

Université de Montréal

Dissection moléculaire de la sénescence cellulaire induite
par le stress et la thérapie dans le cancer de l'ovaire et son
impact sur la réponse des patientes

par

Lilians Calvo Gonzalez

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade M.Sc
en Biologie Moléculaire
option Maladies complexes chez humain

Septembre 2015

© Lilians Calvo Gonzalez, 2015

RESUMÉ

Le cancer de l’ovaire (COv) est le cancer gynécologique le plus létal chez la femme et les traitements existants, chirurgie et chimiothérapie, ont peu évolué au cours des dernières décennies. Nous proposons que la compréhension des différents destins cellulaires tels que la sénescence que peuvent choisir les cellules du cancer de l’ovaire en réponse à la chimiothérapie pourrait conduire à de nouvelles opportunités thérapeutiques. La sénescence cellulaire a été largement associée à l’activité de la protéine TP53, qui est mutée dans plus de 90% des cas de cancer de l’ovaire séreux de haut grade (COv-SHG), la forme la plus commune de la maladie. Dans nos travaux, à partir d’échantillons dérivés de patientes, nous montrons que les cultures primaires du cancer de l’ovaire séreux de haut grade exposées au stress ou à des drogues utilisées en chimiothérapie entrent en sénescence grâce à l’activité d’un isoforme du gène CDKN2A (p16INK4A). Dans ces cellules, nous avons évalué les caractéristiques fondamentales de la sénescence cellulaire tels que les altérations morphologiques, l’activité bêta galactosidase associée à la sénescence, les dommages à l’ADN, l’arrêt du cycle cellulaire et le phénotype sécrétoire associé à la sénescence. En utilisant des micromatrices tissulaires construites à partir d’échantillons humains de COv-SHG pré- et post-chimiothérapie, accompagnées de leurs données cliniques, nous avons quantifié des marqueurs de sénescence incluant une diminution de la prolifération cellulaire quelques semaines après chimiothérapie. De façon intéressante, l’expression de p16INK4A dans les échantillons de COv-SHG prétraitement corrèle avec une survie prolongée des patientes suite au traitement. Ceci suggère ainsi pour la première fois un impact biologique bénéfique pour la présence de cellules cancéreuses qui sont capable d’activer la sénescence, particulièrement pour le traitement du cancer de l’ovaire. Dans le but de compléter les thérapies actuelles avec des approches de manipulation pharmacologique de la sénescence, nos résultats suggèrent qu’il serait important de déterminer l’impact positif ou négatif de la sénescence induite par la thérapie sur la progression de la maladie et la survie, pour chaque type de cancer de façon indépendante.

ABSTRACT

Human ovarian cancer (OvCa) is the deadliest gynecologic malignancy and existing surgical/chemotherapeutic treatment options have been relatively static for decades. We propose that understanding OvCa cell fate decisions taken in response to chemotherapy could guide new therapeutic opportunities. Damage-induced cellular senescence is often associated with TP53 activity, which is heavily mutated in high grade serous (HGS) OvCa (>90%), the most common form of this disease. Here, using patient derived tissues, we show that primary HGS-OvCa cultures predominantly trigger CDKN2A- associated (p16INK4A isoform) senescence following exposure to stress or chemotherapy. Key senescence hallmarks including altered morphology, senescence-associated-Beta-galactosidase, DNA damage, cell cycle arrest and the senescence-associated secretory phenotype were evaluated and detected in damaged cells. Using tissue microarrays built from pre- and post-treatment human HGS-OvC tissue samples with accompanying clinical data, we quantified post-treatment hallmarks of senescence including reduced cell proliferation weeks after chemotherapy. Importantly, p16INK4A expression in pre-treatment HGS-OvC samples correlated with increased patients survival, suggesting for the first time that senescence-competence in human cancer cells may have a beneficial impact on treatment outcomes for patients. In order to guide the potential improvement of existing human therapies via pharmacological senescence manipulation, our results suggests that it is important to determine for many types of human cancer whether treatment-induced senescence positively or negatively impacts disease progression and patient survival.

