8A illustre que pour obtenir une dose suffisante au sein de la tumeur, la dose déposée en surface par les photons est plus importante, sachant que la dose délivrée par les photons diminue en fonction de la profondeur, induisant une dose plus importante au niveau des organes à risques (OAR). Contrairement à cela, les protons délivrent la dose à une profondeur donnée en fonction de leur énergie. En effet, en traversant un milieu homogène, du fait de leur charge et de leur masse, les protons perdent peu d'énergie et déposent la grande majorité de leur énergie avant leur arrêt, expliquant la présence du pic de Bragg. Le pic de Bragg étroit ne permet pas d'irradier une tumeur de manière homogène. Ainsi, il est nécessaire de superposer plusieurs pics de Bragg de différentes profondeurs, correspondant à des énergies de protons différents, afin de construire un pic de Bragg étalé, qui permet de délivrer une dose maximale stable au niveau de la tumeur, tout en protégeant au maximum les tissus sains au-delà de la tumeur (Figure 8B).

L'intérêt de la protonthérapie pour les PDAC réside dans son avantage dosimétrique comparativement à la radiothérapie avec des photons. Cela permet d'améliorer l'index thérapeutique en diminuant la dose aux organes à risque de proximité (duodénum) mais aussi d'augmenter la dose dans le volume cible. Plusieurs études *in silico* et cliniques ont déjà rapporté des résultats sur l'intérêt des protons dans les PDAC. Comparant la protonthérapie à un traitement par RT conformationnelle 3D, une diminution statistiquement significative de la dose dans la moelle, le rein gauche, le rein droit, le foie et l'intestin grêle a été montrée, que l'irradiation ait utilisé un fractionnement classique ou un hypofractionnement [76,77]. Dans le cadre d'une irradiation exclusive de PDAC inopérable, Bouchard *et al.* ont montré que les protons permettent d'atteindre une dose de 72 Gy, tout en diminuant la dose dans l'intestin grêle, comparativement à une irradiation par photons (le volume d'intestin recevant 15 Gy : 61% en photons et 9% en protons) [78]. Lee *et al.* ont montré *in silico* que grâce aux protons, il était possible d'étendre le volume irradié pour inclure les aires ganglionnaires, sans pour autant augmenter la dose dans les OAR, précisant que de tels résultats ne sont pas possibles avec les photons [79]. Sur le plan clinique, une équipe a publié les résultats d'un essai de phase

I sur des carcinomes pancréatiques qui délivrait 25 Gy en 5 fractions en préopératoire et concomitamment à la gemcitabine. Quatre cas de toxicité de grade 3 ont été décrits, mais les doses toxiques limites n'ont pas été atteintes et 11 patients sur 15 ont pu être opérés [80]. En parallèle, l'utilisation d'une dosimétrie adaptative à la variation de position des OAR permet de diminuer la toxicité [81]. Un essai de phase II a permis d'obtenir une médiane de survie globale de 18 mois avec un taux à 2 ans de 31%, alors que le taux de survie sans récurrence locale à 2 ans était de 69%. La toxicité était limitée et sur les 11 patients initialement inopérables, 4 ont finalement été opérés [79]. Ainsi ces deux techniques d'irradiation fortement conformationnelles limitent la toxicité des tissus sains avoisinants, tels que l'intestin et semblent être adéquates pour l'irradiation des PDAC localement avancées.

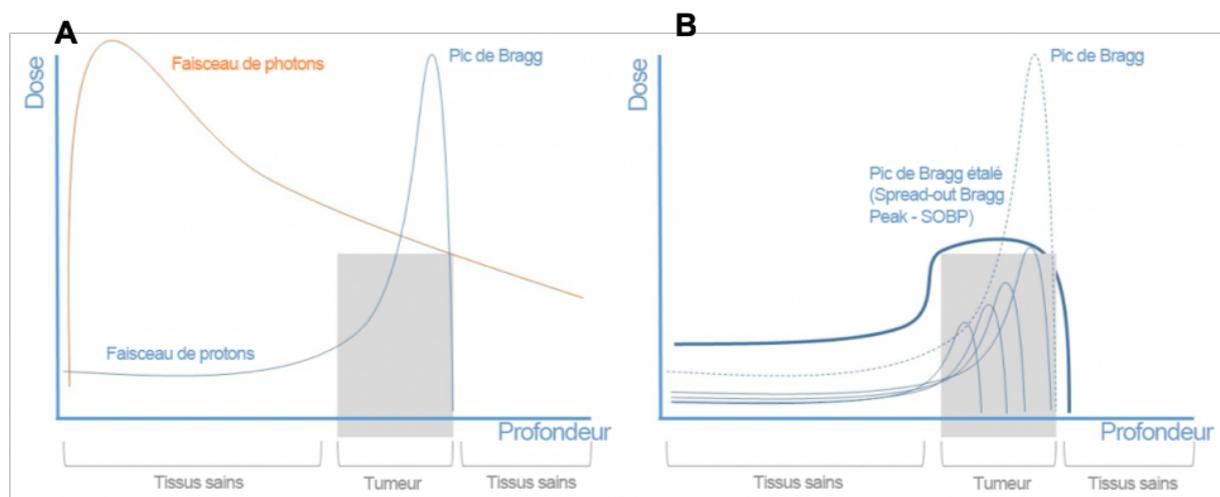


Figure 8 : A : Distribution de dose d'un faisceau de photons et de protons en fonction de la profondeur des tissus sains et tumoraux et B : Superposition de plusieurs pics de Bragg pour obtenir un pic de Bragg étalé en fonction de la profondeur des tissus (d'après <https://www.uzleuven.be/fr/protontherapie>).

1.7.4. Prise en charge au stade métastatique

1.7.4.1. Première ligne

La gemcitabine a longtemps été le traitement de référence de première ligne métastatique des adénocarcinomes pancréatiques depuis la publication d'un essai clinique de phase III qui avait randomisé 126 patients entre une perfusion hebdomadaire de 5-FU (600 mg/m²) ou de gemcitabine (1000 mg/m²) [82]. Les auteurs ont mis en évidence une amélioration significative de la survie globale dans le groupe gemcitabine (P=0,0025). Par ailleurs, les auteurs ont montré une amélioration du bénéfice clinique dans le bras gemcitabine (23,8%) par rapport au bras 5-FU (4,8% ; P=0,0022). Le bénéfice clinique était défini comme une amélioration d'au moins

un des critères suivants : la douleur ou la nécessité d'un traitement antalgique, l'index de Karnofsky, le poids, sur une durée d'au moins 4 semaines, sans détérioration des autres critères. Par la suite de nombreux essais ont tenté de moduler l'efficacité de la gemcitabine en association avec des taxanes, des sels de platines ou des anthracyclines sans bénéfice en survie globale [83]. Un essai clinique randomisé de phase III évaluant l'ajout à la gemcitabine, d'un inhibiteur de tyrosine kinase de l'EGFR, l'erlotinib, dans une population de patients présentant un adénocarcinome du pancréas métastatique a montré un bénéfice significatif en survie globale mais considéré cliniquement comme non pertinent (6,24 vs 5,91 mois) [84]. Plus récemment, les résultats des essais MPACT et PRODIGE-4/ACCORD-11 ont modifié la prise en charge en première ligne métastatique des patients atteints d'un adénocarcinome du pancréas métastatique. L'essai PRODIGE-4/ACCORD-11, publié en 2011 est un essai clinique de phase III de supériorité, comparant le schéma FOLFIRINOX à la gemcitabine en monothérapie, dans une population de patients avec un adénocarcinome pancréatique métastatique ou localement avancé [71]. Les patients devaient avoir un statut OMS <0-1 et un taux de bilirubine inférieur à 1,5 fois la normale. Cette étude est la première à montrer un bénéfice d'une polychimiothérapie comparativement à la gemcitabine en ce qui concerne la survie globale (survie médiane : 11,1 vs 6,8 mois ; HR=0,57 ; P<0,001). Cette étude a fait du schéma FOLFIRINOX le traitement standard de première ligne des patients présentant un adénocarcinome du pancréas métastatique ou localement avancé, qui avait un état général conservé. Par la suite, une deuxième étude a été publiée et a comparé l'association nab-paclitaxel et gemcitabine avec la gemcitabine en monothérapie [72]. Dans cette étude, 861 patients ont été randomisé entre une dose standard de gemcitabine en monothérapie ou la même dose de gemcitabine et le nab-paclitaxel (125 mg/m²). Cette étude a mis en évidence une amélioration significative de la survie globale (survie médiane : 8,5 vs 6,7 mois ; HR=0,72; P<0,001). Cependant aucune étude n'a comparé le schéma FOLFIRINOX à l'association gemcitabine et nab-paclitaxel. Actuellement, le schéma FOLFIRINOX est préféré pour les patients OMS 0-1 et ne présentant pas d'hyperbilirubinémie avant le début du traitement [39].

1.7.4.2. Deuxième ligne

Après une première ligne de traitement, la plupart des patients présentent une dégradation de leur état général rendant difficile une seconde ligne de traitement. Seuls les patients avec un statut OMS 0-1 peuvent bénéficier d'une seconde ligne de traitement.

Les combinaisons de CT à base d'oxaliplatine ont été évaluées en 2^{ème} ligne après échec d'une CT à base de gemcitabine. L'essai CONKO-003 a montré une amélioration de la survie sans

progression (2,9 vs 2,0 mois ; HR 0,68 ; P=0,019) et de la survie globale (5,9 vs 3,3 mois ; HR=0,66; P=0,01) avec l'ajout de l'oxaliplatine au 5-FU comparativement à une monothérapie par 5-FU [85]. Plus récemment, l'essai de phase III PANCREOX a comparé dans une population de patients OMS \leq 2, le schéma FOLFOX6 modifié (mFOLFOX6) à une monothérapie par 5-FU [86]. Les auteurs n'ont pas mis en évidence de différence sur la survie sans progression (2,9 vs 3,1 mois ; HR=1.0 ; P=0,99). Cependant, la survie globale était significativement inférieure dans le groupe mFOLFOX6 (6,1 mois) comparativement au groupe 5-FU en monothérapie (9,9 mois ; HR=1,78 ; P=0,02). Ceci pouvant s'expliquer par le fait que dans le groupe mFOLFOX6 le taux d'effets secondaires \geq grade 3 était significativement plus important (63% vs 11%), mais aussi car le taux d'arrêt de traitement était plus important (20,4% vs 1,9%) et que les patients sous mFOLFOX6 ont eu significativement moins de lignes de traitements supplémentaires (6,8 vs 25%).

Par ailleurs, l'ajout de l'irinotecan dans sa forme liposomale au 5-FU a été évalué dans l'essai de phase III NAPOLI-1 [87]. Les patients traités par l'association 5-FU et irinotecan liposomal avaient une meilleure survie sans progression (médiane : 3,1 vs 1,5 mois; HR=0,56; P=0,0001), un meilleur taux de réponse objective (16% vs 1%; P=0,0001) et une meilleure survie globale, comparativement au 5-FU en monothérapie.

Cependant, aucune étude ne s'est intéressée au traitement après CT par FOLFIRINOX ou gemcitabine et nab-paclitaxel en première ligne.

A partir de l'ensemble de ces données, des recommandations ont été formulées récemment et sont présentées de manière schématique dans la figure 9.

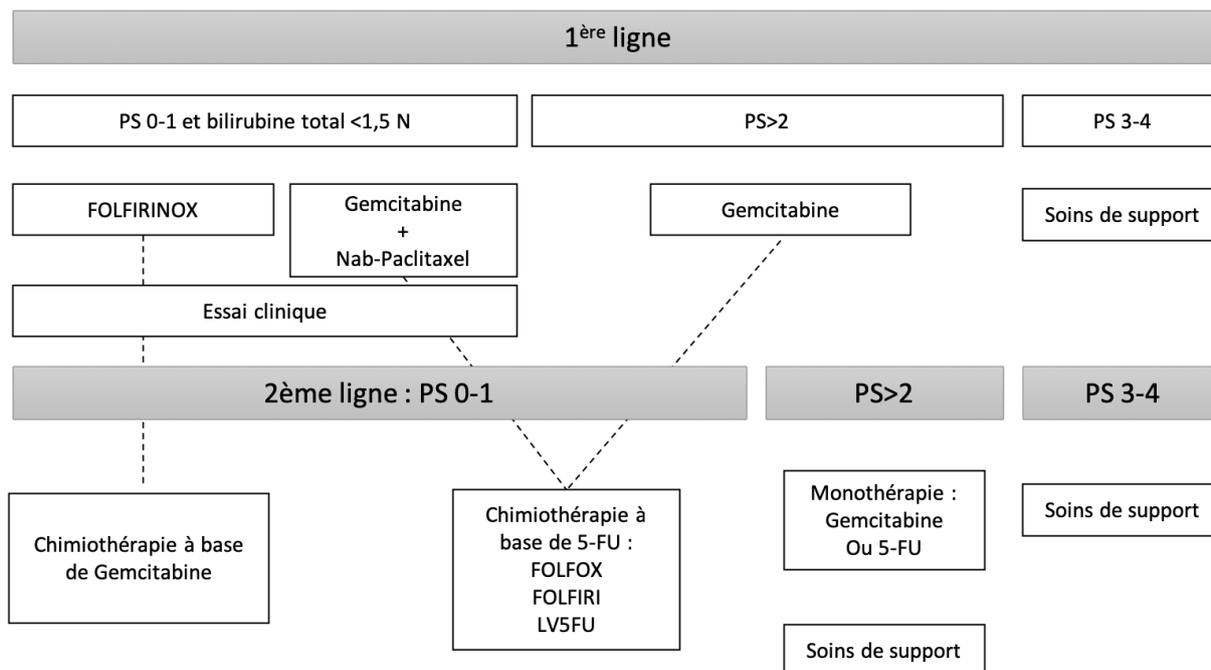


Figure 9 : Schéma de prise en charge des adénocarcinomes pancréatiques métastatiques adapté de Neuzillet et al. [39].

2. Rationnel biologique de la chimioradiothérapie à base de gemcitabine

2.1. Les rayonnements ionisants induisent des dommages à l'ADN

L'ADN est constamment soumis à des dommages qui peuvent être endogènes ou alors dus à des sources environnementales telles que les rayonnements ionisants. L'effet biologique des rayonnements ionisants est principalement lié à leur capacité à créer des dommages de l'ADN, soit de manière directe, soit plus fréquemment de manière indirecte par création de radicaux issus de la radiolyse de l'eau (Figure 10) [88]. En effet, l'ionisation des molécules d'eau conduit à la formation d'espèces radicalaires oxydantes telles que le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$). En présence d'oxygène les espèces radicalaires peuvent engendrer des radicaux superoxydes $\text{O}_2\bullet^-$ qui sont à l'origine de stress oxydant.

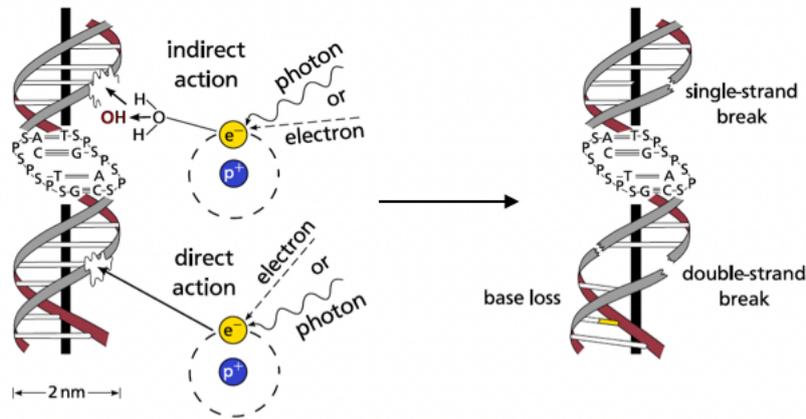


Figure 10 : Effets directs et indirects des rayonnements ionisants provoquant des dommages à l'ADN adapté de Müssig et al. [89].

La conséquence biologique de ces effets indirects consiste en la création d'une grande diversité de dommages à l'ADN tel que des modifications de bases, des cassures simple-brin (CSB), des cassures double-brin (CDB), des ponts inter brins et des lésions covalentes ADN-protéines [90]. Ces lésions de l'ADN font intervenir trois types de protéines. Tout d'abord, une étape de reconnaissance de la lésion est indispensable et fait intervenir des senseurs (MRN, PARP). Il s'en suit une phase pendant laquelle des protéines médiatrices permettent d'amplifier le signal et de recruter des protéines effectrices. Leurs rôles est de permettre la réparation des dommages de l'ADN, mais aussi d'induire un arrêt dans le cycle cellulaire afin de permettre cette réparation et enfin, en cas de difficultés de réparation, d'induire la mort cellulaire programmée (Figure 11). Certaines protéines interviennent dans plusieurs voies de réparation. La réparation correcte des dommages à l'ADN est primordiale pour la survie cellulaire et le maintien de l'intégrité génomique. En fonction du type de dommage, les voies de signalisation sont différentes. Nous nous intéresserons particulièrement à la réparation des CSB, CDB et des mésappariements de bases.

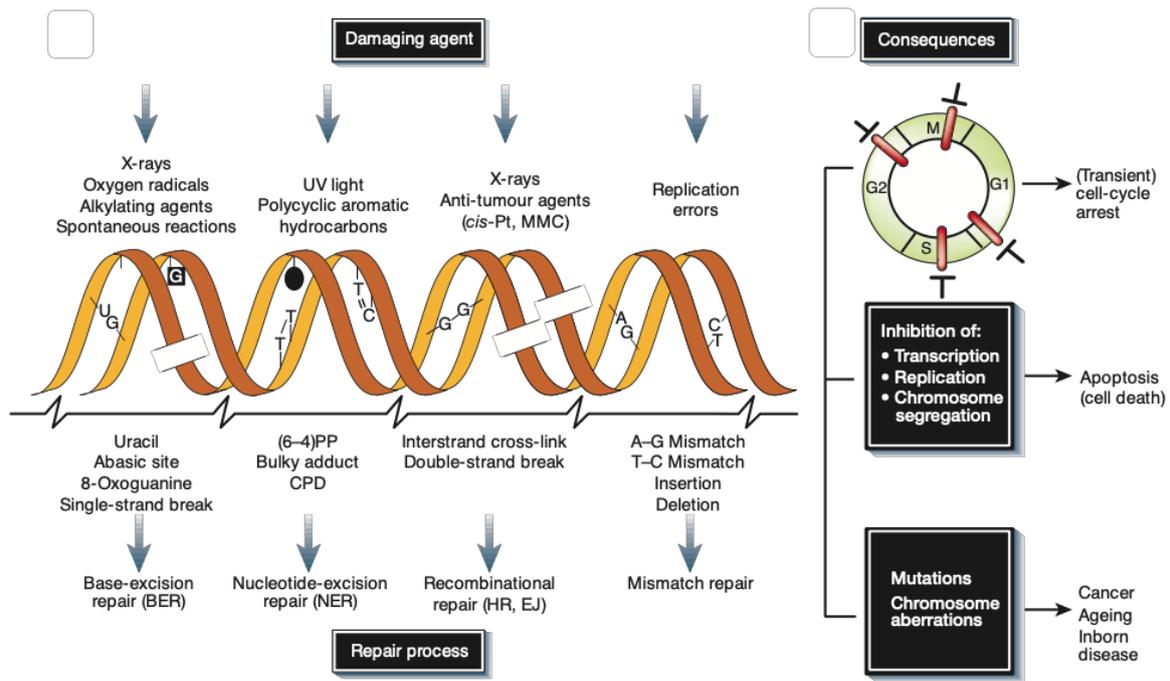


Figure 11 : Dommages induits par les rayonnements ionisants et principales voies de réparation impliquées [91].

2.1.1. Réparation des mésappariements de bases

Leur réparation par excision de bases (BER) permet de prendre en charge les bases endommagées par le stress oxydatif, mais aussi les CSB de l'ADN (Figure 12). Son fonctionnement dans le cas de la réparation des mésappariements de base est assez bien connu et fait intervenir plusieurs étapes :

- Phase de reconnaissance par une glycosylase qui supprime la ou les bases mésappariées et engendrant un site abasique. Actuellement onze glycosylases humaines ont été décrites et sont spécifiques du type de lésion.
- Création d'une brèche par une phosphodiesterase.
- Synthèse d'ADN par l'action concertée de la polymérase β , la ligase II et de la protéine XRCC1.
- Brin d'ADN réparé par la ligase I ou III.

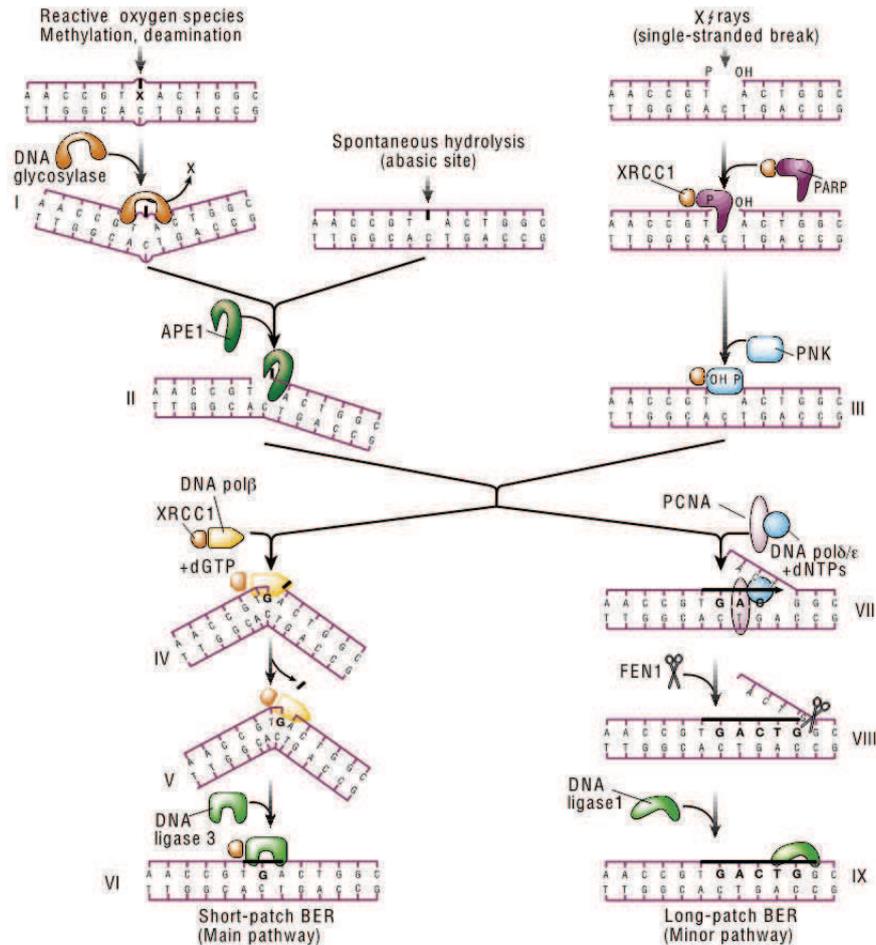


Figure 12 : Mécanisme de réparation par excision de base [91].

2.1.2. Réparation des cassures simple-brin

Les CSB sont reconnues par la PARP-1 en complexe avec XRCC1 qui permet de recruter d'autres protéines telles que PNK qui façonne les extrémités de la cassure et facilite l'action des polymérase et ligases (Figure 12). L'action de la PARP sera décrite dans le paragraphe 3.

2.1.3. Réparation des cassures double brin

La recombinaison homologue (RH) domine en phase S et G2, alors que la voie de religation non-homologue (NHEJ) est présente dans toutes les phases du cycle cellulaire. L'activation d'une voie plutôt qu'une autre dépend donc de l'avancement dans le cycle cellulaire [92].

2.1.3.1. La recombinaison homologue

Dans ce mécanisme de recombinaison homologue, la CDB est reconnue par le complexe MRN [93] composé de MRE11, RAD50 et NBS1 [92], ce qui permet de protéger et de signaler le dommage via ATM (Figure 13). Cela permet également le recrutement d'une endonucléase qui

effectue une résection des brins d'ADN de 5'- 3' [93]. L'extrémité simple brin 3' est alors envahie par les protéines BRCA1 et BRCA2, ainsi que la protéine RAD51, ce qui permet la recherche de régions homologues de la cassure sur la chromatide sœur [94]. Il y a alors appariement du simple brin 3' de la cassure avec le brin complémentaire de la région homologue trouvée, à l'origine d'une formation d'une boucle en D, puis synthèse d'ADN grâce à une ADN polymérase [95] (Figure 13).

2.1.3.2. La religature non-homologue

Le mécanisme de religature non-homologue (c-NHEJ) permet de joindre deux extrémités de CDB [96]. Il permet d'effectuer la ligature de tout type d'ADN et ne requière pas de séquences homologues (Figure 12). Tout d'abord, la protéine 53BP1 est recrutée aux sites de dommages et cela permet l'orientation vers la voie NHEJ pour la réparation [97]. La première étape est la reconnaissance de la cassure et la liaison à l'ADN par l'hétérodimère Ku (Ku70 et Ku80), ce qui permet de le protéger d'une éventuelle dégradation [98]. Cet hétérodimère procède à la phosphorylation de l'histone H2AX, ce qui permet de relaxer la chromatine. Cette liaison entraîne également le recrutement d'autres facteurs de réparation: DNA-PKcs (permet l'accessibilité des CDB aux autres protéines), ADN polymérase (synthèse d'ADN), XRCC4 (*X-ray cross complementing protein 4*) et la ligase IV. Ce mécanisme ne permettant pas de restaurer la molécule d'ADN initiale, des pertes de nucléotides entre les deux extrémités jointes ou même des ajouts de nucléotides sont possibles. De nouvelles combinaisons de séquences peuvent donc être produites.

2.1.3.3. Ligation alternative

Ce mécanisme de la voie alternative de NHEJ fait appel à des microhomologies (Figure 13). La CDB est reconnue par la PARP1, ce qui oriente vers la voie A-NHEJ, plutôt que la voie C-NHEJ [99]. Le complexe MRN ainsi que CtIP permettent la résection des brins à l'origine d'extrémités simple brin [95]. Ensuite, une hybridation des microhomologies entre ces extrémités peut avoir lieu. Cela va générer des extrémités sortantes non appariées, qui vont être clivées. La polymérisation et la ligation des brins complètent la réparation d'ADN. Ce mécanisme est également sujet aux erreurs, puisqu'il peut joindre deux molécules d'ADN non apparentées, ces erreurs de jonctions sont plus probables qu'avec la C-NHEJ [99].

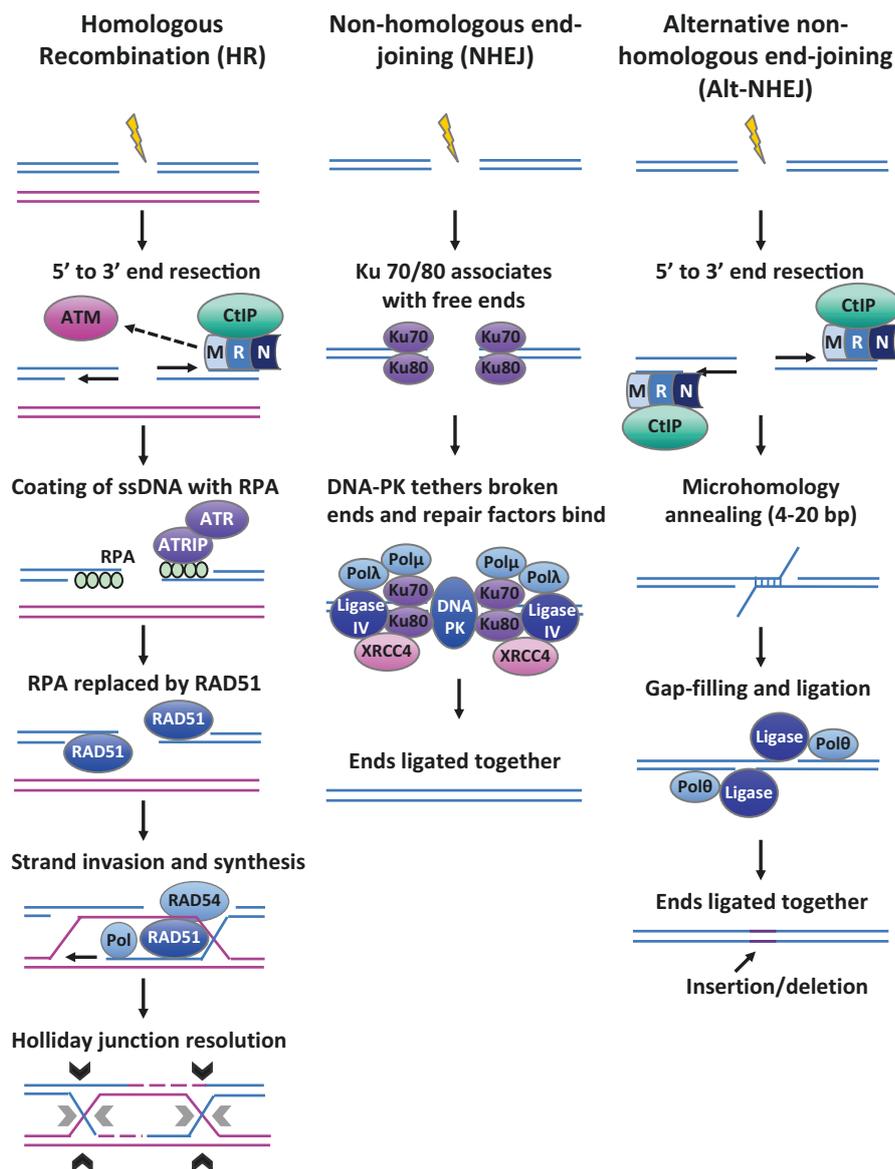


Figure 13 : Trois mécanismes de réparation des cassures double-brins : la recombinaison homologue (HR), la religation non-homologue (c-NHEJ) et la ligation alternative (A-NHEJ) [100].

2.2. La gemcitabine est un agent radiosensibilisant

La gemcitabine est un antimétabolite utilisé dans de nombreuses indications en cancérologie. Pour être active, elle subit plusieurs modifications sous forme de phosphorylations (Figure 14) [101]. La déoxycytidine kinase (DCK) catalyse la phosphorylation de la gemcitabine en gemcitabine monophosphate (Gem-MP). Deux kinases contribuent à la phosphorylation en gemcitabine diphosphate (Gem-DP) et triphosphate (Gem-TP) (Figure 14).

Tout d'abord, la Gem-DP inhibe la ribonucléotide réductase (RNRase) empêchant ainsi la transformation de nucléotide diphosphate en nucléotide triphosphate et diminuant ainsi le pool de nucléotide triphosphate au sein de la cellule (Figure 14.1). La Gem-TP inhibe la cytidine désaminase qui est la principale enzyme de dégradation de la gemcitabine, augmentant ainsi le pool de gemcitabine au sein de la cellule (Figure 14.2). De plus, la Gem-TP s'insère dans l'ADN de manière compétitive avec d'autres déoxynucléoside triphosphate (dNTP) (Figure 14.3), induisant l'inhibition de la synthèse d'ADN. Ceci a pour conséquence une augmentation de l'intégration de la gemcitabine au sein de l'ADN comparativement aux autres nucléotides [102]. L'ensemble de ces mécanismes explique la radiosensibilisation par la gemcitabine. Il a aussi été démontré aussi que la radiosensibilisation *in vitro* était à la fois temps et dose dépendante. En d'autres termes, une exposition prolongée à une concentration faible radiosensibilise autant qu'une exposition courte à une concentration élevée [103,104].

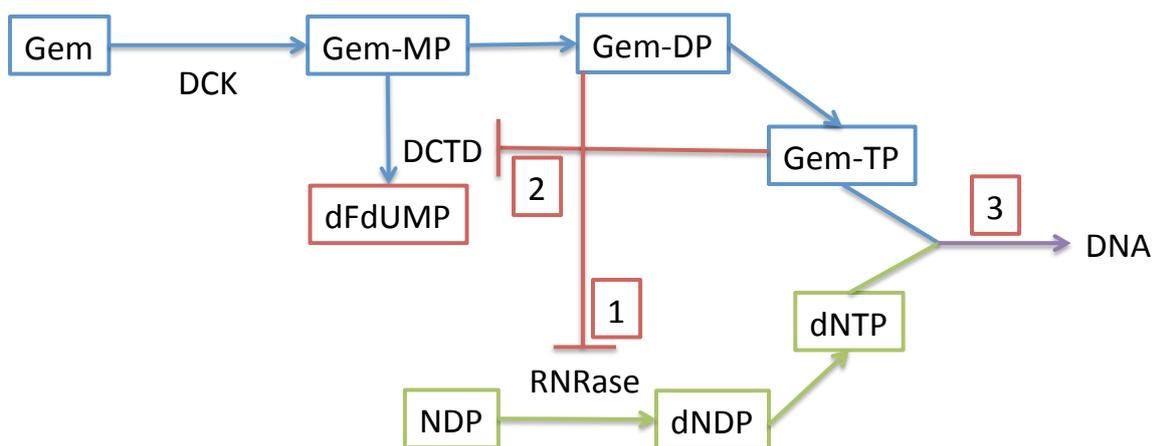


Figure 14 : Schématisation des différents mécanismes d'action de la gemcitabine. DCK : déoxycytidine kinase, Gem : Gemcitabine, MP : monophosphate, DP : diphosphate, TP : triphosphate, dFdUMP : difluorodéoxyuridine monophosphate, DCTD : déoxycytidine déaminase, NDP : nucléoside diphosphate, dNDP : déoxynucléoside diphosphate, dNTP : déoxynucléoside triphosphate, RNRase : ribonucléotide réductase.

3. La Poly(ADP-ribosylation)

3.1. Synthèse du Poly(ADP-ribose)

Décrit pour la première fois en 1963 par Chambon *et al.*, le poly (ADP-ribose) est un polymère d'unité d'ADP-ribose dérivé de l'hydrolyse du NAD⁺ avec libération simultanée d'un nicotinamide (Figure 15) [105]. La poly(ADP-ribose)ylation (PARylation) des protéines est une modification post-traductionnelle réversible dans laquelle les PARP hydrolysent le NAD⁺ dans

le but de forme des homopolymère d'ADP-ribose, parfois branchés sur des protéines acceptrices ou bien sur elles-mêmes. Cette modification se fait par une liaison covalente sur des résidus lysine, glutamate ou asparagine [105]. *A contrario*, les poly(ADP-ribose) glyohydrolase (PARG) sont des glycohydrolases permettant la dégradation les liaisons glycosidiques entre les molécules d'ADP ribose [105].

La synthèse du polymère fait suite à trois étapes :

- Une première étape de mono(ADP-ribosyl)ation de la protéine acceptrice
- Une seconde étape d'élongation par ajout d'ADP(ribose). Dans cette réaction, il s'agit de la formation d'une liaison glycosidique entre deux riboses liés à l'adénine de chaque unité d'ADP-ribose.
- Une troisième étape permet de créer des ramifications en permettant la création d'une liaison glycosidique entre deux riboses qui sont liés au nicotinamide.

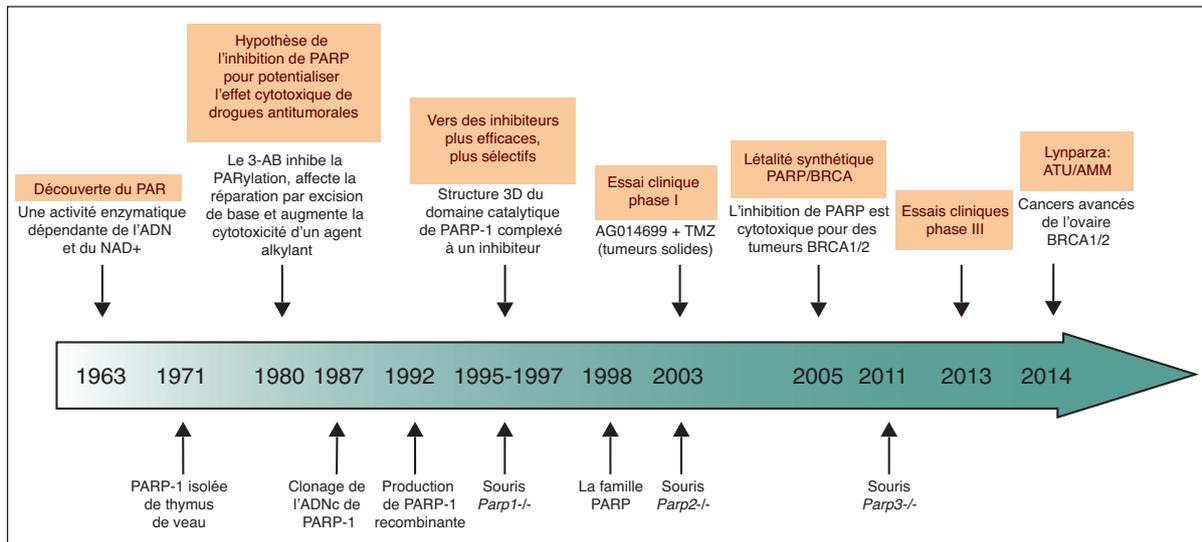


Figure 15 : De la découverte de la PARylation à l'autorisation de mise sur le marché des inhibiteurs de PARP (d'après Schreiber et al.) [105].

3.2. La superfamille des PARP

Jusqu'en 2004, la poly(ADP-ribose) polymérase -1 (PARP-1) était la seule protéine identifiée comme pouvant catalyser la réaction de poly(ADP-ribosyl)ation. En recherchant les protéines qui présentaient une homologie avec le domaine catalytique de PARP-1, Amé *et al.* ont mis en évidence de nouvelles protéines, agrandissant la famille à 17 protéines [106]. Ces protéines sont impliquées dans le maintien de nombreuses fonctions cellulaires telles que la réparation de l'ADN, la transcription, le cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, la mort cellulaire, l'inflammation et la réponse immunitaire. A partir de ces données, Schreiber *et al.* ont proposé

une classification basée sur les fonctions établies et permettant de les regrouper en quatre familles (Figure 16) [107] :

- Les PARP dépendantes de l'ADN (PARP-1, PARP-2 et PARP-3) qui permettent de reconnaître des domaines d'ADN discontinus via leur domaine de liaison à l'ADN N-terminal.
- Les tankyrases (Tankyrase 1 (PARP-5a) et Tankyrase 2 (PARP-5b)) via leur large domaine de répétitions ankyrine permettent d'interagir avec de nombreuses protéines et régulent de nombreuses fonctions cellulaires telles que la maintenance des télomères ou encore la mitose.
- Les PARP CCCH (PARP-7; PARP-12 et PARP-13) présentent des motifs en doigts de Zinc : Cystéine-Cystéine-Cystéine-Histidine, leur permettant la liaison à l'ARN. Ainsi PARP-13, a été présenté comme un régulateur des modifications post-transcriptionnelles des ARN messagers mais aussi de miRNA.
- Les macros PARP (PARP-9, PARP-14 et PARP-15) comme leur nom l'indique possèdent un domaine macro permettant la liaison au poly(ADP) ribose (PAR).

Les autres protéines de la PARP (PARP-4; PARP-10; PARP-11; PARP-6; PARP-8 et PARP-16) ne sont pas classées dans des sous-groupes précis.

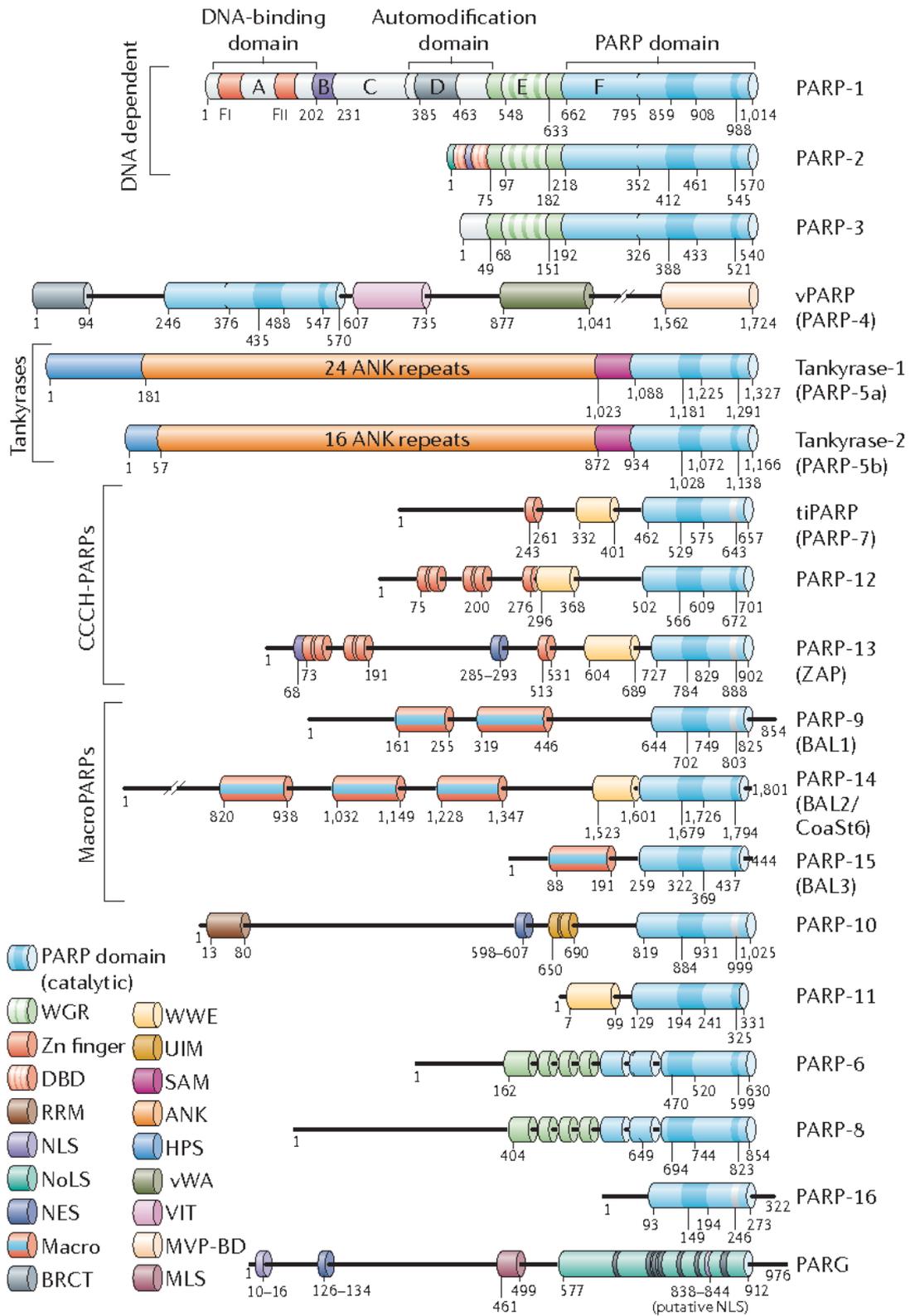


Figure 16 : Classification des 17 PARP et de la PARG [107].

Par la suite, Kleine *et al.* ont présenté une nouvelle classification basée sur leur activité enzymatique. En effet, bien que certaines PARP soit structurellement proche, leur activité enzymatique peut être totalement différente et de même que leur fonction dans la cellule [108].

Il en résulte une classification en 3 sous-groupes :

- Les PARP qui ont une activité de poly(ADP-ribosyl)ation tels que PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4, Tankyrase 1 et Tankyrase 2
- Les PARP avec une activité de mono(ADP-ribosyl)ation tels que PARP-10, PARP-14 et PARP-15
- Les PARP ne présentant pas d'activité enzymatique

A partir de ces données, Hottiger *et al.* ont présenté une nouvelle nomenclature basée sur cette classification. Les auteurs préfèrent le terme d'ADP-ribosyl transférase (ART) [109]. En effet, cette publication a mis en évidence que les PARP ont une activité transférase et que certains membres de la famille ont une activité de mono(ADP-ribosyl)ation.

3.3. Rôle de la PARylation dans la réponse aux dommages à l'ADN

Parmi les PARP, PARP-1 et PARP-2 sont les protéines les plus exprimées au sein de la cellule et sont principalement impliquées dans la reconnaissance des dommages à l'ADN (Figure 17) [107]. En effet, la PARylation a plusieurs conséquences dont la finalité est de permettre la réparation des dommages à l'ADN. Tout d'abord, elle permet le remodelage de la chromatine au niveau du site endommagé en permettant le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine (Figure 17). Leur recrutement a pour conséquence d'inhiber l'activité transcriptionnelle au niveau de la lésion, en attendant la réparation. Parallèlement, la PARylation permet de recruter des protéines impliquées directement dans la réparation des CSB (XRCC1, Ligase III) ou des CDB (MRE11, NBS1).

Concernant la réparation des CSB, l'activité de la PARP-1 est bien documentée et reconnue. La reconnaissance des CSB par la PARP-1 engendre à la fois une auto-PARylation mais aussi une PARylation de nombreuses protéines nucléaires. L'auto-PARylation permet le recrutement de protéines pivot impliquées dans la voie BER et réparation des CSB : XRCC1, polymérase β et ligase III (Figure 17). PARP-2 est aussi reconnue comme étant impliquée dans la réparation des CSB, alors que PARP-3 ne présente, *a priori*, pas de rôle dans cette réparation.

Concernant la réparation des CDB, l'implication de PARP-1 a été démontrée en mettant en évidence les interactions physiques et fonctionnelles avec les protéines impliquées dans la réparation de ces cassures. Parmi les voies de réparation des CDB, il est démontré que PARP-1 intervient principalement dans la voie de A-NHEJ (Figure 17). En effet, dans les cellules

déficientes en NHEJ (Ku^{-/-}), en absence de PARP-1, il n'y a pas de réparation des CDB. De plus, il a été démontré une interaction physique entre PARP-1 et le complexe protéique de la voie A-EJ. De plus, il a été montré une accumulation de MRE11 et NBS1 aux sites des CDB et que cette accumulation nécessite PARP-1, suggérant un rôle de PARP-1 dans la réparation des cassures par recombinaison homologue (Figure 17). Enfin, les CDB provoquées par le stress répliatif mettent en jeu PARP-1 et PARP-2. En effet, Bryant *et al.* ont montré que PARP-1 et PARP-2 étaient nécessaires au redémarrage de la fourche de réplication [110]. En effet, les délétions de PARP-1 et PARP-2 abrogent la recombinaison induite par l'hydroxyurée et sensibilisent les cellules à cette CT [110].

En conclusion, bien qu'initialement le rôle de PARP-1 ait été principalement décrit dans la réparation des mésappariements de bases (voie BER) et la réparation des CSB, les données récentes de la littérature complètent son rôle dans la reconnaissance des CDB et son implication principale dans la voie A-NHEJ. De plus, le rôle de PARP-2 et PARP-3 dans la reconnaissance et la réparation des dommages de l'ADN est de plus en plus reconnue [111].

De ce fait, inhiber les PARP impliquées dans la reconnaissance de ces lésions permettrait d'augmenter la létalité de ces lésions et engendrerait une augmentation de la mort cellulaire.

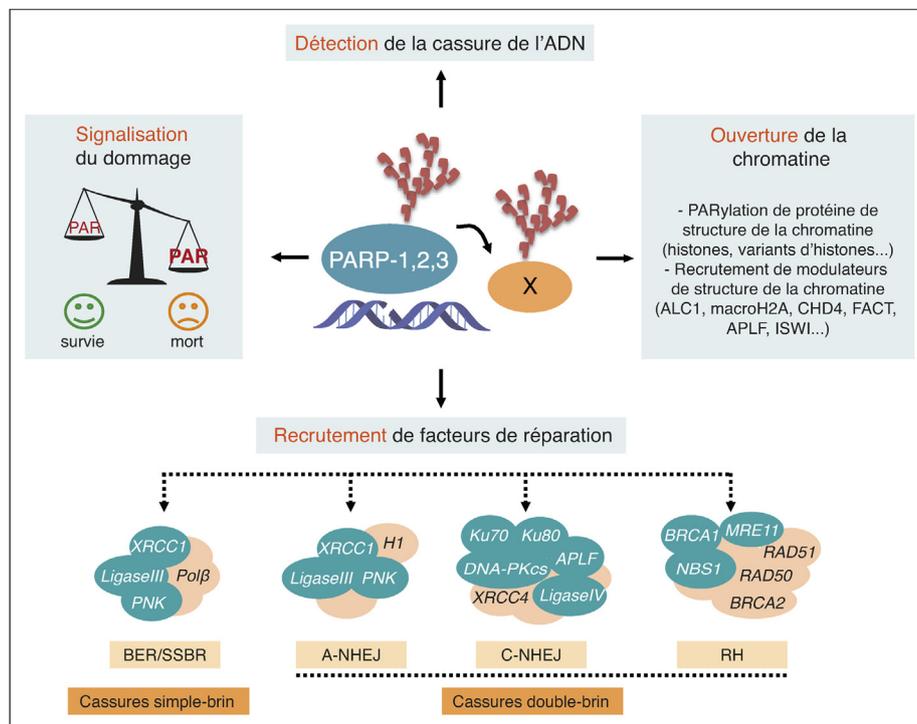


Figure 17 : Rôle de la PARP dans la réponse aux dommages de l'ADN [105]. PAR : poly(ADP-rybosyl); BER : réparation par excision de base; SSBR : réparation des cassures simple-brin ; A-NHEJ : ligation alternative ; C-NHEJ : religation non-homologue ; RH : recombinaison homologue ; X : protéine acceptrice.

3.4. Les inhibiteurs de PARP

Dans le cadre de thérapie anticancéreuse, les inhibiteurs de la PARP-1/2 sont apparus comme une cible thérapeutique de choix dans la mesure où l'inhibition de la PARylation permet de bloquer les mécanismes de réparations associés à ce phénomène [112]. Ainsi, il est possible d'utiliser les inhibiteurs de PARP (PARPi) selon deux modalités, soit en monothérapie selon le principe de létalité synthétique ou alors en combinaison avec des agents génotoxiques tels que les alkylants de l'ADN ou les rayonnements ionisants [105].

De nombreux PARPi sont actuellement en cours de développement clinique ou ont obtenus l'AMM dans certaines indications. L'olaparib (AZD-2281) est celui qui est le plus avancé dans son stade de développement clinique [113]. En effet, il s'agit d'un PARPi initialement testé en monothérapie dans les cancers présentant des mutations BRCA1/2 [114]. Par la suite, l'olaparib a été utilisé en combinaison avec des CT génotoxiques, parmi lesquelles le témozolomide, dans des modèles précliniques et cliniques de glioblastome, mélanome, sarcome d'Ewing et de cancer de la prostate [115,116]. Actuellement l'olaparib a obtenu l'AMM en maintenance pour les cancers de l'ovaire avec mutations germinales ou somatiques de BRCA1/2 en réponse aux sels de platine. D'autres PARPi tels que le niraparib (MK-4827) ou le rucaparib (AG-014699) ont aussi l'AMM en monothérapie dans la prise en charge des cancers avancés de l'ovaire. Enfin, de nouveaux PARPi sont en cours de développement clinique tel que le veliparib (ABT-888) et le talazoparib (BMN 673).

Récemment, un essai clinique de phase III randomisé a montré un bénéfice en survie sans progression dans les PDAC avec une mutation germinale de BRCA1/2, en réponse après une CT à base de sels de platine [117].

3.4.1. Traitement en monothérapie: principe de létalité synthétique

En 2005, deux études ont montré l'impact majeur des PARPi dans les cellules déficientes en BRCA1/2. L'inhibition de la PARP empêche la réparation des CSB par le mécanisme BER qui deviennent des CDB au passage de la fourche de réplication et qui, en absence de protéines impliquées dans la réparation des CDB (BRCA1/2), conduisent à la mort cellulaire (Figure 18.2) [118,119].

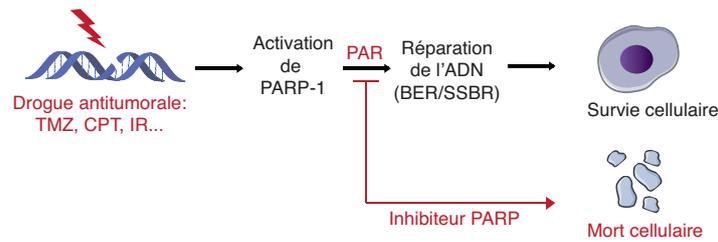
La létalité synthétique est un phénomène selon lequel une mutation d'un seul gène n'est pas létale pour la cellule mais devient létale lorsqu'elle est associée à une autre mutation [120]. Dans le contexte d'une cellule cancéreuse, une mutation dans un gène impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN n'induit pas de mort cellulaire. L'inhibition d'une protéine impliquée dans la réparation permettrait d'augmenter la mortalité cellulaire dans ces cellules

déjà déficientes. En d'autres termes, dans les cellules déficientes en BRCA1/2, gène dont la protéine est impliquée dans la réparation des CDB par recombinaison homologue, l'inhibition de la PARP empêche la réparation des CSB et induit des CDB au passage de la fourche de réplication [121]. Ces CDB sont donc moins facilement réparées et augmentent ainsi la mortalité cellulaire (Figure 18.2). Il est tout à fait possible d'extrapoler cette théorie à l'ensemble des gènes impliqués dans la voie de recombinaison homologue : c'est le concept de « BRCAness » [122]. En effet, il a été démontré que d'autres anomalies telles que des hyperméthylation du promoteur de BRCA, une perte de RAD51, une mutation d'ATM ou un déficit en MRE11 peuvent être des mécanismes alternatifs qui rendent les cellules cancéreuses plus sensibles aux PARPi [123–125].

D'autres mécanismes de toxicité des PARPi ont été mis en évidence. Tout d'abord, il a été démontré que les PARPi induisent la phosphorylation de DNA-PKcs et augmentent la réparation des CDB par la voie NHEJ, augmentant la mutagenèse et conduisant à une instabilité génomique. Cette instabilité est à l'origine de la cytotoxicité cellulaire. En effet, cette dernière est diminuée en association avec des PARPi et des inhibiteurs de DNA-PKcs [126]. Plus récemment, Murai *et al.* ont proposé un modèle de cytotoxicité des PARPi basé sur leurs capacités à piéger la PARP sur le site de dommage à l'ADN et ceci indépendamment de leur potentiel d'inhibition de l'activité catalytique de la PARP. En effet, les auteurs soulignent que la cytotoxicité des PARPi est plus importante que l'invalidation du gène de la PARP [127].

La découverte de la létalité synthétique entre la PARP et BRCA a rapidement été utilisée pour son application clinique chez les patientes avec un cancer de l'ovaire et porteuses de mutations germinales/somatiques de BRCA1/2. Plus récemment, d'autres localisations telles que les cancers de prostate, les cancers du sein ou encore les PDAC ont fait l'objet d'essais cliniques dans la même population de patients mutés pour ces gènes [128]. Enfin, des signatures génomiques cherchant à mettre en évidence des anomalies dans la voie de RH pourront à l'avenir permettre d'élargir les indications de traitement avec des PARPi en monothérapie [125].

1. Potentialisation de chimio- et radiothérapies



2. Ciblage de tumeurs invalidées pour la réparation par RH (ex: mutation BRCA1/2) = létalité synthétique

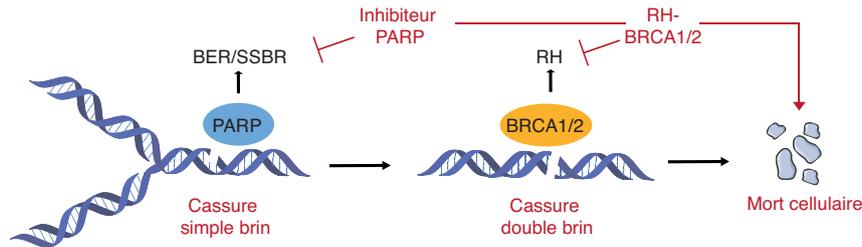


Figure 18 : Principe du ciblage de la PARylation dans les stratégies anticancéreuses [105]
TMZ : témozolomide; CPT : cisplatine, IR : irradiation, PAR : poly(ADP-rybosyl); BER : réparation par excision de base; SSBR : réparation des cassures simple-brin; RH : recombinaison homologue.

3.4.2. Combinaisons des PARPi avec des chimiothérapies

Bien avant l'utilisation des PARPi dans le contexte de létalité synthétique, certains auteurs avaient émis l'hypothèse selon laquelle il pourrait exister une synergie entre les PARPi et des agents de CT ciblant l'ADN. En effet, les CT génotoxiques augmenteraient les dommages à l'ADN et en inhibant la PARP, ces dommages pourraient être amplifiés (Figure 18.1). Ainsi, de nombreuses études précliniques ont montré la synergie avec des agents de CT tels que le témozolomide, le cisplatine ou les inhibiteurs de topoisomères I. En effet, le témozolomide est un agent alkylant de l'ADN avec une bonne distribution encéphalique. Il crée des adduits au niveau des nucléotides de l'ADN, sous la forme de N⁷-méthylguanine (N7-MeG), O⁶-méthylguanine (O6-MeG) et N³-méthyladénine (N3-MeA). Les adduits N7-MeG et N3-MeA représentent environ 90% des adduits provoqués par le témozolomide. L'adduit O6-MeG est principalement réparé par le système faisant intervenir la MGMT, alors que la réparation des deux autres adduits fait principalement intervenir le système de réparation de base, BER, dépendant de la PARP. De ce fait, il existe un rationnel biologique à combiner le témozolomide avec un PARPi. Ainsi la combinaison veliparib et temozolomide a été évaluée dans un modèle murin de mélanome et a montré une augmentation du temps jusqu'à reprise tumorale. Par la

suite, d'autres auteurs ont montré la synergie entre PARPi et TMZ dans des modèles de glioblastome ou de sarcome d'Ewing. Ces données précliniques font l'objet d'un développement clinique principalement dans le glioblastome. Ainsi l'essai randomisé de phase II/III NCT02152982 évalue l'association TMZ et veliparib avec la RT, comparativement à l'association TMZ et RT, dans les glioblastomes avec méthylation du promoteur de MGMT. Une autre association possible des PARPi consiste à les coupler avec des sels de platine. En effet, il est connu que les sels de platine permettent de créer des adduits covalents, principalement sous forme de ponts inter brins. Ces anomalies conduisent à un effondrement de la fourche de réplication et la formation de CSB et CDB. Une partie de ces cassures sont donc principalement réparées par la voie BER/PARP. Des données précliniques ont montré que l'association PARPi et CT à base de cisplatine était synergique, particulièrement dans les cancers de l'ovaire [20]. Ceci a conduit à de nombreux essais cliniques principalement dans le cancer de l'ovaire [129].

3.4.3. Combinaison des PARPi avec la radiothérapie

Comme mentionné précédemment, l'irradiation des cellules tumorales engendre des modifications au niveau de l'ADN et principalement des CSB et des CDB. Un certain nombre de ces lésions sont létales d'emblée, mais un grand nombre de ces lésions sont potentiellement létales si elles ne sont pas réparées dans de bonnes conditions. C'est pour augmenter la létalité de ces dernières que les PARPi ont leur intérêt [130]. En effet, la RT crée des CSB de l'ADN qui potentiellement sont reconnues par la PARP dont l'auto-PARYlation permet le recrutement d'enzymes impliquées dans la réparation *ad integrum* de ces lésions. En absence de réparation ces lésions peuvent se transformer, au passage de la fourche de réplication, en cassures double-brin qui seront plus difficiles à réparer. De plus, comme nous l'avons mentionné précédemment, les PARP sont impliquées dans plusieurs voies de réparation de l'ADN que ce soit pour la réparation des CSB ou des CDB.

La radiosensibilisation par les PARPi est dépendante de la capacité de prolifération des cellules cancéreuses et les PARPi sont plus actifs en phase S du cycle cellulaire [131]. Ainsi, Dungey *et al.* ont montré que la radiosensibilisation des lignées de glioblastome est plus importante en phase S du cycle cellulaire (SER=1,60) qu'en phase G1 (SER=1,27) ou G2 (SER=1,33) [132]. Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où les tumeurs sont plus proliférantes que les cellules saines, permettant ainsi d'obtenir un index thérapeutique plus important.

En plus de l'inhibition de la réparation, de par leur structure proche du nicotinamide, qui est un puissant vasodilatateur, les PARPi permettent aussi de réoxygéner les tumeurs en augmentant

le débit de perfusion au sein de la tumeur. De plus, les PARPi radiosensibilisent plus particulièrement les cellules hypoxiques (Figure 19). En effet, il a été montré que les cellules hypoxiques présentent une altération dans les voies de réparation de l'ADN les rendant plus sensibles aux PARPi. C'est le concept de létalité synthétique contextuel (Figure 19) [133]. Ainsi les mécanismes de radiosensibilisation des PARPi sont multiples et agissent à la fois sur la cellule cancéreuse, mais aussi sur le microenvironnement tumoral (Figure 19). L'ensemble du rationnel d'utilisation des PARPi comme radiosensibilisant, de même que les études précliniques et cliniques utilisant les PARPi ont fait l'objet d'une publication [134].

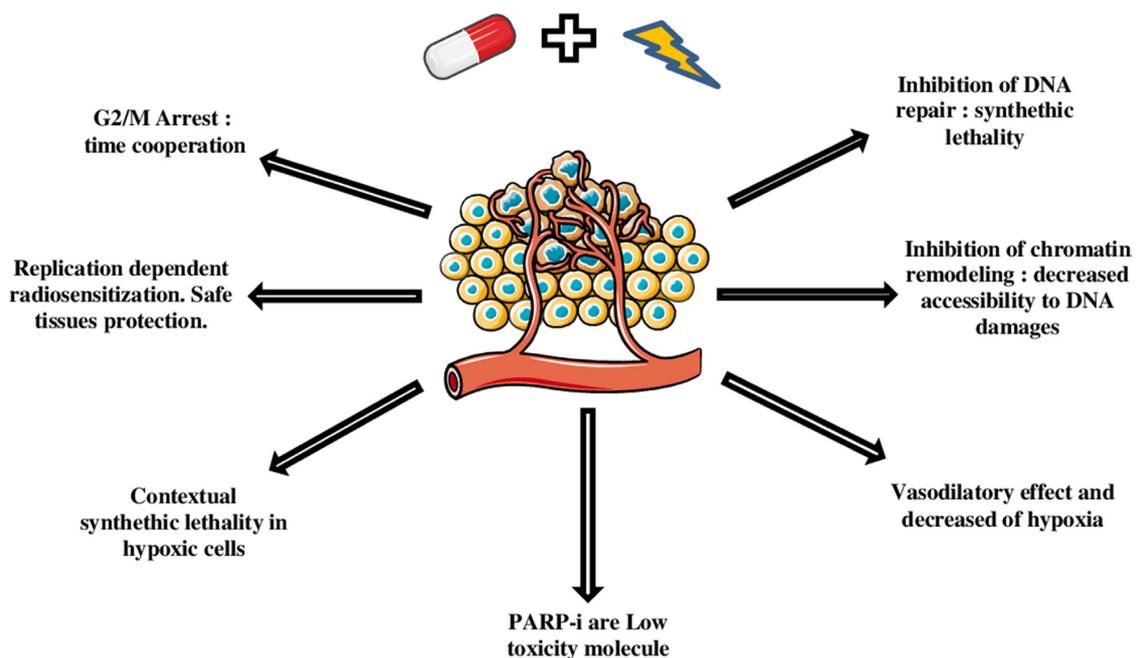


Figure 19 : Mécanismes impliqués dans la radiosensibilisation par des PARPi [134].

PARTIE II

Objectifs

PARTIE II : Objectifs

L'adénocarcinome pancréatique est un problème majeur de santé publique. En effet, son incidence est en augmentation et sa mortalité ne diminue pas, faisant de ce cancer l'un de ceux au pronostic le plus péjoratif. Les avancées technologiques constantes en matière de techniques d'irradiation, telles que la radiothérapie avec modulation d'intensité (RCMI), la SBRT ou encore la protonthérapie, permettent d'améliorer le ciblage physique de la tumeur, tout en épargnant, au mieux, les OAR. Cependant, cette évolution technologique ne permettra pas à elle seule d'améliorer le pronostic de ces tumeurs. En effet, l'association de la RT avec des thérapies ciblant la réparation de l'ADN est une voie qui nécessite d'être explorée dans la prise en charge des adénocarcinomes pancréatiques.

Au vu du rationnel d'utilisation des PARPi en combinaison avec la RT et des CT ciblant l'ADN, nous avons souhaité évaluer ces associations dans des modèles précliniques de PDAC.

Pour cela, ce travail de thèse avait pour objectifs :

- De faire le point sur les différentes stratégies actuellement en cours de développement sur le ciblage des voies de réparation, en association avec la radiothérapie dans les PDAC. Ce travail a fait l'objet d'une revue systématique de la littérature évaluant la radiosensibilisation avec différentes molécules ciblant la réponse aux dommages à l'ADN dans les PDAC.
- D'évaluer *in vitro* la radiosensibilisation de la gemcitabine, de l'olaparib et de leur association sur quatre lignées cellulaires de carcinomes pancréatiques qui ne présentent pas de mutation BRCA1/2.
- D'évaluer *in vivo* la radiosensibilisation de la gemcitabine, de l'olaparib et de leur association sur un modèle de xénogreffe de PDAC sur souris nude, après une irradiation à dose forte par photons X ou par protons.
- D'évaluer la réponse transcriptomique après irradiation et/ou traitement par la gemcitabine et/ou l'olaparib.
- Enfin, dans la mesure où plusieurs PARPi sont actuellement en cours d'évaluation, nous avons testé la radiosensibilisation *in vitro* de deux PARPi dont la capacité de piégeage de la PARP sur l'ADN est différente : l'olaparib et le talazoparib, sur 4 lignées cellulaires de cancers pancréatiques.

PARTIE III

Matériels

& Méthodes

PARTIE III : Matériels et Méthodes

1. Les lignées cellulaires pancréatiques

Pour la partie *in vitro*, nous avons étudiés 4 lignées cellulaires pancréatiques : MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC-3 et AsPC-1.

La lignée cellulaire MIA PaCa-2 (CRL-1420, ATCC) provient d'un adénocarcinome pancréatique d'un homme de 65 ans qui présentait une tumeur au niveau du corps et de la queue du pancréas et de la région péri-aortique [135]. Ces cellules sont adhérentes et ont une morphologie de type épithéliale. Le milieu utilisé pour sa mise en culture est composé de 500 ml de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; PAN Biotech™), 10% de sérum de veau fœtal (SVF; PAN Biotech™) préalablement décomplémenté 30 minutes à 56°C, une solution de pénicilline (10 000 U/ml) et de streptomycine (PS) (10 mg/ml) (PAN Biotech™), 1x de d'acides aminés non essentiels (PAN Biotech™), 1 mM de sodium pyruvate (PAN Biotech™) et 10 mM de tampon acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) 1 M (PAN Biotech™).

Les cellules AsPC-1 (CRL-1682™, ATCC) proviennent d'un adénocarcinome d'une femme caucasienne de 62 ans. Elles sont cultivées dans du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI ; PAN Biotech™) complété avec 10% de SVF (PAN Biotech™) ainsi que 1% d'antibiotiques pénicilline et streptomycine (PAN Biotech™, 10 000 U/ml pénicilline - 10 mg/ml streptomycine).

Les cellules PANC-1 (CRL-1469™, ATCC) proviennent d'un adénocarcinome d'un homme caucasien de 56 ans. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (PAN Biotech™) complété avec 10% de SVF (PAN Biotech™) et 1% d'antibiotiques pénicilline et streptomycine (PAN Biotech™).

La lignée cellulaire BxPC-3 (CRL-1687, ATCC) est issue d'un adénocarcinome pancréatique provenant d'une femme de 61 ans [135]. Le milieu utilisé pour sa mise en culture est composé de 500 ml de RPMI (Pan Biotech™), 10% de SVF et 1% de pénicilline-streptomycine.

Concernant les principales mutations (KRAS, CDKN2A, TP53 et SMAD4) de ces lignées cellulaires, elles sont reportées dans le Tableau 4. L'ensemble de ces lignées ne présentent pas de mutation ou délétion des gènes BRCA1/2.

	MIA PaCa-2	PANC-1	AsPC-1	BxPC-3
KRAS	G12C	G12D	G12D	Sauvage
TP53	R248W	R273H	Délétion	Y220C
Smad 4	Sauvage	Sauvage	Sauvage	Délétion
CDKN2A	Délétion	Délétion	Sauvage	Sauvage

Tableau 4 : Principales mutations des lignées cellulaires pancréatiques.

2. La culture cellulaire

Les lignées cellulaires ont été entretenues et maintenues en culture monocouche à 37°C sous atmosphère humide en présence de 5% de CO₂. Les cellules ont été observées au microscope inversé à contraste de phase et les milieux de culture ont été changés tous les deux, trois jours. Les passages ont été effectués environ une fois par semaine, lorsque les cellules atteignaient une confluence d'environ 70-80%. Les cellules adhérentes ont été mises en suspension par incubation avec une solution de trypsine-EDTA (Pan Biotech) à 37°C pendant 5 à 7 minutes en fonction de la lignée cellulaire. Les comptages cellulaires ont été réalisés par un test d'exclusion au bleu de trypan (Invitrogen) réalisé sur un compteur automatique de cellules Countess (Invitrogen).

3. Schémas de traitement des analyses *in vitro*

Le même schéma thérapeutique a été appliqué pour l'ensemble des 4 lignées cellulaires pancréatiques. Tout d'abord, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Vingt-quatre heures après ensemencement, les cellules ont été traitées par la gemcitabine ou le DMSO pour un délai de 24 heures. Par la suite, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été traitées avec l'olaparib ou le DMSO. Une heure après ce dernier traitement, les cellules ont été irradiées à différentes doses.

Dans le cadre d'une seconde étude comparant l'olaparib et le talazoparib, les cellules ont étéensemencées selon les mêmes conditions que précédemment puis traitées par soit l'olaparib, soit le talazoparib pendant 1h puis irradiées à différentes doses (2,4,6 Gy).

4. Traitements pharmacologiques

4.1. Gemcitabine

La gemcitabine (Selleckchem) a été mise en solution dans du DMSO (Sigma-Aldrich) à 10

mM. La concentration finale de gemcitabine choisie pour le projet est de 10 nM.

4.2. Inhibiteurs de la PARP

Deux PARPi ont été utilisés. L'olaparib (AZD2281, Ku-0059436, Selleckchem) a été mis en solution à 10 mM dans 1 ml de DMSO (Sigma-Aldrich), avec une concentration finale d'olaparib choisie pour le projet est de 1 μ M. De même le talazoparib (BMN 673, Selleckchem) a été mis en solution à 1 mM dans du DMSO (Sigma-Aldrich), avec une concentration finale de talazoparib choisie pour le projet est de 100 nM.

5. Procédure d'irradiations *in vitro*

Les irradiations *in vitro* ont été effectuées au moyen d'un irradiateur auto-protégé BIOBEAM GM 8000 (Gamma Service Medical GmbH). Cet appareil dispose d'une source de Césium 137 (^{137}Cs) délivrant des rayons gamma, avec un débit de dose à 3 Gy/minutes. Les doses d'irradiation utilisées varient de 2 à 10 Gy. Toutes les irradiations ont eu lieu à température ambiante et en conditions normoxiques. A ces cellules irradiées, s'ajoutent des cellules non irradiées, témoin, maintenues dans les mêmes conditions que celles irradiées.

6. Test de viabilité cellulaire

Un test avec le réactif Uptiblué® (Interchim) a été utilisé afin de déterminer la prolifération cellulaire dans nos échantillons en fonction des doses de traitements utilisées et du temps de traitement. Le réactif Uptiblué® contient un indicateur de croissance cellulaire qui permet de détecter l'activité métabolique. L'indicateur d'oxydo-réduction inclus dans le réactif est basé sur la résazurine qui est un composé bleu et non fluorescent qui, lorsqu'il est réduit en résorufine devient rose et fluorescent. La mesure de la prolifération cellulaire est basée sur la fluorescence de ce réactif. Afin de réaliser ce test de prolifération cellulaire, les cellules ont étéensemencées en plaques 96 puits à une concentration de 1 000 cellules par puit. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les cellules ont été traitées avec des gammes de concentrations de gemcitabine (10 nM-1 μ M) ou d'olaparib (10 nM-10 μ M) pour une durée de 48 à 72 heures. La mesure de prolifération cellulaire a été possible par l'ajout de 20 μ L de réactif Uptiblué® par puit (10% du volume total) puis incubation 4 heures à 37°C. Une mesure de fluorescence a ensuite été réalisée à l'aide d'un lecteur de microplaques Synergy (Biotek®) et analysée avec le logiciel Gen5 (Biotek). La longueur d'onde d'excitation est de 560 nm et la mesure de la longueur d'onde d'émission s'effectue à 590 nm. Le blanc a été réalisé avec un volume de 200 μ l de milieu de culture cellulaire. La valeur de fluorescence mesurée du blanc a été soustraite

aux autres échantillons contenant des cellules, afin de ne prendre en compte que la viabilité cellulaire au cours de cette expérience.

7. La survie clonogénique

Le test de survie clonogénique est la méthode de choix pour déterminer la survie cellulaire après un traitement par radiations ionisantes et par agents cytotoxiques [136]. Ce test est basé sur la capacité d'une cellule isolée à se développer en colonie, après 14 à 20 jours d'incubation en fonction de la lignée cellulaire utilisée. Une colonie est définie par un amas d'au minimum 50 cellules.

Les cellules MIA PaCa-2, PANC-1, BxPC-3 et AsPC-1 ont étéensemencées à raison de 2.10^5 cellules par puit (2 ml par puit) dans des plaques 6 puits (Falcon). Les cellules ont été traitées par gemcitabine (10 nM), olaparib (1 μ M), talazoparib (100 nM) et/ou irradiées (dose : 2-6 Gy ou 2-10 Gy selon l'étude) selon les procédures décrites précédemment. 24h après irradiation, les cellules ont été réensemencées. Chaque concentration cellulaireensemencée est connue et celle-ci est adaptée en fonction de la dose d'irradiation. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 14 à 20 jours en fonction de la lignée cellulaire. Le test de survie clonogénique a été ensuite arrêté. Les colonies ont été lavées au tampon phosphate salin (PBS ; Pan Biotech) puis fixées et colorées par une solution contenant 0,5% de cristal violet (Sigma-Adrich, 1 g de cristal violet dissous dans 50 ml d'éthanol et 950 ml d'eau distillé). Après rinçage au PBS, les plaques ont été séchées à température ambiante. Les colonies positives (>50 cellules) ont ensuite été comptées à l'œil nu. La fraction de cellules survivantes a été calculée par rapport à un contrôle sans traitement.

L'efficacité d'ensemencement (EE) a été calculée à partir des cellules non-irradiées selon la formule :

$$EE = 100 \times \frac{\text{nombre de colonies formées}}{\text{nombre de cellulesensemencées}}$$

Les résultats sont exprimés en fractions de survie calculées pour toutes les conditions selon la formule :

$$\text{Fraction de survie} = \frac{\text{nombre de colonies formés en condition X}}{\text{nombre de cellulesensemencées en condition X}} \times \frac{1}{EE}$$

8. Co-marquage cycle cellulaire/ γ H2AX

24h après les traitements, le milieu a été aspiré puis les cellules ont été lavées avec 1 ml de PBS. Les cellules ont été trypsinées, récoltées et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Les cellules ont été lavées au PBS et fixées avec une solution d'éthanol 70% froid puis congelés à -20°C pour un jour minimum. Une solution de BSA-T-PBS a été préparée avec 5 g de BSA (Sigma-Aldrich) dissous dans 500 ml de PBS et 1 ml de TRITON X-100 (0,2%, Merck Millipore). Pour le marquage anti- γ H2AX, les tubes ont été centrifugés 5 min à 1500 rpm, l'éthanol a été retiré et les cellules ont été re-suspendues dans 2 ml de BSA-T-PBS à deux reprises. Les cellules ont été re-suspendues dans 100 μl de solution d'anticorps primaire phospho- γ -H2AX (1/100^e, Merck Millipore), puis incubées une nuit à 4°C . Le lendemain, 2 ml de BSA-T-PBS ont été ajoutés dans chaque tube et centrifugés pendant 5 min à 1500 rpm à deux reprises. Les cellules ont été re-suspendues dans 100 μl de solution contenant l'anticorps secondaire Anti-souris Alexa 488 (Thermofischer) dilué au 1/1000^e. Les tubes ont été incubés 1 heure à température ambiante, dans l'obscurité et mélangés régulièrement. Puis 2 ml de BSA-T-PBS ont été ajoutés dans tous les tubes après l'incubation et ils ont été centrifugés pendant 5 min à 1500 rpm. Une solution iodure de propidium (IP)/RNASE a été préparée avec de la RNASE à 100 $\mu\text{g/ml}$ (Thermofischer) et de l'IP à 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été ensuite re-suspendues dans 200 μl de solution IP/RNASE puis incubées 30 minutes à température ambiante, dans l'obscurité et mélangées régulièrement. Les tubes ont été ensuite directement passés au cytomètre en flux. Un minimum de 10 000 cellules a été analysé au cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (Becton Dickinson). L'analyse des données a été faite avec le logiciel BD Accuri Software (Becton Dickinson).

9. Évaluation de la mort cellulaire

9.1. Apoptose

Les cellules pancréatiques ont été traitées par les agents pharmacologiques (olaparib/gemcitabine/talazoparib) et irradiées. Vingt-quatre heures après traitement à l'olaparib et/ou à la gemcitabine et quarante-huit heures après traitement par l'olaparib ou le talazoparib, le milieu a été aspiré et les cellules ont été lavées avec du PBS et trypsinées. Les cellules ont été reprises dans 200 μl de binding buffer (FITC *Annexin V Apoptosis Detection kit*, BD Pharmingen), sauf pour le premier tube (DMSO, non irradié) où les cellules ont été reprises avec 400 μl de binding buffer. 100 μl de ces solutions sont repris dans de nouveaux tubes avec 5 μl d'iodure de propidium (IP, FITC *Annexin V Apoptosis Detection kit*, BD Pharmingen) et 5 μl d'annexine V (FITC *Annexin V Apoptosis Detection kit*, BD Pharmingen).

Le contrôle a été effectué à partir du premier tube (DMSO, 0 Gy) où trois marquages ont été effectués: sans marquage, marquage à l'IP seul, marquage à l'annexine V seul et double marquage. Ensuite, 400 µl de binding buffer ont été ajoutés par tube puis la lecture a été faite avec un cytomètre. Un minimum de 10 000 cellules par condition a été analysé au cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (Becton Dickinson). L'analyse des données a été faite avec le logiciel BD Accuri Software.

Ce co-marquage permet alors de mettre en évidence trois populations cellulaires, les cellules vivantes (Annexine V-/IP-), les cellules en apoptose précoce (Annexine V+/IP-) et les cellules en apoptose tardive ou nécrose (Annexine V+/IP+).

9.2. Autophagie

Le marquage de l'autophagie a été réalisé à l'aide d'un kit : Cyto-ID® *Autophagy Detection Kit* (Enzo Life Sciences) et a permis le marquage des vésicules autophagiques de façon spécifique à l'aide d'un agent fluorescent. Cet agent fluorescent est un traceur cationique amphiphile. Celui-ci pénètre dans les cellules et marque les vacuoles liées à la voie de signalisation de l'autophagie. Ce test a été réalisé à partir des mêmes conditions que la mesure de l'apoptose (§23.1).

Vingt-quatre heures après traitement, 500 000 cellules ont été récoltées, les cellules ont été lavées au PBS, centrifugées 5 minutes à 1500 rpm puis suspendues dans 250 µl de PBS + 250 µl de solution de marquage autophagique (Cyto-ID, dilué au 1/2000^e dans du PBS). Les tubes ont été incubés à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à 37°C. Après marquage, les cellules ont été centrifugées 5 minutes à 1500 rpm, le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire a été suspendu dans 200 µl de PBS. Un minimum de 10 000 cellules a été analysé au cytomètre en flux. Un facteur d'induction d'autophagie, fonction de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) a été ensuite calculé selon la formule [137] :

$$\text{Facteur d'induction d'autophagie} = 100 \times \frac{\text{MFI traité} - \text{MFI contrôle}}{\text{MFI traité}}$$

10. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage permettant de mettre en évidence une protéine spécifique ainsi que sa localisation dans la cellule. Les puits de la Lab Tek (Brand Products, Thermo Fisher Scientific) ont étéensemencés avec 25 000 cellules/ml dans 2 ml d'une suspension cellulaire. 24h après ensemencement, les cellules ont été traitées

par différents agents, en fonction de la finalité de l'expérience (olaparib, talazoparib, irradiation, H₂O₂).

Pour le marquage des lames, le milieu de chacun des puits de la lame a été retiré et un lavage PBS a été effectué (2 ml par puit). Les cellules ont été ensuite fixées en PFA 4% ou par une solution de méthanol : acétone froid (v/v 1 : 1) puis incubées 15 minutes à température ambiante. La solution de méthanol-acétone a été utilisée pour le marquage de la PARylation car le PFA active la PARylation. Les cellules ont été ensuite rincées avec du PBS-Triton à 0,5% ou PBS-Tween 20 0,05%, puis incubées 10 minutes à température ambiante. Cette étape a été réalisée 2 fois. Le marquage des lames, les délais de traitement et les dilutions des anticorps sont présentés dans le Tableau 5. Les anticorps primaires anti- γ -phospho-H2Ax, anti-DNA PKcs, anti-RAD51 et anti-53BP1 ont été dilués dans une solution de PBS-Triton 0,1%, BSA 1% (Sigma Life sciences). L'anticorps anti-PAR a été dilué dans une solution de PBS-Tween 20 0,05% contenant 1mg/ml de BSA.

400 μ l de cette solution d'anticorps ont été ajoutés dans les puits. Les lames ont été incubées une nuit à 4°C. Trois lavages PBS-Triton 0,1% (2 ml par puit) ont été effectués, avec 10 min d'incubation à chaque fois. Les anticorps secondaires Alexa 488 ou Alexa 568 ont été dilués dans une solution de PBS-Triton 0,1%, BSA 0,1% (Tableau 5). 400 μ l de cette solution d'anticorps par puit ont été incubés 3h à température ambiante et dans l'obscurité, pour éviter que les fluorochromes ne soient excités par la lumière. Ensuite, la solution de chaque puit est retirée. Deux lavages PBS (2 ml par puit, 10 min d'incubation) ont été effectués puis 30 μ l de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, agent intercalant de l'ADN, Southern Biotech) et d'un *antifading* ont été déposés dans chaque « puit » de la lame. Les lamelles ont été déposées sur chaque lame, qui ont été ensuite placées à 4°C, à l'abri de la lumière pendant au moins 30 minutes. Les cellules ont été visualisées au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 80i, objectif 40x, logiciel NIS Element BR). Les cellules présentant plus de 10 foci ont été comptées sur l'ensemble des cellules présentes dans le champ. Un minimum de 100 noyaux a été compté par condition.

Anticorps	Isotype	Dilution	Délai	Fournisseur
Anti-phospho-H2A.X	IgG monoclonal de souris, clone JBW301	1:500	24h	Merck Millipore
Anti-DNA PKcs (phospho S2056)	IgG polyclonal de lapin	1:1000	3h	Abcam
Anti-53BP1	IgG polyclonal de lapin	1:1000	24h	Bio-Techne
Anti-RAD51	IgG polyclonal de lapin	1:300	3h	Abcam
PAR	IgG monoclonal de souris	1:1500	1h	Laboratoire de poly(ADP-ribosylation et intégrité du génome, ESBS, Illkirch
Anti-PARP-1	IgG monoclonal de lapin	1:4000		Cell Signaling
Anti-Histone H3 [1B1B2]	IgG monoclonal de souris	1:2000		Abcam
Anticorps secondaire Alexa Fluor 568	IgG polyclonal chèvre anti-lapin	1:1000		Invitrogen
Anticorps secondaire Alexa Fluor 488	IgG polyclonal chèvre anti-souris	1:1000		Invitrogen
Anticorps secondaire IgG HRP-conjugué	Chèvre Anti-lapin	1:2000		Sigma-Aldrich
Anticorps secondaire IgG HRP-conjugué	Chèvre Anti-souris	1:2000		Sigma-Aldrich

Tableau 5 : Anticorps utilisés pour l'immunofluorescence et le western-blot.

11. Piégeage de la PARP-1

Afin d'évaluer la capacité des PARPi à piéger la PARP-1 sur l'ADN, les cellules ont été traitées par un PARPi (olaparib/talazoparib) pendant 1h puis les cellules ont été incubées 10 min avec 500 μ M de H₂O₂. Les fractions protéiques nucléaires et liées à la chromatine ont ensuite été extraites avec un kit d'extraction des fractions sub-cellulaire (*Subcellular protein extraction kit*, #78840, Thermofischer Scientific). Les extraits protéiques ont été déposés sur gel SDS-PAGE (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette). Après migration et transfert sur membrane de PVDF, les membranes ont été saturées avec du TBS (Tris-Buffered saline) avec 0,05% de Tween et 5% BSA pendant 1h puis incubées à 4°C toute la nuit avec l'anticorps primaire monoclonal anti-PARP-1 de lapin (Cell signaling, France, Tableau 5). Après lavages, les immunocomplexes ont été détectés avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'HRP et les Western-blot ont été

révélés par chimioluminescence avec le ChemiDoc Touch (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette et analysé avec le logiciel Image lab (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette).

12. Etude *in vivo*

12.1. Xénogreffe des tumeurs sur souris nude NMRI

Une étude a été réalisée pour évaluer la radiosensibilisation *in vivo* de la gemcitabine et/ou de l'olaparib sur les cellules tumorales pancréatiques MIA PaCa-2. Les protocoles d'expérimentation ont été approuvés par le comité d'éthique n°35 CREMEAS et autorisés par le Ministère de l'Enseignement Supérieur de la recherche et de l'Innovation sous les références APAFIS#14091-2018031512594332 v1 pour l'étude photon et APAFIS#11951-201706091022756 v4 pour l'étude proton. Durant toute la durée de l'expérimentation, les souris ont été hébergées à l'animalerie du Institut de recherche en cancérologie digestive (IRCAD Strasbourg) pour l'étude photon et à l'animalerie de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC, Strasbourg) pour l'étude proton.

Les tumeurs ont été obtenues par injection sous-cutanée de $5 \cdot 10^6$ cellules MIA PaCa-2 (ATCC) dans 100 μ l d'une solution de 10% de SVF/DMEM : Matrigel (1 : 1) dans le flanc droit de souris nude NMRI Foxn1 femelles âgées de 5 semaines (Janvier Labs, France). Des tumeurs d'environ 100 ± 20 mm³ de diamètre ont été obtenues 10 jours après injection. Les souris ont alors été randomisées afin de les répartir en 12 groupes de traitement de 10 souris chacun. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale après anesthésie à l'isoflurane (2,5%) dès qu'un point limite ont été atteint (volume tumoral $V \geq 1500$ mm³, nécrose de la tumeur, perte de poids, altération de l'apparence générale et de la condition corporelle de l'animal).