Table des matières

RESUME	I
ABSTRACT	II
LISTE DE TABLEAUX	V
LISTE DE FIGURES	VI
LISTE D'ABRÉVIATIONS	VIII
REMERCIEMENTS	XIV
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
I. LE CANCER DE L'OVAIRE	1
1.1 CANCER DE L'OVAIRE.....	1
1.2 CLASSIFICATION DES CANCERS DE L'OVAIRE	3
1.3 L'ORIGINE DES CANCERS ÉPITHÉLIAUX DE L'OVAIRE (CEO).....	6
1.4 LE CANCER DE L'OVAIRE SÉREUX DE HAUT GRADE (COV-SHG).....	7
1.5 STATISTIQUES ET HISTORIQUE DES TRAITEMENTS CONTRE LE CANCER DE L'OVAIRE	9
1.6 MODE D'ACTION DES TRAITEMENTS COMMUNEMENT UTILISÉS EN CHIMIOTHÉRAPIE : PACLITAXEL, CISPLATINE/CARBOPLATINE ET IRRADIATION	10
1.7 RÉPONSE AUX DOMMAGES À L'ADN (RDA)	14
1.8 LES INHIBITEURS DE PARP ET LA LÉTALITÉ SYNTHÉTIQUE	15
1.9 DESTIN CELLULAIRE	16
II. LA SÉNESCENCE CELLULAIRE	17
1.1 HISTORIQUE	17
1.2 MÉCANISMES INDUISANT L'ENTRÉE EN SÉNESCENCE	18
1.3 LE PHÉNOTYPE SÉNESCENT	22
1.4 LA SÉNESCENCE INDUITE PAR LA THÉRAPIE CONTRE LE CANCER (TIS).....	27
1.5 ÉTAT DES CONNAISSANCES : LA SÉNESCENCE DANS LE CANCER DE L'OVAIRE	27
1.6 BÉNÉFIQUE OU NÉFASTE : IMPACT DES CELLULES CANCÉREUSES SÉNESCENTES DANS LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL	29
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	31
I. PRÉMISSE.....	31
II. HYPOTHÈSE	31
III. OBJECTIFS.....	32
CHAPITRE II. RESULTATS EXPERIMENTAUX	33
I. SUMMARY	34
II. INTRODUCTION	35
III. MATERIALS AND METHODS.....	37
IV. RESULTS	42
V. DISCUSSION	48
VI. REFERENCES	53
VII. FIGURE AND TABLE LEGENDS	56

CHAPITRE III : DISCUSSION	67
PARTIE 1.....	68
“LE STRESS DE CULTURE INDUIT L’ENTRÉE EN SÉNESCENCE DES CELLULES PRIMAIRES DU CANCER DE L’OVAIRE (COV-SHG)”	68
PARTIE 2.....	71
“ DÉTECTION DES MARQUEURS DE SÉNESCENCE DANS LES TUMEURS DES PATIENTES “	71
PARTIE 3.....	73
“LA CHIMIOTHÉRAPIE ET LA RADIATION IONISANTE INDUISENT L’ENTRÉE EN SÉNESCENCE DES CELLULES PRIMAIRES DU CANCER DE L’OVAIRE (COV-SHG)”	73
CHAPITRE IV : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	76
CONCLUSIONS	76
PERSPECTIVES	77
REFERENCES	79
ANNEXE 1	91
ANNEXE 2	92

LISTE DE TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau 1. Incidence et mortalité des cancers gynécologiques au Canada en 2010....	2
Tableau 2. Stadification du cancer de l’ovaire selon FIGO (2014).....	4
Tableau 3. Classification Graduel du Cancer de l’ovaire.....	5
Tableau 4. Classification dualistique proposée par Kurman et Shih, 2010.....	5

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Table 1: Patient characteristics of pre- and post- chemotherapy samples in the epithelial ovarian tumor tissue microarray (TMA).....	66
--	----