12.2. Groupes de traitement

Après la greffe, les souris ont été réparties de manière aléatoire en 12 groupes :

- 1) Groupe témoin : les souris non-irradiées et non traitées
- 2) Groupe PARPi: traitement à l'olaparib
- 3) Groupe antimétabolite: traitement à la gemcitabine
- 4) Groupe olaparib + gemcitabine
- 5) Groupe irradiation photons à 10 Gy
- 6) Groupe olaparib + irradiation photons à 10 Gy
- 7) Groupe gemcitabine + irradiation photons à 10 Gy
- 8) Groupe CRT photon : olaparib + gemcitabine + irradiation photons (10 Gy)
- 9) Groupe irradiation protons à 10 Gy
- 10) Groupe olaparib + irradiation protons à 10 Gy

- 11) Groupe gemcitabine + irradiation protons à 10 Gy
- 12) Groupe chimioradiothérapie proton: olaparib + gemcitabine + irradiation protons (10 Gy)

12.3. Traitement par la gemcitabine et/ou l'olaparib

L'olaparib (50 mg/kg, SelleckChem) et la gemcitabine (40 mg/kg, SelleckChem) ont été administrés par voie intra-péritonéale 24 heures et 1 heure avant irradiation. La gemcitabine est dissoute dans du DMSO pour une concentration de 50 mg/ml, puis diluée dans du sérum physiologique à une concentration finale de 0,4 mg/100 µl et administrée à la concentration de 10 µl/g de masse corporelle. L'olaparib a été dissout dans du DMSO pour obtenir une concentration de 50 mg/ml, puis dilué dans du sérum physiologique et 10% de 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine (Sigma), afin d'augmenter sa solubilité, à une concentration finale de 0,5 mg/100 µl et administré à la concentration de 10 µl/g de masse corporelle.

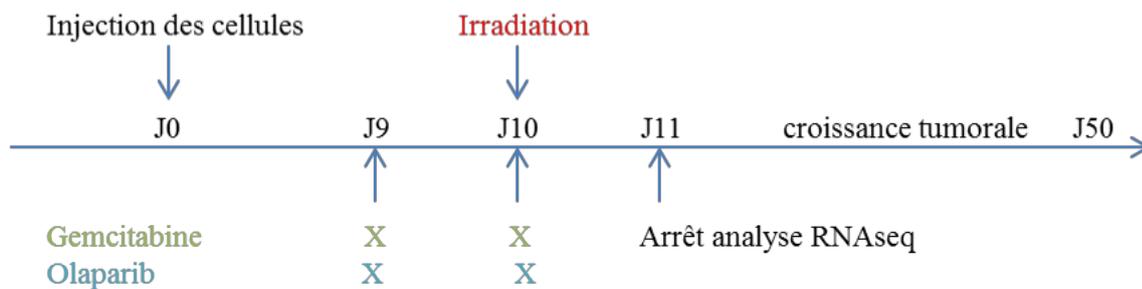


Figure 20 : Schéma de traitement des souris nude NMRI avec l'olaparib et/ou la gemcitabine et/ou l'irradiation.

12.4. Irradiations *in vivo*

Pour les expériences *in vivo*, les irradiations ont été effectuées, pour les rayons X, sur un accélérateur linéaire Novalis Tx (Service de Radiothérapie, Centre Paul Strauss, Strasbourg). L'irradiation par photon, limitée à la tumeur, a été assurée en protégeant la souris au moyen d'un bouclier en plomb (XRaystore), à l'exception de la zone tumorale.

Dans le cas de l'irradiation par des protons, les expériences ont été réalisées sur la ligne de radiobiologie du cyclotron Cyrcé (IPHC, Strasbourg) [138]. Pour les protons, la distribution de dose ne nécessite pas de protection (pic de Bragg).

Les souris ont été anesthésiées avant irradiation avec un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg). L'irradiation a été réalisée avec une dose unique ablative de 10 Gy et un débit de dose de 8 Gy/min.

12.5. Évaluation de la croissance tumorale

L'efficacité des traitements a été évaluée par le paramètre de retard de croissance (temps pour atteindre le volume limite de 1500 mm³) et la survie. La croissance tumorale et le poids des souris ont été mesurés 3 fois par semaine. Les mesures des tumeurs ont été recueillies à l'aide d'un pied à coulisse et le volume tumoral a été calculé selon la formule suivante : $V = (\text{Longueur} \times \text{largeur}^2) / 2$.

12.6. Extraction et qualification de l'ARN

Vingt-quatre heures après le traitement, cinq souris par groupe ont été euthanasiées et les tumeurs excisées ont été cryoconservées. L'ARN des tumeurs a été extrait à l'aide du kit RNeasy Plus Universal Tissue Mini kit (Qiagen®) selon les instructions du fournisseur. Les rendements d'ARN, les concentrations et les ratios $A_{260/280}$ ont été déterminés et quantifiés sur un spectromètre Nanodrop®. L'intégrité et la qualité des ARN totaux ont été analysées sur un Bioanalyser 2100 (Agilent®). Les ARN validés ont ensuite été stockés à -80°C avant l'envoi pour séquençage de nouvelle génération.

13. Analyse RNAseq

L'analyse transcriptomique a été effectuée via la plateforme GenomEast de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Illkirch). Le séquençage a été réalisé en 2x50 paires de bases sur un séquenceur HiSeq 4000 d'Illumina avec une profondeur de lecture d'environ 60 millions de *reads* par échantillon.

L'analyse RNAseq a été réalisée en utilisant le langage R (version 3.6.0). Une analyse différentielle a été effectuée entre les différents traitements avec le DESeq² package. Les gènes avec une p valeur <0,05 et un fold change >1,5 ont été considérés comme différentiellement exprimés et représentés dans un volcano plot généré avec le package EnhancedVolcano. L'identification des voies biologiques dans chaque comparaison, les annotations et l'analyse d'enrichissement des gènes différentiellement exprimés a été réalisée avec le logiciel Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/>). Les bibliothèques Ggplot2 et clusterProfiler [139,140] ont été utilisées pour illustrer les analyses. Les cibles des lncRNA ont été identifiées à l'aide de la base de données LncRNADisease 2.0 [141].

14. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec l'environnement statistique R (version 3.5.2). Les données descriptives sont exprimées en moyenne \pm erreur-standard à la moyenne. Les comparaisons de moyennes ont été faites avec un test t de Student. Pour l'analyse de la survie clonogénique, les courbes ont été modélisées en appliquant le modèle linéaire quadratique en utilisant le package CFAssay [142] dans l'environnement R. Les courbes ont été comparées avec un test ANOVA.

Pour l'analyse *in vivo*, la progression a été définie comme la première date à laquelle le volume tumoral avait doublé par rapport au volume tumoral de départ au début du traitement. Les courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier ont été construites avec le package Survminer dans l'environnement R. La comparaison des fonctions de survie a été fait selon un test du Log-rank.

Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

PARTIE IV

Résumé PARTIE IV

Revue systématique de la littérature de la radiosensibilisation par des inhibiteurs de voies de réparation de l'ADN dans les cancers du pancréas

Des mutations impliquant des voies de réparation de l'ADN se produisent dans près de 40% des adénocarcinomes pancréatiques (PDAC), comme cela a récemment été confirmé dans une étude de séquençage de « *whole exome* » [20]. Les auteurs ont observé une fréquence élevée de mutations et de délétions dans les gènes qui interviennent dans la prise en charge des dommages à l'ADN (ATM, CHEK2, BRCA1 et BRCA2). Le facteur déterminant de la radiosensibilité cellulaire est la capacité des cellules à réparer les cassures double brin. Par conséquent, le ciblage des protéines impliquées dans la réponse des dommages de l'ADN aux rayonnements ionisants peut constituer une stratégie thérapeutique appropriée. La sensibilité à l'irradiation dépend du déficit de réparation de l'ADN et l'utilisation d'agents inhibant la réparation de l'ADN peut augmenter le nombre et/ou la complexité des cassures de l'ADN, entraînant la mort cellulaire [143]. Nous avons cherché à déterminer si la combinaison d'un traitement inhibant la réparation de l'ADN associé à la radiothérapie pouvait radiosensibiliser les PDAC dans des modèles *in vitro* ou *in vivo*. Pour répondre à cela, nous avons effectué une revue systématique de la littérature afin d'identifier les publications évaluant l'association de la radiothérapie et de thérapies ciblant la réponse aux dommages de l'ADN dans des modèles de PDAC. Le ratio de rehaussement standard (SER), la survie médiane et le retard de croissance tumoral ont été extraits. Nous avons identifié 13 publications utilisant des thérapies ciblant la réparation de l'ADN dans des modèles précliniques de PDAC.

Douze publications utilisant neuf lignées cellulaires différentes ont été incluses dans la revue. Les thérapies ciblaient spécifiquement PARP1/2, CHK1/2, ATR, Wee1, PP2A et DNA-PK. Le niveau de radiosensibilisation différait en fonction du type de lignées cellulaires et du type de traitement utilisé. Selon le type d'inhibiteur de la réponse aux dommages de l'ADN, le SER variait de 1,14 à 1,48. Pour les lignées cellulaires BRCA sauvage, tous les inhibiteurs de réponses aux dommages à l'ADN (DDRi) ont présenté une radiosensibilisation, à l'exception de l'inhibiteur de Wee1. MIA PaCa-2 étant la lignée cellulaire la plus étudiée, nous avons analysé le niveau de radiosensibilisation et montré que la radiosensibilisation augmentait de 30 à 75% selon l'inhibiteur étudié. L'ensemble des études *in vitro* a montré que les lignées cellulaires de PDAC pouvaient être radiosensibilisées par les DDRi dans une grande majorité d'études (24/28) avec un SER moyen de $1,35 \pm 0,047$.

Nous avons aussi évalué la radiosensibilisation *in vivo* des lignées cellulaires pancréatiques. Quinze expériences se sont intéressées à l'association de la radiothérapie et des DDRi *in vivo*. La plupart des études sur le sujet se sont intéressées principalement à des modèles de xénogreffes sur souris immunodéprimées. Les lignées cellulaires les plus utilisées sont des lignées commerciales mais 1/3 des expériences ont été faites avec des lignées dérivées de patients (PDX). Les schémas d'irradiation différaient aussi d'une publication à l'autre avec dans 2/3 des cas une irradiation fractionnée. Une radiosensibilisation a pu être mise en évidence dans 60% des cas.

Enfin, nous avons recherché les études évaluant l'association de la gemcitabine, de la radiothérapie et des DDRi. Deux études se sont intéressées à cette association (inhibiteurs de CHK1 et Wee1) *in vitro* et trois études à cette association *in vivo* (inhibiteurs de CHK1, Wee1 et ATR).

En conclusion, de nombreuses études se sont intéressées à évaluer la radiosensibilisation par DDRi dans des modèles précliniques de PDAC. Ces résultats vont dans le sens d'une radiosensibilisation *in vitro* et *in vivo*. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à la triple association de l'irradiation, de la gemcitabine et de l'olaparib.

Targeting DNA repair in combination with radiotherapy in pancreatic cancer: a systematic review of preclinical studies.

Waisse WAISSI, MD. MSc. (1,2), Adrien PAIX MD. MSc (1), Anaïs NICOL MSc. (2), Georges NOEL, MD. PhD. (1,2), Hélène BURCKEL PhD (2)*

1: Radiotherapy department, Centre Paul Strauss, 3, rue de la Porte de l'Hôpital, BP 42, 67065 Strasbourg cedex

2: Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, Centre Paul Strauss, UNICANCER, F-67000 STRASBOURG, France

*: **Corresponding author:** Dr H. BURCKEL, PhD, same address, hburckel@strasbourg.unicancer.fr

Conflict of Interest: no conflict for all authors

Targeting DNA repair in combination with radiotherapy in pancreatic cancer: a systematic review of preclinical studies

Abstract:

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a devastating disease with a cumulative 5-year overall survival of less than 10% for all stages. Current research that combines radiation with targeted therapy may dramatically improve prognosis. We investigated preclinical outcomes of DNA repair inhibitor targeted therapy associated with radiotherapy.

Methods: We searched Pubmed database to identify publications assessing DNA damage targeted therapies in preclinical models of PDAC *in vitro* and *in vivo*. Standard enhancement ratio (SER), median survival and growth delay were extracted.

Results: We identified thirteen publications using DNA repair targeted therapies in preclinical models of PDAC. Twelve publications comprising 28 experiments evaluated radiosensitization with DNA repair inhibitor *in vitro* and displayed cell killing by a factor of 1.35 ± 0.047 . Moreover, 86% (24/28) of *in vitro* experiments showed radiosensitization with DDRi. However, only 60% (9/15) of the fifteen *in vivo* experiments showed radiosensitization.

Conclusion: DNA repair targeted therapies use promising radiosensitizers for PDAC and could successfully be translated into clinical trials.

Introduction:

Pancreatic cancer has one of the highest mortality rates among carcinomas. Chemoradiotherapy (CRT) of pancreatic cancer enables unresectable tumors to be resectable and can improve outcomes. Pancreas is an abdominal gland surrounded by many radiosensitive organs such as small bowel, kidneys and liver. Nowadays, delivering appropriate dose to the tumor and minimizing dose to normal tissue is mainly possible, using modern techniques of radiotherapy such as intensity modulated radiotherapy (IMRT) or stereotactic body radiotherapy (SBRT). Another way to optimize cancer cell killing and reduce adverse events to normal tissue is based on the development of targeted radiosensitizers. Targeted therapy differs from chemotherapy as it interferes with a key pathway in tumoral progression, whereas chemotherapy acts on cell growth/division. In the era of personalized medicine, association between radiotherapy and targeted therapy could offer a new perspective for patients with pancreatic cancer. Recently, interest has focused on the understanding of molecular and biological nature of pancreatic cancer [1]. Over the last few years, several studies have delivered a large and complete genetic analysis of pancreatic cancer. Indeed, key oncogenes (KRAS) and tumor suppressor genes (CDKN2A, TP53, SMAD4, BRCA2) are highly mutated in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and appear early in the tumoral progression leading to cell proliferation, differentiation and survival [2]. DNA repair has become a major topic of investigation for the treatment of cancer. Mutations involving DNA repair pathways occur in almost 40% of PDAC, as it has recently been confirmed in a whole-exome sequencing study from microdissected PDAC cases associated with outcome data. Authors observed a high frequency of mutations and deletions in genes that interfere with DNA damage maintenance, such as multiple Fanconi Anemia genes (ATM, CHEK2, BRCA1 and BRCA2)[2]. The key determinant of cellular radiosensitivity is the capacity of cells to repair highly lethal DNA double-strand breaks (DSBs). Therefore, targeting proteins involved in DNA damage response to ionizing radiation may be an appropriate alternative strategy. Indeed, a recent whole-genome sequencing study analysing structural variations among pancreatic cancers identified four structural variations based on translocations, copy number variations, deletions and amplifications [3]. Tumors with an “unstable” subtype were harbouring BRCANess signature with BRCA1/2 or PALB2 deleterious mutations and were sensitive to platinum-based therapy. Irradiation sensitivity depends on DNA repair deficiency and using agents that inhibit DNA repair may enhance number and/or complexity of strand breaks, leading to cell death. Therefore, the goal of the present systematic review was to retrieve publications regarding *in vitro* and *in vivo* assessments of DNA repair targeted therapies used as radiosensitizers for pancreatic cancer (2007–2018).

We aimed to investigate whether *in vitro* and *in vivo* combination of DNA repair targeted therapy and irradiation are affected by types of targeted therapies and/or by types of cell lines.

Materials and methods:

Data sources and study selection. PubMed database was searched with the following search string: "Pancreatic cancer"[All Fields] AND ("radiosensitization"[All Fields] OR "chemoradiation"[All Fields] OR "radiochemotherapy"[All Fields] OR "chemoradiotherapy"[All Fields] OR "radiation"[All Fields]) AND ("2007/01/01"[PDAT] : "2019/01/11"[PDAT]). Then, all titles or abstracts containing DNA damage response terms (ATM/ATR, CHK1/2, Wee1, PARP, DNA-PK, PP2A) were identified. References of all included studies were reviewed for more eligible studies. The last search was run on January the 11th 2019. Each study was screened and reviewed for eligibility independently by two authors. For *in vitro* assessment, studies were excluded if they did not report colony forming assay with multiple dose assessment. Finally, because photon irradiation is currently standard of care for patients with PDAC, we analyzed studies using photons as part of treatment.

Outcomes. The primary outcome was the standard enhancement ratio (SER) evaluating the *in vitro* radiosensitization effect of DNA damage response inhibitor on colony forming assay. For studies which did not specify SER in their manuscript, data were extracted from published plots using Web Plot Digitizer (<https://automeris.io/WebPlotDigitizer>) to convert datapoints into numerical values. Then SER was determined by calculating the ratio of doses in treated and control conditions for a given isoeffect (SF=0.1).

Secondary outcomes included the *in vivo* radiosensitization effect of DNA damage response inhibitors, the *in vitro/in vivo* radiosensitization effect of DNA damage response inhibitors on normal cell lines and the *in vitro/in vivo* effect of DNA damage response inhibitors on gemcitabine-based chemoradiotherapy.

Data extraction. Data were extracted independently and verified by two authors (WW and AP) using a predefined data extraction form.

For each study, we extracted the type of cell line and the type of targeted therapy used. Concerning *in vivo* studies, the type of graft (xenotopic/orthotopic), the radiotherapy schedule (fractionation/single dose) and the criteria for assessing drug activity (tumor doubling time/ tumor growth delay) were also reported.

Results:

Identified studies:

PubMed database searches yielded 2496 unique citations. All abstracts from PubMed were retrieved and using `pubmed.mineR` package we selected 76 abstracts containing one of the following terms: “ATM”, “ATR”, “PARP”, “Wee1”, “PP2A”, “CHK” and “DNA-PK”. After full-text review and evaluation of appropriate references, 13 unique citations were included in this review (Figure 1).

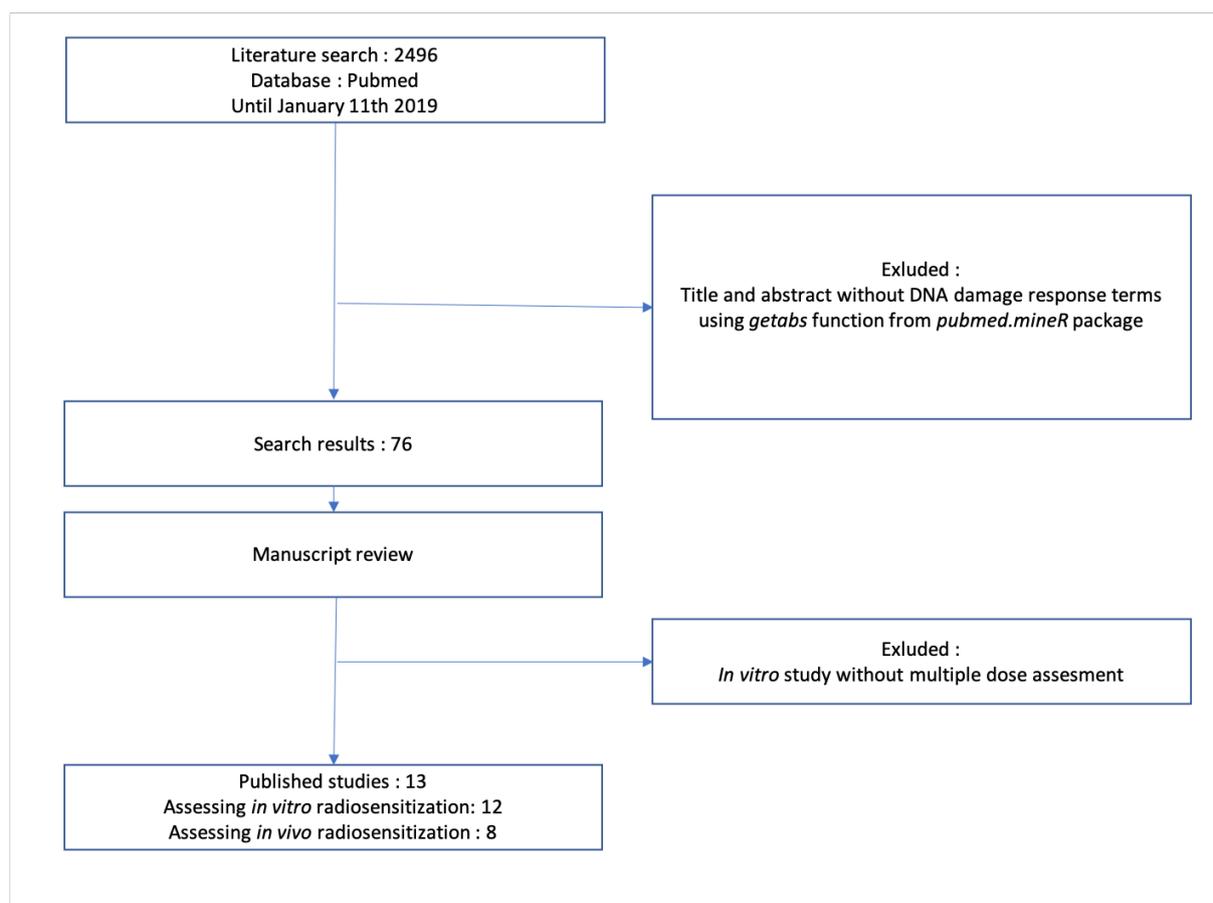


Figure 1: Flow chart of systematic review.

In Vitro radiosensitization:

Twelve publications using 9 different cell lines were included in the review (Table 1). They presented therapies targeting PARP1/2, CHK1/2, ATR, Wee1, PP2A and DNA-PK in respectively three, three, two, two, one and one studies. Radiosensitization level differed from type of cell lines and type of targeted therapy (figure 2 and 3). Depending on the type of DNA damage response (DDR) inhibitor, SER ranged from 1.14 to 1.48. For BRCA-WT cell lines, all DDR inhibitors (DDRi) showed radiosensitization, except for Wee1 inhibitor which radiosensitized in 40% of experiments (2/5). As MIA PaCa-2 was the most studied cell line, we

analyzed the level of radiosensitization and showed that radiosensitization was enhanced from 30 to 75% depending on DDRi. In two studies with Capan-1 (BRCA2 mutated) cell line, there was no radiosensitization with either Wee1 or CHK1 inhibitors. Taken together, the pooled analysis of *in vitro* studies showed that DNA targeting therapy radiosensitized pancreatic cancer cell lines in a large majority of studies (24/28), with a mean standard enhancement ratio of 1.35 ± 0.047 .

Author	Target	DDR inhibitor	Cell line	Radiosensitization	SER±SE	Mean SER±SE		
Fokas <i>et al.</i> [5]	ATR	VE-822	MIA PaCa-2	Yes	2.1* (N=3)	1.48 ± 0.11		
			PSN1	Yes	1.5* (N=3)			
			PancM	Yes	1.5* (N=3)			
Prevo <i>et al.</i> [17]		VE-821	MIA PaCa-2	Yes	1.4* (N=3)			
			PSN1	Yes	1.3* (N=3)			
			PANC-1	Yes	1.35* (N=3)			
			PancM	Yes	1.25* (N=3)			
Morgan <i>et al.</i> [23]		CHK1	AZD7762	MIA PaCa-2	Yes		1.5±0.08 (N=4)	1.35 ± 0.13
Vance <i>et al.</i> [4]				MIA PaCa-2	Yes		1.5±0.0 (N=3)	
	Mpanc-96			Yes	2±0.01 (N=3)			
Engelke <i>et al.</i> [7]	MK8776		AsPc-1	Yes	1.2±0.1 (N=3)			
			MIA PaCa-2	Yes	1.2±0.1 (N=3)			
			BxPC-3	Yes	1.2±0.1 (N=3)			
			CAPAN-1	No	0.9±0.1 (N=3)			
Tuli <i>et al.</i> [13]	PARP		Veliparib	MIA PaCa-2	Yes	1.29# (N=NC)	1.34 ± 0.07	
Vance <i>et al.</i> [4]			Olaparib	MIA PaCa-2	Yes	1.5±0.1 (N=3)		
		Mpanc-96		Yes	1.5±0.1 (N=3)			
Karnak <i>et al.</i> [14]		AsPc-1		Yes	1.2±0.2 (N=3)			
		MIA PaCa-2	Yes	1.2±0.1 (N=3)				
Kausar <i>et al.</i> [8]	Wee1	AZD1775	MIA PaCa-2	No	1.1±0.1 (N=4)	1.14 ± 0.05		
			PANC-1	No	1.1±0.1 (N=4)			
CAPAN-1			No	1±0.3 (N=4)				
Karnak <i>et al.</i> [14]			AsPc-1	Yes	1.2±0.1 (N=3)			
			MIA PaCa-2	Yes	1.3±0.1 (N=3)			
Li <i>et al.</i> [18]			DNA-PK	NU7026	PANC-1		Yes	1.44* (N=3)
	898T	Yes			1.33* (N=3)			
Wei <i>et al.</i> [24]	PP2A	LB100	MIA PaCa-2	Yes	1.3±0.04 (N=3)	1.35 ± 0.05		
			PANC-1	Yes	1.4±0.04 (N=3)			

Table 1: *In vitro* radiosensitizing effect of DNA damage response inhibitors. *DDR* =DNA Damage Response; *SER*=Standard enhancement ratio; *SE*=Standard error. * Data extracted from cell survival curves. #Standard error was not described in the manuscript.

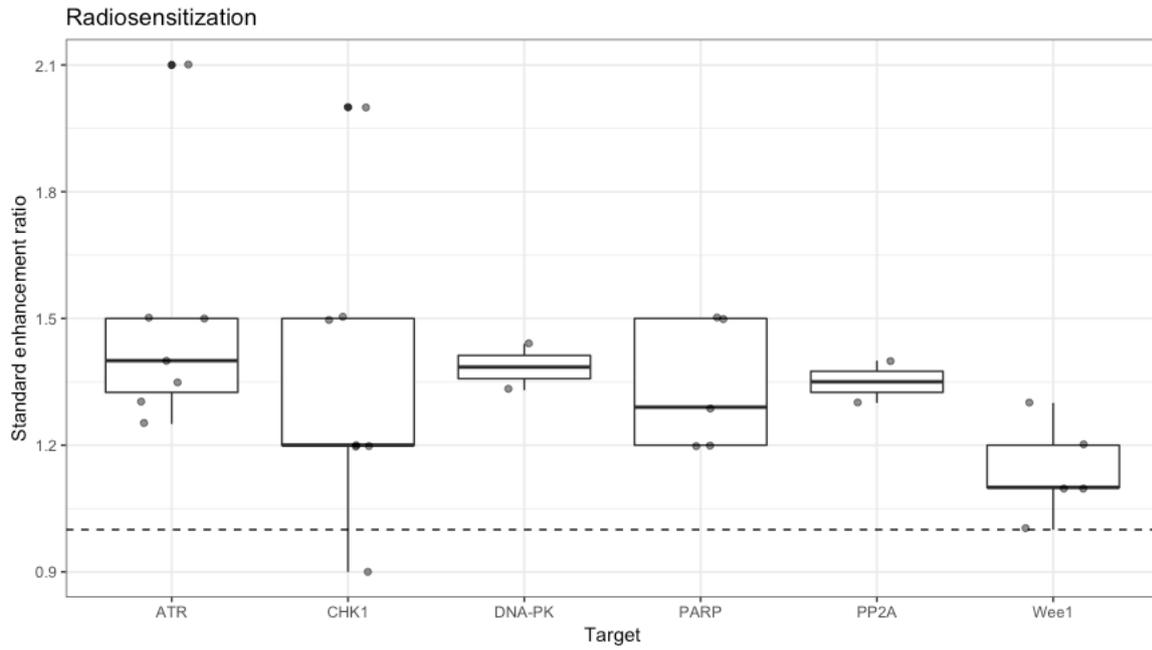


Figure 2: Boxplot representing standard enhancement ratio as a function of DNA damage response inhibitor type.

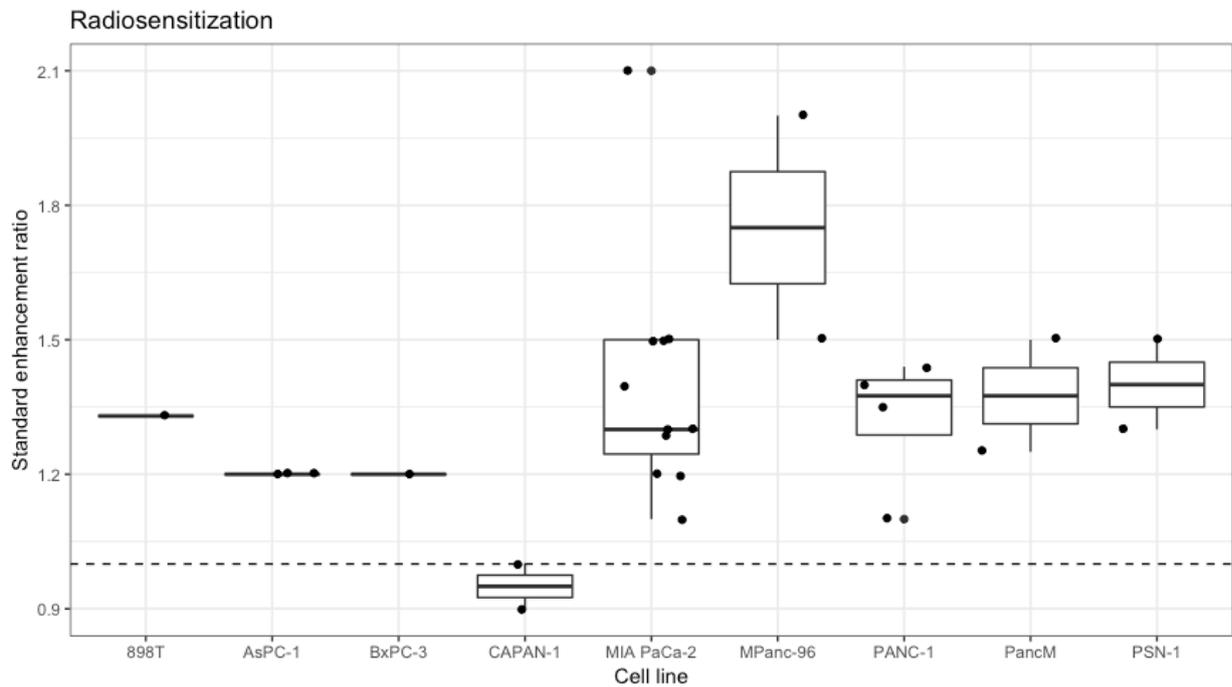


Figure 3: Boxplot depicting standard enhancement ratio as a function of cell line type.

In Vivo radiosensitization:

Eight studies with fifteen different experiments were included in this review (Table 2). Almost all experiments worked on subcutaneous xenografts, except one which used orthotopic xenograft. Most *in vivo* experiments were based on commercial cell lines derived xenograft

models (10/15), the others on patient-derived xenografts (PDX). For both survival and volume experiments, the reporting amount of pancreatic tumor cells injected gave a median of 5.10^6 cells (range: 1.10^6 - 5.10^6). One-third of the experiments reported single dose schedule (5/15) from 5 to 12 Gy, whereas the remaining ten experiments reported fractionated irradiation (from 1 to 2 Gy per fraction, for a total dose of 9 to 18 Gy). Radiosensitization effects were reported in 60% experiments (9/15), by enhancing tumor doubling time or increasing growth delay, compared to irradiation alone.

Potentialized gemcitabine-based chemoradiotherapy:

As gemcitabine-based chemoradiotherapy is part of treatment for patients with locally advanced PDAC, we aimed to analyze the capacity of DDRi to enhance chemoradiosensitization. Two *in vitro* studies assessed gemcitabine-based chemoradiotherapy (GB-CRT) sensitization with DNA repair targeted therapies on five different cell lines for a total of seven experiments (Table 3). Five among seven experiments showed a significant enhancement of GB-CRT with DDRi, compared to radiosensitization with gemcitabine alone. Capan-1 cell line was the only one that could not be radiosensitized with DDRi when treated with GB-CRT. Three *in vivo* studies assessed gemcitabine-based chemoradiotherapy sensitization with DNA repair targeted therapies on subcutaneous xenografts (Table 4). One study used PDX. The addition of DDRi to the combination of gemcitabine and irradiation extended substantially tumor growth delay (survival) and time required for tumor doubling in two out of three experiments and trend to enhance tumor growth delay in the latter.

Effect on normal cell radiosensitivity:

Given that the dose-limiting toxicity for radiation treatment of the pancreas is duodenum, two studies also evaluated the effect of DDRi on the radiosensitization of normal intestinal epithelial cells. Vance *et al.* showed that neither olaparib (PARP inhibitor, PARPi) nor AZD7762 (CHK1 inhibitor) radiosensitized normal cells [4]. However, their association enhanced cytotoxicity compared to each inhibitor alone. Fokas *et al.* evaluated the radiosensitizing effect of VE-822 (ATR inhibitor (ATRi)) on intestinal morphology, after mice abdominal X-ray irradiation (XRT). Authors showed that in mice treated with VE-822 and XRT, number of apoptotic intestinal cells, jejunal morphology and weight loss were not significantly different compared to mice treated with XRT alone [5].

Discussion:

Although many chemotherapeutic agents have been evaluated for radiosensitization of pancreatic cancer, 5-fluorouracil and gemcitabine are the most used in current daily practice. More recently, non-chemotherapeutic agents such as DNA damage response inhibitors were under development as single agents or in association with chemotherapy. In this review, we aimed to define the potential radiosensitizing role of DDRi for pancreatic cancer. To the best of our knowledge, this is the first systematic review assessing published preclinical radiosensitization data, through DDR inhibition in pancreatic cancer. We identified that DNA repair targeted therapies enhanced by one-third radiosensitization *in vitro*. As a result of the small number of studies, we could not fully establish that radiosensitization was influenced by the type of DNA repair inhibitor or type of cell line. As the therapeutic effect depends on the difference between efficacy on tumor cells and toxicity on normal cells, we submitted in this review that only two studies out of fifteen assessed the effect of two targeted therapies (PARPi and ATRi) on both epithelial intestinal and pancreatic tumor cells. These studies emphasized that neither PARPi nor ATRi enhanced radiation effect on intestinal cells *in vitro* (PARPi) and *in vivo* (ATRi) [4,5]. Whereas gemcitabine-based chemoradiotherapy can increase local control rates and improve progression-free survival, local recurrence remains a matter of concern [6]. DDRi may radiosensitize and also enhance gemcitabine-based chemoradiotherapy. Three publications presented that targeting DDR proteins (CHK1, ATR, Wee1) is an effective strategy for sensitizing pancreatic cancers to gemcitabine-based chemoradiation [5,7,8].

Irradiation induces different types of DNA damage such as single-strand breaks (SSB), double-strand breaks (DSB), DNA crosslinks and base modifications. The type of DNA damage triggers different response pathway. It is well known that PARP-1 is a major SSB sensor, allowing the recruitment of DNA repair proteins such as XRCC1, DNA ligase III and polymerase- β , thus inducing DNA repair [9]. As a single agent, PARPi are particularly used for treatment of homologous recombination (HR) deficient cells, based on the concept of synthetic lethality [10]. However, only a small fraction of pancreatic cancers (15.4%) is HR deficient [11]. As a fundamental component of DDR, PARP-1 can be inhibited in cancer cells, thus explaining the rationale for combination with irradiation [12]. In this review, we pointed out that three studies presented an increase of *in vitro* radiosensitization with PARPi from 20 to 50% [4,13,14]. However, two of these studies evaluated radiosensitization *in vivo* [13,14] and only one showed radiosensitization [13]. Based on preclinical data, authors conducted a phase I study evaluating gemcitabine-based chemoradiotherapy with PARPi (veliparib) and indicated that the association was well-tolerated and emphasized that PARP3 and RBX1

expressions were associated with improved overall survival [15].

Single-strand breaks could also activate ATR/CHK1 pathway, thus triggering S and G2/M-phase checkpoints. It is worth noting that ATR is also involved into the stabilization of stalled forks replication preventing their collapse [16]. Thus, inhibiting ATR may enhance stress replication. Two studies evaluated ATRi as radiosensitizer and presented a SER from 1.3 to 2.1, depending on cell lines [5,17]. This *in vitro* radiosensitization was confirmed *in vivo* [5].

DSB remains to be the major lethal type of DNA damage after irradiation. DSBs repair requires histone H2AX phosphorylation, recruitment of MRN complex (MRE11-Rad50-Nbs1) and ATM. Two main mechanisms are involved in DSBs repair: homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ). DDRi were evaluated in proficient and deficient HR cell lines. It is stressed that DDRi did not radiosensitize BRCA2 mutated and HR deficient cell line Capan-1 [7,14]. Indeed, HR deficient cells are sensitive to both DDRi and irradiation alone. Thus, the expected benefit of their combination would be very small and not clinically significant. In comparison to HR, DSB ligation through NHEJ pathway is active throughout the cell cycle and has faster kinetic. Li et al. showed that PDAC developed a reliance on NHEJ and as major component of NHEJ, DNA-PK inhibition enhanced radiosensitization *in vitro* [18].

In past few years, radiotherapy technical advances such as protontherapy, allowed to increase physical dose to the tumor, while decreasing dose to normal tissue. Thanks to physical characteristic of Bragg peak (BP), protons demonstrate a good dose distribution. The biological effectiveness of charged particles is mostly dependent on the linear energy transfer (LET) of the particles. Indeed, it has been postulated that multiple damage within a short DNA segment, known as clustered damage sites, is the major lethal type of damage induced by high-LET particles [19]. Thus, one would argue that enhancing the number or complexity of DNA damage through DDR inhibition could improve biological effectiveness [20]. Thus, two studies investigated the effect of PARP inhibition on the response of high-LET irradiation and showed that *in vitro* enhancement ratio ranged from 1.4 to 2.5, depending on LET and PARPi concentrations [21,22]. Authors implied that PARPi sensitized cells with high-LET irradiation by enhancing the number of sub-lethal oxidative clustered DNA damage, thus leading to a delay in DNA damage repair [22].

In past decades, many advances have been made for most of cancer subtypes. However, there was no substantial change for patients diagnosed with pancreatic cancers. In the same time, the comprehension of pancreatic cancer biology generated considerable interest. The major challenge is now to translate this biological knowledge into clinical application. For this purpose, targeting DNA damage response in combination with radiotherapy is of great potential

and needs to be confirmed with clinical data. Lastly, future clinical trials should also assess the potential of biomarkers of response for each drug, thus identifying patients that could benefit from each type of radiosensitizers.

References

- [1] Falasca M, Kim M, Casari I. Pancreatic cancer: Current research and future directions. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 2016. doi:10.1016/j.bbcan.2016.01.001.
- [2] Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin W-C, Mansour J, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* 2015;6:6744. doi:10.1038/ncomms7744.
- [3] Waddell N, Pajic M, Patch A-M, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015;518:495–501. doi:10.1038/nature14169.
- [4] Vance S, Liu E, Zhao L, Parsels JD, Parsels LA, Brown JL, et al. Selective radiosensitization of p53 mutant pancreatic cancer cells by combined inhibition of Chk1 and PARP1. *Cell Cycle* 2011;10:4321–9. doi:10.4161/cc.10.24.18661.
- [5] Fokas E, Prevo R, Pollard JR, Reaper PM, Charlton PA, Cornelissen B, et al. Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death Dis* 2012;3:e441–e441. doi:10.1038/cddis.2012.181.
- [6] Zhu C-P, Shi J, Chen Y-X, Xie W-F, Lin Y. Gemcitabine in the chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: A meta-analysis. *Radiother Oncol* 2011;99:108–13. doi:10.1016/j.radonc.2011.04.001.
- [7] Engelke CG, Parsels LA, Qian Y, Zhang Q, Karnak D, Robertson JR, et al. Sensitization of Pancreatic Cancer to Chemoradiation by the Chk1 Inhibitor MK8776. *Clin Cancer Res* 2013;19:4412–21. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3748.
- [8] Kausar T, Schreiber JS, Karnak D, Parsels LA, Parsels JD, Davis MA, et al. Sensitization of Pancreatic Cancers to Gemcitabine Chemoradiation by WEE1 Kinase Inhibition Depends on Homologous Recombination Repair. *Neoplasia* 2015;17:757–66. doi:10.1016/j.neo.2015.09.006.
- [9] Vyas S, Chesarone-Cataldo M, Todorova T, Huang Y-H, Chang P. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat Commun* 2013;4. doi:10.1038/ncomms3240.
- [10] Chalmers AJ, Lakshman M, Chan N, Bristow RG. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition as a Model for Synthetic Lethality in Developing Radiation Oncology Targets. *Semin Radiat Oncol* 2010;20:274–81. doi:10.1016/j.semradonc.2010.06.001.
- [11] Heeke AL, Pishvaian MJ, Lynce F, Xiu J, Brody JR, Chen W-J, et al. Prevalence of Homologous Recombination–Related Gene Mutations Across Multiple Cancer Types. *JCO Precis Oncol* 2018;2018.
- [12] Curtin NJ, Szabo C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Mol Aspects Med* 2013;34:1217–56. doi:10.1016/j.mam.2013.01.006.
- [13] Tuli R, Surmak AJ, Reyes J, Armour M, Hacker-Prietz A, Wong J, et al. Radiosensitization of Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo through Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibition with ABT-888. *Transl Oncol* 2014;7:439–45. doi:10.1016/j.tranon.2014.04.003.
- [14] Karnak D, Engelke CG, Parsels LA, Kausar T, Wei D, Robertson JR, et al. Combined Inhibition of Wee1 and PARP1/2 for Radiosensitization in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*

2014;20:5085–96. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1038.

[15] Tuli R, Shiao SL, Nissen N, Tighiouart M, Kim S, Osipov A, et al. A phase 1 study of veliparib, a PARP-1/2 inhibitor, with gemcitabine and radiotherapy in locally advanced pancreatic cancer. *EBioMedicine* 2019. doi:10.1016/j.ebiom.2018.12.060.

[16] Qiu Z, Oleinick NL, Zhang J. ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy. *Radiother Oncol* 2018;126:450–64. doi:10.1016/j.radonc.2017.09.043.

[17] Prevo R, Fokas E, Reaper PM, Charlton PA, Pollard JR, McKenna WG, et al. The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy. *Cancer Biol Ther* 2012;13:1072–81. doi:10.4161/cbt.21093.

[18] Li Y-H, Wang X, Pan Y, Lee D-H, Chowdhury D, Kimmelman AC. Inhibition of Non-Homologous End Joining Repair Impairs Pancreatic Cancer Growth and Enhances Radiation Response. *PLoS ONE* 2012;7:e39588. doi:10.1371/journal.pone.0039588.

[19] Hada M, Georgakilas AG. Formation of Clustered DNA Damage after High-LET Irradiation: A Review. *J Radiat Res (Tokyo)* 2008;49:203–10. doi:10.1269/jrr.07123.

[20] Calugaru V, Nauraye C, Cordelières FP, Biard D, De Marzi L, Hall J, et al. Involvement of the Artemis Protein in the Relative Biological Efficiency Observed With the 76-MeV Proton Beam Used at the Institut Curie Proton Therapy Center in Orsay. *Int J Radiat Oncol* 2014;90:36–43. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.05.018.

[21] Hirai T, Shirai H, Fujimori H, Okayasu R, Sasai K, Masutani M. Radiosensitization effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cells exposed to low and high linear energy transfer radiation. *Cancer Sci* 2012;103:1045–50. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02268.x.

[22] Hirai T, Saito S, Fujimori H, Matsushita K, Nishio T, Okayasu R, et al. Radiosensitization by PARP inhibition to proton beam irradiation in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;478:234–40. doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.062.

[23] Morgan MA, Parsels LA, Zhao L, Parsels JD, Davis MA, Hassan MC, et al. Mechanism of Radiosensitization by the Chk1/2 Inhibitor AZD7762 Involves Abrogation of the G2 Checkpoint and Inhibition of Homologous Recombinational DNA Repair. *Cancer Res* 2010;70:4972–81. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3573.

[24] Wei D, Parsels LA, Karnak D, Davis MA, Parsels JD, Marsh AC, et al. Inhibition of Protein Phosphatase 2A Radiosensitizes Pancreatic Cancers by Modulating CDC25C/CDK1 and Homologous Recombination Repair. *Clin Cancer Res* 2013;19:4422–32. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0788.

[25] Lohse I, Kumareswaran R, Cao P, Pitcher B, Gallinger S, Bristow RG, et al. Effects of Combined Treatment with Ionizing Radiation and the PARP Inhibitor Olaparib in BRCA Mutant and Wild Type Patient-Derived Pancreatic Cancer Xenografts. *PLOS ONE* 2016;11:e0167272. doi:10.1371/journal.pone.0167272.

Author	Target	DDR inhibitor	Cell line	Type of graft	Fractionation	Endpoint	Endpoint for RT (days)	Endpoint for RT + inhibitor (days)	P	Radiosensitization
Morgan <i>et al.</i> [23]	CHK1	AZD7762	MIA PaCa-2	xeno	1.8 Gy/fraction, 5 days a week for 2 weeks (18Gy)	Tumor DT	89 (68-nd)	>114 (83-nd)	NS	No
			PDX	xeno		Tumor DT	15(9-18)	44 (39-53)	<0.001	Yes
			PDX	xeno		Tumor DT	32,5(16-42)	44,5(43-47)	<0.001	Yes
Engelke <i>et al.</i> [10]		MKK8776	MIA PaCa-2	xeno	1 Gy/fraction, 5 days a week for 2 weeks (10Gy)	Tumor DT	NC	NC	NS	No
Fokas <i>et al.</i> [5]	ATR	VE-822	PSN-1	xeno	6 Gy once	Tumor GD	NC	NC	<0.001	Yes
			PSN-1	xeno	2 Gy/fraction, 5 days a week for 1 week (10Gy)	Tumor GD	NC	NC	<0.001	Yes
			MIA PaCa-2	xeno	6 Gy once	Tumor GD	NC	NC	<0.001	Yes
Karnak <i>et al.</i> [14]	PARP	Olaparib	MIA PaCa-2	xeno	1.8 Gy/fraction, 5 days a week for 1 week (9Gy)	Tumor DT	13 (10-16)	10 (4-15)	NS	No
Lohse <i>et al.</i> [25]			PDX	xeno	12 Gy once	Tumor GD	53.5	53.167	NS	No
			PDX	xeno	12 Gy once	Tumor GD	61.5	58	NS	No
Tuli <i>et al.</i> [13]		Veliparib	MIA PaCa-2	ortho	5 Gy once	Tumor GD	28	36	<0.05	Yes
Kausar <i>et al.</i> [8]	Wee1	AZD1175 AZD1175	PDX	xeno	1.8 Gy/fraction, 5 days a week for 2 weeks (18Gy)	Tumor DT	17 (8-25)	21(16-26)	NS	No
Karnak <i>et al.</i> [14]			MIA PaCa-2	xeno	1.8 Gy/fraction, 5 days a week for 1 week (9Gy)	Tumor DT	13 (10-16)	17 (10-18)	<0.05	Yes
Karnak <i>et al.</i> [14]	PARP/ Wee1	Olaparib/ AZD1175	MIA PaCa-2	xeno	1.8 Gy/fraction, 5 days a week for 1 week (9Gy)	Tumor DT	13 (10-16)	26(18-36)	<0.05	Yes
Wei <i>et al.</i> [24]	PP2A	LB100	MIA PaCa-2	xeno	1.2 Gy/fraction, 5 days a week for 2 weeks (12Gy)	Tumor GD	24	33.5	<0.05	Yes

Table 2: *In vivo* radiosensitizing effect of DNA damage response inhibitors. DDR =DNA Damage Response; DT=Doubling time; GD=Growth Delay compared to control. PDX =Patient-derived xenograft, xeno=Xenotopic.

Author	Treatment	Target	Cell line	Gemcitabine SER	DDRi and Gemcitabine combination SER	Enhancement of Gemcitabine-based CRT
Engelke et al. [7]	MK8776	CHK1	AsPc-1	1.1±0.1	1.6±0.1	Yes
			MIA PaCa-2	1.2±0.1	1.6±0.1	Yes
			BxPC-3	1.1±0.2	1.7±0.3	Yes
			Capan-1	1.3±0.1	1.3±0.1	No
Kausar et al. [8]	AZD1775	Wee1	MIA PaCa-2	1.3±0.2	2.1±0.2	Yes
			PANC-1	1.1±0.4	1.5±0.2	Yes
			Capan-1	1.8±0.4	1.9±0.2	No

Table 3: *In vitro* radiosensitizing effect of DNA damage response inhibitors association with gemcitabine compared to gemcitabine alone. *DDRi* =DNA Damage Response inhibitor; *DT*=Doubling time.

Author	Cell line	Type of graft	Treatment	Target	Fractionation	Tumor DT after RT + Gem	Tumor DT after RT + Gem + DDRi	P	Radiosensitization compared to Gemcitabine-based CRT
Kausar et al. [8]	PDX	Xenograft	AZD1775	Wee1	1.8 Gy/fraction, 5 days a week for 2 weeks (18Gy)	21.5	34	0.07	Trend
Engelke et al. [7]	MIA PaCa-2	Xenograft	MK8776	CHK1	1 Gy/fraction, 5 days a week for 2 weeks (10Gy)	NC	NC	0.0087	Yes
Fokas et al. [5]	PSN-1	Xenograft	VE-822	ATR	6 Gy once	NC	NC	P<0.001	Yes

Table 4: *In vivo* radiosensitizing effect of DNA damage response inhibitors association with gemcitabine compared to gemcitabine alone. *DDRi* =DNA Damage Response inhibitor; *DT*=Doubling time.

PARTIE V

Résumé PARTIE V

Évaluation *in vitro* de la radiosensibilisation par l'olaparib et/ou la gemcitabine de quatre lignées cellulaires d'adénocarcinomes pancréatiques

Après avoir mis en évidence, dans une revue systématique de la littérature, l'absence de données de radiosensibilisation avec la gemcitabine et l'olaparib dans des lignées cellulaires pancréatiques, nous avons évalué la radiosensibilisation de quatre lignées pancréatiques BRCA1/2 sauvage par la gemcitabine, l'olaparib et leur association.

Dans un premier temps, nous avons constaté que la lignée BxPC-3 est plus radiorésistante que les autres lignées. En effet, la fraction de survie à 5 Gy (SF5) est de 21,1 % pour la lignée BxPC-3, tandis que les SF5 des lignées AsPc-1, MIA PaCa-2 et PANC-1 étaient respectivement de 5,1%, 7,1% et 14,2%.

Nous avons aussi étudié la chimiosensibilité des quatre lignées tumorales en ce qui concerne la survie clonogénique. Nous avons montré que la gemcitabine à 10 nM ne diminuait pas de manière significative la survie clonogénique des lignées cellulaires. Au-delà de 10 nM, deux sous-types de réponses ont été observés. En effet, les lignées AsPC-1 et BxPC-3 sont plutôt sensibles à la gemcitabine, alors que les lignées PANC-1 et MIA PaCa-2 sont plus résistantes. Par la suite, nous avons étudié la radiosensibilisation par l'olaparib et/ou la gemcitabine sur les quatre lignées cellulaires. La lignée BxPC-3 n'est pas radiosensibilisée par l'olaparib (SER = 1,02), alors qu'elle est la lignée cellulaire la plus radiosensibilisée par la gemcitabine (SER= 1,75). *A contrario*, la lignée PANC-1 est peu radiosensibilisée par la gemcitabine (SER=1,04), mais bien plus radiosensibilisée par l'olaparib (SER=1,38). Enfin l'addition de l'olaparib à l'association chimioradiothérapie à base de gemcitabine radiosensibilise les trois lignées cellulaires MIA PaCa-2, PANC-1 et AsPc-1 comparativement à une chimioradiothérapie seule (P<0,05).

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la distribution dans le cycle cellulaire des lignées de cancer pancréatique traitées par l'olaparib et/ou la gemcitabine et/ou l'irradiation. En présence de gemcitabine, un arrêt du cycle cellulaire en phase S a été observé, alors que l'irradiation augmentait le pourcentage de cellules arrêtées en phase G2/M. Le pourcentage d'arrêt en phase G2/M augmentait avec la dose d'irradiation. Enfin, l'olaparib seul ne modifie pas la distribution dans le cycle cellulaire, mais en association avec l'irradiation, l'olaparib augmente le pourcentage de cellules arrêtées en phase G2/M.

Puis, la proportion de cellules présentant un marquage γ -H2Ax a été évaluée par cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules marquées par γ -H2Ax augmente avec la dose d'irradiation et ceci quelle que soit la lignée cellulaire.

Sur les quatre lignées cellulaires MIA PaCa-2, PANC-1, AsPc-1 et BxPC-3 nous n'avons pas mis en évidence d'apoptose à 24h, quel que soit le traitement. Cependant, l'irradiation à forte dose (10 Gy), ainsi que la gemcitabine, induisaient de l'autophagie sur les lignées cellulaires pancréatiques. L'ajout de l'olaparib ne modifiait pas l'induction d'autophagie.

En conclusion, ce travail *in vitro* a montré une radiosensibilisation de trois lignées cellulaires de PDAC par l'olaparib à une concentration non cytotoxique. De plus, dans les trois lignées cellulaires, l'olaparib augmente la radiosensibilisation liée à la gemcitabine. Concernant la lignée BxPC-3, elle n'est pas radiosensibilisée par l'olaparib. A la suite de ce travail, nous avons continué d'explorer la radiosensibilisation dans un modèle préclinique *in vivo* (PARTIE VI) puis nous avons cherché à savoir si en changeant d'inhibiteur de PARP, la radiosensibilisation de ces lignées pouvait varier (PARTIE VII), plus particulièrement sur la lignée BxPC-3.

Gemcitabine-based chemoradiotherapy improved by PARP inhibitor in pancreatic cancer cells

W. WAISSI (1,2), J-C AME (3), G. NOEL(1,2), H. BURCKEL *(2)

1: Radiotherapy Department, Centre Paul Strauss, 3, rue de la Porte de l'Hôpital, BP 42, 67065

Strasbourg cedex

2: Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, Centre Paul Strauss, UNICANCER, F-67065

STRASBOURG Cedex, France

3: Poly(ADP-ribosyl)ation and Genome Integrity. UMR7242, Centre National de recherche

Scientifique/Université de Strasbourg, Institut de recherche de l'Ecole de Biotechnologie de

Strasbourg, 300 bld S. Brant, CS10413, F-67412 Illkirch, France

*: **Corresponding author:** Dr H. BURCKEL, PhD, same address,

hburckel@strasbourg.unicancer.fr

Conflict of Interest: no conflict for all authors

ABSTRACT:

Background: Pancreatic ductal adenocarcinoma is a devastating disease with a cumulative 5-year overall survival of approximately 9% for all stages. Gemcitabine-based chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer is highly toxic. We conducted an *in vitro* study to determine whether poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition radiosensitized gemcitabine-based chemotherapy on pancreatic adenocarcinoma cell lines.

Materials and methods: Four human pancreatic cancer cell lines, MIA PaCa-2, AsPC-1, BxPC-3 and PANC-1 were treated in their exponential growth phase at room temperature. Cells were previously treated with non-cytotoxic concentration of gemcitabine (10 nM) and/or olaparib (1 μ M). Low-LET gamma radiations were carried out using a ^{137}Cs irradiator with a dose rate of 2.5 Gy/min. Cells were irradiated with single doses of 2, 5 and 10 Gy. Clonogenic assay, cell cycle distribution, PAR immunoblotting and γ -H2AX quantifications were performed.

Results: *In vitro*, treatment with olaparib alone was not cytotoxic, but highly radiosensitized cell lines (standard enhancement ratio (SER)=1.21 \pm 0.06 for AsPC-1, SER=1.27 \pm 0.02 for MIA PaCa-2 and SER=1.38 \pm 0.01 for PANC-1), particularly at high dose per fraction (10 Gy). Simultaneously, a non-cytotoxic concentration of gemcitabine also radiosensitized cells, but clearly less than olaparib (SER=1.22 \pm 0.01 for AsPC-1, SER=1.11 \pm 0.04 for MIA PaCa-2 and SER=1.03 \pm 0.04 for PANC-1). In contrast, BxPC-3 cells were radiosensitized with gemcitabine (SER=1.75 \pm 0.01) but not with olaparib (SER=1.02 \pm 0.02). Interestingly, olaparib significantly enhanced gemcitabine-based radiosensitization in three out of four cell lines. In addition, combination of olaparib and irradiation induced a G2/M arrest in all cell lines. Finally, 24h after treatment, the number of remaining γ -H2AX stained cells was higher with cells treated with a combination of gemcitabine/olaparib and 10 Gy irradiation, compared to irradiation alone.

Conclusion: Our results showed that MIA PaCa-2, AsPC-1 and PANC-1 cell lines could be radiosensitized by the combination of gemcitabine and olaparib, through an increase of unrepaired double-strand breaks and a G2 phase block. This combination of olaparib with gemcitabine-based chemoradiotherapy could lead to an enhancement of local control *in vivo* and an improvement in disease-free survival.

INTRODUCTION

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has a very poor prognosis with a 5-year overall survival of approximately 9% (1,2). Surgery remains the only means of cure. However, at the time of diagnostic, up to 30% of patients present with unresectable locally advanced pancreatic cancer. In a subset of these patients, failing to control the primary tumor may result in side effects that can lead to death. Therefore, making unresectable tumors resectable may improve outcomes.

As gemcitabine has been shown to both be effective and to enhance radiosensitivity on PDAC cells, chemoradiotherapy (CRT) with gemcitabine is one of the current effective option for treating non-metastatic unresectable pancreatic cancer (3). However, gemcitabine-based CRT has high rate toxicity leading to a reduction of gemcitabine dose or chemotherapy discontinuation. Using modern techniques of radiotherapy such as intensity modulated radiotherapy (IMRT) or stereotactic body radiotherapy (SBRT) may simultaneously enhance dose to tumor and decrease dose to organ-at-risk, leading to a reduction of gemcitabine-radiation related toxicity. Besides targeted therapies that could be radiosensitizers and/or chemopotentiating agents may enhance this synergy.

Recently, DNA repair has become a major topic of investigation for the treatment of cancer. The key determinant of cellular radiosensitivity is the capacity of cells to repair highly lethal DNA double-strand breaks (DSBs). Therefore, targeting proteins implicated in the response to ionizing radiation-induced DNA damage, such as poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), may be an appropriate strategy. Indeed, PARP-1 is a major DNA damage sensor allowing the recruitment of DNA repair proteins involved in DNA single- and double-strand breaks repair (4). At the outset of PARP inhibitors (PARPi) development, targeting BRCA1/2 mutant tumors has been the main approach and is known as the concept of synthetic lethality. Ongoing phase III trials are testing olaparib in different tumor types with BRCA1/2 mutations such as breast cancer (clinical trial.gov NCT02032823, NCT02000622), ovarian cancer (NCT01844986, NCT01874363) and pancreatic cancer (NCT02184195). More recently, the use of PARPi has been investigated on BRCA1/2 wild-type tumors in combination with radiotherapy (4). Olaparib is one of the most recent and extensively studied PARPi, which potentiated the effect of radiotherapy in different cell lines and tumor xenograft models (5). However, association of olaparib, gemcitabine and radiotherapy has never been assessed on BRCA wild type pancreatic cancer cells yet. The main purpose of this study is to evaluate the *in vitro* antitumor efficacy of the association of a PARPi (olaparib) and gemcitabine, combined with different radiation doses, on four pancreatic cancer cell lines.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The human pancreatic cancer cell lines MIA PaCa-2, AsPC-1, PANC-1 and BxPC-3 were purchased from American Type Culture Collection (CRL-1420TM, CRL-1682, CRL-1469 and CRL-1687, respectively, ATCC; Rockville, MD, USA) and banked at Centre Paul Strauss. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and 95% air. PANC-1 was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, PAN Biotech GmbH) and 1% of a solution of penicillin (10000 IU/ml) and streptomycin (10 mg/ml) (PAN Biotech GmbH). MIA PaCa-2 was cultured in the same conditions with 1% of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, 1mM, PAN Biotech GmbH), 1% of sodium pyruvate (10 mM, PAN Biotech GmbH) and 1% of non-essential amino acids (NEAA, PAN Biotech GmbH). AsPc-1 and BxPc-3 were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI; PAN Biotech GmbH) supplemented with 10% FBS, and 1% of a solution of penicillin (10000 IU/ml) and streptomycin (10 mg/ml). Subconfluent cell monolayers were trypsinized once a week using 0.5% trypsin containing 2% EDTA (PAN Biotech GmbH) and plated at passage ratios between 0.25:10 to 1:10 according to the cell line or used directly for study after enumeration determined with a Countess® Cell Counter (Countess, Invitrogen, Carlsbad, USA).

Drugs and chemicals

Olaparib and gemcitabine were provided by Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). Stock solutions were prepared at 10 mM in DMSO and stored in aliquots at -20°C. Olaparib was used at 1 µM and gemcitabine at 10 nM.

Irradiation exposure

Cells seeded in 6-well plates were exposed, at room temperature, to photon irradiation, one hour after pharmacological treatment (olaparib and/or gemcitabine), at one fraction-doses of 2 Gy, 5 Gy and 10 Gy. A ¹³⁷Cs γ-irradiator (Biobeam GM 8000, GSM GmbH, Leipzig, Germany) was used in the Paus Strauss Center (Strasbourg, France) at a dose rate of 2.5 Gy/min. Control flasks were sham irradiated.

Clonogenic survival assay

Cells were seeded in 6-well plates at a density of 2×10^5 cells per well and allowed to adhere overnight in standard culture conditions. Cells were exposed to DMSO (control), olaparib and/or gemcitabine 1 hour before irradiation with 2, 5 or 10 Gy. Following treatment for 24 hours, cells were trypsinized, collected and numbered. Then, cells were seeded at optimised densities according to radiation dose and plated at two different dilutions into 6-well plates. Twelve to nineteen days later, depending on cell lines, the clones were stained using 0.05% crystal violet (Sigma-Aldrich) in 5% ethanol solution and positive colonies (>50 cells) were scored. The plating efficiency (PE) and then the surviving fractions were calculated. Survival curves were plotted using surviving fractions for different dose. To generate the radiation dose–response curves, the data fitted to the linear quadratic (LQ) model where $S(D)$ is the fraction of cells surviving a dose of D and α/β are inactivation constants: $S(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2}$. Semi-logarithmic survival curves were constructed for determination of survival ability of cells in response to various treatments. The linear-quadratic (LQ) cell survival curve parameters were calculated with CFAssay Package.

PARP inhibitor activity

Cells were pre-incubated with olaparib (1 μ M) during 1 hour. The treated cells were then exposed to 500 μ M of H_2O_2 for 10 minutes. Cells were fixed with a solution of methanol/acetone 1:1 at 4°C for 20 minutes. Next, cells were permeabilized by three washes with PBS-tween. The PAR signal was then detected by incubation with the anti-PAR antibody (1/1000) in PBS-tween and BSA 0.1% for 2 hours at 4°C. Then, the cells were washed three times with PBS-tween. The cells were incubated with the secondary mouse antibody anti-IgG coupled with Alexa 488 (1/2000) in PBS-tween and BSA 0.1% for 2 hours at 4°C. Subsequently, cells were washed with PBS-tween, next PBS and finally PBS-DAPI. Last, cells glass slides were prepared by fixation with Mowiol and antifade agent DABCI. Finally, detection of poly(ADP-ribose) (PAR) was analyzed by immunofluorescence microscopic imaging using an Olympus BH-2 fluorescent microscope equipped with a digital camera.

Cell cycle distribution

24 hours after treatments, treated cells were trypsinised, harvested and washed twice in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) fixed in 1 ml of ice-cold 70% ethanol and stored at -20°C. The pellet was resuspended in 200 μ l PBS containing 1 mg/ml RNase A, and the cellular DNA was stained with propidium iodide (PI; 0,1 mg/ml; Sigma). Cells were incubated at 37°C

in the dark for 30 min prior to analysis. Cell cycle determination was performed using a BD Accuri™ C6 flow cytometer (Becton Dickinson, BD, San Jose, CA, USA) and fluorescence of at least 10,000 cells were analyzed using BD Accuri and the ModFit softwares, provided by the manufacturer.

Apoptotic detection assay

Apoptotic cells were quantified 24 hours after irradiation. Harvested cells were washed with PBS and resuspended in 200 µl of 1X Annexin V Binding Buffer (FITC Annexin V Apoptosis Detection kit, BD Pharmingen). Then, 5 µl of Annexin V and 5 µl of propidium iodide (PI) were added to 100 µl of the solution. After incubation in the dark at room temperature for 15 min, 200 µl 1X Annexin V Binding Buffer was added to the solution and the fluorescence of 10,000 cells was analyzed using a BD Accuri™ C6 flow cytometer and software (BD). Annexin V⁺/PI⁻ cells were recorded as being early apoptotic, whereas Annexin V⁺/PI⁺ were considered to be necrotic.

Autophagic detection assay

For autophagy determination 24 hours after irradiation, we used the Cyto-ID™ Autophagy Detection kit (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were washed in PBS (pH 7.2) and resuspended in 500 µl PBS containing Cyto-ID® Green Detection Reagent (0,1% v/v). Then, cells were incubated at 37°C in the dark for 30 min and were resuspended in 200 µl PBS. The fluorescence emission of 10,000 cells was analyzed using a BD Accuri™ C6 cytometer and software (BD).

Determination of γ -H2AX formation

For γ -H2AX foci visualization, cells grown on lab-tek were treated as indicated earlier and fixed with a 4% paraformaldehyde solution for 15 minutes. Then samples were permeabilized with PBS containing 0.5% Triton-X-100 and blocked with 10% BSA. Then, cells were incubated overnight at 4°C, with blocking buffer containing primary antibody against γ -H2AX followed by incubation with Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG for 3 hours at room temperature. Samples were counterstained with antifading agent containing DAPI. The formation of foci in nuclei were monitored by immunofluorescence using an Olympus BH-2 fluorescence microscope equipped with digital camera.

For γ -H2AX analysis in flow cytometry, 24 hours after treatment, cells were harvested and

washed in ice-cold PBS, fixed in 1 ml of 70% ethanol and stored at -20°C for 24 hours. Fixed cells were centrifuged and pellet was resuspended twice in 2 ml cold PBS containing 10% bovine serum albumin (BSA, Aldrich) and 0,2% Triton-X-100 (T-PBS-BSA). Then, labelling was performed using a solution of monoclonal mouse anti-phospho-histone-H2AX (ser 139) polyclonal antibody (clone JBW301; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) diluted in 1/100 in T-PBS-BSA. Cells were stored at 4°C overnight. Cells were washed twice with 2 ml T-PBS-BSA and resuspended in 100 µl of a solution containing an anti-mouse IgG fluorescein-conjugated antibody diluted at 1:200 (Invitrogen) and were stored 1 hour in room temperature and gently shake. Then, 2 ml T-PBS-BSA was added, cells were centrifuged and pellet was resuspended in 200 µl of PBS containing PI (5 µg/ml) and RNase A (100 µg/ml). Next, cells were stored at room temperature in the dark for 30 min and gently shake. The fluorescence of 10,000 cells was analysed using a BD Accuri™ C6 flow cytometer and software (BD). For quantification of γ -H2AX positivity, a gate was arbitrarily set on the control, untreated sample to define a region of positive staining for γ -H2AX of approximately 5%. This gate was then overlaid on the treated samples.

Statistical analysis

Experiments were performed at a minimum in triplicate and results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) unless otherwise indicated. Statistical differences of data were assessed by the t-test using R Software (ver. 3.4.0 <http://cran.r-project.org/>). p-values lower than 0.05 were considered as statistically significant. For clonogenic survival assay, results from 4 experiments were subjected to linear-quadratic regression analysis, using the maximum likelihood approach. Differences between curves were evaluated using a two-way ANOVA test.

RESULTS

Cytotoxicity of gemcitabine and/or olaparib on PDAC cell lines

To assess long term differential inhibition with gemcitabine, we conducted clonogenic survival assay and showed that 10 nM of gemcitabine was not cytotoxic for all PDAC cell lines (Figure 1). However, beyond this concentration, cell lines were differentially sensitive to gemcitabine. Indeed, at 200 µM gemcitabine, surviving fractions were 35%, 23%, 11% and 2% for PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1 and BxPC-3 cells, respectively.

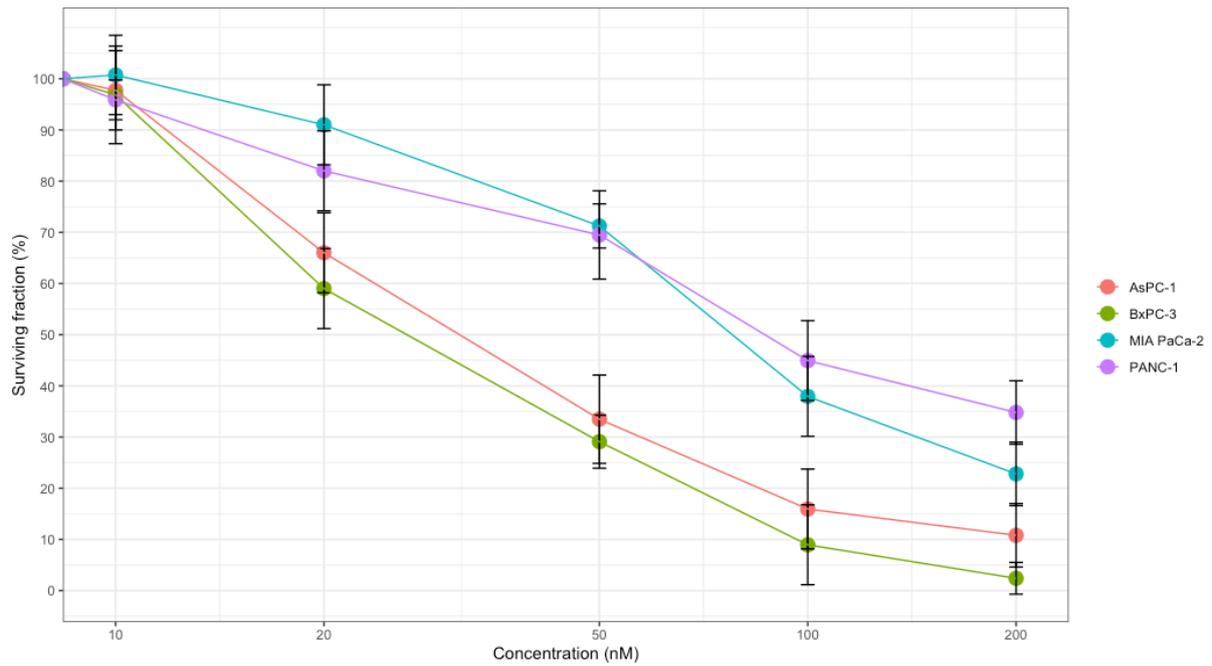


Figure 1: Cell survival of PDAC cell lines after gemcitabine treatments. Cells were treated with 10 nM to 200 nM gemcitabine for 24 hours and cell survival was determined using clonogenic formation assay. Experiments were done in triplicate and represent mean with standard error of 3 independent experiments.

Finally, we confirmed that olaparib, at a concentration of 1 μ M, did not significantly decrease long term surviving fraction on the four pancreatic cell lines (Table 1).

Treatment	MIA PaCa-2	PANC-1	AsPC-1	BxPC-3
<i>Olaparib (1 μM)</i>	<i>1,02\pm0,03</i>	<i>0,97\pm0,02</i>	<i>1,05\pm0,06</i>	<i>0,93\pm0,05</i>
<i>Gemcitabine (10 nM)</i>	<i>1,01\pm0,02</i>	<i>0,95\pm0,02</i>	<i>0,98\pm0,03</i>	<i>0,96\pm0,03</i>

Table 1: Surviving fraction after treatment with olaparib or gemcitabine for PDAC cell lines. Mean \pm SEM in 5 independent experiments.

Taking together, these data displayed that olaparib at a concentration of 1 μ M and gemcitabine at 10 nM were not toxic for PDAC cell lines.

Effect of olaparib on PARylation

Olaparib at 1 μ M significantly reduced PARP-1 activity in the four PDAC cell lines (Figure 2). As olaparib at 1 μ M was not cytotoxic for PDAC cell lines, but significantly decreased PARylation level, this concentration was selected for subsequent experiments.

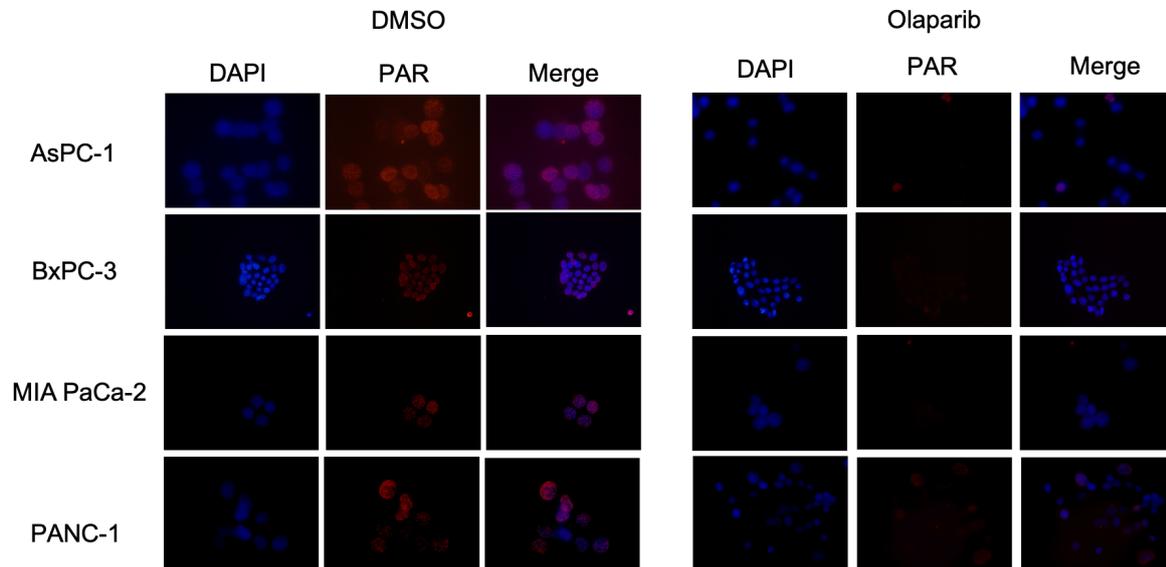


Figure 2: Immunodetection of PAR in the four PDAC cell lines either untreated (DMSO) or treated with olaparib (1 μ M). DNA is counterstained with DAPI.

Radiosensitization of gemcitabine and/or olaparib on PDAC cell lines

A broad range of intrinsic sensitivity was identified across PDAC cell lines as presented in Figure 3. Among the four cell lines, BxPC-3 is the most radioresistant (surviving fraction at 2 Gy, SF2=71%) and AsPC-1 the most radiosensitive (SF2=24%).

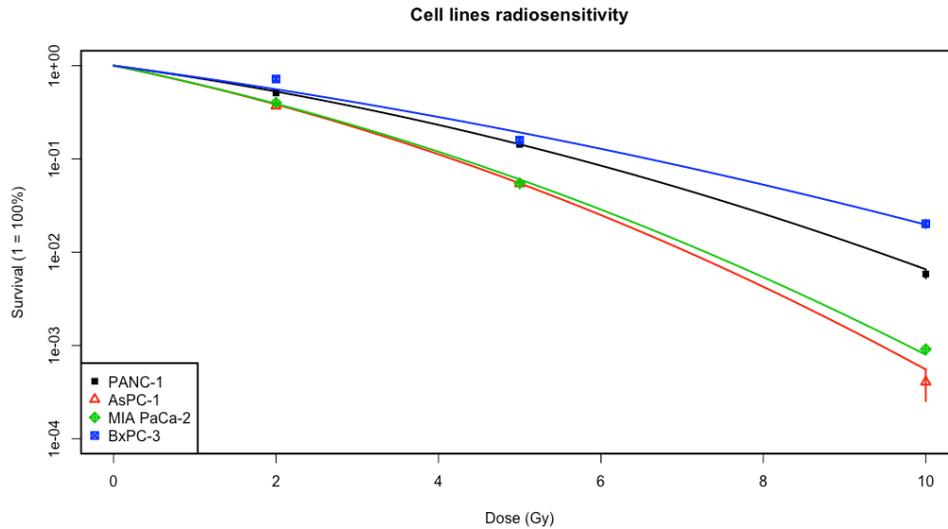


Figure 3: Clonogenic survival curves of PANC-1, AsPC-1, MIA PaCa-2 and BxPC-3 cell lines treated with increasing dose of radiotherapy (2, 5 and 10 Gy). Data shown from 4 to 5 experiments.

To investigate intrinsic radiosensitivity and validate that a one-hour pre-treatment with olaparib and 24 hours pre-treatment with gemcitabine enhanced radiosensitivity in PDAC cell lines, clonogenic assays were performed (Figure 4). Olaparib highly radiosensitized MIA PaCa-2, AsPC-1 and PANC-1 cell lines (standard enhancement ratio: SER=1.21±0.06 for AsPc-1, SER=1.27±0.02 for MIA PaCa-2, and SER=1.38±0.01 for PANC-1), particularly at high dose per fraction (10 Gy). In contrast, olaparib did not radiosensitize BxPC-3 cell line (SER=1.02±0.01).

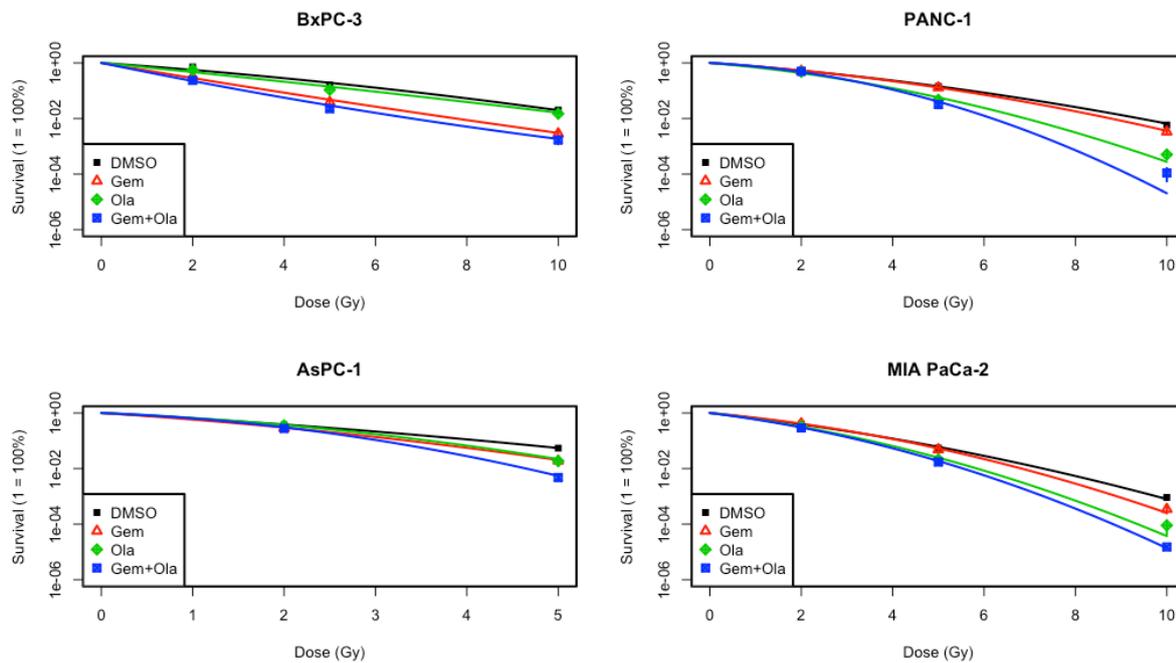


Figure 4: Clonogenic survival curves presenting surviving fractions of PANC-1, AsPC-1, MIA PaCa-2 and BxPC-3 cell lines treated with gemcitabine (Gem 10 nM), olaparib (Ola 1 μ M) or the association of gemcitabine and olaparib (Gem+Ola). Data are shown from 4 to 5 experiments.

Moreover, a non-cytotoxic concentration of gemcitabine radiosensitized MIA PaCa-2 and PANC-1 cells, but substantially less than olaparib (SER=1.11 \pm 0.04 for MIA PaCa-2 and SER=1.03 \pm 0.04 for PANC-1, Table 2). In contrast, BxPC-3 cell line was highly radiosensitized by gemcitabine (SER=1.75 \pm 0.005). Finally, AsPC-1 was radiosensitized by either gemcitabine or olaparib at the same level (Table 2).

Combination of gemcitabine and olaparib enhanced radiosensitization compared to gemcitabine or olaparib alone, in all cell lines except BxPC-3, with a major effect on PANC-1 (Table 2).

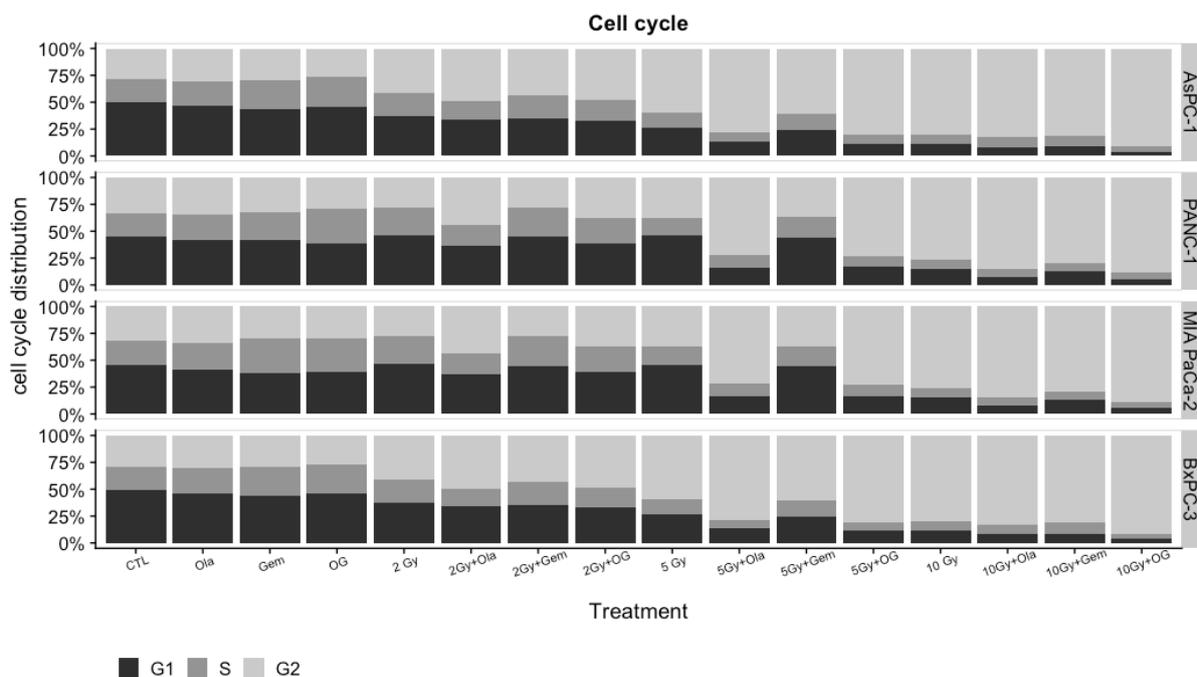
Cell line	Treatment	α (Gy-1)	β (Gy-2)	SER
MIA PaCa-2	DMSO	0.454	0.025	1.0
	Gemcitabine	0.404	0.040	1,04±0,01
	Olaparib*	0.515	0.048	1,24±0,001
	Olaparib+Gemcitabine•	0.590	0.041	1,30±0,02
PANC-1	DMSO	0.273	0.024	1.0
	Gemcitabine *	0.250	0.032	1,04±0,01
	Olaparib*	0.402	0.041	1,38±0,01
	Olaparib+Gemcitabine•	0.291	0.077	1,48±0,05
AsPC-1	DMSO	0.438	0.033	1.0
	Gemcitabine *	0.520	0.053	1,22±0,01
	Olaparib*	0.319	0.098	1,21±0,06
	Olaparib+Gemcitabine•	0.367	0.138	1,45±0,08
BxPC-3	DMSO	0.267	0.013	1.0
	Gemcitabine*	0.640	-0.006	1,75±0,01
	Olaparib	0.374	0.004	1,02±0,02
	Olaparib+Gemcitabine	0.779	-0.015	2,07±0,07

Table 2: Values of linear quadratic parameters (α and β) and standard enhancement ratio (SER) from PDAC cells treated with ionizing radiation and olaparib and/or gemcitabine. Statistical significance is indicated: * $p < 0.05$ (vs control). • $p < 0.05$ (vs Gemcitabine). Data are

shown of 4-6 independent experiences.

Effect of the treatments on cell cycle

As expected, analysis of cell cycle distribution using flow cytometry (Supplementary figure 1) revealed that irradiation induced a G2/M phase arrest 24 hours after irradiation and the percentage of cells in G2/M phase expanded with increasing radiation doses (2-10 Gy). Moreover, the association of olaparib and irradiation enhanced cell cycle arrest in G2/M phase, 24 hours after irradiation. Concurrently, gemcitabine alone markedly increased cell cycle arrest in S-phase. Cells co-treated with gemcitabine and olaparib with or without irradiation, did not significantly modify cell cycle distribution, compared to olaparib alone. Taking together, these results presented that olaparib and irradiation had combined effect on cell cycle arrest in G2-phase, whereas gemcitabine blocked cells in early S-phase independently of olaparib and/or irradiation treatment.



Supplementary figure 1: Cell cycle distribution of PANC-1, AsPC-1, MIA PaCa-2 and BxPC-3 cell lines, after irradiation (2, 5 and 10 Gy) and treatment with olaparib (1 μ M) and/or gemcitabine (10 nM). Data presented of 4 independent experiments.

Effect of the treatments on γ -H2AX foci persistence

Residual double-strand breaks are generally irreparable and may induce cell death. We recorded foci corresponding to the persistent activation of γ -H2AX in control and treated cells 24 hours

after the exposure to gemcitabine, olaparib and irradiation alone or in combination (Figure 5). As expected, the number of persistent γ -H2AX foci after irradiation increased according to the dose and after pre-treatment with olaparib, with a strong rise for MIA PaCa-2. The addition of olaparib with gemcitabine did not consistently increase the number of residual γ -H2AX foci after treatment on all PDAC cell lines.