LISTE DE FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1. Taux de mortalité des cancers gynécologiques au Canada en 2010.....	2
Figure 2. Classification histopathologique des cancers de l’ovaire élaborée par l’OMS	3
Figure 3. Série d’évènements contribuant au développement des COV-SHG.....	8
Figure 4. Arrêt du cycle cellulaire en phase métaphase du cycle cellulaire induit par Paclitaxel.....	11
Figure 5. Mécanisme d’action de la cisplatine menant aux différents destins cellulaires	13
Figure 6. Réponse aux dommages à l’ADN.....	15
Figure 7. Destins cellulaires induits lors des traitements anticancéreux	17
Figure 8. Voie de signalisation de p16INK4A induisant un arrêt de la prolifération en phase G1 du cycle cellulaire.....	21
Figure 9. Voies moléculaires induisant l’entrée en sénescence.....	24
Figure 10. Résumé des marqueurs déterminant le phénotype sénescence.....	26

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Figure 1. HGS-OvCa primary cultures undergo replicative senescence.....	60
Figure 2. Replicatively senescent HGS-OvCa primary cultures harbor evidence of persistent DDR signaling.....	61
Figure 3. Replicative senescence in HGS-OvCa primary cultures is associated with p16INK4A.....	62

Figure 4. p16INK4a expression levels in epithelial HGS-OvCa tissues are correlated with disease progression and patient survival..... 63

Figure 5. HGS-OvCa primary cultures undergo p16^{INK4A} -associated TIS..... 64

Figure 6. Persistent DDR-associated hallmarks of senescence are detected in primary HGS-OvCa cells after IR/chemotherapy..... 65

DISCUSSION

Figure 11. Cascade de signalisation conduisant à la transcription du locus p16INK4A en réponse à un dommage à l'ADN..... 75

LISTE D'ABRÉVIATIONS

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
ALT : Alternative telomere lengthening
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATR : Ataxia telangiectasia Rad3-related
A2780 : Lignée cellulaire de carcinome ovarien

B

BRAF : B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
BRCA -1-2 : Breast cancer gene -1-2, early onset
Bax : BCL2-associated X protein

C

c-ABL : Protéine abelson
Ca²⁺ : Calcium
CCNE1 : Cyclin E1
CDB : Cassure double brin
CDC2 : Cell division cycle protein 2 homolog also known as cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)
CDC25a : Protéine du gene du cycle cellulaire 25A
CDK : Kinases dépendantes de cyclines
CDKi : Inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines
CDK1 : Cyclin-dependent kinase 1
CDK12 : Cyclin-dependent kinase 12
CEO : Cancer épithélial de l'ovaire
CHK2 : Checkpoint kinase 2
c-Myc : Homologue cellulaire de la protéine rétrovirale v-Myc
COv : Cancer de l'ovaire
COv-SHG : Cancer de l'ovaire séreux de haut grade
CŒUR : Canadian Ovarian Experimental Unified Resource
CSB : Cassure simple brin
CTNNB1 : Catenin (cadherin-associated protein), beta 1

CTR1 : Solute carrier family 31 (copper transporter), member 1 also known as SLC31A1