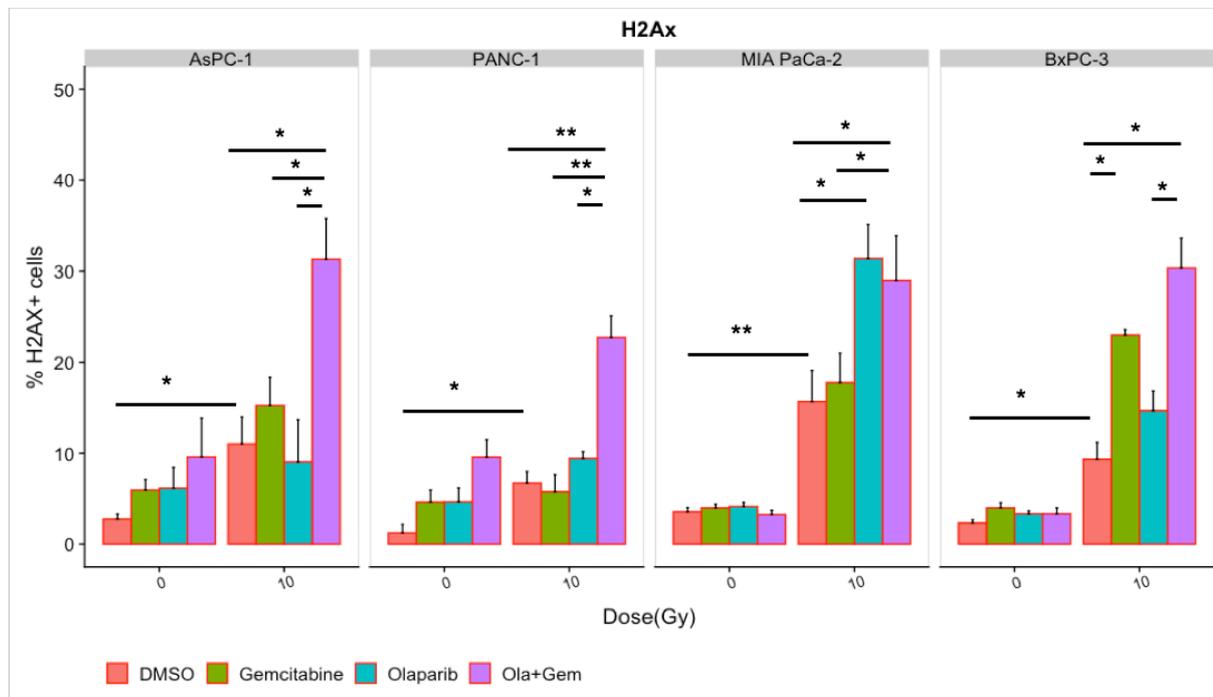
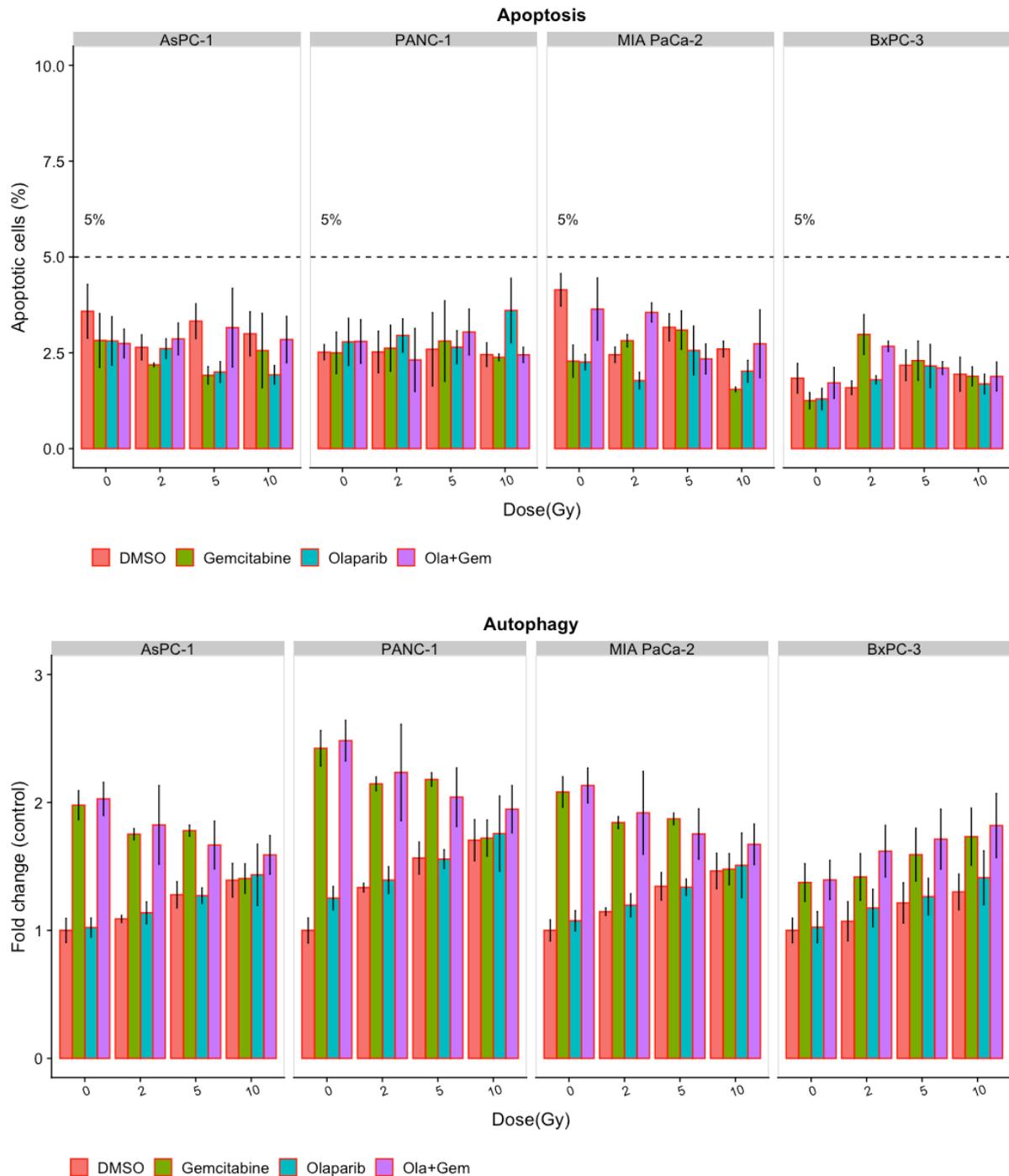


Figure 5: Effect of irradiation (10 Gy), olaparib (1 μ M) and gemcitabine (10 nM) on the amount of γ -H2AX positive cells, 24 hours after treatment on PANC-1, AsPC-1, MIA PaCa-2 and BxPC-3 cell lines. Cells were labelled 24 hours after treatment with anti- γ -H2AX antibody and analyzed for γ -H2AX positivity and DNA content. Data shown are the mean percentage of γ -H2AX positive cells from 4 independent experiments. Statistical significance is indicated: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***)

Effect on cell death induction (apoptosis and autophagy)

Next, we investigate whether treatment with olaparib, gemcitabine and irradiation, individually or in combination could induce apoptosis or autophagy on PDAC cell lines. Percentages of cells undergoing apoptotic cell death were determined 24 hours after treatment. As presented in supplementary figure 2, apoptosis levels were very low whatever the treatment and never exceeded 5%. Then, autophagy was assessed as another mechanism of cell death (Supplementary figure 2). Both gemcitabine and irradiation treatments alone induced autophagy, whereas olaparib did not induce autophagic cells compared to non-treated cells (Supplementary figure 2). Cells treated with the association of gemcitabine and olaparib alone

or coupled with irradiation, did not induce significantly higher autophagy than in gemcitabine treated cells alone.



Supplementary figure 2: *Effect of irradiation (2, 5 and 10 Gy), olaparib (1 μ M) and gemcitabine (10 nM) on PANC-1, AsPC-1, MIA PaCa-2 and BxPC-3 cell death quantification (apoptosis and autophagy). (A) Cells were labelled 24 hours after treatment with Annexin V and propidium iodide. Cells marked as Annexin V⁺/PI⁺ were determined by flow cytometry. (B)*

Cells were labelled after 24 hours using Cyto-ID[®] Green detection reagent according to treatment protocol, and the mean fluorescence was determined by flow cytometry. Results are expressed in fold induction of autophagy.

DISCUSSION

Effective treatments for locally advanced pancreatic cancer are limited. Therefore, any new modality to replace or support current treatments for pancreatic cancer would be highly valuable.

In this study, we evaluated *in vitro* efficacy of the association of gemcitabine, olaparib and irradiation in four locally advanced pancreatic cancer cell lines. First, our results indicated that this triple association reduced cell growth and clonogenic survival, compared to both gemcitabine/irradiation or olaparib/irradiation combinations and standard treatment (chemoradiotherapy with gemcitabine alone). This effect was mainly due to the radiosensitizing effect of olaparib. Although olaparib alone at a concentration of 1 μ M was not toxic for all four cell lines as wanted for this project, it had a clear radiosensitizing effect and particularly with high dose of radiation (10 Gy). This is consistent with results of Vance *et al.*, who treated MIA PaCa-2 cells with 1 μ M of olaparib and increasing doses of irradiation (ranged from 2 to 8 Gy) and found a radiation enhancement ratio of 1.5 ± 0.1 , whereas cytotoxicity of olaparib alone was 1.1 ± 0.1 (7). It is also coherent with Karnak *et al.* who reported radiosensitization of AsPC-1 cell line with olaparib (SER= 1.2 ± 0.2). We also studied two other pancreatic cell lines that have never been studied before with olaparib, PANC-1 and BxPC-3. Another aspect of the present study was the investigation of cell cycle perturbation with PARPi. We and others have shown that PARP-1 inhibition resulted in a greater accumulation of cells in the G2/M phase in response to radiation, likely due to persistent DNA damage, whereas gemcitabine blocked cells in early S-phase, likely due to the inhibition of replication (8–10). As G2 checkpoint activation is known to be a consequence of persistent DNA damage, we assessed DSBs repair through residual γ -H2Ax foci, 24 hours after treatments and presented that olaparib combined with irradiations (10 Gy) increased γ -H2AX foci compared to control irradiated cells. To properly compare radiosensitization effect of gemcitabine with olaparib, we assessed radiosensitization effect of a non-cytotoxic concentration of gemcitabine (10 nM). As Pauwels *et al.* indicated in different types of cancer cell lines, radiosensitization with gemcitabine was time-exposure dependant and was higher with 24 hours exposure before irradiation (14), therefore we treated cell lines with 24 hours of gemcitabine before irradiation. To display radiosensitization with CHK1/2

(AZD7762) inhibitor in pancreatic cancer, Morgan *et al.* irradiated and co-treated MIA PaCa-2 cells with gemcitabine/AZD7762 and showed a radiation enhancement ratio of 1.5 with gemcitabine treatment alone. In their treatment schedules, cells were treated 24 hours before irradiation with gemcitabine and at time of irradiation, approximately 45% of cells were in S-phase (15). Indeed, Im *et al.* presented that radiosensitization with gemcitabine required a depletion in deoxynucleotide for approximately 4 hours with accumulation of cells in S-phase (16). These observations are coherent with our hypothesis that gemcitabine could synchronise cell lines into S-phase, thus leading to enhanced sensitization after irradiation and/or olaparib treatment.

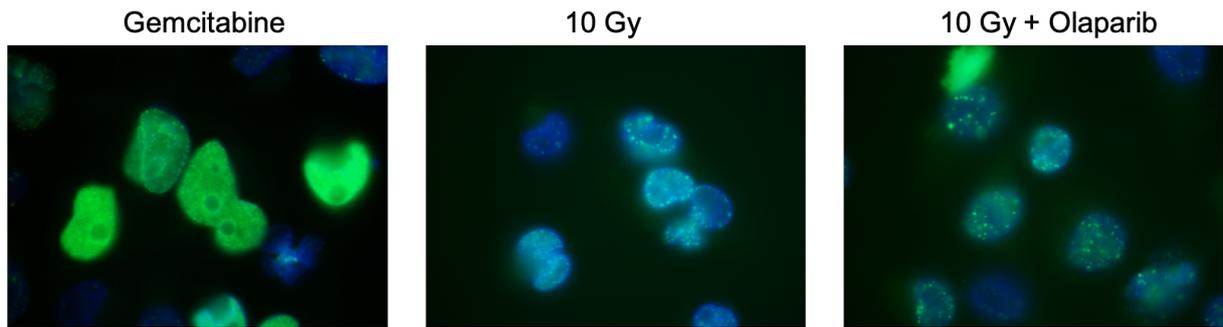
On the side, qualitative differences were noticed in staining patterns of γ -H2AX (supplementary figure 3). Indeed, cells treated with olaparib shaped discrete punctuated and well-defined foci, compared with cells treated with gemcitabine that displayed a diffuse, pan-nuclear γ -H2AX staining pattern. Ewald *et al.* showed that H2AX phosphorylation was not only associated with DSBs but also with agents that inhibit DNA synthesis, such as gemcitabine and was due to stalled replication forks during S-phase (17). Moreover, they displayed that some γ -H2AX foci co-localized with DNA damage response proteins (Mre11, Rad50 and Nbs1) at the site of stalled replication forks, shortly after nucleoside analogue exposure. More recently, Bryant *et al.* presented that treatment with hydroxyurea induced stalled replication forks, thus stimulating PARP-1 activation, leading to recruitment of Mre11 and Nbs1, and promoting repair through homologous recombination (13). Then, there is interplay between gemcitabine inducing stalled replication forks, PARP activation and homologous recombination, which needs more investigations, focusing on pancreatic cancer cell lines.

We also reported that cell death was partly induced by autophagy, specifically for gemcitabine-base treatments, but apoptosis was clearly not involved. Our results are consistent with literature. Indeed, Chen *et al.* indicated that even with the highest concentration of olaparib (1 μ M), there was at most 6% of apoptosis in PANC-1 and BxPC-3 pancreatic cancer cell lines (18). More recently, Pandita *et al.* displayed that in MIA PaCa-2 cell line, treatment with 660 nM of gemcitabine resulted in 2% of apoptosis (19). MIA PaCa-2 cells seemed to be more resistant to gemcitabine. This was partly explained by the fact that gemcitabine induced apoptosis through p53 pathway and mutant p53 cells (20). Autophagy is a conserved process by which cytoplasm and cellular organelles are degraded in lysosomes. There is much controversy concerning the role of treatment induced-autophagy in pancreatic cancer. Authors argued that gemcitabine-induced autophagy prevents pancreatic carcinoma entering in apoptotic pathway, thus allowing resistance to treatment (20,21). Others claimed that autophagy

constituted a death mechanism, when pancreatic cancer cells were treated with gemcitabine and/or ionizing radiation (20,22). Indeed, Rosenfeldt *et al.* used a humanized genetically modified mouse model of PDAC and showed that autophagy's role in tumor development was connected to the status of p53. Indeed, loss of autophagy in tumor lacking p53 accelerated tumor onset, whereas it blocked progression to high grade malignant tumors in p53 wild-type cells (22). These data are consistent with results published by Fiorini *et al.*, describing in a mutant p53 cell line, that incubation of gemcitabine with p53 reactivating molecules, induced autophagy and apoptosis. However, inhibiting autophagy enhanced anti-proliferative activity of combined treatment, thus demonstrating that autophagy induced by gemcitabine in p53 wild-type cell line may have a pro-survival effect (20). Here, we presented on p53 mutant cell lines, that gemcitabine induced autophagy compared to control, but this effect was clearly attenuated with increasing radiation doses and did not seem to be synergic. On the other hand, surviving fraction and cell growth were decreased with irradiation and gemcitabine compared to control, and the addition of olaparib also decreased surviving fraction. These data suggested that some other types of cell death contribute to the effectiveness of the combined triple treatment with gemcitabine, olaparib and irradiation. Several studies have examined the mechanism of cell-death induced by PARP inhibition. Some authors explored senescence as a mode of cell death after irradiation and treatment with PARPi. A radiosensitization of tumor cells was observed via the promotion of senescence (23). Another induced cell death could be mitotic catastrophe. Indeed, Porcelli *et al.* showed that MIA PaCa-2 cells pre-treated with 1 μ M of rucaparib, another PARPi, before irradiation (10 Gy) presented micronuclei and polynucleate cells 24 hours after combined treatment (9).

Generally, our results presented that PDAC cell lines could be sensitized by irradiation and olaparib treatments, through an increase of unrepaired DSBs and a block in G2 phase. Moreover, we displayed that this radiosensitizing effect was greater with higher dose per fraction.

Our work could have clinical impact for patients with locally advanced PDAC. Indeed, the low response rate after chemoradiation (52%) could be enhanced by the radiosensitization effect of olaparib (24). Moreover, as olaparib radiosensitized cells when treated with high dose of radiation, patients could benefit from advanced modality treatment technology such as stereotactic radiotherapy, which can deliver high dose per fraction in a highly conformal way. Finally, we need to investigate the effect of gemcitabine, olaparib and irradiation on an *in vivo* model of PDAC.



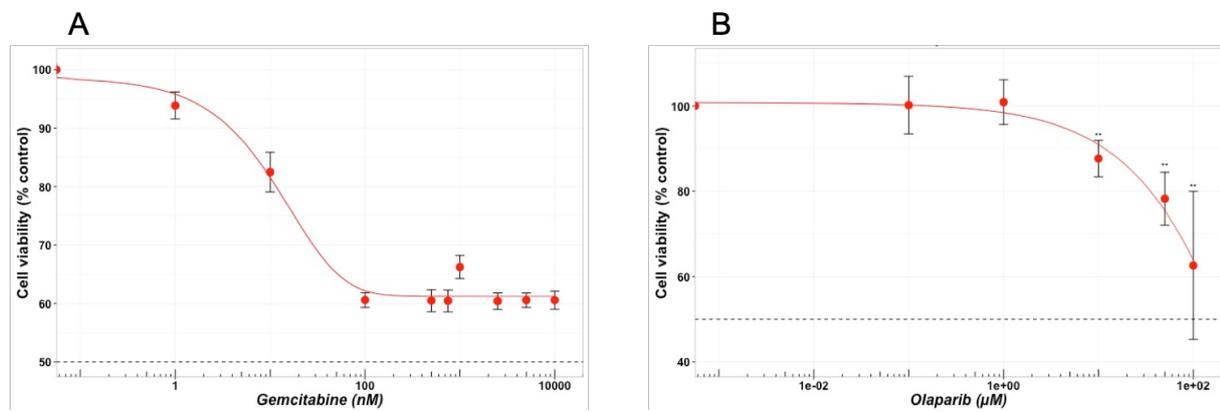
Supplementary figure 3 : Pattern of γ -*H2AX* foci after treatment with gemcitabine, irradiation or association of 10 Gy irradiation with olaparib.

REFERENCES :

1. Les données - Institut National Du cancer [Internet]. [cited 2016 Mar 6]. Available from: <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/29-incidence-mortalite/38-ensemble-des-cancers/#ind2>
2. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *The Lancet*. 2011;378(9791):607–620.
3. Zhu C-P, Shi J, Chen Y-X, Xie W-F, Lin Y. Gemcitabine in the chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: A meta-analysis. *Radiother Oncol*. 2011 May;99(2):108–13.
4. Scott CL, Swisher EM, Kaufmann SH. Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors: Recent Advances and Future Development. *J Clin Oncol*. 2015 Apr 20;33(12):1397–406.
5. Senra JM, Telfer BA, Cherry KE, McCrudden CM, Hirst DG, O'Connor MJ, et al. Inhibition of PARP-1 by Olaparib (AZD2281) Increases the Radiosensitivity of a Lung Tumor Xenograft. *Mol Cancer Ther*. 2011 Oct 1;10(10):1949–58.
6. Home page - Genomics of Drug Sensitivity in Cancer [Internet]. [cited 2016 May 31]. Available from: <http://www.cancerrxgene.org/>
7. Vance S, Liu E, Zhao L, Parsels JD, Parsels LA, Brown JL, et al. Selective radiosensitization of p53 mutant pancreatic cancer cells by combined inhibition of Chk1 and PARP1. *Cell Cycle*. 2011 Dec 15;10(24):4321–9.
8. Pauwels B, Korst AE., Pattyn GG., Lambrechts HA., Van Bockstaele DR, Vermeulen K, et al. Cell cycle effect of gemcitabine and its role in the radiosensitizing mechanism in vitro. *Int J Radiat Oncol*. 2003 Nov;57(4):1075–83.
9. Porcelli L, Quatralè AE, Mantuano P, Leo MG, Silvestris N, Rolland JF, et al. Optimize radiochemotherapy in pancreatic cancer: PARP inhibitors a new therapeutic opportunity. *Mol Oncol*. 2013 Jun 1;7(3):308–22.
10. Hirai T, Shirai H, Fujimori H, Okayasu R, Sasai K, Masutani M. Radiosensitization effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cells exposed to low and high linear energy transfer radiation. *Cancer Sci*. 2012 Jun 1;103(6):1045–50.
11. Jacob DA, Bahra M, Langrehr JM, Boas-Knoop S, Stefaniak R, Davis J, et al. Combination therapy of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide and gemcitabine shows strong antitumor activity in pancreatic cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Jul 5;0(0):060705083413015–
12. Noël G, Godon C, Fernet M, Giocanti N, Méglin-Chanet F, Favaudon V. Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. *Mol Cancer Ther*. 2006 Mar 1;5(3):564–74.
13. Bryant HE, Petermann E, Schultz N, Jemth A-S, Loseva O, Issaeva N, et al. PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J*. 2009;28(17):2601–2615.

14. Pauwels B, Korst AE, Lardon F, Vermorken JB. Combined modality therapy of gemcitabine and radiation. *The oncologist*. 2005;10(1):34–51.
15. Morgan MA, Parsels LA, Zhao L, Parsels JD, Davis MA, Hassan MC, et al. Mechanism of Radiosensitization by the Chk1/2 Inhibitor AZD7762 Involves Abrogation of the G2 Checkpoint and Inhibition of Homologous Recombinational DNA Repair. *Cancer Res*. 2010 Jun 15;70(12):4972–81.
16. Im MM, Flanagan SA, Ackroyd JJ, Shewach DS. Drug Metabolism and Homologous Recombination Repair in Radiosensitization with Gemcitabine. *Radiat Res*. 2015 Jan;183(1):114–23.
17. Ewald B, Sampath D, Plunkett W. H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. *Mol Cancer Ther*. 2007 Apr 3;6(4):1239–48.
18. Chen S, Wang G, Niu X, Zhao J, Tan W, Wang H, et al. Combination of AZD2281 (Olaparib) and GX15-070 (Obatoclox) results in synergistic antitumor activities in preclinical models of pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2014 Jun;348(1–2):20–8.
19. Pandita A, Kumar B, Manvati S, Vaishnavi S, Singh SK, Bamezai RNK. Synergistic Combination of Gemcitabine and Dietary Molecule Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells and Down Regulates PKM2 Expression. Singh AP, editor. *PLoS ONE*. 2014 Sep 8;9(9):e107154.
20. Fiorini C, Cordani M, Padroni C, Blandino G, Di Agostino S, Donadelli M. Mutant p53 stimulates chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2015 Jan;1853(1):89–100.
21. Papademetrio DL, Cavaliere V, Simunovich T, Costantino S, Campos MD, Lombardo T, et al. Interplay between autophagy and apoptosis in pancreatic tumors in response to gemcitabine. *Target Oncol*. 2014 Jun;9(2):123–34.
22. Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature*. 2013 Dec 4;504(7479):296–300.
23. Alotaibi M, Sharma K, Saleh T, Povirk LF, Hendrickson EA, Gewirtz DA. Radiosensitization by PARP Inhibition in DNA Repair Proficient and Deficient Tumor Cells: Proliferative Recovery in Senescent Cells. *Radiat Res*. 2016 Mar;185(3):229–45.
24. Ben-Josef E, Schipper M, Francis IR, Hadley S, Ten-Haken R, Lawrence T, et al. A Phase I/II Trial of Intensity Modulated Radiation (IMRT) Dose Escalation With Concurrent Fixed-dose Rate Gemcitabine (FDR-G) in Patients With Unresectable Pancreatic Cancer. *Int J Radiat Oncol*. 2012 Dec;84(5):1166–71.

Annexe de la partie V



Annexe : Test de viabilité cellulaire de la lignée MIA PaCa-2 avec une gamme croissante de gemcitabine (1 nM à 10 µM) (A) et d'olaparib (100 nM à 100 µM) (B).

PARTIE VI

Résumé PARTIE VI

Évaluation *in vivo* de la radiosensibilisation par l'olaparib et/ou la gemcitabine après irradiation photon ou proton et analyse transcriptomique

Après avoir montré, *in vitro*, la radiosensibilisation par l'olaparib, la gemcitabine et leur association, particulièrement dans la lignée MIA PaCa-2, nous avons cherché à savoir si cela pouvait se traduire par une radiosensibilisation *in vivo* dans un modèle de xéno greffe sur souris nude. De plus, nous avons cherché à savoir si en changeant de particule d'irradiation (protonthérapie), la radiosensibilisation avec l'olaparib et/ou la gemcitabine était plus importante. Pour cela, nous avons injecté des cellules de la lignée MIA PaCa-2 en sous-cutanée au niveau du flanc des souris nude NMRI, puis les souris ont été randomisées entre différents type d'irradiation (rayons X ou protons) précédés ou non d'un traitement par l'olaparib et/ou la gemcitabine.

Nous avons montré que l'irradiation par protonthérapie à la dose physique de 10 Gy ralentissait de manière significative la croissance tumorale comparativement à l'irradiation par photon. Prenant comme critère de jugement principal le doublement du volume tumoral, une différence significative a été mise en évidence avec un temps de doublement médian de 19 jours pour le groupe contrôle, 30 jours pour le groupe irradié par photons et de 40 jours pour le groupe traité par protonthérapie ($p < 0,001$). Ainsi, le temps de doublement après irradiation en protonthérapie est 30% plus important qu'en radiothérapie avec des rayons X. Bien que cela soit attendu du fait d'une efficacité biologique plus importante des protons, cette différence est tout de même bien plus importante que celle attendue avec un EBR moyen estimé à 1,1.

Dans notre modèle *in vitro*, nous avons montré que l'olaparib radiosensibilisait la lignée pancréatique MIA PaCa-2 de manière significative et ceci particulièrement avec de fortes doses d'irradiations (10 Gy). Les résultats sur la croissance tumorale *in vivo* n'ont pas permis de montrer cette différence en irradiation photons ($P=0,47$), mais une importante radiosensibilisation a été observée avec la protonthérapie ($p=0,048$).

Comparativement au traitement standard de chimioradiothérapie avec la gemcitabine, le suivi de la croissance tumorale après irradiation et traitements par la gemcitabine et l'olaparib a montré un ralentissement supplémentaire de la croissance tumorale après une irradiation par des rayons X ou des protons. Nous avons montré une diminution significative de la croissance tumorale avec la triple association combinant la gemcitabine, l'olaparib et la protonthérapie.

De manière très impressionnante, une disparition complète de tumeur a été observée dans trois souris sur dix après protonthérapie, olaparib et gemcitabine.

Afin de mieux comprendre la réponse à ces associations de traitement, une analyse transcriptomique 24h après irradiation a été réalisée. Les neuf différents groupes étudiés pour l'analyse transcriptomique étaient : contrôle non irradié, irradiation photon (RT), irradiation proton (PT), gemcitabine + RT, gemcitabine + PT, olaparib + RT, olaparib + PT, gemcitabine + olaparib + RT et gemcitabine + olaparib + PT. Les tumeurs ont été traitées aux différentes conditions, puis excisées 24h après irradiation. Les ARN de 45 tumeurs ont été extraits et qualifiés. Les différents échantillons ont été envoyés à la plateforme de bio-informatique GenomEast de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Illkirch) pour l'analyse RNASeq. Nous avons mis en évidence une régulation transcriptionnelle hétérogène en fonction des traitements. L'enrichissement a permis d'identifier des processus biologiques impliqués dans la régulation des microvésicules. Par ailleurs, une dérégulation de l'expression des ARN long non codants (lnc RNA) a également pu être démontrée. Enfin, une signature transcriptomique de la réponse à la gemcitabine a été identifiée.

En conclusion, ce travail sur un modèle *in vivo* a montré l'intérêt d'associer des inhibiteurs de PARP à la protonthérapie, mais aussi d'évaluer de potentiels biomarqueurs de réponse à ces associations de traitements.

Radiosensitizing pancreatic cancer with PARP inhibitor and gemcitabine: an *in vivo* and a whole-transcriptome analysis after proton or X-rays therapies

W. WAISSI (1,2), A. NICOL (2), M. ROUSSEAU (2), D. JARNET (1), G. NOEL (1,2), H. BURCKEL
*(2)

1: Radiotherapy Department, Centre Paul Strauss, 3, rue de la Porte de l'Hôpital, BP 42, 67065 STRASBOURG, France

2: Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, Centre Paul Strauss, UNICANCER, F-3, rue de la Porte de l'Hôpital, BP 42, 67065 STRASBOURG, France

*: **Corresponding author:** Dr H. BURCKEL, PhD, same address,
hburckel@strasbourg.unicancer.fr

Conflict of Interest: no conflict for all authors

Radiosensitizing pancreatic cancer with PARP inhibitor and gemcitabine: an *in vivo* and a whole-transcriptome analysis after proton or X-rays therapies

Abstract:

Purpose/Objective(s): Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a devastating disease with a cumulative 5-year overall survival of less than 9% for all stages. Thirty percent of patients diagnosed with PDAC present with a locally advanced disease that could benefit from chemoradiotherapy with gemcitabine, which is effective but toxic. Over the past few years, studies have focused on the development of targeted radiosensitizers such as poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. We conducted an *in vivo* study to determine whether PARP inhibition enhanced gemcitabine-based chemoradiosensitization of pancreatic cancer xenografts, with either proton or X-rays irradiations.

Materials and methods: MIA PaCa-2 cells were injected subcutaneously into the flank of athymic nude mice. Tumor-bearing mice were treated with gemcitabine and/or olaparib for two consecutive days before irradiation (10 Gy) with either X-rays or protons. Tumor size was measured three times per week for tumor growth. Furthermore, 24 hours after irradiation, tumors were excised and fresh frozen tissues were stored. RNA-Seq profiling analysis was performed to examine whole-transcriptome alterations.

Results: First, a significant growth inhibition was observed with 10 Gy proton irradiations compared to 10 Gy photon irradiations ($p=0.046$). Moreover, the combination of olaparib, gemcitabine and protontherapy significantly sensitized tumor xenografts, compared to gemcitabine ($p=0.05$), olaparib ($p=0.034$) or protontherapy ($P<0.0001$) alone. Finally, RNA-Seq analysis exhibited a large number of dysregulated genes between different treatment associations, particularly genes involved in extracellular vesicles and exosomes and long non-coding RNA (lncRNA). Finally, a transcriptomic signature was identified to be associated with gemcitabine treatment.

Conclusions: The addition of olaparib to gemcitabine-based chemoradiotherapy enhanced significantly local control *in vivo*, especially with proton therapy. Whole-transcriptome analysis presented several dysregulated lncRNA and genes associated with extracellular vesicles.

INTRODUCTION

As a result of its high rate of mortality, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is considered as one of the most aggressive human malignancy (Vincent et al., 2011). Approximately 30% of patients are diagnosed with locally advanced disease with a median overall survival of 24 months (Suker et al., 2016). Two randomised studies have confirmed the superiority of chemoradiotherapy (CRT) compared to radiotherapy alone (Huguet et al., 2014). However, the overall downstaging rate after CRT regimens is only 4-15%, highlighting the need of novel combinations.

On the side, gemcitabine-based chemoradiotherapy can be used in first-line treatment for PDAC, nevertheless its toxicity is a matter of concern. Hence, adding a targeted therapy and diminishing Gemcitabine dose could be interesting to investigate. Gemcitabine inhibits DNA synthesis, thus inducing S-phase arrest (Alvarellos et al., 2014).

Inhibiting DNA damage response, through poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibition could be an option. PARP-1 has an essential role in the recognition of DNA damage and initiation of DNA single- and double-strand breaks repair. Therefore, PARP inhibitors (PARPi) could sensitize cells to exogenous DNA damage inducer treatment, such as irradiation or gemcitabine (Curtin and Szabo, 2013). Olaparib inhibits PARP-1 by interacting with the binding site of the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). PARPi radiosensitization is specific of the S phase of the cell cycle, as it involves stalled replication forks (Noël et al., 2006). Then the combination of PARPi and irradiation could be interesting for PDAC. Thus, synchronising cancer cells in S phase of the cell cycle with gemcitabine treatment, before PARPi treatment and irradiation could enhance radiosensitizing effect of PARPi.

In addition to conventional photons, other types of radiation such as protons have recently been used in cancer therapy (Nichols et al., 2015). Protons have the physical advantage to shape tumors without increasing dose to normal tissue, as there is no more significant radiation dose beyond the Bragg peak (Woodward and Amos, 2016). Therefore, we assessed the efficacy of olaparib, a PARP inhibitor, to sensitize human pancreatic cancer xenografts to gemcitabine-based chemoradiotherapy, with either photons or protons irradiations, and to identify potential transcriptomic alterations between those treatments.

MATERIALS AND METHODS

Xenografts

Animal's procedures were performed according to institutional and national guidelines. All

procedures were assessed under protocols approved by the French Ministry of Agriculture and in accordance with the ethical rules for the care and use of animals for research. MIA PaCa-2 cells ($5 \cdot 10^6$) were suspended in 1:1 mixture of 10% fetal bovine serum/DMEM:Matrigel and injected subcutaneously in the right flank of 5-week, athymic, NMRI-Foxn1 nu/nu mice (Janvier Labs, Saint Berthevin, France). Ten days after injection, mice were randomized in different treatment groups to obtain an equivalent tumor volume average in each group ($100 \pm 20 \text{ mm}^3$). Each group included 10 mice for growth delay and 5 mice for RNA-Seq analysis.

Tumor size was measured three times a week using a caliper until tumor volume reached the limit point of 1500 mm^3 . Tumor volume (TV) was calculated according to the equation: $TV = (L \times W^2)/2$, where L and W are the length and width dimensions of the tumor, respectively. Mice were sacrificed by cervical dislocation after isoflurane anaesthesia, 24 hours after irradiation for RNA-Seq analysis or as soon as a limit point was reached for growth delay. Survival times were calculated from the day of randomization to death ($TV \geq 1500 \text{ mm}^3$).

Treatments

Gemcitabine (40 mg/kg) and olaparib (50 mg/kg) were administered via intra-peritoneal injections 24 hours and 1 hour before irradiation (Figure 1). Gemcitabine (Selleck Chemicals LLC, Houston, USA) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in PBS at a concentration of 0.4 mg/100 μl . Olaparib (Selleck Chemicals LLC) was also dissolved in DMSO and diluted as needed in PBS and in 10% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (Sigma) at a concentration of 0.5 mg/100 μl .

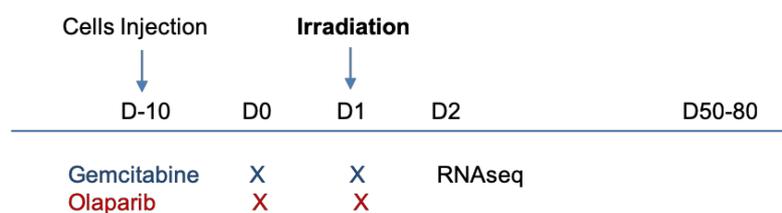


Figure 1: Randomized tumor bearing mice ($n=15$ per group) were treated with DMSO or olaparib (50 mg/kg) and/or gemcitabine (40 mg/kg) for two consecutive days. One hour after the last treatment injection, mice were irradiated with 10 Gy X-rays, proton therapy or sham. Five tumors per group were harvested 24 hours after irradiation for RNA-Seq analysis. Tumor volumes were evaluated three times a week for tumor growth delay until 50 or 80 days according to radiotherapy schedules.

Irradiation procedures

Mice were irradiated under anaesthesia (ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg). Photons and protons irradiations were performed at a physical dose of 10 Gy with a dose rate of 8 Gy/min.

Photon irradiation

Photon irradiations were carried out using Novalis Tx (Varian), with 6 MeV energy photon in Centre Paul Strauss (Strasbourg, France). For tumor irradiation, animals were positioned so that only tumor would be irradiated and the rest of the animal was protected with lead shield (XRaystore, La Garde, France). Some dosimetry assays were previously performed in order to ensure the mice lead shield protection.

Proton irradiation

The proton beam irradiations were extracted from CYRCé Cyclotron in Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (Strasbourg, France) with an averaged energy beam of 25 MeV. Using an in-house immobilization bed, tumor was irradiated directly in contact with the collimator. Dosimetry and characterization of the beam have been recently published (Constanzo et al., 2019).

RNA extraction, RNA-Seq and gene enrichment analysis

Animals were euthanized 24 hours after irradiation for RNA-Seq. For each condition, tumors from five mice were collected. Tumors samples were excised and flash frozen in liquid nitrogen, followed by storage at -80°C. Total RNA was extracted using RNeasy Plus Universal Tissue Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) as per manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). RNA quantification and quality (ratio of OD260/230 and OD260/280) were assessed using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

The RNA sequencing procedure was performed by the Plateforme Biopuces et Séquençage de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Illkirch, France). RNA-Seq libraries were generated from total RNA using TruSeq Stranded mRNA LT Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA), according to manufacturer's instructions. Once qualified, single-end libraries were sequenced using 2 x 50 bp output on a Hiseq 4000 device (Illumina).

RNA-Seq analysis was performed with the free software R (R version 3.6.0). The DESeq2 package was used to perform differential analysis between all treatment modalities (Love et al., 2014). Genes with an adjusted p-value < 0.05 and a fold change >1.5 were considered

differentially expressed (DE) and represented in a volcano plot, obtained with the package EnhancedVolcano. To identify biological process (GO BP) within each cluster, annotations and enrichment analyses of the DE genes were conducted using Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) online tool (<https://david.ncifcrf.gov/>) and a customised background. Ggplot2 and clusterProfiler were used to illustrate the results of these analyses (Wickham, 2009; Yu et al., 2012). The lncRNA's targets were identified with the help of LncRNADisease 2.0 database which list lncRNAs and their associated diseases (Bao et al., 2019).

Statistical analysis

For tumor growth experiments, the time required for tumor volume doubling was determined for each xenograft by identifying the earliest day by which the volume was twice higher than before treatment. Kaplan-Meier curve were constructed for analysis of doubling time and log-rank test was performed to compare doubling time between two treatment groups. Using multivariate cox regression model, treatment variables were identified associated with better local control.

RESULTS

Tumor Growth

Mice bearing MIA PaCa-2 xenografts were treated with 50 mg/kg olaparib or 40 mg/kg gemcitabine or both treatments for two consecutive days. One hour after the last treatment injection, tumors were locally irradiated with 10 Gy X-rays, protons or sham irradiation. Gemcitabine and olaparib as single agent or their combination had no significant effect on tumor growth or tumor doubling time (Figures 2A-B). In contrast, a single dose of 10 Gy X-rays significantly inhibited growth delay and enhanced tumor-doubling time compared to sham irradiation ($P < 0.0001$, Figures 2-3A). Moreover, a single dose of 10 Gy protons irradiation significantly increased tumor growth delay compared to X-ray irradiation ($P = 0.046$, Figures 2-3A). Indeed, the median time for tumor to reach twice their initial volume was 19 days for controls (DMSO), 30 days for photons irradiation and 40 days with protons (Supplementary table 1). Thus, enhancement factor was 1.3 with protons compared to photons, meaning that proton irradiation enhanced tumor doubling-time by 30%.

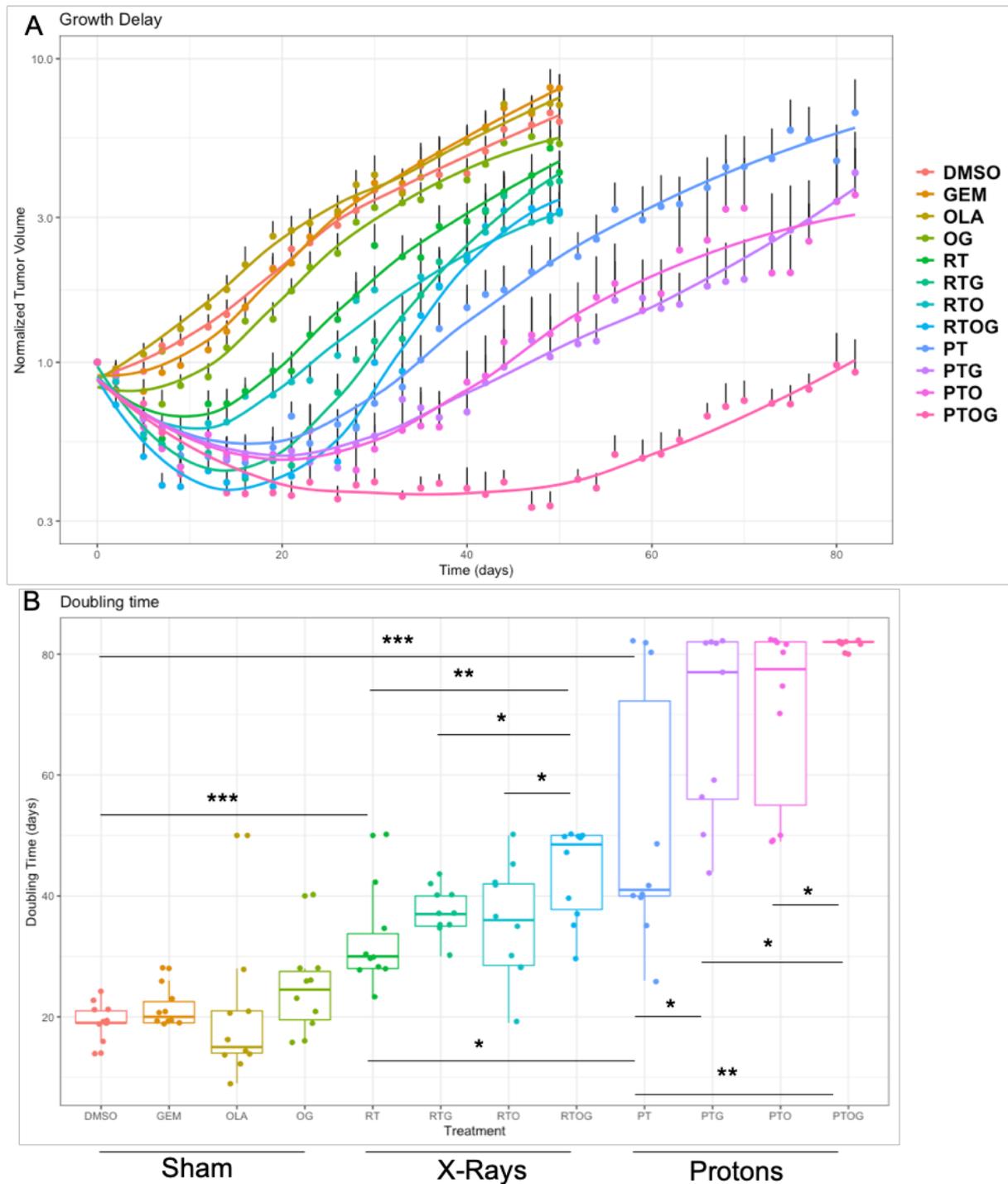


Figure 2: Athymic nude mice bearing subcutaneous MIA PaCa-2 xenografts were treated with DMSO, gemcitabine (GEM), olaparib (OLA), olaparib + gemcitabine (OG), X-Rays (RT), gemcitabine + X-rays (RTG), olaparib + X-rays (RTO), olaparib + gemcitabine + X-rays (RTOG), proton therapy (PT), gemcitabine + proton therapy (PTG), olaparib + proton therapy (PTO) and olaparib + gemcitabine + proton therapy (PTOG). Mice were followed until 50 or 80 days, according to radiotherapy schedules and mean normalized tumor volume \pm SE (A) and mean tumor volume doubling time (B) are described.