D

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phenylindole

DDR : DNA Damage Response

DNA-SCARS : DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence

DSBs : double strand breaks

DSiB: domage simple brin

E

EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

ERBB2 : Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

F

FBS : Fetal bovine serum

FIGO : Fédération Internationale des Gynécologues et Obstétriciens

FOXO1 : Forkhead box protein O1

Fas/FasL : Fas cell surface death receptor/ Fas ligand

G

GADD45a : Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha

GRP78 : Glucose-regulated protein 78

GROS : Growth Related Oncogenes

GTP : Guanosine-5'-triphosphate

H

HBP1 : HMG-box transcription factor 1

HGS-OvCa : High grade serous ovarian carcinoma

HIRA : Histone repressor A

HMGA : MacroH2A, high mobility group A

HMG1 : High mobility group box 1

HMG2 : High mobility group box 2

hMSH2 : MutS homolog 2

HP1- γ : Heterochromatin protein 1- γ

HP1 : Heterochromatin Protein 1

HUS1 : HUS1 checkpoint homolog

H2AX : H2 histone family, member X

I

IGFBP7 : Insulin-Like Growth Factor-Binding protein 7

IL-6-8 : Interleukine -6-8

J

JNK : c-Jun N-terminal kinases

K

KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

M

mIR : MicroRNA

MKK3/6 : Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase -3-6

MMP3 : Matrix metalloprotéase 3

MMP-1-3 : Matrix metalloprotéase -1-3

MMR : Complexe protéique impliqué dans la réparation des mésappariements

MMT : Micromatrices tissulaires

MRE11 : Meiotic recombination 11

MRN : Complexe MRN composé de MRE11, RAD50 et NBS1

N

NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NER: Nucleotide excision repair

NF- κ B : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NF1 : Neurofibromin 1

NK : Natural Killer

NOX : NADPH Oxydase

NBS1 : Nijmegen breakage syndrome protein 1

O

OMS : Organisation mondiale de la sante

OSE : Milieu de culture des cellules du cancer de l'ovaire

OvCa : Ovarian cancer

P

PDTX : Patient-derived tumour xenografts

PML : Promyelocytic leukemia

POT1 : Protein of telomere 1

PR : Progesterone

p15 : Protéine codé par le gène cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (CDKN2B)

p16^{INK4A} : Protéine codé par le gène cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)

p21^{CIP1/WAF1} : Protéine codé par le gène cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A)

p27^{Kip1} : Protéine codé par le gène cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B)

p38MAPK : p38 Mitogen-activated protein kinase

p73 : Tumor protein p73

R

RAD9 : RAD 9 homolog

RAD1 : RAD1 checkpoint DNA exonuclease

RAD50 : RAD50 homolog

Rap1 : Ras-related protein 1

Rb : Retinoblastome protein

RB1: Retinoblastome 1

RDA : Réponse aux dommages à l'ADN

RE : Réticulum endoplasmique

REB : Réparation par excision de base

REN : Réparation par excision de nucléotides

RH : Recombinaison homologue

RNA : Ribonucleic acid

RNH : Recombinaison non homologue

RMM : Complexe protéique impliqué dans la réparation des mésappariements

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SASP : Senescence associated secretory phenotype

SAFH : Senescence associated heterochromatin foci

shRNA: short/small hairpin RNA

SOD : Superoxide dismutase

T

TAO : Thousand and one amino acid kinases

TEM: Transition épithélio-mésenchymateuse

TIN2 : TRF1-interacting nuclear protein 2

TIS : Therapy-induced senescence

TMA : Tissue macro-array

TME : Transition mésenchymo-épithéliale

TPP1 : Tripeptidyl peptidase 1

TP53 : Tumor protein p53

TRF1/2 : Telomeric repeat factor 1, Telomeric repeat factor 2

V

v-Myc : Avian myelocytomatosis viral oncogene

V-plex : Meso Scale Discovery V-PLEX Human Biomarker Proinflammatory pannel 1

W

Wnt-5 : Wingless-type oncogene analog 5

WNT16B : wingless-type MMTV integration site family member 16B

53BP1 : p53-binding protein 1

À Adriana pour avoir allumé en moi la flamme de la recherche et m’ avoir fourni un
modèle de scientifique/femme à imiter

À Nico pour être mon compagnon, mon ami, mon âme sœur, ma famille

À ma mère pour tenir la barre haute, et ma grand-mère pour compenser ces exigences

Aux professeurs qui m’ ont appris à poursuivre non pas les réponses mais les questions :

Jean-Marc Deragon, Eva, Eve Toulza, Manuel Echeverria et beaucoup d’ autres

Remerciements

J'aimerais avant tout remercier Francis Rodier, ce n'est pas par hasard que je suis venue à Montréal ou que j'ai voulu faire ma maîtrise avec toi. Aujourd'hui, je suis convaincue d'avoir pris la bonne décision. Merci de ta confiance, et d'avoir dépassé mes attentes en tant que directeur de recherche, scientifique et personne. Merci de m'avoir confié un si beau projet !

Merci à Richard Bertrand, pour me guider dans la mer bureaucratique des universités et toujours me donner le bon conseil au bon moment. Merci Richard, j'étais vraiment chanceuse que tu sois là. Merci à Vivianne Jodoin, pour m'avoir aidé dans ma transition de l'université française UPVD à l'UdeM. Merci à toutes les personnes de l'UPVD qui ont fait possible mon arrivée à Montréal, notamment Nathalie Picault, Maria-Angela Bassetti et Valérie Hinoux. Merci aux deux personnes à l'UdeM qui même sans me connaître m'ont guidé pour permettre mon arrivée à l'UdeM : Julie Mantovani et Martine Raymond. Merci à Jean-Marc Deragon pour tes cours de Biologie Moléculaire, tout ce qui est venu après, a commencé là, en amphithéâtre licence L2. Merci à Eva, toute la passion pour la biologie s'est cultivée avec toi à Cuba. Merci à Echeverria, pour nous exiger des questions, merci à Eve Toulza pour son support.

Merci à Bernard et Mathieu Foulquié, la passion s'est initiée avec vous en 1998 ! Merci à Jean-Marc, mon père, tu as permis que tous mes rêves deviennent réalité. Tu m'as appris une des meilleures qualités des êtres humains et sans doute la plus nécessaire pour les scientifiques : la persévérance ! Merci à Ernesto, aussi mon père t'as été la meilleure figure paternelle qu'un enfant pouvait désirer, tu m'as fourni le meilleur exemple de gentillesse au monde.

Merci à Shuofei, mon phare dans le laboratoire, dans la recherche et parfois même dans la vie. Merci d'avoir partagé avec moi ta simplicité, tes succès et ton mode de vie. T'es un exemple à suivre de chercheuse, de femme et de collègue. Merci d'être toujours souriante ! I will miss you !

Merci à Sabrina et Aurélie, celui-ci c'est notre mémoire les filles, merci de m'avoir aidée, supportée, conseillée et d'avoir vécu toutes les émotions du labo avec moi. Je n'ai vraiment pas de paroles pour vous dire à quel point vous avez été importantes cette année et demie au labo. Merci d'avoir été les deux personnes les plus importantes de ma vie à

Montréal. Je vous porte avec moi n'importe où le chemin de la vie me conduira. Merci à Guillaume, pour tes blagues scientifiques et ta vision exigeante des sciences. Tu m'as beaucoup appris ! Merci à Nico qui m'a beaucoup aidé surtout au début de la maîtrise. Merci à Amel et à Stéphanie, l'une pour être franche et en même temps douce, et l'autre pour m'avoir servi comme repère au laboratoire. Merci à tous les étudiants d'été, spécialement à Anais Cheblal. Merci à Patrick pour avoir décidé de s'impliquer dans ma maîtrise, m'avoir aidé et avoir été une figure présente cette dernière année. Merci à Isabelle Clément, qu'on a été chanceux de t'avoir dans l'équipe avec ton expertise et toujours ton gros sourire ! Merci à tous les autres membres du labo surtout à Michael, au labo t'es passé comme une comète rapide mais efficace ! Merci à tous les membres du laboratoire d'Anne-Marie Mes-Massons en particulier à Lise, Manon, Euridice, Hubert, Laudine et Lilianne. Merci à tous les étudiants qui se sont impliqués dans ma vie personnelle au-delà du bench pour partager des questions, hypothèses et aspirations : Masha, Nadia, Prasamit, Yannick, Gany. Merci à toute ma famille et amis, c'est grâce à vos sacrifices et encouragements que j'ai poursuivi mes rêves : Lucia, Osvaldo, Edenia, Tati, Yilo, Lisbe, Jimaguas, Lila, Irma, Yansulier, Thea-Katrin, mi querida Inma, ma chère Laura, Claire toujours souriante, Gabrielle la PhDeuse, Neleidys, Katy, et mes chers Karl, Michael, Gerald et Beto.