Irradiation	Systemic treatment	Median 2 fold change in tumor volume
NI	DMSO	19 days
	Gemcitabine	19 days
	Olaparib	14 days
	Olaparib + gemcitabine	23 days
10 Gy Photons	DMSO	30 days
	Gemcitabine	37 days
	Olaparib	35 days
	Olaparib + gemcitabine	47 days
10 Gy Protons	DMSO	40 days
	Gemcitabine	77 days
	Olaparib	75 days
	Olaparib + gemcitabine	NR

Supplementary table 1: Median progression-free survival (days) obtained for each condition observed until 80 days. NI : Not irradiated; NR: Never reached.

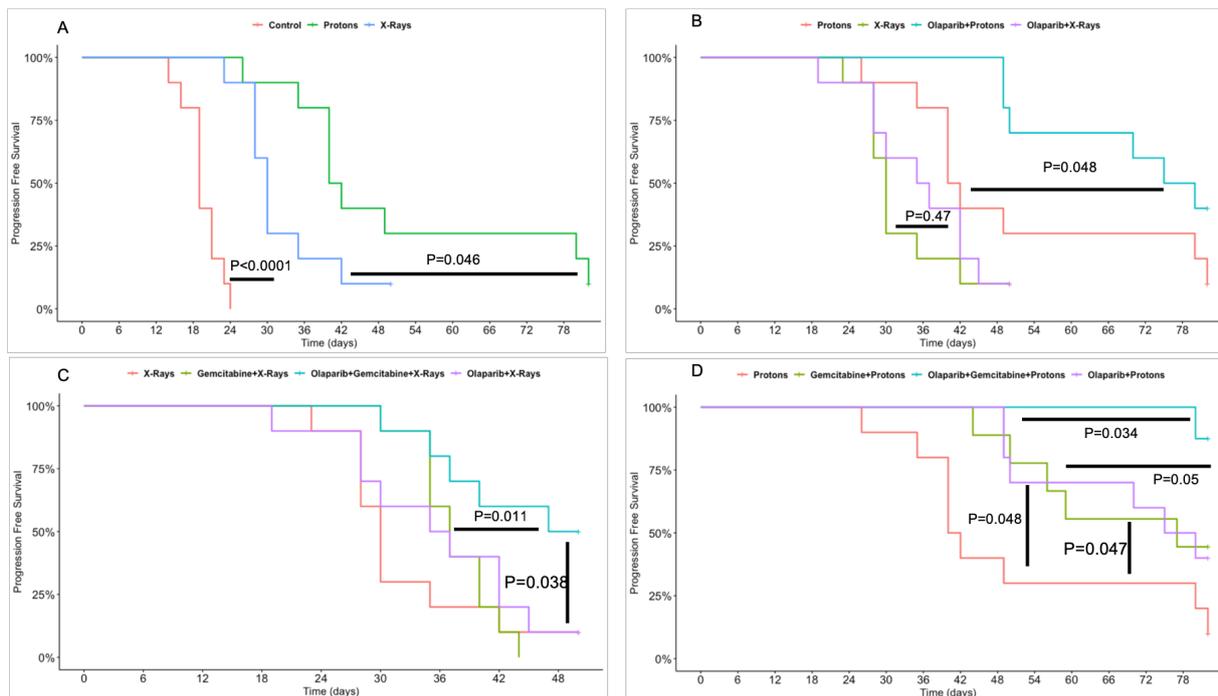


Figure 3: Athymic nude mice bearing subcutaneous MIA PaCa-2 xenografts were treated with (A) : DMSO (Control, red), X-Rays (10 Gy, blue) or protons (10 Gy, green) ; (B) : X-Rays (10 Gy, green) or protons (10 Gy, red), olaparib and X-rays (purple) and olaparib and protons (blue) ; (C) X-Rays (10 Gy, red) alone, the combinations of olaparib and X-rays (purple) or

gemcitabine and X-rays (green) and the triple therapy of olaparib, gemcitabine and X-Rays (blue) and (D) : proton therapy alone (red), the combinations of olaparib and proton therapy (purple) or gemcitabine and protons (green) and the triple therapy of olaparib, gemcitabine and protons (blue). Mice were followed until 50 or 80 days according to radiotherapy schedules and progression-free survival was designated as the time when tumor doubled compared to the tumor size before treatment (day 0).

To investigate the potential radiosensitization effect of olaparib, tumor-bearing mice were treated with olaparib 24 hours and 1 hour before irradiation (Figure 1). While X-rays alone significantly reduced tumor growth as presented above, pre-treatment with olaparib did not significantly enhanced progression-free survival ($P=0.47$) (Figure 3B), nor tumor-doubling time (Figure 2B), compared with X-rays alone. However, pre-treatment with olaparib before irradiation with protons significantly enhanced progression-free survival and tumor-doubling time, compared to proton therapy alone ($P=0.048$) (Figure 3B). Thus, olaparib was an effective radiosensitizer on PDAC tumor xenografts with proton irradiation, whereas no significant effects were found with photons.

As gemcitabine-based chemoradiotherapy is a treatment option for locally advanced PDAC, we evaluated whether olaparib enhanced tumor response to gemcitabine and irradiation combinations (Figure 5). Olaparib sensitized PDAC tumor xenografts to gemcitabine-based chemoradiation, as evidenced by significantly higher median tumor-doubling time in response to triple combination compared to the association's gemcitabine-radiation or olaparib-radiation (Figure 2). Although pre-treatment with olaparib significantly enhanced tumor growth delay after X-Rays ($P=0.0011$) or protons gemcitabine-based chemoradiotherapy ($P=0.05$), proton radiosensitization was more effective compared to X-ray ($P=0.024$) (Figures 3C and D).

Finally, after 50 days, 90% of tumor-bearing mice treated with the triple combination of olaparib, gemcitabine and proton therapy had objective responses, defined as the decrease of two-fold of their initial volume for 6 mice on 10 and even absence of tumor for three mice (Figure 4). In contrast, the objective response rate with X-Rays-based triple combination was 10% after 50 days.

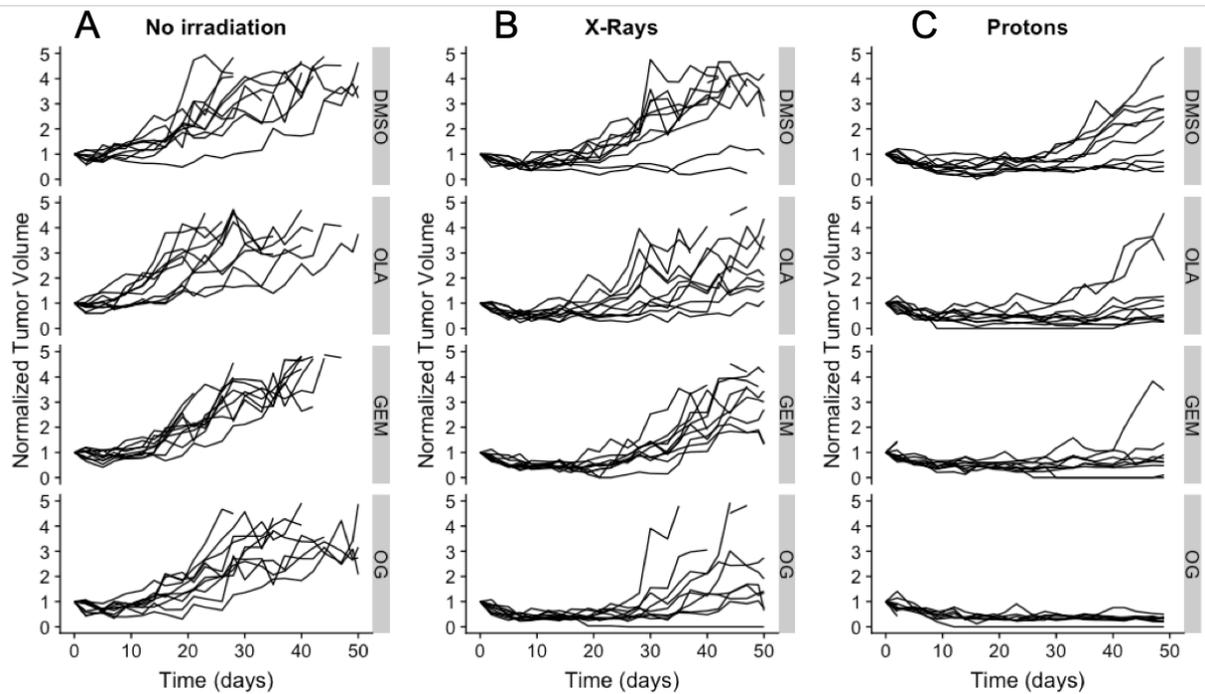


Figure 4: Growth of MIA PaCa-2 tumors in athymic nude mice treated with DMSO (dms, control), olaparib (OLA), gemcitabine (GEM) or olaparib and gemcitabine (OG) with either sham irradiation (A), X-rays (B) or proton therapy (C). 10 mice per group.

RNA sequencing analysis

Gene transcripts were analysed 24 hours after irradiation in each group. The number of genes significantly differentially expressed (DE) was determined according to treatment comparisons (Table 1) and some of them are illustrated in volcano plots (Figure 5).

Comparison (A vs B)	Number of DE transcripts	Number of lncRNA
RT vs RTG	77	9 (11.6%)
RT vs RTO	0	0 (0%)
RT vs RTOG	153	11 (7.19%)
RT vs CTL	7	1 (14.28%)
RT vs PT	227	22 (4.5%)
RTG vs RTOG	22	1 (4.5%)
RTO vs RTOG	26	4 (15%)
CTL vs PT	425	32 (7.5%)
PT vs PTG	217	10 (4.6%)
PT vs PTO	739	15 (2.0%)
PT vs PTOG	1336	51 (3.81%)
PTG vs PTOG	0	0 (0%)
PTO vs PTOG	31	7 (22.5%)
RTOG vs PTOG	2691	68 (2.52%)
RTO vs PTO	588	19 (3.23%)
RTG vs PTG	1749	105 (6.0%)

Table 1: Numbers of significantly differentially expressed genes according to all treatment comparisons (p -value adjusted < 0.05 and \log_2 Fold Change $> |1|$). CTL: control (DMSO); RT: X-rays; RTG: gemcitabine + X-Rays ; RTO: olaparib + X-Rays; RTOG: gemcitabine + olaparib + X-Rays ; PT: proton therapy; PTG: gemcitabine + protons; PTO: olaparib + protons ; PTOG: gemcitabine + olaparib + protons.

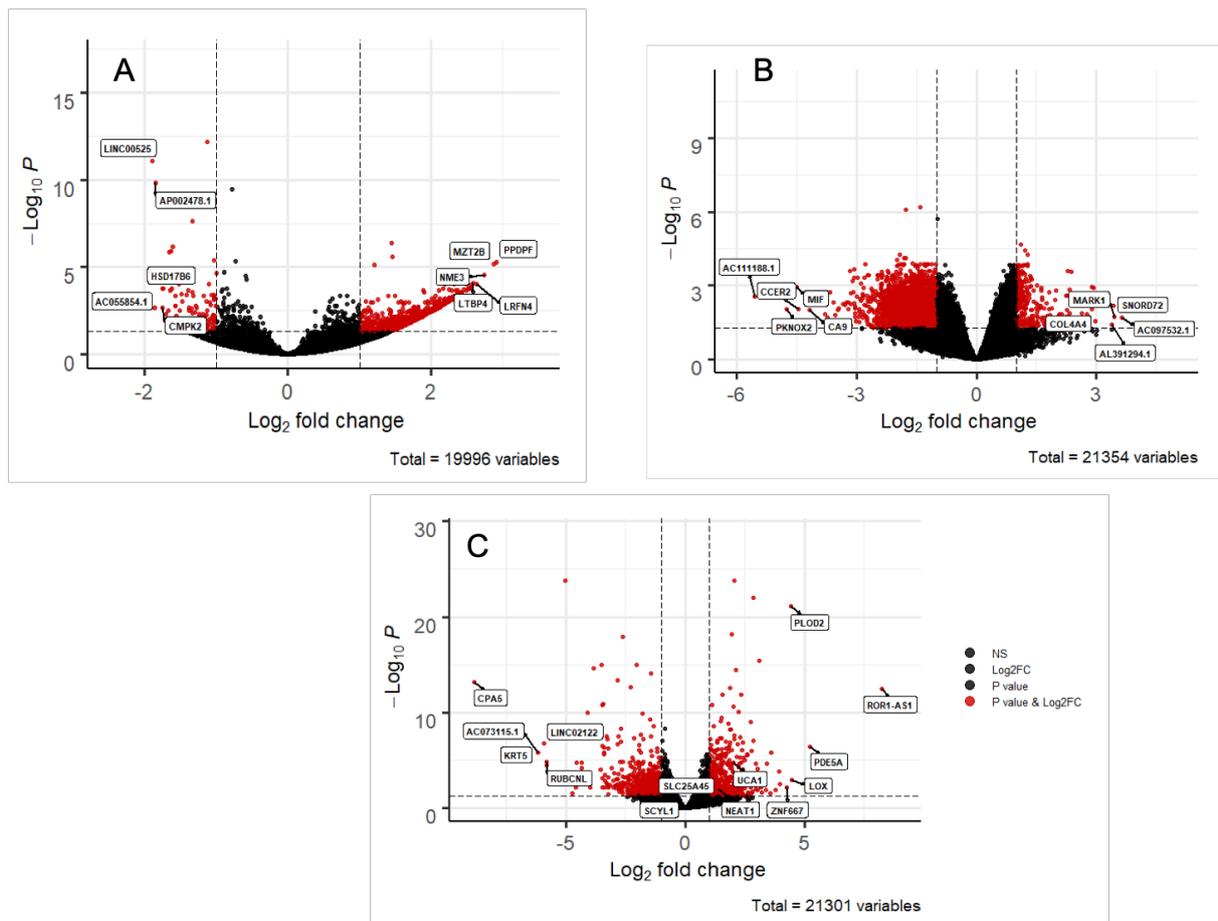


Figure 5: Volcano plot illustrating fold change (log base 2) compared with p value ($-\log$ base 10) between A) proton therapy (PT) and gemcitabine-olaparib-protontherapy (B) gemcitabine-olaparib-X-rays (RTOG) and gemcitabine-olaparib-protontherapy (PTOG) and (C) gemcitabine-X-rays (RTG) and gemcitabine-protontherapy (PTG). Horizontal bar represents a significance level of $p = 0.05$ significance level and vertical bar represents a significant \log_2FC . The red points represented the transcripts with a \log_2 fold change higher than $|1|$ and a P-value less than 0.05. The 10 most differentially expressed transcripts in each contrast are labelled in the black boxes, among them, the most significantly dysregulated lincRNA.

To identify possible genes and pathways affected by radiosensitization with gemcitabine, olaparib or the combined treatments, RNA sequencing was performed on excised MIA PaCa-2 xenografts. The numbers of DE transcripts between all contrasts are reported in Table 1. Intriguingly, there were less than 10 DE transcripts expressed in three comparisons (proton-gemcitabine (PTG) vs proton-olaparib-gemcitabine (PTOG), X-rays (RT) vs X-rays-olaparib (RTO) and RT vs control (CTL)). Moreover, nine comparisons have between 10 and 800 DE transcripts. The most relevant differentially expressed transcripts were encountered between X-rays-olaparib-gemcitabine (RTOG) and PTOG, with 2691 DE transcripts. Then, second most

relevant differences were observed between X-rays-gemcitabine (RTG) and PTG, with 1749 DE transcripts. Finally, we also observed 1336 DE transcripts between protontherapy (PT) and PTOG (Figure 5).

Enrichment analyses were performed for all comparisons and DE genes involved in cellular components terms such as organelle part and extracellular vesicle are common in the three most relevant comparisons (PT/PTOG, RTOG/PTOG, RTG/PTG, Figures 6A, B and C, respectively). Extracellular vesicles are known to carry a large amount of RNA, particularly long non coding RNA (lncRNA).

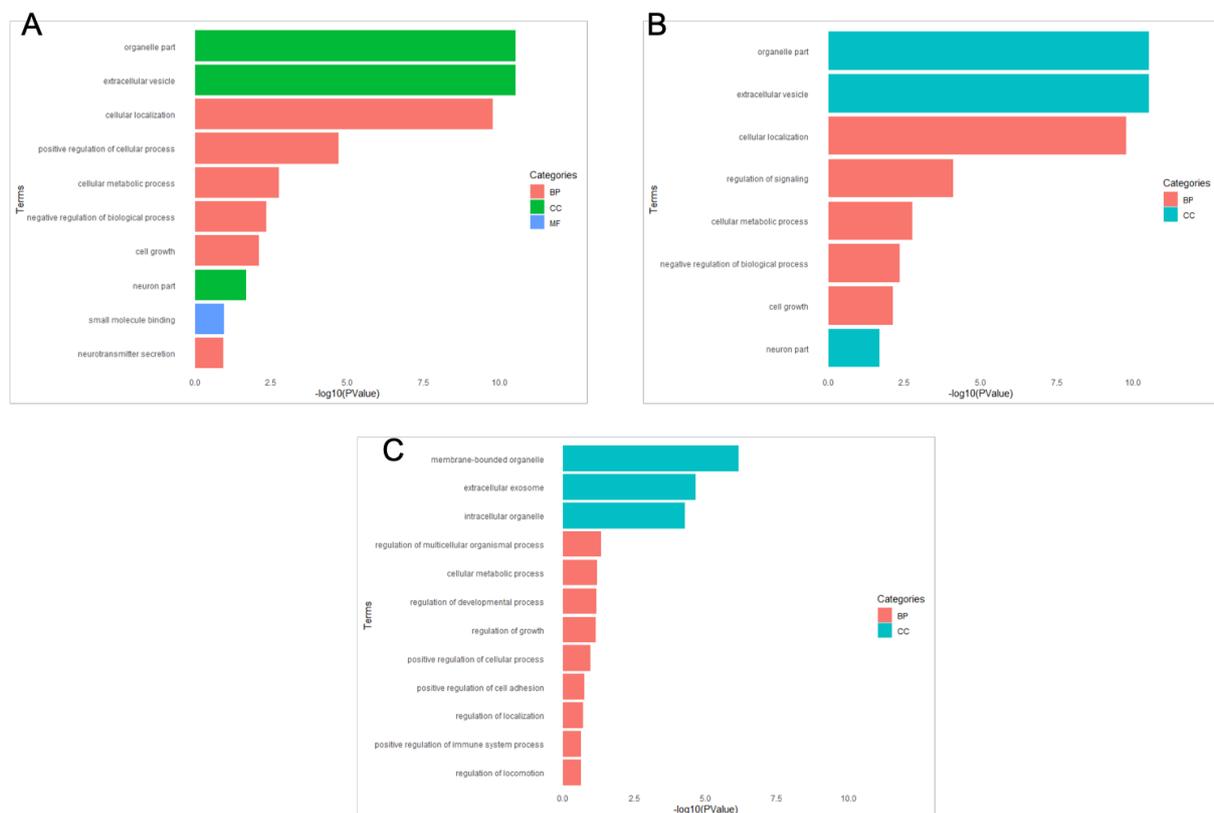


Figure 6: Enrichment on biological process for (A) PT vs PTOG, (B) RTOG vs PTOG and (C) RTG vs PTG. BP: biological process, CC: cellular component.

Besides, we identified that our whole RNA sequencing also revealed a large amount of long non-coding RNA (lncRNA). Thus, 2.5%, 3.8% and 6% of transcripts were lnc-RNA in RTOG vs PTOG, PT vs PTOG and RTG vs PTG comparisons, respectively. According to the lncRNA

Disease 2.0 Database, five lncRNA were known to be involved in PDAC development, progression, invasion or metastasis: UCA1 (Urothelial Cancer Associated 1), NEAT1 (Nuclear Abundant Transcript 1), HAR1A (Highly Accelerated Region 1A), HAR1B (Highly Accelerated Region 1B) and FTX (XIST Regulator). Among the significant DE lncRNA obtained in our analysis, two of them were found to be dysregulated between RTG vs PTG: UCA1 and NEAT1 (Table 1). NEAT1 is a nuclear-restricted lncRNA known to be associated with PDAC progression and metastasis. Indeed, UCA1 and NEAT1 were upregulated when tumors were treated with protontherapy compared to X-rays, after pre-treatment with gemcitabine. Furthermore, we also found that two of its targets, SCYL1 and SLC25A45, were significantly downregulated in gemcitabine-proton therapy condition.

According to the significant differences observed in growth delay analysis between irradiation type, independently of systemic treatment, we focused on common DE genes between X-rays (RT) and Proton therapy (PT) schedules (Table 2). Five common genes were identified, but their regulation was dependant of the pre-treatment with gemcitabine. Indeed, when cells were pre-treated with gemcitabine, genes were downregulated, whereas there were upregulated in absence of gemcitabine. This emphasized the transcriptomic consequences of gemcitabine. Based on this observation, we evaluated the consequences of gemcitabine treatment using supervised clustering analysis. Two clusters were found representing tumors treated with gemcitabine-based irradiation and tumors that were not treated with gemcitabine, irrespective of the type of irradiation or treatment with olaparib (Figure 7). We identified a 23-gene signature highly correlated with gemcitabine treatment. Among these genes, there was a strong negative association between tumors treated with gemcitabine and expression of 4 transcripts. Furthermore, there was a strong correlation between negative expression of 19 transcripts and tumors that were treated with gemcitabine. The identified genes correlated with gemcitabine treatment are listed in table 3.

Gene name	Description	Log2FC RT vs PT	Adjusted P-value RT vs PT	Log2FC RTO vs PTO	Adjusted P-value RTO vs PTO	Log2FC RTG vs PTG	Adjusted P-value RTG vs PTG	Log2FC RTOG vs PTOG	Adjusted P-value RTOG vs PTOG
CDC20	cell division cycle 20	1.58	0.02	1.98	0.013	-1.26	0.036	-1.07	0.015
COX6B1	cytochrome c oxidase subunit 1.17 6B1	1.17	0.04	1.13	0.04	-1.06	0.14	-1.073	0.0008
TIMM10	translocase of inner mitochondrial membrane 10	1.38	0.03	1.55	0.036	-1.46	0.007	-1.12	0.0029
UBB	ubiquitin B	1.36	0.03	1.50	0.035	-1.14	0.03	-1.06	0.0064
EIF5AL1	eukaryotic translation initiation factor 5A-like 1	1.57	0.02	2.08	0.0027	-1.46	0.009	-1.59	0.0008

Table 2: Significantly dysregulated transcripts between tumors treated with X-Rays and tumors treated with Protons, with a P -value < 0.05 and a $|\log_2FC| > 1$.

X-Rays (RT), gemcitabine + X-rays (RTG), olaparib + X-rays (RTO), olaparib + gemcitabine + X-rays (RTOG), proton therapy (PT), gemcitabine + proton therapy (PTG), olaparib + proton therapy (PTO) and olaparib + gemcitabine + proton therapy (PTOG).

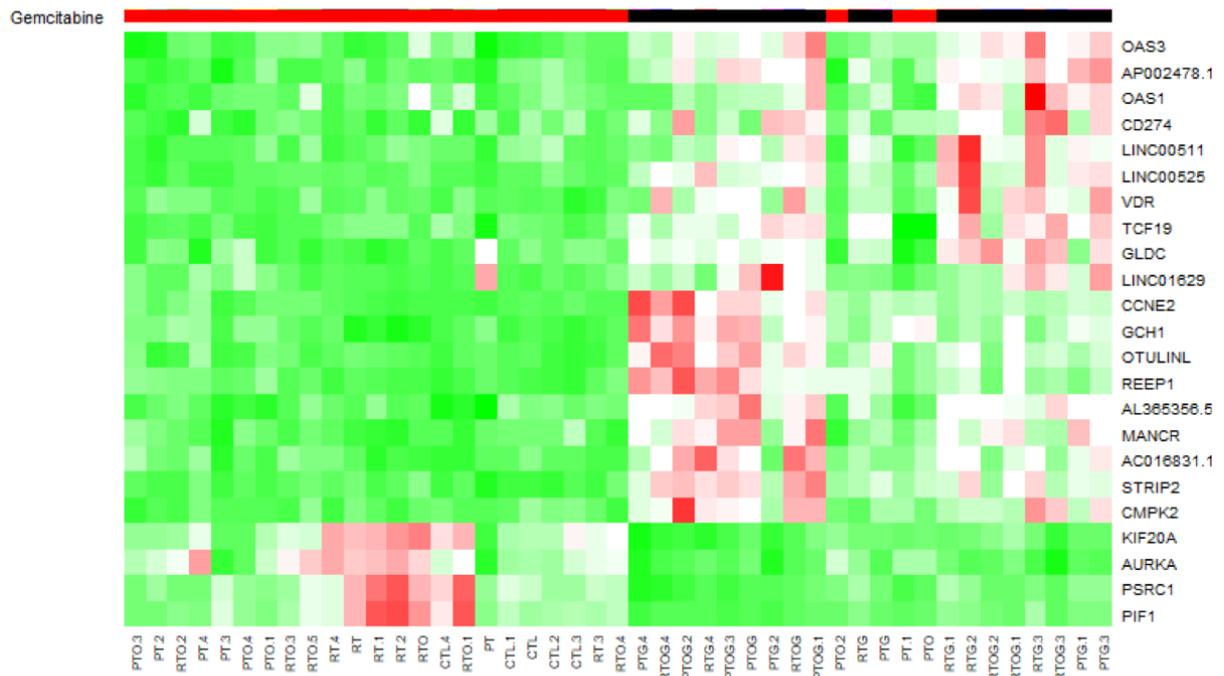


Figure 7: Heatmap presenting the gene expression levels in RNA samples of MIA PaCa-2 tumors treated with (black) or without gemcitabine (red).

DMSO (CTL), X-Rays (RT), gemcitabine + X-rays (RTG), olaparib + X-rays (RTO), olaparib + gemcitabine + X-rays (RTOG), proton therapy (PT), gemcitabine + proton therapy (PTG), olaparib + proton therapy (PTO) and olaparib + gemcitabine + proton therapy (PTOG). Five samples per condition.

Gene name	Description	log2 FC	Adjusted P-value
REEP1	receptor accessory protein 1	1.45	5.75E-12
AURKA	aurora kinase A	-0.93	3.47E-10
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1	1.22	2.70E-06
OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3	1.06	5.77E-12
VDR	vitamin D receptor	1.87	1.13E-16
KIF20A	kinesin family member 20A	-1.03	2.40E-07
CD274	CD274 molecule	0.93	2.97E-06
STRIP2	striatin interacting protein 2	1.39	3.49E-18
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	1.05	3.12E-06
PSRC1	proline and serine rich coiled-coil 1	-0.94	5.15E-05
CMPK2	cytidine/uridine monophosphate kinase 2	1.97	8.78E-13
TCF19	transcription factor 19	0.88	2.14E-19
PIF1	PIF1 5'-to-3' DNA helicase	-1.66	5.01E-07
OTULINL	OTU deubiquitinase with linear linkage specificity like	1.47	1.73E-21
LINC00525	Linc RNA 525	1.68	4.77E-35
CCNE2	cyclin E2	1.63	5.36E-13
GLDC	glycine decarboxylase	1.19	9.08E-13
AC016831.1		1.18	2.30E-11
LINC00511	Linc RNA 511	1.16	1.23E-13
MANCR	mitotically associated linc RNA	0.96	5.06E-16
AL365356.5		1.05	2.14E-19
LINC01629	Linc RNA 1629	1.79	4.14E-06
AP002478.1		1.26	2.14E-19

Table 3: Significantly dysregulated transcripts between tumors treated with gemcitabine and tumors not treated with gemcitabine, with a P-value < 0.05 and a log2FC > |1|.

DISCUSSION

In this study, we investigated the potential of olaparib, a potent PARP inhibitor, to radiosensitize PDAC xenografts after gemcitabine-based chemoradiotherapy with X-ray or proton therapy. This tumor growth study presented that protontherapy alone significantly increased progression-free survival, compared to radiotherapy with photon. It is well known that the relative biologic effectiveness (RBE) is defined as the ratio between the dose delivered in photon irradiation and proton irradiation, achieving the same specified biologic effect (Paganetti, 2014). As recommended by the ICRU 78, it is common to use a constant generic RBE of 1.1 in clinical studies (Newhauser, 2009). However, in our study 10 Gy protons delayed tumor growth by enhancing tumor-doubling by 30% compared to X-ray with the same dose. Therefore, we could assume that RBE would be 1.3 with MIA PaCa-2 PDAC xenografts. Indeed, the RBE for protontherapy is considered as complex function of cell type α/β , linear energy transfer (LET), dose and endpoint (Paganetti, 2014). Because the 1.1 RBE is a general definition, in this particular case of PDAC tumors, the difference of effect observed between photons and protons irradiations could be due to previous cited factors.

In our study, olaparib did not radiosensitize pancreatic cancer xenografts with photon irradiation. This was consistent with Karnak *et al.*, who evaluated fractionated radiotherapy (X-rays) with olaparib in MIA PaCa-2 xenografts model and found that olaparib did not induce radiosensitization (Karnak *et al.*, 2014). Other publications displayed no radiosensitization with olaparib in PDX model, in BRCA-WT PDAC tumors (Lohse *et al.*, 2016). In contrast, olaparib sensitized PDAC xenografts treated with proton therapy. The major difference between photon and proton irradiations is the linear energy transfer (LET). Indeed, the average LET of conventional megavoltage radiotherapy is around 0.2 keV/ μm , whereas in the spread-out Bragg peak region, the simulated LET was between 2-3 keV/ μm , which is approximately ten times higher than megavoltage X-rays (Constanzo *et al.*, 2019). DNA damages induced by high LET particles such as protons are more complex and clustered than those induced by photons (Keszenman and Sutherland, 2010), particularly closely associated oxidized base and single-strand breaks. These lesions are mainly repaired by BER, in which PARP plays a significant role (Carter *et al.*, 2018; Chaudhary *et al.*, 2016). Recently, Hirai *et al.* determined that treatment of MIA PaCa-2 cell line by olaparib before proton irradiation enhanced radiosensitization and specifically in the SOBP region, compared to the entrance region, thus demonstrating that PARP inhibition radiosensitized cancer cells in a LET dependent manner (Hirai *et al.*, 2016). Furthermore, we displayed that association with gemcitabine and olaparib relevantly enhanced gemcitabine-based chemoradiotherapy either with X-rays or proton irradiation. Few studies investigated proton-based radiosensitization with PARPi and all of them were *in vitro* studies (Hirai *et al.*, 2012, 2016). To the best of our knowledge, this is the first study evaluating proton-based chemoradiosensitization with gemcitabine and olaparib in a preclinical *in vivo* model of PDAC xenograft. Moreover, studies evaluated other DNA damage response inhibitor to sensitize gemcitabine-based chemoradiation, in preclinical model of PDAC xenografts (Engelke *et al.*, 2013; Fokas *et al.*, 2012; Kausar *et al.*, 2015). Indeed, Kausar *et al.* evaluated AZD1775 (Wee1 inhibitor) in PDX model of PDAC and presented enhancement of tumor-doubling time with association of photons radiotherapy, gemcitabine and AZD1775 (34 days) compared to gemcitabine radiotherapy (21.5 days) (Kausar *et al.*, 2015). Fokas *et al.* evaluated the potential role of ATR inhibitor (VE-822) to sensitize PDAC xenografts to gemcitabine-based chemoradiotherapy. The addition of VE-822 to the combination of gemcitabine and X-rays extended tumor growth delay, compared with X-rays and gemcitabine (Fokas *et al.*, 2012). Engelke *et al.* presented that MIA PaCa-2 xenografts were significantly sensitized to gemcitabine-based chemoradiation by Chk1 inhibitor (Engelke *et al.*, 2013). All these data highlighted that targeting DNA damage response pathways is an effective manner to enhance

gemcitabine-based chemoradiotherapy, thus translating in better clinical outcomes.

Recently Tuli *et al.* published results of phase I clinical trial assessing efficacy of gemcitabine, fractionated intensity-modulated radiotherapy and veliparib, a PARPi, in locally advanced PDAC (Tuli *et al.*, 2019). Authors emphasized that co-treatment with veliparib and gemcitabine was well tolerated, and median progression-free survival was 9.8 months (95% CI: 8.4-18.6). Moreover, alterations in PARP3 expression was associated with improved survival (Tuli *et al.*, 2019). However, baseline poly(ADP-ribose) levels, tumor mutational burden or microsatellite instability were not correlated with survival. Thus, assessing that transcriptional response to treatment could help to better identify biomarkers of response.

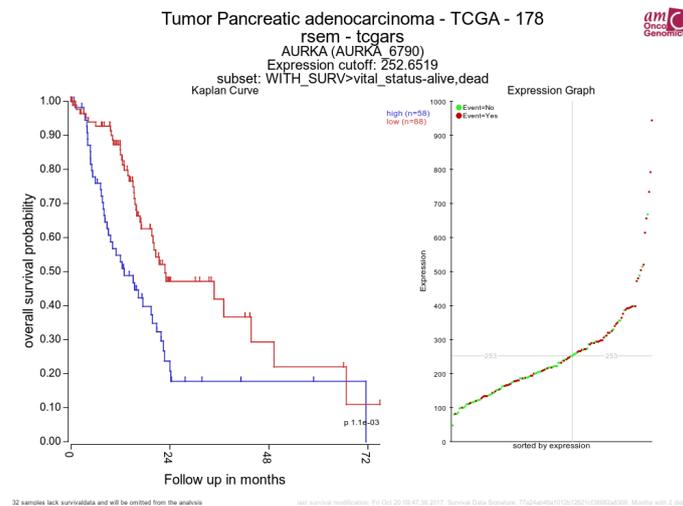
Bioinformatics analyses were performed to investigate transcriptional response after irradiation, associated or not with gemcitabine and/or olaparib. First, transcriptomic response was affected in various ways by all treatment associations. Indeed, a wide range of DE genes between different conditions varied from no significantly DE genes to maximum 2691 DE genes. This highlighted that irradiations and/or their combinations with olaparib and/or gemcitabine sometimes highly altered early transcriptomic response. The number of DE transcripts was important in three comparisons, and meaningful dysregulated terms were obtained after enrichment. Among these terms, extracellular vesicles and exosomes were common to the most relevant three comparisons with high absolute log fold change. Microvesicles enclose a large type of molecules and particularly lncRNA. Indeed, an important number lncRNA have been identified to be part of intercellular communication, through microvesicles secretions and could provide drug resistance (Dragomir *et al.*, 2018). Thus, lncRNA charged microvesicles could be used as a diagnostic tool or biomarker of response and could be easily assessed with fluid sample through liquid biopsy. In our study, by means of an in-depth analysis, many long non-coding RNA were found differentially expressed between some conditions with irradiations. lncRNA are newly recognized as regulators of genes expression, transcriptionally and post transcriptionally, thus affecting mRNA biogenesis (Engreitz *et al.*, 2016). Gene Ontology and Kegg pathway enrichment analysis are major processes for investigating gene group that contribute in common biological process or molecular function, however, genes affected by lncRNA are not considered in these approaches. There have been lots of evidence that lncRNA may affect number of biological process of cancer cells, such as proliferation, cell cycle regulation, DNA repair, cell death, invasion, metastasis (Bhan *et al.*, 2017). However, less is known about the potential prognosis value of lncRNA, particularly after irradiation. In our analysis, we identified two known lncRNA involved in PDAC progression: NEAT1 and UCA1. NEAT1 has been reported to be

upregulated in PDAC and is a prognostic factor of overall survival (Raphael et al., 2017). Huang et al. described that NEAT1 enhanced cancer progression through downregulation of miR-506-3p (Huang et al., 2017). UCA1 was initially identified in bladder cancer tissues and its overexpression enhanced bladder cancer cells invasiveness. Then it has been shown to be associated in many other cancers such as gastric cancer, colorectal cancer and recently PDAC (Zhang et al., 2017). UCA1 is known to be upregulated in 4 PDAC cell lines (PANC-1, BxPC-3, Capan-1 and MIA PaCa-2) (Zhang et al., 2017). Different mechanisms, such as downregulation of miR-135a and Hippo pathways, explained PDAC prognosis (Zhang et al., 2018). However, it has never been identified as a predictive factor of response after treatment. As observed in our tumor growth analysis, proton therapy is more effective than X-Rays. Then identification of common dysregulated genes between X-rays and protons is a matter of concern. We identified five genes differentially expressed between proton therapy and X-rays. Furthermore, their expressions were influenced by pre-treatment with gemcitabine. Then, using supervised clustering, our analysis showed a gemcitabine response signature. Indeed, we displayed that there was a high correlation between underexpression of AURKA and gemcitabine treatment. The Aurora kinases comprise a family of three homologs serine/threonine kinases that play an essential role in cell cycle progression, particularly in G2/M phase. Among them, Aurora kinase A participates in centrosome assembly. This kinase is important for the maintenance of genomic integrity. It is well known that overexpression of Aurora kinase A is associated with tumor proliferation and chromosomal instability. Thus, downregulation of AURKA after treatment with gemcitabine-based CRT could explain response to these treatments. Based on the hypothesis that AURKA could be a prognostic factor in PDAC, we assessed TCGA database and found that patient with underexpression of AURKA have a significant better overall survival (supplementary figure 1). This is consistent with our data exhibiting that downregulation of AURKA after gemcitabine-based CRT could enhance tumor response.

To the best of our knowledge, this is the first study evaluating tumor growth and transcriptional changes after treatment with olaparib, gemcitabine and irradiation with protons or X-rays in PDAC mice model. Our analysis described that the association of gemcitabine, olaparib and proton therapy significantly enhanced tumor response and progression-free survival in heterotopic xenograft mice model.

Knowing that irradiation and PARPi could enhance immune response (Césaire et al., 2018), it could be interesting to evaluate tumor, its microenvironment and the immune response to

radiation with DNA damage response inhibitor drug association, in models such as genetically engineered mouse model (GEMM) (Castle et al., 2017; Kersten et al., 2017).



Supplementary figure 1: Kaplan-Meier curve analysis of overall survival according to AURKA expression based on TCGA RNA sequencing data.

REFERENCES

- Alvarellos, M.L., Lamba, J., Sangkuhl, K., Thorn, C.F., Wang, L., Klein, D.J., Altman, R.B., and Klein, T.E. (2014). PharmGKB summary: gemcitabine pathway. *Pharmacogenet. Genomics* *24*, 564–574.
- Bao, Z., Yang, Z., Huang, Z., Zhou, Y., Cui, Q., and Dong, D. (2019). LncRNADisease 2.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res.* *47*, D1034–D1037.
- Bhan, A., Soleimani, M., and Mandal, S.S. (2017). Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res.* *77*, 3965–3981.
- Carter, R.J., Nickson, C.M., Thompson, J.M., Kacpersek, A., Hill, M.A., and Parsons, J.L. (2018). Complex DNA Damage Induced by High Linear Energy Transfer Alpha-Particles and Protons Triggers a Specific Cellular DNA Damage Response. *Int. J. Radiat. Oncol.* *100*, 776–784.
- Castle, K.D., Chen, M., Wisdom, A.J., and Kirsch, D.G. (2017). Genetically engineered mouse models for studying radiation biology. *Transl. Cancer Res.* *6*, S900–S913.
- Césaire, M., Thariat, J., Candéias, S.M., Stefan, D., Saintigny, Y., and Chevalier, F. (2018). Combining PARP inhibition, radiation, and immunotherapy: A possible strategy to improve the

treatment of cancer? *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3793.

Chaudhary, P., Marshall, T.I., Currell, F.J., Kacperek, A., Schettino, G., and Prise, K.M. (2016). Variations in the Processing of DNA Double-Strand Breaks Along 60-MeV Therapeutic Proton Beams. *Int. J. Radiat. Oncol.* **95**, 86–94.

Constanzo, J., Vanstalle, M., Finck, C., Brasse, D., and Rousseau, M. (2019). Dosimetry and characterization of a 25-MeV proton beam line for preclinical radiobiology research. *Med. Phys.* **46**, 2356–2362.

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

Dragomir, M., Chen, B., and Calin, G.A. (2018). Exosomal lncRNAs as new players in cell-to-cell communication. *Transl. Cancer Res.* **7**, S243–S252.

Engelke, C.G., Parsels, L.A., Qian, Y., Zhang, Q., Karnak, D., Robertson, J.R., Tanska, D.M., Wei, D., Davis, M.A., Parsels, J.D., et al. (2013). Sensitization of Pancreatic Cancer to Chemoradiation by the Chk1 Inhibitor MK8776. *Clin. Cancer Res.* **19**, 4412–4421.

Engreitz, J.M., Ollikainen, N., and Guttman, M. (2016). Long non-coding RNAs: spatial amplifiers that control nuclear structure and gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 756–770.

Fokas, E., Prevo, R., Pollard, J.R., Reaper, P.M., Charlton, P.A., Cornelissen, B., Vallis, K.A., Hammond, E.M., Olcina, M.M., Gillies McKenna, W., et al. (2012). Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death Dis.* **3**, e441–e441.

Hirai, T., Shirai, H., Fujimori, H., Okayasu, R., Sasai, K., and Masutani, M. (2012). Radiosensitization effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition in cells exposed to low and high linear energy transfer radiation. *Cancer Sci.* **103**, 1045–1050.

Hirai, T., Saito, S., Fujimori, H., Matsushita, K., Nishio, T., Okayasu, R., and Masutani, M. (2016). Radiosensitization by PARP inhibition to proton beam irradiation in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 234–240.

Huang, B., Liu, C., Wu, Q., Zhang, J., Min, Q., Sheng, T., Wang, X., and Zou, Y. (2017). Long non-coding RNA NEAT1 facilitates pancreatic cancer progression through negative modulation of miR-506-3p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 828–834.

Huguet, F., Mukherjee, S., and Javle, M. (2014). Locally Advanced Pancreatic Cancer: The Role of Definitive Chemoradiotherapy. *Clin. Oncol.* **26**, 560–568.

Karnak, D., Engelke, C.G., Parsels, L.A., Kausar, T., Wei, D., Robertson, J.R., Marsh, K.B., Davis, M.A., Zhao, L., Maybaum, J., et al. (2014). Combined Inhibition of Wee1 and PARP1/2 for Radiosensitization in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* *20*, 5085–5096.

Kausar, T., Schreiber, J.S., Karnak, D., Parsels, L.A., Parsels, J.D., Davis, M.A., Zhao, L., Maybaum, J., Lawrence, T.S., and Morgan, M.A. (2015). Sensitization of Pancreatic Cancers to Gemcitabine Chemoradiation by WEE1 Kinase Inhibition Depends on Homologous Recombination Repair. *Neoplasia* *17*, 757–766.

Kersten, K., de Visser, K.E., van Miltenburg, M.H., and Jonkers, J. (2017). Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol. Med.* *9*, 137–153.

Keszenman, D.J., and Sutherland, B.M. (2010). Yields of Clustered DNA Damage Induced by Charged-Particle Radiations of Similar Kinetic Energy per Nucleon: LET Dependence in Different DNA Microenvironments. *Radiat. Res.* *174*, 238–250.

Lohse, I., Kumareswaran, R., Cao, P., Pitcher, B., Gallinger, S., Bristow, R.G., and Hedley, D.W. (2016). Effects of Combined Treatment with Ionizing Radiation and the PARP Inhibitor Olaparib in BRCA Mutant and Wild Type Patient-Derived Pancreatic Cancer Xenografts. *PLOS ONE* *11*, e0167272.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*.

Newhauser, W. (2009). International Commission on Radiation Units and Measurements Report 78: Prescribing, Recording and Reporting Proton-beam Therapy. *Radiat. Prot. Dosimetry* *133*, 60–62.

Nichols, R.C., Huh, S., Li, Z., and Rutenberg, M. (2015). Proton therapy for pancreatic cancer. *World J. Gastrointest. Oncol.* *7*, 141–147.

Noël, G., Godon, C., Fernet, M., Giocanti, N., Mégnin-Chanet, F., and Favaudon, V. (2006). Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 564–574.

Paganetti, H. (2014). Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. Variations as a function of biological endpoint, dose, and linear energy transfer. *Phys. Med. Biol.* *59*, R419–R472.

Raphael, B.J., Hruban, R.H., Aguirre, A.J., Moffitt, R.A., Yeh, J.J., Stewart, C., Robertson, A.G.,

Cherniack, A.D., Gupta, M., Getz, G., et al. (2017). Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32, 185-203.e13.

Suker, M., Beumer, B.R., Sadot, E., Marthey, L., Faris, J.E., Mellon, E.A., El-Rayes, B.F., Wang-Gillam, A., Lacy, J., Hosein, P.J., et al. (2016). FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic cancer: a systematic review and patient-level meta-analysis. *Lancet Oncol.* 17, 801–810.

Tuli, R., Shiao, S.L., Nissen, N., Tighiouart, M., Kim, S., Osipov, A., Bryant, M., Ristow, L., Placencio-Hickok, V.R., Hoffman, D., et al. (2019). A phase 1 study of veliparib, a PARP-1/2 inhibitor, with gemcitabine and radiotherapy in locally advanced pancreatic cancer. *EBioMedicine*.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet* 378, 607–620.

Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63.

Wickham, H. (2009). *Ggplot2: elegant graphics for data analysis* (New York: Springer).

Woodward, W.A., and Amos, R.A. (2016). Proton Radiation Biology Considerations for Radiation Oncologists. *Int. J. Radiat. Oncol. • Biol. • Phys.* 95, 59–61.

Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., and He, Q.-Y. (2012). clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS J. Integr. Biol.* 16, 284–287.

Zhang, M., Zhao, Y., Zhang, Y., Wang, D., Gu, S., Feng, W., Peng, W., Gong, A., and Xu, M. (2018). LncRNA UCA1 promotes migration and invasion in pancreatic cancer cells via the Hippo pathway. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1864, 1770–1782.

Zhang, X., Gao, F., Zhou, L., Wang, H., Shi, G., and Tan, X. (2017). UCA1 Regulates the Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer by Sponging miR-135a. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* 25, 1529–1541.

PARTIE VII

PARTIE VII

Comparaison de la radiosensibilisation par deux inhibiteurs de PARP : rôle du piégeage de la PARP

Introduction

L'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC) représente la quatrième cause de mortalité par cancer dans le monde. Le pronostic associé au PDAC reste médiocre avec une survie globale à 5 ans de 9%. Ce mauvais pronostic est en partie dû à une symptomatologie non spécifique et à une résistance au traitement conventionnel. Environ 30% des patients sont diagnostiqués avec une maladie localement avancée. Bien que la chimiothérapie néoadjuvante suivie d'une chimioradiothérapie puisse améliorer le contrôle des tumeurs chez ce sous-groupe de patients, près de 30% d'entre eux présenteront une récurrence locale. Compte tenu de ces résultats parfois décevants, la recherche de nouveaux agents radiosensibilisants est indispensable pour améliorer le contrôle tumoral et la survie spécifique. Des études récentes se sont intéressées à la compréhension moléculaire et biologique de PDAC. Récemment, une étude de séquençage de l'exome entier a confirmé que 40% des tumeurs présentaient une mutation dans les voies de réparation de l'ADN. Ainsi, cibler la réponse aux dommages de l'ADN est une solution prometteuse pour les patients atteints de PDAC. Des études récemment publiées évaluant de l'olaparib, un inhibiteur de la PARP, dans des PDAC mutées BRCA1/2 ont montré une amélioration de la survie sans progression chez les patients atteints de PDAC métastatique. La combinaison de la radiothérapie et des inhibiteurs de la PARP (PARPi) pourrait constituer un moyen efficace d'améliorer le contrôle local et la survie sans maladie [7]. L'effet radiosensibilisant des PARPi est secondaire à différents mécanismes. Les PARPi inhibent l'activité enzymatique de la PARP, diminuant ainsi la PARylation des protéines. En complément de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PARP, les PARPi ont une capacité de piégeage de la PARP sur l'ADN. Cette capacité varie d'un PARPi à l'autre [127]. Nous avons précédemment montré que l'olaparib radiosensibilisait *in vitro* les lignées pancréatiques MIA PaCa-2, BxPC-3, AsPC-1 et PANC-1. Seule la lignée BxPC-3 n'était pas radiosensibilisée par l'olaparib. Nous avons donc évalué la capacité de radiosensibilisation de deux PARPi : l'olaparib et le talazoparib sur les quatre lignées cellulaires pancréatiques MIA PaCa-2, BxPC-3, AsPC-1 et PANC-1.

Une concentration non cytotoxique d'olaparib et de talazoparib diminue de manière significative la PARylation.

Nous avons précédemment montré que l'olaparib à 1 μM n'était pas cytotoxique sur les quatre lignées cellulaires pancréatiques. Afin de trouver une concentration non cytotoxique de talazoparib, nous avons traité les lignées cellulaires avec des concentrations croissantes de talazoparib pendant 24h, puis les cellules ont été réensemencées en conditions clonogéniques. Les résultats du test de survie clonogénique pour les quatre lignées cellulaires sont présentés dans la figure 21. Nous avons mis en évidence qu'à la concentration de 100 nM, le talazoparib n'est pas cytotoxique pour les lignées cellulaires pancréatiques MIA PaCa-2, BxPC-3, AsPC-1 et PANC-1.

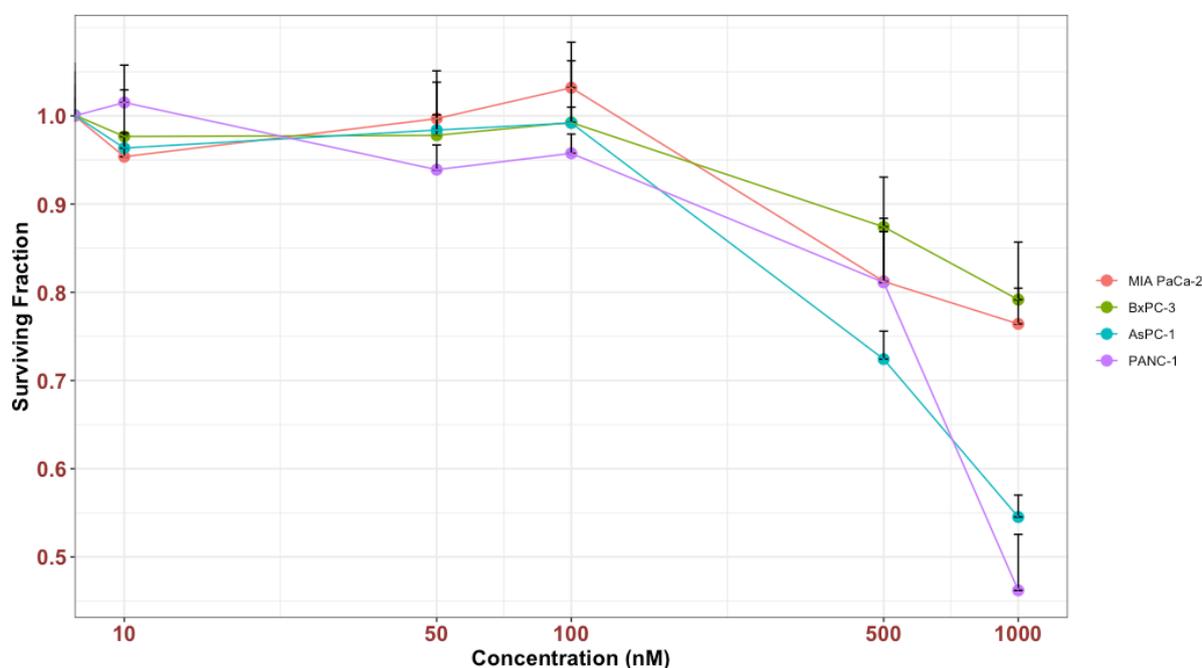


Figure 21 : Survie clonogénique (fractions de survie) des lignées cellulaires MIA PaCa-2, BxPC-3, AsPC-1 et PANC-1 en fonction de la concentration de talazoparib (10-1000 nM). Moyennes +/- écart-type de 3 expériences indépendantes.

Afin de s'assurer de l'inhibition de la PARylation à cette concentration, nous avons traité les cellules avec le talazoparib à la concentration de 100 nM, puis les cellules ont été endommagées par ajout d' H_2O_2 . Le marquage de la PARylation en immunofluorescence après traitement par H_2O_2 a mis en évidence une disparition de la PARylation après prétraitement par le talazoparib (Figure 22). Parallèlement, nous avons montré que l'olaparib à la dose de 1 μM diminue aussi de manière significative la PARylation.

Ainsi, à une concentration non cytotoxique de 1 μM d'olaparib ou de 100 nM de talazoparib,

la PARylation était significativement diminuée.

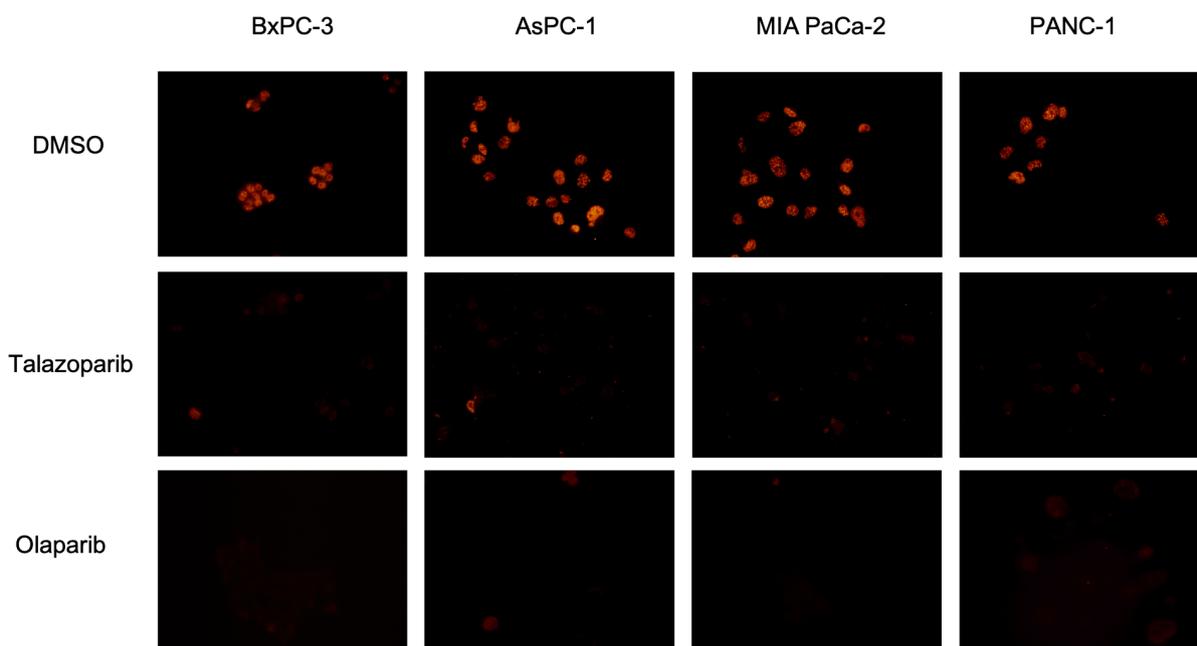


Figure 22 : Immunofluorescence anti-PAR des lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2 et PANC-1 après traitement par DMSO (contrôle), avec le talazoparib (100 nM) ou l'olaparib (1 μ M).

Le talazoparib radiosensibilise d'avantage les lignées cellulaires pancréatiques que l'olaparib.

Afin de comparer le pouvoir radiosensibilisant de l'olaparib (1 μ M) et du talazoparib (100 nM) sur les quatre lignées cellulaires, les cellules ont été prétraitées par l'olaparib ou le talazoparib, puis irradiées 1h après avec des doses d'irradiation de 2, 4 et 6 Gy. Les courbes de survie clonogénique confirment une radiosensibilisation par l'olaparib dans le cas des trois lignées cellulaires ($P < 0,0001$) mais pas sur la lignée BxPC-3 ($P = 0,256$). *A contrario*, le talazoparib radiosensibilise les quatre lignées cellulaires ($P < 0,0001$), avec une capacité de radiosensibilisation plus importante que l'olaparib ($P < 0,0001$) (figure 23).

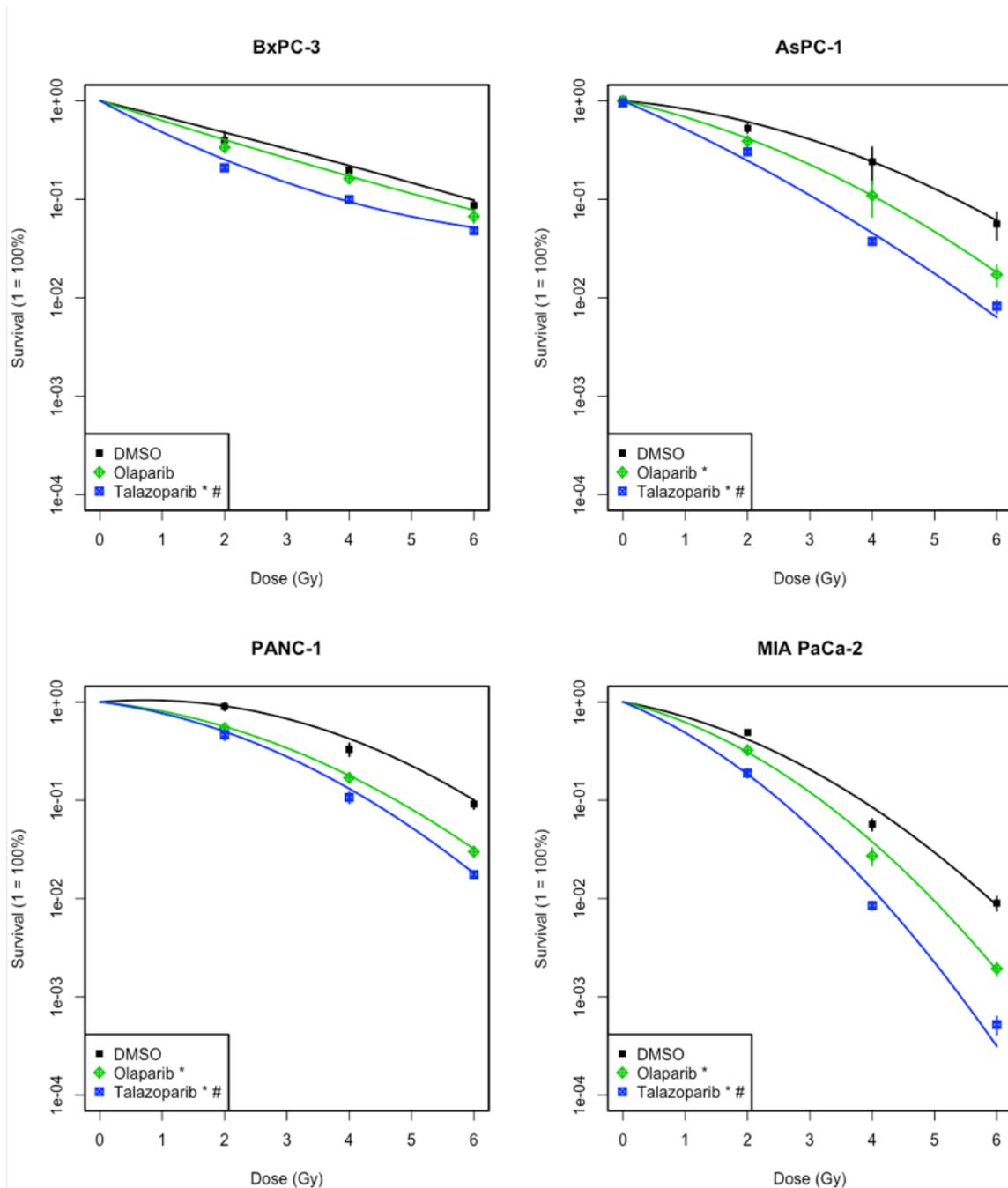


Figure 23 : Courbes de survie clonogénique des lignées cellulaires pancréatiques PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 et MIA PaCa-2 après irradiation et prétraitement par le DMSO, l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM). Moyennes \pm écart-type de 5 ou 6 expériences indépendantes. * $P < 0,05$ vs DMSO ; # $P < 0,05$ vs olaparib.

Le talazoparib augmente significativement le piégeage de la PARP-1 sur l'ADN, comparativement à l'olaparib.

Nous avons montré précédemment que l'olaparib et le talazoparib à des concentrations non cytotoxiques diminuent de manière significative l'activité enzymatique de la PARP (Figure 21).

Cependant, nous avons montré qu'il existait une différence de radiosensibilisation entre les deux inhibiteurs de PARP. Plus particulièrement dans la lignée BxPC-3, nous avons montré une radiosensibilisation avec le talazoparib mais pas avec l'olaparib, alors que dans les deux cas, les inhibiteurs diminuent la PARylation aux concentrations testées. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il existe un autre mécanisme pouvant expliquer la radiosensibilisation : le piégeage de la PARP-1. Pour mettre en évidence le piégeage de la PARP-1 sur l'ADN, les cellules ont été traitées avec l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM), puis mises en contact avec de l' H_2O_2 et ensuite collectées afin d'extraire les fractions protéiques nucléaires et chromatinienne. L'expression protéique de la PARP-1 a été analysée en western-blot. Nous avons mis en évidence une augmentation de la fraction chromatinienne de la PARP-1 après traitement par le talazoparib comparativement à l'olaparib sur les quatre lignées cellulaires pancréatiques (Figure 24).

Ainsi, le talazoparib à une concentration non cytotoxique augmente le piégeage de la PARP-1 sur l'ADN de manière plus importante que l'olaparib.

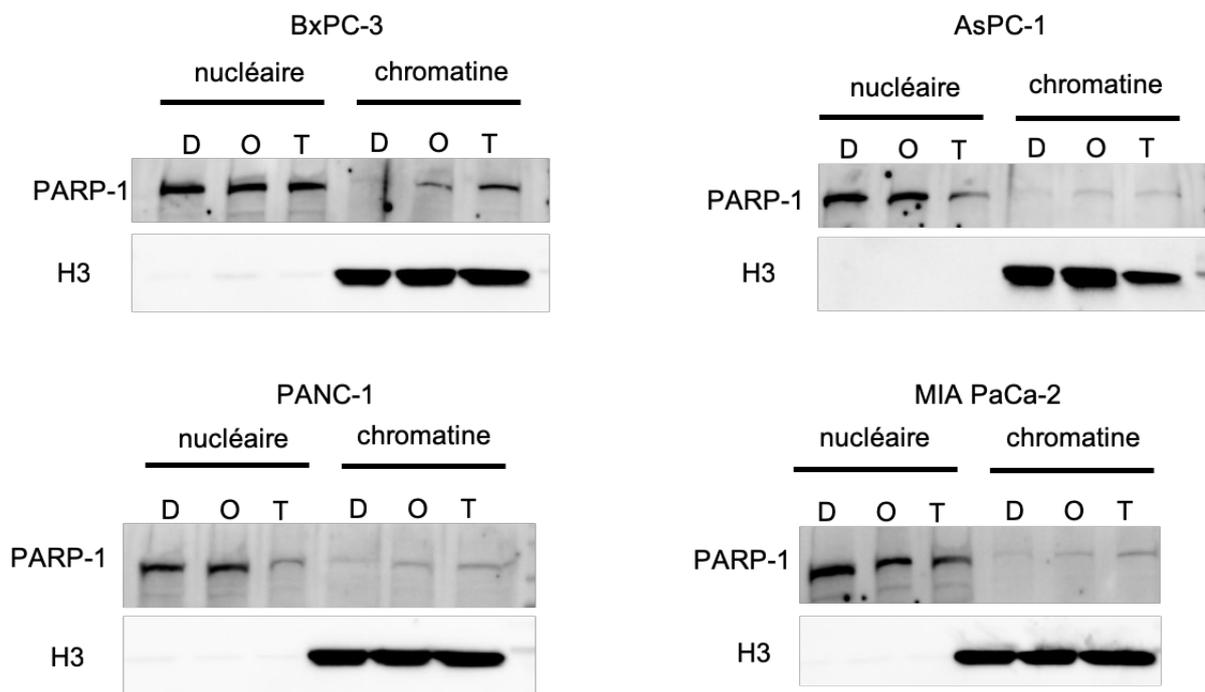


Figure 24 : Expression des fractions nucléaires et chromatinienne de la PARP-1 sur les lignées cellulaires PANC-1, AsPC-1, BxPC-3 et MIA PaCa-2, en fonction du traitement : DMSO (D), olaparib (1 μ M) (O) et talazoparib (100 nM) (T). H3 : Histone H3 confirmant l'extraction de la fraction chromatinienne.

Le talazoparib augmente significativement les dommages à l'ADN à 24h comparativement à l'olaparib.

Afin d'évaluer si la radiosensibilisation observée par l'olaparib (1 μ M) et le talazoparib (100 nM) était liée à la persistance des cassures double brins de l'ADN, les cellules ont été marquées par l'anticorps anti- γ H2AX, 24h après irradiation et/ou traitement par un PARPi.

Les résultats sont présentés dans la figure 25 et ont montré la formation de foci γ H2AX après traitement par le talazoparib dans les quatre lignées cellulaires comparativement au groupe contrôle mais aussi par rapport au groupe traité par l'olaparib seul. De plus, le nombre de cassures double brin résiduelles est significativement plus important lorsque les cellules étaient prétraitées par le talazoparib avant irradiation (6 Gy), comparativement à une irradiation exclusive et ceci pour les quatre lignées.

Enfin, le nombre de cellules positives pour γ H2AX est significativement plus important après traitement par le talazoparib comparativement à l'olaparib après irradiation (Tableau 6).

L'ensemble de ces résultats met en évidence une augmentation du nombre de cassures double brin non réparés à 24h qui est plus important après un traitement par le talazoparib comparativement à l'olaparib.

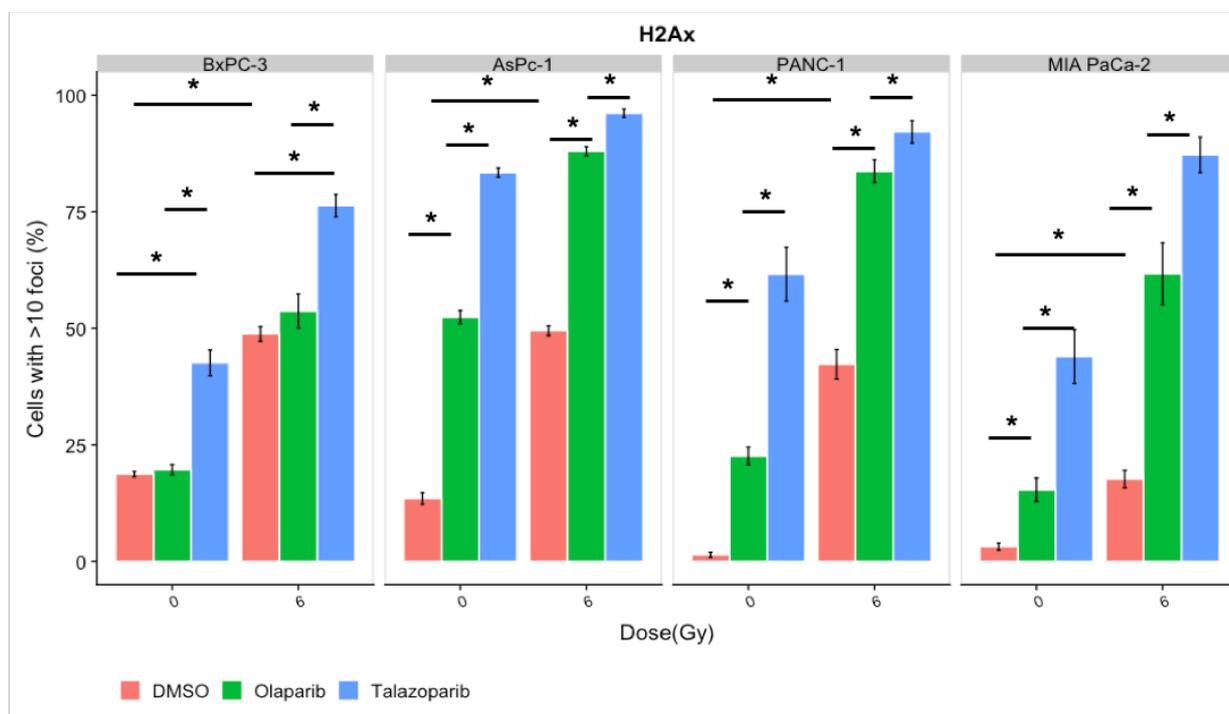


Figure 25 : Pourcentage de cellules avec plus de 10 foci γ H2AX sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM). Moyennes +/- écart-type de 3 expériences indépendantes. *P<0,05

Traitement	BxPC-3	AsPc-1	PANC-1	MIA PaCa-2
DMSO	19 %	14 %	2 %	3 %
Olaparib	20 %	52 %	23 %	15 %
Talazoparib	43 %	83 %	61 %	43 %
6 Gy	49 %	49 %	42%	18 %
6 Gy + olaparib	54 %	88 %	83 %	62 %
6 Gy + talazoparib	76 %	96 %	92 %	87 %

Tableau 6 : Pourcentage de cellules positives pour γ H2AX (> 10 foci/cellule) sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM).

Les inhibiteurs de PARP induisent significativement un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M.

La persistance des cassures de l'ADN non réparées induit un arrêt du cycle cellulaire. De ce fait, nous avons évalué la distribution des cellules dans le cycle cellulaire après un traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM) associé ou non à une irradiation (6 Gy). Les résultats sont reportés dans la figure 26 et mettent en évidence un arrêt significatif des cellules en phase G2/M après prétraitement par le talazoparib, mais pas avec l'olaparib. De plus, un traitement par l'olaparib ou le talazoparib associé à l'irradiation induit un arrêt significatif du cycle cellulaire en phase G2/M comparativement à une irradiation seule.

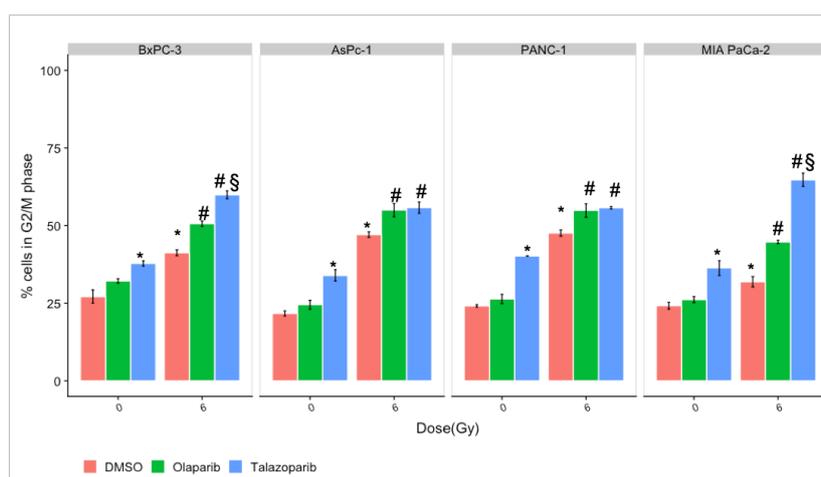


Figure 26 : Pourcentage des cellules arrêtées en phase G2/M du cycle cellulaire sur les lignées cellulaires BxPC-3, MIA PaCa-2, AsPC-1 et PANC-1, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM). Moyennes +/- écart-type de 4 expériences indépendantes. * : $P < 0,05$ vs DMSO), # : $P < 0,05$ (vs 6 Gy), § : $P < 0,05$ (vs 6 Gy+olaparib).

Les cassures double brin engendrées par l'irradiation et les PARPi induisent préférentiellement la voie de réparation NHEJ.

Afin d'évaluer les voies de réparations mises en jeu par l'association radiothérapie et PARPi, les cellules ont été prétraitées par un PARPi et irradiées ou non à 6 Gy 1h après traitement. Puis, les cellules ont été marquées par un anticorps anti-DNA-PKcs, 3h après l'irradiation ou par un anticorps anti-53BP1, 24h après l'irradiation (Figures 27-28).

L'irradiation seule augmente de manière significative la formation de foci DNA-PKcs et 53BP1. De plus, le talazoparib seul augmente la formation des foci DNA-PKcs et 53BP1 dans les quatre lignées cellulaires. *A contrario*, l'olaparib n'induit pas la formation de foci DNA-PKcs et 53BP1 dans la lignée BxPC-3 alors que c'est le cas dans les trois autres lignées. L'association de l'irradiation avec un PARPi augmente le nombre de foci DNAPKcs dans les lignées BxPC-3 et AsPc-1, mais pas dans les lignées PANC-1 et MIA PaCa-2 où la formation de foci est bien augmentée par l'irradiation seule (Tableau 7).

Au total, l'irradiation et les PARPi, en particulier le talazoparib induisent principalement la réparation des cassures double brin par la voie de la NHEJ.

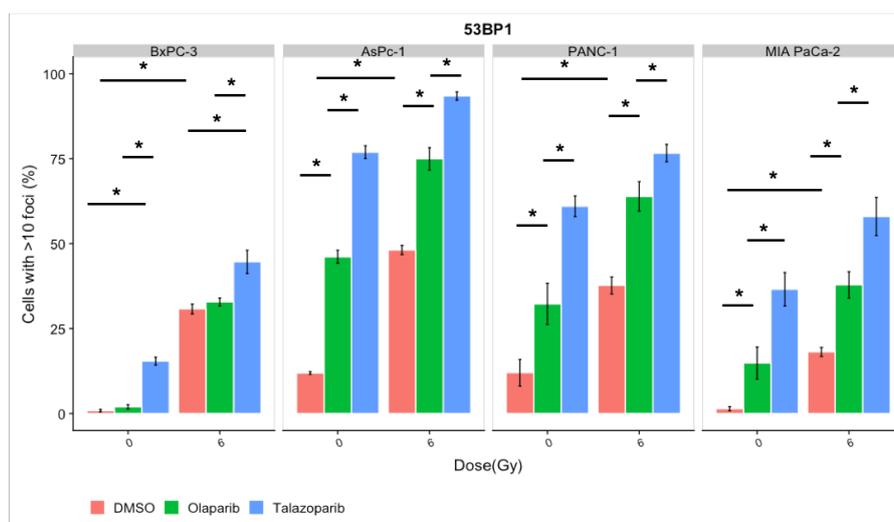


Figure 27 : Pourcentage de cellules avec plus de 10 foci 53BP1 sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 μ M) ou le talazoparib (100 nM). Moyennes +/- écart-type de 3 expériences indépendantes. * $P < 0,05$

Traitement	BxPC-3	AsPc-1	PANC-1	MIA PaCa-2
DMSO	1 %	12 %	12 %	1 %
Olaparib	2 %	46 %	32 %	15 %
Talazoparib	15 %	76 %	61 %	36 %
6 Gy	31 %	48 %	37%	18 %
6 Gy + olaparib	33 %	75 %	63 %	37 %
6 Gy + talazoparib	45 %	93 %	76 %	58 %

Tableau 7 : Pourcentage de cellules positives pour 53BP1 (> 10 foci/cellule) sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 24h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 µM) ou le talazoparib (100 nM).

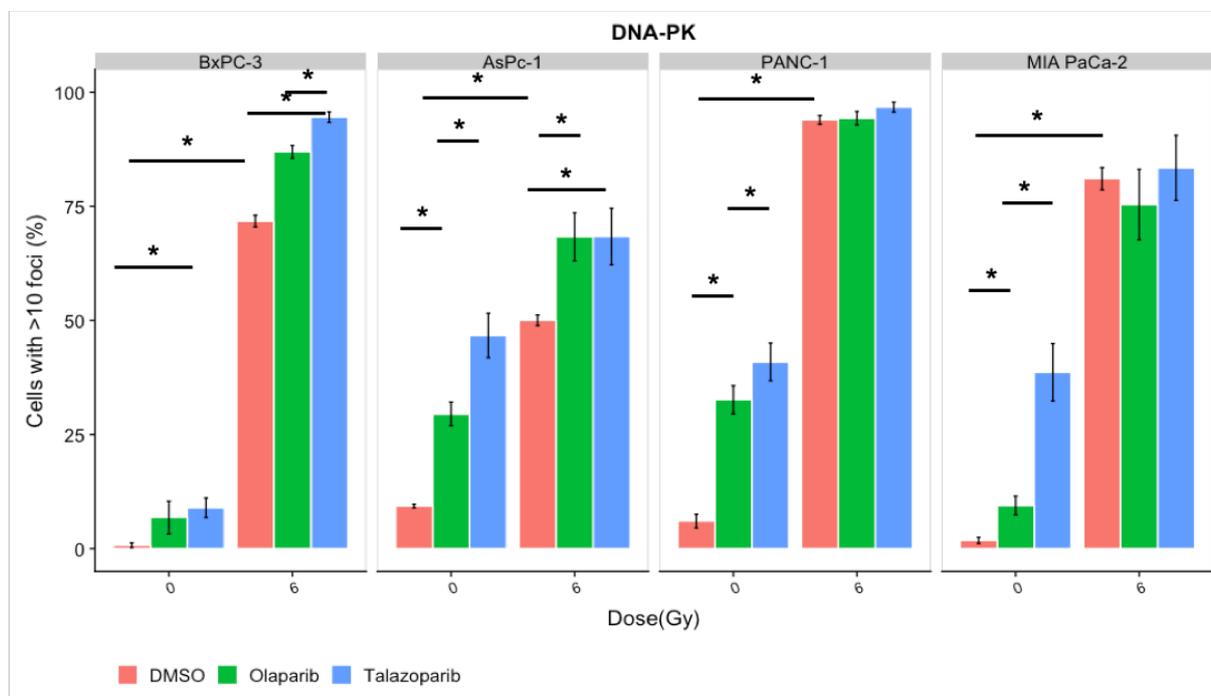


Figure 28 : Pourcentage de cellules avec plus de 10 foci DNA-PKcs sur les lignées cellulaires BxPC-3, AsPC-1, PANC-1 et MIA PaCa-2, 3h après irradiation et/ou traitement par l'olaparib (1 µM) ou le talazoparib (100 nM). Moyennes +/- écart-type de 3 expériences indépendantes. *P<0,05

Discussion :

En monothérapie, ni l'olaparib, ni le talazoparib ne diminuent la survie clonogénique des quatre lignées cellulaires pancréatiques. Ceci est cohérent avec le fait que les lignées de PDAC étudiées sont BRCA1/2 sauvages. Dans cette étude, des concentrations non cytotoxiques

d'olaparib ou de talazoparib augmentent considérablement l'efficacité des rayonnements ionisants sur quatre lignées de cellules de PDAC et l'effet de la radiosensibilisation dépend de la lignée cellulaire. De plus, nos résultats ont indiqué que cette radiosensibilisation est plus élevée avec le talazoparib, comparativement à l'olaparib. En effet, l'olaparib ne radiosensibilise pas la lignée BxPC-3, alors qu'elle est radiosensibilisée par le talazoparib. Comme les deux inhibiteurs de PARP ont été utilisés à des concentrations non cytotoxiques et que la PARylation est significativement réduite, l'augmentation de l'effet de radiosensibilisation observée pour le talazoparib serait principalement due à l'effet de piégeage de la PARP-1. Ce piégeage de la PARP est connu pour être plus élevé avec le talazoparib [127,144]. En effet, l'effet de la radiosensibilisation des PARPi n'est pas seulement dû à l'inhibition de l'activité catalytique de la PARP-1, mais également à l'effet de piégeage de celle-ci qui est confinée au site des dommages à l'ADN, bloquant sa réparation [127]. Le talazoparib est capable de piéger la PARP avec un facteur 10 000 fois plus élevé que les autres PARPi [144]. De plus, l'effet ne semble pas dépendre du type de cellules tumorales. En effet, Laird *et al.* ont évalué l'effet radiosensibilisant du talazoparib (200 nM) par rapport au veliparib, dans le cancer du poumon à petites cellules et ont montré que le piégeage de PARP contribue à la radiosensibilisation [145]. Le veliparib est connu pour avoir l'effet de piégeage de PARP le plus faible de tous les PARPi. Comme l'olaparib a récemment montré une amélioration de la survie sans progression chez les patients atteints de PDAC métastatiques et porteurs de mutations de BRCA1/2, nous avons voulu évaluer la radiosensibilisation des lignées PDAC par le talazoparib en la comparant à l'olaparib [117].

Une autre hypothèse pouvant expliquer le meilleur effet de radiosensibilisation du talazoparib serait que le talazoparib ait une activité anti-PARP-3 supérieure à celle de l'olaparib, expliquant ainsi son activité plus élevée [146]. En effet, des études récentes ont souligné le rôle émergent de la PARP-3 dans l'équilibre entre les voies de réparation concurrentes. Beck *et al.* ont montré que la PARP-3 empêche la résection terminale extensive, afin de favoriser la réparation par la voie NHEJ classique, en facilitant le recrutement de Ku80 sur les sites de lésions de l'ADN [111]. Par conséquent, l'inhibition de la PARP-3 diminue la voie de réparation c-NHEJ. Dans notre étude, nous avons montré que la radiosensibilisation par le talazoparib induit principalement la réparation par la voie NHEJ, ce qui ne permet pas de confirmer l'hypothèse de l'inhibition de la PARP-3. Les prochains travaux devront donc s'intéresser à confirmer le rôle du piégeage de la PARP comme principal mécanisme de radiosensibilisation dans les lignées de PDAC mais aussi de comprendre si l'inhibition spécifique de PARP-3 contribue à la radiosensibilisation.

Une radiosensibilisation dépendante des lignées cellulaires de PDAC a été observée avec le talazoparib et l'olaparib. Cela souligne l'intérêt de biomarqueurs de réponse à l'association irradiation et talazoparib. En effet, les complexes PARP-ADN sont réparés par plusieurs voies de réparation, en particulier la voie de l'anémie de Fanconi [1]. D'autres gènes tels que FEN1, la polymérase β ou PCNA sont prédictifs de la réponse aux inhibiteurs de PARP ayant une forte capacité à piéger la PARP-1 sur l'ADN [1].

L'association radiothérapie et thérapie ciblée peut aussi conduire à des toxicités plus importantes. En effet, la toxicité des PARPi diffère d'un inhibiteur à l'autre et le talazoparib est 73 fois plus puissant pour engendrer la mort des cellules progénitrices hématopoïétiques que le rucaparib, un autre PARPi [147]. Ces résultats suggèrent que l'activité de piégeage de la PARP-1 est l'un des principaux facteurs de toxicité au niveau de la moelle osseuse [147,148]. Il est donc nécessaire de prendre cela en compte dans le choix thérapeutique. Dans notre étude, les concentrations d'olaparib et talazoparib choisies ne sont pas cytotoxiques mais radiosensibilisent les lignées cellulaires. Toutefois, nous n'avons pas évalué l'effet de ces inhibiteurs sur des cellules non cancéreuses.

Les inhibiteurs de la PARP sont de plus en plus utilisés pour le traitement des PDAC. Dans une étude récente de phase I/II, Tuli *et al.* ont évalué la chimioradiothérapie à base de gemcitabine associée à un PARPi, le veliparib, chez des patients présentant des PDAC localement avancés ou *border line*. La médiane de survie globale et de survie sans progression était respectivement de 14,6 et 9,8 mois, sensiblement proches, mais inférieures aux résultats des essais randomisés de chimioradiothérapie récents [62,67], suggérant une moindre efficacité du veliparib comparativement aux agents de chimiothérapie. Le veliparib est un inhibiteur dont la capacité à piéger la PARP-1 sur l'ADN est limitée, pouvant expliquer ainsi un faible bénéfice de cette radiosensibilisation [149]. Les futures études de radiosensibilisation devraient s'intéresser à associer des inhibiteurs de PARP avec une activité de piégeage plus importante afin de montrer un bénéfice en ce qui concerne la survie sans progression et de survie globale.

En résumé, les inhibiteurs de la PARP ont une grande capacité à radiosensibiliser *in vitro* un grand nombre de lignées cellulaires de PDAC, en particulier le talazoparib, qui exerce la plus grande activité de piégeage de la PARP à l'heure actuelle. Le traitement des PDAC localement avancés est une problématique majeure pour les oncologues-radiothérapeutes. Notre étude est la première étape dans le développement d'une nouvelle stratégie pour ce sous-groupe de patients. Dans la mesure où la radiosensibilisation diffère d'une lignée cellulaire à l'autre, cet effet de radiosensibilisation peut dépendre du fond génétique des PDAC. Par conséquent, la

recherche de biomarqueurs de réponse devrait être généralisée dans les études futures pour permettre la sélection des patients. De plus, afin de réduire les effets secondaires de l'irradiation, l'administration de la radiothérapie avec les techniques de stéréotaxie ou en utilisant la protonthérapie devrait être développée. Cette approche pourrait se traduire par une amélioration du contrôle local, une meilleure survie sans maladie et une meilleure qualité de vie.

PARTIE VIII

Conclusions

& perspectives

PARTIE VIII : Conclusions générales et perspectives

L'adénocarcinome pancréatique est un cancer dont à la fois l'incidence et la mortalité ne cessent de croître en France et dans le monde [2,150]. Il constitue de ce fait un enjeu majeur de santé publique. Son diagnostic est souvent très tardif du fait de l'absence de symptomatologie clinique spécifique. Ceci explique que seulement 20% des patients soient diagnostiqués au stade localisé et peuvent ainsi bénéficier d'un traitement chirurgical à visée curative et que 50% des patients soient diagnostiqués au stade métastatique. Le cadre nosologique dans lequel s'inscrit ce travail de thèse est celui des adénocarcinomes pancréatiques localement avancés, qui représentent environ 30% des patients au moment du diagnostic. Pour ces patients, la CRT est une option thérapeutique qui a démontré sa supériorité, comparativement à la RT exclusive ou la CT exclusive [58]. Cependant, le bénéfice en ce qui concerne le contrôle local ne s'inscrit pas toujours en bénéfice en ce qui concerne la survie globale, et ceci du fait d'une augmentation de la toxicité liée aux traitements, pouvant conduire à diminuer les doses de CT et de RT [68]. Une autre des problématiques concerne l'apparition de métastases à distance pouvant aussi impacter la survie globale de ces patients. Les évolutions technologiques au cours de ces dernières décennies ont permis d'améliorer la définition des volumes d'irradiation avec l'acquisition tomographique, de mieux cibler ces volumes en cours de traitement avec la RT guidée par l'image et enfin d'avoir des index de conformation améliorés avec la RCM [151]. Par ailleurs, les techniques d'irradiation utilisant des particules chargées telles que les protons ou encore les ions carbonés ont permis d'améliorer la balistique et d'augmenter l'effet biologique comparativement aux photons [78]. La finalité de ces développements technologiques consiste à augmenter le contrôle tumoral tout en diminuant les effets secondaires au niveau des organes à risque. Cependant, il est important de noter que les récurrences locales restent fréquentes, nécessitant ainsi d'améliorer le ciblage biologique en parallèle du ciblage physique en RT. Parmi les voies de ciblage, l'inhibition des voies de réparation des dommages à l'ADN permet d'augmenter les effets de la RT et des CT [100]. Les PARPi ont montré leur potentiel à induire la mort cellulaire des cellules présentant des anomalies dans la voie de recombinaison homologue et ceci en monothérapie [114]. Ces constatations ont conduit à des essais ayant permis d'obtenir l'AMM dans les cancers de l'ovaire avec mutation BRCA1/2 et répondeurs aux sels de platine [114,114]. Un autre essai a récemment montré le bénéfice en survie sans progression dans les PDAC métastatiques avec mutation BRCA1/2 [117].

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse a consisté à évaluer l'efficacité des inhibiteurs de PARP dans des modèles précliniques de carcinomes pancréatiques.

Les résultats de l'étude *in vitro* réalisée sur 4 lignées cellulaires pancréatiques ont mis en évidence des profils de radiosensibilité intrinsèque et de chimiosensibilité à la gemcitabine différents. Par ailleurs, le prétraitement par la gemcitabine et/ou l'olaparib modifie la radiosensibilité des lignées tumorales avec des degrés de radiosensibilisation différents en fonction de la lignée cellulaire. La radiosensibilisation par l'olaparib est liée à l'accumulation de CDB non réparées à 24 heures, induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. *A contrario*, la gemcitabine induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S. L'évaluation des morts cellulaires n'a pas mis en évidence d'apoptose à 24 heures, quel que soit le traitement pour les 4 lignées cellulaires déjà évaluées. Cependant nous avons montré que l'irradiation à forte dose (10 Gy) induisait de l'autophagie sur les 4 lignées cellulaires pancréatiques. En parallèle, l'olaparib et la gemcitabine à dose non cytotoxique ne modifient pas l'induction d'autophagie. Les résultats de cette étude *in vivo* sur la lignée MIA PaCa-2 ont tout d'abord mis en évidence une efficacité biologique supérieure des protons, comparée aux photons et ceci avec une différence bien plus importante qu'attendue. De plus, même si la lignée MIA PaCa-2 ne présente pas d'anomalies de BRCA1/2, l'olaparib a permis sa radiosensibilisation, avec la protonthérapie. Ce niveau de radiosensibilisation était sensiblement identique avec la gemcitabine, le principal agent radiosensibilisant utilisé en clinique, mais connue pour être moins bien toléré et plus toxique que l'olaparib. Enfin, la triple l'association irradiation, olaparib et gemcitabine a montré un ralentissement de la croissance tumorale, particulièrement avec la protonthérapie.

Les protons sont un type de rayonnement qui possède des caractéristiques particulières qui font que la dose est délivrée sous forme d'un pic dit de Bragg. Au-delà de celui-ci, la dose délivrée est nulle, les organes à proximité ne sont donc pas irradiés et le risque de complications est quasiment négligeable [76,152]. Plusieurs études dosimétriques se sont intéressées à la problématique des cancers pancréatiques et ont montré d'une part pouvoir significativement diminuer la dose aux OAR digestifs et aux reins, et d'autre part d'augmenter la dose jusqu'à 72 Gy en proton [78]. Ceci est d'autant plus intéressant dans la problématique des PDAC localement avancés ou borderline où l'irradiation par protonthérapie pourrait permettre d'augmenter le taux de réponse pathologique complète, ainsi que le taux de résection en marges saines, qui sont des facteurs pronostiques reconnus de survie globale [153].

L'analyse transcriptomique 24 heures après les traitements a présenté un large nombre de gènes différentiellement exprimés entre les différentes combinaisons de traitement. L'enrichissement a fait ressortir des gènes impliqués particulièrement dans la régulation des microvésicules. Nous avons aussi montré un grand nombre d'ARN long non codants qui étaient différentiellement exprimés entre les différentes modalités de traitement, soulignant le rôle des régulations post-transcriptionnelles dans la réponse des PDAC à l'irradiation, la gemcitabine et l'olaparib. Une signature transcriptomique liée à la réponse à la gemcitabine a pu être identifiée. Enfin nous avons comparé 2 inhibiteurs de PARP : l'olaparib et le talazoparib. Une plus grande radiosensibilisation avec le talazoparib comparativement avec l'olaparib a été démontrée et ceci pour les 4 lignées cellulaires pancréatiques BRCA sauvage. Nous avons montré précédemment que la lignée BxPC-3 n'était pas radiosensibilisée par l'olaparib et nous avons pu conforter les résultats. Cependant, cette radiosensibilisation est plus importante avec le talazoparib. Murai et al. avait pu mettre en évidence que l'activité de piégeage de la PARP sur l'ADN pouvait aussi être à l'origine de sa cytotoxicité et ceci indépendamment de son activité enzymatique. Nous avons donc exploré cette hypothèse et nous n'avons pu montrer que le talazoparib augmentait le piégeage de la PARP sur la chromatine comparativement à l'olaparib.

L'une des limites de ce travail réside dans le fait qu'il s'est intéressé exclusivement à la radiosensibilisation et la réponse des cellules de cancer pancréatique sans évaluer cette association sur le microenvironnement tumoral. En effet, il est connu que les cellules cancéreuses communiquent avec les autres composantes cellulaires du microenvironnement. Ainsi, il serait intéressant d'étudier la réponse du microenvironnement tumoral et de la réponse immunitaire avec l'association PARPi et radiothérapie [154], ceci dans le but de contourner l'une des problématiques majeures dans les PDAC : l'absence de réponse aux inhibiteurs de checkpoint immunitaire.

Enfin, la recherche de biomarqueurs de réponse à l'association radiothérapie et PARPi fait partie des axes de recherche actuellement au laboratoire. Pour cela, nous nous intéressons particulièrement aux variants structuraux et à leur complexité afin de prédire la réponse à la radiothérapie et aux PARPi. En effet, lorsqu'il s'agit de rechercher des marqueurs/signatures prédictifs de réponses à la radiothérapie *in vitro*, la plupart des publications ne se sont intéressées qu'à la variation de gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN. Cependant, les mutations dans les gènes codants pour des protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN n'ont pas obligatoirement pour conséquences des pertes ou gain de fonction de ces protéines. Ainsi, une nouvelle approche serait d'identifier les conséquences

fonctionnelles de dérégulation de ces voies de réparation sous forme de « cicatrices » (genomic scars) sur l'ADN [155]. Récemment, plusieurs études ont montré que la mesure de trois marqueurs d'instabilité génomique, la perte d'hétérozygotie (*Loss of heterozygosity*), le déséquilibre télomérique (*Telomeric allelic imbalance*) et les réarrangements génomiques de plus de 10 Mb (*Large Scale Transition*) étaient des marqueurs de déficiences en recombinaison homologue [156]. De plus, la présence de cette signature serait corrélée à la réponse à des traitements ciblant l'ADN tels que les sels de platines mais aussi à de inhibiteurs de PARP et ceci indépendamment du statut BRCA [157]. Pour nous aider à répondre à cette problématique, nous mettons actuellement en place une méthode de séquençage *long read* basée sur la technologie Oxford Nanopore Technologies®, avec laquelle les séquences obtenues se caractérisent par une plus grande longueur (plusieurs centaines de kilobases) comparativement aux méthodes de séquençage *short read* qui est actuellement plus répandues. Du fait de la longueur des séquences, l'assemblage des reads est facilité, permettant de diminuer la profondeur de séquençage tout en restant sensible dans la détection des variants structuraux. Une étude récente a montré la faisabilité du séquençage en une journée afin de mettre en évidence des variants structuraux dans les glioblastomes [158]. L'identification de ces biomarqueurs de réponse permettrait d'individualiser les traitements.

Au total, ce travail présente une première étape avant un essai de phase I évaluant l'association d'un PARPi avec une capacité de piégeage de la PARP plus importante et la RT dans les PDAC localement avancés.

Références

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- [2] Drouillard A, Manfredi S, Lepage C, Bouvier A-M. Épidémiologie du cancer du pancréas. *Bull Cancer (Paris)* 2018;105:63–9. doi:10.1016/j.bulcan.2017.11.004.
- [3] L’Institut publie L’essentiel des faits et chiffres des cancers en France (édition 2019) - Actualités n.d. <https://www.e-cancer.fr/Actualites-et-evenements/Actualites/L-Institut-publie-L-essentiel-des-faits-et-chiffres-des-cancers-en-France-edition-2019> (accessed August 15, 2019).
- [4] Binder-Foucard F, Bossard N, Delafosse P, Belot A, Woronoff A-S, Remontet L. Cancer incidence and mortality in France over the 1980–2012 period: Solid tumors. *Rev D’Épidémiologie Santé Publique* 2014;62:95–108. doi:10.1016/j.respe.2013.11.073.
- [5] Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol* 2019;10:10–27. doi:10.14740/wjon1166.
- [6] Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika D, Wang X-S, et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet* 2015;385:977–1010. doi:10.1016/S0140-6736(14)62038-9.
- [7] SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. SEER n.d. https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/index.html (accessed August 15, 2019).
- [8] Survival Rates for Pancreatic Cancer n.d. <https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html> (accessed July 29, 2019).
- [9] Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol* 2015;44:186–98. doi:10.1093/ije/dyu240.
- [10] Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol* 2012;23:1880–8. doi:10.1093/annonc/mdr541.
- [11] Duell EJ, Lucenteforte E, Olson SH, Bracci PM, Li D, Risch HA, et al. Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol* 2012;23:2964–70. doi:10.1093/annonc/mds140.
- [12] Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, et al. Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol* 2012;23:374–82. doi:10.1093/annonc/mdr120.
- [13] Larsson SC, Wolk A. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *Br J Cancer* 2012;106:603–7. doi:10.1038/bjc.2011.585.
- [14] Behrens G, Jochem C, Schmid D, Keimling M, Ricci C, Leitzmann MF. Physical activity and risk of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 2015;30:279–98. doi:10.1007/s10654-015-0014-9.
- [15] Canto MI, Harinck F, Hruban RH, Offerhaus GJ, Poley J-W, Kamel I, et al. International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut* 2013;62:339–47. doi:10.1136/gutjnl-2012-303108.

- [16] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988;53:549–54. doi:10.1016/0092-8674(88)90571-5.
- [17] Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia N Y N* 2005;7:17–23. doi:10.1593/neo.04445.
- [18] Fokas E, O'Neill E, Gordon-Weeks A, Mukherjee S, McKenna WG, Muschel RJ. Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 2015;1855:61–82. doi:10.1016/j.bbcan.2014.12.001.
- [19] Takai E, Yachida S. Genomic alterations in pancreatic cancer and their relevance to therapy. *World J Gastrointest Oncol* 2015;7:250–8. doi:10.4251/wjgo.v7.i10.250.
- [20] Waddell N, Pajic M, Patch A-M, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015;518:495–501. doi:10.1038/nature14169.
- [21] Shugang X, Hongfa Y, Jianpeng L, Xu Z, Jingqi F, Xiangxiang L, et al. Prognostic Value of SMAD4 in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Transl Oncol* 2016;9:1–7. doi:10.1016/j.tranon.2015.11.007.
- [22] Wang J-D, Jin K, Chen X-Y, Lv J-Q, Ji K-W. Clinicopathological significance of SMAD4 loss in pancreatic ductal adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8:16704–11. doi:10.18632/oncotarget.14335.
- [23] Lüttges J, Galehdari H, Bröcker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D, Klöppel G, et al. Allelic Loss Is Often the First Hit in the Biallelic Inactivation of the p53 and DPC4 Genes During Pancreatic Carcinogenesis. *Am J Pathol* 2001;158:1677–83.
- [24] Raphael BJ, Hruban RH, Aguirre AJ, Moffitt RA, Yeh JJ, Stewart C, et al. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2017;32:185–203.e13. doi:10.1016/j.ccell.2017.07.007.
- [25] Caberlotto L, Lauria M. Systems biology meets -omic technologies: novel approaches to biomarker discovery and companion diagnostic development. *Expert Rev Mol Diagn* 2015;15:255–65. doi:10.1586/14737159.2015.975214.
- [26] Witkiewicz AK, McMillan EA, Balaji U, Baek G, Lin W-C, Mansour J, et al. Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat Commun* 2015;6:6744. doi:10.1038/ncomms7744.
- [27] Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M, Gingras M-C, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 2016;531:47–52. doi:10.1038/nature16965.
- [28] Raffenne J, Cros J. La caractérisation moléculaire définit plusieurs sous-types d'adénocarcinome canalaire du pancréas. *Bull Cancer (Paris)* 2018;105:55–62. doi:10.1016/j.bulcan.2017.11.010.
- [29] Connor AA, Denroche RE, Jang GH, Timms L, Kalimuthu SN, Selander I, et al. Association of Distinct Mutational Signatures With Correlates of Increased Immune Activity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncol* 2017;3:774–83. doi:10.1001/jamaoncol.2016.3916.

- [30] Janky R, Binda MM, Allemeersch J, Van den Broeck A, Govaere O, Swinnen JV, et al. Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 2016;16:632. doi:10.1186/s12885-016-2540-6.
- [31] Moffitt RA, Marayati R, Flate EL, Volmar KE, Loeza SGH, Hoadley KA, et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* 2015;47:1168–78. doi:10.1038/ng.3398.
- [32] Collisson EA, Sadanandam A, Olson P, Gibb WJ, Truitt M, Gu S, et al. Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* 2011;17:500–3. doi:10.1038/nm.2344.
- [33] Linsen SEV, de Wit E, Janssens G, Heater S, Chapman L, Parkin RK, et al. Limitations and possibilities of small RNA digital gene expression profiling. *Nat Methods* 2009;6:474–6. doi:10.1038/nmeth0709-474.
- [34] Neuzillet C, Sauvanet A, Hammel P. Prognostic factors for resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Visc Surg* 2011;148:e232–43. doi:10.1016/j.jviscsurg.2011.07.007.
- [35] Huang Z, Liu F. Diagnostic value of serum carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer: a meta-analysis. *Tumor Biol* 2014;35:7459–65. doi:10.1007/s13277-014-1995-9.
- [36] Bipat S, Phoa SSKS, van Delden OM, Bossuyt PMM, Gouma DJ, Laméris JS, et al. Ultrasonography, Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging for Diagnosis and Determining Resectability of Pancreatic Adenocarcinoma: A Meta-Analysis. *J Comput Assist Tomogr* 2005;29:438. doi:10.1097/01.rct.0000164513.23407.b3.
- [37] Tamm EP, Balachandran A, Bhosale PR, Katz MH, Fleming JB, Lee JH, et al. Imaging of Pancreatic Adenocarcinoma: Update on Staging/Resectability. *Radiol Clin North Am* 2012;50:407–28. doi:10.1016/j.rcl.2012.03.008.
- [38] Al-Hawary MM, Francis IR, Chari ST, Fishman EK, Hough DM, Lu DS, et al. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Radiology Reporting Template: Consensus Statement of the Society of Abdominal Radiology and the American Pancreatic Association. *Radiology* 2014;270:248–60. doi:10.1148/radiol.13131184.
- [39] Neuzillet C, Gaujoux S, Williet N, Bachet J-B, Bauguion L, Colson Durand L, et al. Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Dig Liver Dis* 2018;50:1257–71. doi:10.1016/j.dld.2018.08.008.
- [40] De Angelis C, Brizzi RF, Pellicano R. Endoscopic ultrasonography for pancreatic cancer: current and future perspectives. *J Gastrointest Oncol* 2013;4:220–30. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2013.002.
- [41] Okasha HH, Naga MI, Esmat S, Naguib M, Hassanein M, Hassani M, et al. Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration versus Percutaneous Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration in Diagnosis of Focal Pancreatic Masses. *Endosc Ultrasound* 2013;2:190–3. doi:10.4103/2303-9027.121239.
- [42] Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002;2:897–909. doi:10.1038/nrc949.
- [43] Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, et al. Recent Progress in Pancreatic Cancer. *CA Cancer J Clin* 2013;63:318–48. doi:10.3322/caac.21190.
- [44] Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, DePinho RA. Genetics and

biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006;20:1218–49. doi:10.1101/gad.1415606.

[45] Kamarajah SK, Burns WR, Frankel TL, Cho CS, Nathan H. Validation of the American Joint Commission on Cancer (AJCC) 8th Edition Staging System for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma: A Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Analysis. *Ann Surg Oncol* 2017;24:2023–30. doi:10.1245/s10434-017-5810-x.

[46] Farges O, Bendersky N, Truant S, Delperro JR, Pruvot FR, Sauvanet A. The Theory and Practice of Pancreatic Surgery in France. *Ann Surg* 2017;266:797–804. doi:10.1097/SLA.0000000000002399.

[47] Hishinuma S, Ogata Y, Tomikawa M, Ozawa I, Hirabayashi K, Igarashi S. Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic cancer, based on autopsy findings. *J Gastrointest Surg* 2006;10:511–8. doi:10.1016/j.gassur.2005.09.016.

[48] Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2007;297:267–77. doi:10.1001/jama.297.3.267.

[49] Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, et al. Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine and Long-term Outcomes Among Patients With Resected Pancreatic Cancer: The CONKO-001 Randomized Trial. *JAMA* 2013;310:1473–81. doi:10.1001/jama.2013.279201.

[50] Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, et al. Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2010;304:1073–81. doi:10.1001/jama.2010.1275.

[51] Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet* 2017;389:1011–24. doi:10.1016/S0140-6736(16)32409-6.

[52] Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 1987;59:2006–10.

[53] Klinkenbijl JH, Jeekel J, Sahnoud T, Pel R van, Couvreur ML, Veenhof CH, et al. Adjuvant Radiotherapy and 5-fluorouracil After Curative Resection of Cancer of the Pancreas and Periapillary Region: Phase Iii Trial of the Eortc Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. *Ann Surg* 1999;230.

[54] Regine WF, Winter KA, Abrams RA, Safran H, Hoffman JP, Konski A, et al. Fluorouracil vs Gemcitabine Chemotherapy Before and After Fluorouracil-Based Chemoradiation Following Resection of Pancreatic Adenocarcinoma: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2008;299:1019–26. doi:10.1001/jama.299.9.1019.

[55] Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, et al. A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2004;350:1200–10. doi:10.1056/NEJMoa032295.

[56] Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul J-L, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2018;379:2395–406. doi:10.1056/NEJMoa1809775.

- [57] Conroy T, Ducreux M. Adjuvant treatment of pancreatic cancer. *Curr Opin Oncol* 2019;31:346–53. doi:10.1097/CCO.0000000000000546.
- [58] Huguet F, Mukherjee S, Javle M. Locally Advanced Pancreatic Cancer: The Role of Definitive Chemoradiotherapy. *Clin Oncol* 2014;26:560–8. doi:10.1016/j.clon.2014.06.002.
- [59] Moertel CG, Childs DS, Reitemeier RJ, Colby MY, Holbrook MA. Combined 5-fluorouracil and supervoltage radiation therapy of locally unresectable gastrointestinal cancer. *Lancet Lond Engl* 1969;2:865–7.
- [60] Moertel CG, Frytak S, Hahn RG, O’Connell MJ, Reitemeier RJ, Rubin J, et al. Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads + 5-fluorouracil), and high dose radiation + 5-fluorouracil: The Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 1981;48:1705–10.
- [61] Cohen SJ, Dobelbower R, Lipsitz S, Catalano PJ, Sischy B, Smith TJ, et al. A randomized phase III study of radiotherapy alone or with 5-fluorouracil and mitomycin-C in patients with locally advanced adenocarcinoma of the pancreas: Eastern Cooperative Oncology Group study E8282. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:1345–50. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.12.074.
- [62] Mukherjee S, Hurt CN, Bridgewater J, Falk S, Cummins S, Wasan H, et al. Gemcitabine-based or capecitabine-based chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer (SCALOP): a multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:317–326.
- [63] Chauffert B, Mornex F, Bonnetain F, Rougier P, Mariette C, Bouché O, et al. Phase III trial comparing intensive induction chemoradiotherapy (60 Gy, infusional 5-FU and intermittent cisplatin) followed by maintenance gemcitabine with gemcitabine alone for locally advanced unresectable pancreatic cancer. Definitive results of the 2000-01 FFCD/SFRO study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2008;19:1592–9. doi:10.1093/annonc/mdn281.
- [64] Klaassen DJ, MacIntyre JM, Catton GE, Engstrom PF, Moertel CG. Treatment of locally unresectable cancer of the stomach and pancreas: a randomized comparison of 5-fluorouracil alone with radiation plus concurrent and maintenance 5-fluorouracil—an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 1985;3:373–8. doi:10.1200/JCO.1985.3.3.373.
- [65] Treatment of Locally Unresectable Carcinoma of the Pancreas: Comparison of Combined-Modality Therapy (Chemotherapy Plus Radiotherapy) to Chemotherapy Alone1. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1988;80:751–5. doi:10.1093/jnci/80.10.751.
- [66] Chang JS, Chiu Y-F, Yu J-C, Chen L-T, Ch’ang H-J. The Role of Consolidation Chemoradiotherapy in Locally Advanced Pancreatic Cancer Receiving Chemotherapy: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc* 2018;50:562–74. doi:10.4143/crt.2017.105.
- [67] Hammel P, Huguet F, van Laethem J-L, Goldstein D, Glimelius B, Artru P, et al. Effect of Chemoradiotherapy vs Chemotherapy on Survival in Patients With Locally Advanced Pancreatic Cancer Controlled After 4 Months of Gemcitabine With or Without Erlotinib: The LAP07 Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2016;315:1844–53. doi:10.1001/jama.2016.4324.
- [68] Zhu C-P, Shi J, Chen Y-X, Xie W-F, Lin Y. Gemcitabine in the chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: A meta-analysis. *Radiother Oncol* 2011;99:108–13. doi:10.1016/j.radonc.2011.04.001.
- [69] Yang Y-F, Cao X-H, Bao C-E, Wan X. Concurrent radiotherapy with oral fluoropyrimidine versus gemcitabine in locally advanced pancreatic cancer: a systematic

- review and meta-analysis. *OncoTargets Ther* 2015;8:3315–22. doi:10.2147/OTT.S91292.
- [70] Marthey L, Sa-Cunha A, Blanc JF, Gauthier M, Cueff A, Francois E, et al. FOLFIRINOX for locally advanced pancreatic adenocarcinoma: results of an AGEO multicenter prospective observational cohort. *Ann Surg Oncol* 2015;22:295–301. doi:10.1245/s10434-014-3898-9.
- [71] Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011;364:1817–25. doi:10.1056/NEJMoa1011923.
- [72] Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N Engl J Med* 2013;369:1691–703. doi:10.1056/NEJMoa1304369.
- [73] Petrelli F, Comito T, Ghidini A, Torri V, Scorsetti M, Barni S. Stereotactic Body Radiation Therapy for Locally Advanced Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis of 19 Trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2017;97:313–22. doi:10.1016/j.ijrobp.2016.10.030.
- [74] Doyen J, Bondiau P-Y, Bénéziéry K, Chand M-È, Thariat J, Leysalle A, et al. [Current situation and perspectives of proton therapy]. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol* 2015;19:211–9; quiz 231–2, 235. doi:10.1016/j.canrad.2014.12.010.
- [75] Paganetti H. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. Variations as a function of biological endpoint, dose, and linear energy transfer. *Phys Med Biol* 2014;59:R419–R472. doi:10.1088/0031-9155/59/22/R419.
- [76] Hsiung-Stripp DC, McDonough J, Masters HM, Levin WP, Hahn SM, Jones HA, et al. Comparative treatment planning between proton and X-ray therapy in pancreatic cancer. *Med Dosim Off J Am Assoc Med Dosim* 2001;26:255–9.
- [77] Kozak KR, Kachnic LA, Adams J, Crowley EM, Alexander BM, Mamon HJ, et al. Dosimetric feasibility of hypofractionated proton radiotherapy for neoadjuvant pancreatic cancer treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:1557–66. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.02.056.
- [78] Bouchard M, Amos RA, Briere TM, Beddar S, Crane CH. Dose escalation with proton or photon radiation treatment for pancreatic cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 2009;92:238–43. doi:10.1016/j.radonc.2009.04.015.
- [79] Lee RY, Nichols RC, Huh SN, Ho MW, Li Z, Zaiden R, et al. Proton therapy may allow for comprehensive elective nodal coverage for patients receiving neoadjuvant radiotherapy for localized pancreatic head cancers. *J Gastrointest Oncol* 2013;4:374–9. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2013.043.
- [80] Hong TS, Ryan DP, Blaszkowsky LS, Mamon HJ, Kwak EL, Mino-Kenudson M, et al. Phase I study of preoperative short-course chemoradiation with proton beam therapy and capecitabine for resectable pancreatic ductal adenocarcinoma of the head. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;79:151–7. doi:10.1016/j.ijrobp.2009.10.061.
- [81] Nichols RC, George TJ, Zaiden RA, Awad ZT, Asbun HJ, Huh S, et al. Proton therapy with concomitant capecitabine for pancreatic and ampullary cancers is associated with a low incidence of gastrointestinal toxicity. *Acta Oncol Stockh Swed* 2013;52:498–505. doi:10.3109/0284186X.2012.762997.
- [82] Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients

with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403–13. doi:10.1200/JCO.1997.15.6.2403.

[83] Reni M, Cordio S, Milandri C, Passoni P, Bonetto E, Oliani C, et al. Gemcitabine versus cisplatin, epirubicin, fluorouracil, and gemcitabine in advanced pancreatic cancer: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2005;6:369–76. doi:10.1016/S1470-2045(05)70175-3.

[84] Van Cutsem E, Vervenne WL, Bennouna J, Humblet Y, Gill S, Van Laethem J-L, et al. Phase III Trial of Bevacizumab in Combination With Gemcitabine and Erlotinib in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2231–7. doi:10.1200/JCO.2008.20.0238.

[85] Oettle H, Riess H, Stieler JM, Heil G, Schwaner I, Seraphin J, et al. Second-Line Oxaliplatin, Folinic Acid, and Fluorouracil Versus Folinic Acid and Fluorouracil Alone for Gemcitabine-Refractory Pancreatic Cancer: Outcomes From the CONKO-003 Trial. *J Clin Oncol* 2014;32:2423–9. doi:10.1200/JCO.2013.53.6995.

[86] Gill S, Ko Y-J, Cripps C, Beaudoin A, Dhesy-Thind S, Zulfiqar M, et al. PANCREOX: A Randomized Phase III Study of Fluorouracil/Leucovorin With or Without Oxaliplatin for Second-Line Advanced Pancreatic Cancer in Patients Who Have Received Gemcitabine-Based Chemotherapy. *J Clin Oncol* 2016;34:3914–20. doi:10.1200/JCO.2016.68.5776.

[87] Wang-Gillam A, Li C-P, Bodoky G, Dean A, Shan Y-S, Jameson G, et al. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* 2016;387:545–57. doi:10.1016/S0140-6736(15)00986-1.

[88] Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J Radiat Res Appl Sci* 2015;8:247–54. doi:10.1016/j.jrras.2015.03.003.

[89] Dirk_PhD_main_final_4_public.pdf n.d. https://tuprints.ulb-tu-darmstadt.de/3858/7/Dirk_PhD_main_final_4_public.pdf (accessed August 28, 2019).

[90] Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer* 2015;16:20–33. doi:10.1038/nrc.2015.2.

[91] Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366–74. doi:10.1038/35077232.

[92] Peng G, Lin S-Y. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World J Clin Oncol* 2011;2:73–9. doi:10.5306/wjco.v2.i2.73.

[93] Jasin M, Rothstein R. Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5. doi:10.1101/cshperspect.a012740.

[94] Li X, Heyer W-D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* 2008;18:99–113. doi:10.1038/cr.2008.1.

[95] Boehler C, Gauthier L, Yelamos J, Noll A, Schreiber V, Dantzer F. Phenotypic characterization of Parp-1 and Parp-2 deficient mice and cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2011;780:313–36. doi:10.1007/978-1-61779-270-0_19.

[96] Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 1998;17:5497–508. doi:10.1093/emboj/17.18.5497.

[97] Guo X, Bai Y, Zhao M, Zhou M, Shen Q, Yun C-H, et al. Acetylation of 53BP1 dictates

the DNA double strand break repair pathway. *Nucleic Acids Res* 2018;46:689–703. doi:10.1093/nar/gkx1208.

[98] Davis AJ, Chen DJ. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res* 2013;2:130–43. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02.

[99] Dueva R, Iliakis G. Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl Cancer Res* 2013;2:163-177–177. doi:10.21037/1152.

[100] Targeting the dna damage response for anti-cancer therapy. New York, NY: Springer Science+Business Media; 2018.

[101] Amrutkar M, Gladhaug IP. Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers* 2017;9. doi:10.3390/cancers9110157.

[102] Alvarellos ML, Lamba J, Sangkuhl K, Thorn CF, Wang L, Klein DJ, et al. PharmGKB summary: gemcitabine pathway. *Pharmacogenet Genomics* 2014;24:564–74. doi:10.1097/FPC.0000000000000086.

[103] Pauwels B, Korst AEC, Pattyn GGO, Lambrechts HAJ, Van Bockstaele DR, Vermeulen K, et al. Cell cycle effect of gemcitabine and its role in the radiosensitizing mechanism in vitro. *Int J Radiat Oncol* 2003;57:1075–83. doi:10.1016/S0360-3016(03)01443-3.

[104] Pauwels B, Korst AE, Lardon F, Vermorcken JB. Combined modality therapy of gemcitabine and radiation. *The Oncologist* 2005;10:34–51.

[105] Schreiber V, Illuzzi G, Héberlé E, Dantzer F. De la découverte du poly(ADP-ribose) aux inhibiteurs PARP en thérapie du cancer. *Bull Cancer (Paris)* 2015;102:863–73. doi:10.1016/j.bulcan.2015.07.012.

[106] Amé J-C, Spenlehauer C, Murcia G de. The PARP superfamily. *BioEssays* 2004;26:882–93. doi:10.1002/bies.20085.

[107] Schreiber V, Dantzer F, Ame J-C, Murcia G de. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:517–28. doi:10.1038/nrm1963.

[108] Kleine H, Poreba E, Lesniewicz K, Hassa PO, Hottiger MO, Litchfield DW, et al. Substrate-Assisted Catalysis by PARP10 Limits Its Activity to Mono-ADP-Ribosylation. *Mol Cell* 2008;32:57–69. doi:10.1016/j.molcel.2008.08.009.

[109] Hottiger MO, Hassa PO, Lüscher B, Schüler H, Koch-Nolte F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci* 2010;35:208–19. doi:10.1016/j.tibs.2009.12.003.

[110] Bryant HE, Petermann E, Schultz N, Jemth A-S, Loseva O, Issaeva N, et al. PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J* 2009;28:2601–2615.

[111] Beck C, Boehler C, Guirouilh Barbat J, Bonnet M-E, Illuzzi G, Ronde P, et al. PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic Acids Res* 2014;42:5616–32. doi:10.1093/nar/gku174.

[112] Dantzer F, Noel G, Schreiber V. Inhibiteurs de la PARP: des avancées significatives dans le traitement des cancers. *Bull Cancer (Paris)* 2011;98:277–290.

[113] Deeks ED. Olaparib: First Global Approval. *Drugs* 2015;75:231–40. doi:10.1007/s40265-015-0345-6.

[114] Kaufman B, Shapira-Frommer R, Schmutzler RK, Audeh MW, Friedlander M, Balmaña J, et al. Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline BRCA1/2

Mutation. *J Clin Oncol* 2015;33:244–50. doi:10.1200/JCO.2014.56.2728.

[115] Clarke MJ, Mulligan EA, Grogan PT, Mladek AC, Carlson BL, Schroeder MA, et al. Effective sensitization of temozolomide by ABT-888 is lost with development of temozolomide resistance in glioblastoma xenograft lines. *Mol Cancer Ther* 2009;8:407–14. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0854.

[116] Lemasson B, Wang H, Galbán S, Li Y, Zhu Y, Heist KA, et al. Evaluation of Concurrent Radiation, Temozolomide and ABT-888 Treatment Followed by Maintenance Therapy with Temozolomide and ABT-888 in a Genetically Engineered Glioblastoma Mouse Model. *Neoplasia N Y N* 2016;18:82–9. doi:10.1016/j.neo.2015.11.014.

[117] Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 2019;381:317–27. doi:10.1056/NEJMoa1903387.

[118] Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005;434:917–21. doi:10.1038/nature03445.

[119] Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913–7. doi:10.1038/nature03443.

[120] Chalmers AJ, Lakshman M, Chan N, Bristow RG. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition as a Model for Synthetic Lethality in Developing Radiation Oncology Targets. *Semin Radiat Oncol* 2010;20:274–81. doi:10.1016/j.semradonc.2010.06.001.

[121] Fogelman DR, Wolff RA, Kopetz S, Javle M, Bradley C, Mok I, et al. Evidence for the efficacy of Iniparib, a PARP-1 inhibitor, in BRCA2-associated pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2011;31:1417–20.

[122] De Summa S, Pinto R, Sambiasi D, Petriella D, Paradiso V, Paradiso A, et al. BRCAness: a deeper insight into basal-like breast tumors. *Ann Oncol* 2013;24:viii13–21. doi:10.1093/annonc/mdt306.

[123] Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, Korinkova G, Simkova D, Bouchal J, et al. Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell Cycle Georget Tex* 2012;11:3837–50. doi:10.4161/cc.22026.

[124] Williamson CT, Muzik H, Turhan AG, Zamò A, O'Connor MJ, Bebb DG, et al. ATM deficiency sensitizes mantle cell lymphoma cells to poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2010;9:347–57. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0872.

[125] Michels J, Vitale I, Sapparbaev M, Castedo M, Kroemer G. Predictive biomarkers for cancer therapy with PARP inhibitors. *Oncogene* 2014;33:3894–907. doi:10.1038/onc.2013.352.

[126] Malewicz M, Kadkhodaei B, Kee N, Volakakis N, Hellman U, Viktorsson K, et al. Essential role for DNA-PK-mediated phosphorylation of NR4A nuclear orphan receptors in DNA double-strand break repair. *Genes Dev* 2011;25:2031–40. doi:10.1101/gad.16872411.

[127] Murai J, Huang SN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res* 2012;72:5588–99. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.

[128] Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*

2016;375:443–53. doi:10.1056/NEJMoa1603144.

[129] Franzese E, Centonze S, Diana A, Carlino F, Guerrera LP, Napoli MD, et al. PARP inhibitors in ovarian cancer. *Cancer Treat Rev* 2019;73:1–9. doi:10.1016/j.ctrv.2018.12.002.

[130] Pernin V, Mégnin-Chanet F, Pennaneach V, Fourquet A, Kirova Y, Hall J. Inhibiteurs de PARP et radiothérapie: rationnel et perspectives pour une utilisation en clinique. *Cancer/Radiothérapie* 2014;18:790–8. doi:10.1016/j.canrad.2014.05.012.

[131] Noël G, Godon C, Fernet M, Giocanti N, Mégnin-Chanet F, Favaudon V. Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. *Mol Cancer Ther* 2006;5:564–74. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0418.

[132] Dungey FA, Löser DA, Chalmers AJ. Replication-Dependent Radiosensitization of Human Glioma Cells by Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Int J Radiat Oncol* 2008;72:1188–97. doi:10.1016/j.ijrobp.2008.07.031.

[133] Chan N, Pires IM, Bencokova Z, Coackley C, Luoto KR, Bhogal N, et al. Contextual Synthetic Lethality of Cancer Cell Kill Based on the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* 2010;70:8045–54. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2352.

[134] Lesueur P, Chevalier F, Austry J-B, Waissi W, Burckel H, Noël G, et al. Poly-(ADP-ribose)-polymerase inhibitors as radiosensitizers: a systematic review of pre-clinical and clinical human studies. *Oncotarget* 2017;8. doi:10.18632/oncotarget.19079.

[135] Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, et al. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines: *Pancreas* 2010;39:425–35. doi:10.1097/MPA.0b013e3181c15963.

[136] Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006;1:2315–9. doi:10.1038/nprot.2006.339.

[137] Chan LL-Y, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, et al. A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy* 2012;8:1371–82. doi:10.4161/auto.21028.

[138] Constanzo J, Vanstalle M, Finck C, Brasse D, Rousseau M. Dosimetry and characterization of a 25-MeV proton beam line for preclinical radiobiology research. *Med Phys* 2019;46:2356–62. doi:10.1002/mp.13512.

[139] Wickham H. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*. New York: Springer; 2009.

[140] Yu G, Wang L-G, Han Y, He Q-Y. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS J Integr Biol* 2012;16:284–7. doi:10.1089/omi.2011.0118.

[141] Bao Z, Yang Z, Huang Z, Zhou Y, Cui Q, Dong D. LncRNADisease 2.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D1034–7. doi:10.1093/nar/gky905.

[142] Braselmann H, Michna A, Heß J, Unger K. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiat Oncol* 2015;10. doi:10.1186/s13014-015-0529-y.

[143] Averbeck D. Mécanismes de réparation et mutagenèse radio-induite chez les eucaryotes supérieurs. *Cancer/Radiothérapie* 2000;4:335–54. doi:10.1016/S1278-3218(00)00008-1.

[144] Hopkins TA, Shi Y, Rodriguez LE, Solomon LR, Donawho CK, DiGiammarino EL, et al. Mechanistic Dissection of PARP1 Trapping and the Impact on In Vivo Tolerability and

Efficacy of PARP Inhibitors. *Mol Cancer Res* 2015;13:1465–77. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0191-T.

[145] Laird JH, Lok BH, Ma J, Bell A, de Stanchina E, Poirier JT, et al. Talazoparib Is a Potent Radiosensitizer in Small Cell Lung Cancer Cell Lines and Xenografts. *Clin Cancer Res* 2018. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0401.

[146] Thorsell A-G, Ekblad T, Karlberg T, Löw M, Pinto AF, Trésaugues L, et al. Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors. *J Med Chem* 2017;60:1262–71. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00990.

[147] Hopkins TA, Ainsworth WB, Ellis PA, Donawho CK, DiGiammarino EL, Panchal SC, et al. PARP1 Trapping by PARP Inhibitors Drives Cytotoxicity in Both Cancer Cells and Healthy Bone Marrow. *Mol Cancer Res* 2019;17:409–19. doi:10.1158/1541-7786.MCR-18-0138.

[148] Zhou J xin, Feng L jin, Zhang X. Risk of severe hematologic toxicities in cancer patients treated with PARP inhibitors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Drug Des Devel Ther* 2017;11:3009–17. doi:10.2147/DDDT.S147726.

[149] Tuli R, Shiao SL, Nissen N, Tighiouart M, Kim S, Osipov A, et al. A phase 1 study of veliparib, a PARP-1/2 inhibitor, with gemcitabine and radiotherapy in locally advanced pancreatic cancer. *EBioMedicine* 2019. doi:10.1016/j.ebiom.2018.12.060.

[150] Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *The Lancet* 2011;378:607–620.

[151] Vieillot S, Fenoglietto P, Moscardo C-L, Aillères N, Lemanski C, Dubois J-B, et al. Quelle radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité? De la technique « step and shoot » à l'arthérapie, point de vue de l'oncologue radiothérapeute. *Cancer/Radiothérapie* 2010;14:550–3. doi:10.1016/j.canrad.2010.06.010.

[152] Woodward WA, Amos RA. Proton Radiation Biology Considerations for Radiation Oncologists. *Int J Radiat Oncol • Biol • Phys* 2016;95:59–61. doi:10.1016/j.ijrobp.2015.10.022.

[153] Nichols RC, Huh S, Li Z, Rutenberg M. Proton therapy for pancreatic cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2015;7:141–7. doi:10.4251/wjgo.v7.i9.141.

[154] Césaire M, Thariat J, Candéias SM, Stefan D, Saintigny Y, Chevalier F. Combining PARP inhibition, radiation, and immunotherapy: A possible strategy to improve the treatment of cancer? *Int J Mol Sci* 2018;19:3793. doi:10.3390/ijms19123793.

[155] Watkins JA, Irshad S, Grigoriadis A, Tutt AN. Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers. *Breast Cancer Res BCR* 2014;16:211. doi:10.1186/bcr3670.

[156] Telli ML, Timms KM, Reid J, Hennessy B, Mills GB, Jensen KC, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:3764–73. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2477.

[157] Marquard AM, Eklund AC, Joshi T, Krzystanek M, Favero F, Wang ZC, et al. Pan-cancer analysis of genomic scar signatures associated with homologous recombination deficiency suggests novel indications for existing cancer drugs. *Biomark Res* 2015;3. doi:10.1186/s40364-015-0033-4.

[158] Euskirchen P, Bielle F, Labreche K, Kloosterman WP, Rosenberg S, Daniau M, et al. Same-day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real-time nanopore

sequencing. *Acta Neuropathol (Berl)* 2017;134:691–703. doi:10.1007/s00401-017-1743-5.

Wäisse WAISSI

Optimisation de la chimioradiothérapie à base de gemcitabine par un inhibiteur de poly(ADP-ribose) polymérase dans les cancers du pancréas

Résumé

L'incidence de l'adénocarcinome pancréatique (PDAC) est en nette augmentation en France durant ces dernières années. Son pronostic reste très péjoratif avec une survie globale à 5 ans inférieure à 9%. Environ 30% des patients se présentent avec un cancer localement avancé pouvant bénéficier d'une chimioradiothérapie.

Ce travail de thèse a évalué le potentiel de l'inhibition de la PARP par l'olaparib associé à la chimioradiothérapie à base de gemcitabine dans les PDAC. Après avoir montré la radiosensibilisation *in vitro* sur 4 lignées cellulaires BRCA1/2 sauvage, nous avons validé cette radiosensibilisation *in vivo* et plus particulièrement avec la protonthérapie. L'analyse des données transcriptomiques après traitement a montré une dérégulation des gènes impliquées dans la régulation des microvésicules, des ARN longs non codants et a identifié une signature associée au traitement par la gemcitabine. Enfin, en évaluant le talazoparib, nous avons montré que la radiosensibilisation est augmenté comparativement à l'olaparib.

Mots clés : Radiothérapie, protonthérapie, poly(ADP-ribose) polymérase, adénocarcinome pancréatique, gemcitabine.

Résumé en anglais

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a devastating disease with a cumulative 5-year overall survival of less than 9% for all stages. Current research that combine radiation with targeted therapy dramatically improve prognosis. We investigated preclinical outcomes of PARP inhibitor associated with radiotherapy and gemcitabine.

In vitro, treatment with olaparib alone was not cytotoxic, but highly radiosensitized cell lines. The addition of olaparib to gemcitabine-based chemoradiotherapy enhanced significantly local control *in vivo*, especially with proton therapy. Whole-transcriptome analysis presented several dysregulated lncRNA and genes associated with extracellular vesicles. Finally, talazoparib enhanced radiation effect on PDAC cell lines by inhibiting PARylation and by enhancing PARP-1 trapping, compared to olaparib.

Keywords: Pancreatic ductal adenocarcinoma, radiotherapy, proton therapy, poly(ADP-ribose) polymerase, gemcitabine.