Merci à ma famille italienne qui m'a soutenu dans l'aventure Montréal et dans des nombreuses autres : Pierluigi, Antonella, Elena, Pina, Marco, Alice.

Merci aux Orishas et aux esprits auquel j'ai demandé du support et de l'aide presque quotidiennement.

Enfin, merci à ma merveilleuse équipe de waterpolo, c'est grâce à vous que j'ai tenu l'hiver, c'est grâce à vous que Montréal est devenu chez moi. Merci ACC Waterpolo. Vous allez me manquer !

Merci à tous ceux qui ont contribué à ce projet de près ou de loin, merci à l'Institut du Cancer de Montréal, et à l'UdeM pour m'avoir accueillie.

Chapitre I : Introduction

I. Le cancer de l'ovaire

1.1 Cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est le cinquième cancer le plus commun au monde et le cancer gynécologique le plus léthal causant la mort de plus de 100 000 femmes chaque année [1]. Au Canada le cancer est la première cause de mort chez la femme (Statistique Canada) et les cancers touchant des organes reproducteurs féminins comptent pour 9,2% de ces décès (Statistiques Canada Tanya Navaneelan). Le plus diagnostiqué au Canada dans cette catégorie est le cancer de l'utérus avec une incidence de 30,3 nouveaux cas par 100 000 femmes, suivi du cancer de l'ovaire avec 14,4 nouveaux cas par 100 000 femmes; en troisième position on trouve le cancer du col de l'utérus avec une incidence de 8,1 nouveau cas par 100 000 femmes (**tableau 1**). Parmi ces trois cancers, celui dont la mortalité est la plus basse est le cancer du col de l'utérus (2,2 décès par 100 000 femmes), cela grâce à une amélioration des méthodes de détection au cours des années. Cependant, incidence et mortalité ne sont pas toujours directement proportionnelles. Un bon exemple est le cancer de l'ovaire, moins incident que le cancer de l'utérus mais bien plus mortel (9,5 versus 5,4 décès par 100 000 femmes) (**figure 1**). Cette différence est largement attribuée à la détection tardive des cancers de l'ovaire. Le risque d'être affecté par un cancer de l'ovaire augmente avec l'âge : il est 20 fois plus élevé pour une femme de plus de 85 ans que pour une femme de moins de 30 ans. L'âge moyen de diagnostic au Canada est de 62 ans. En clinique les cancers de l'ovaire se présentent souvent comme des masses cystiques dans le pelvis. Plus de 80% des patientes souffrant d'un cancer de l'ovaire vont avoir des symptômes, même quand la maladie est encore confinée aux ovaires (premiers stades). Cependant ces symptômes ne sont pas spécifiques au cancer de l'ovaire, mais communs avec plusieurs autres maladies tels que des troubles gastro-intestinaux, génito-urinaires et gynécologiques ce qui complique la détection précoce de cette maladie. De nos jours, les méthodes de détection permettent de diagnostiquer de manière efficace seulement 20% des cancers de l'ovaire,

lorsqu'ils sont encore restreints aux ovaires (stade I). Par conséquent, 80% des patientes sont diagnostiquées seulement aux stades métastatiques (II-IV) de la maladie, expliquant le mauvais pronostic de ces cancers [2].

Tableau 1. Incidence et mortalité des cancers gynécologiques au Canada en 2010. Reprinted from Navaneelan, Tanya. 2015. "Trends in the incidence and mortality of female reproductive system cancers." *Health at a Glance*. Statistics Canada catalogue no. 82-624-X, with permission from Statistics Canada Open Licence Agreement

Incidence and mortality summary statistics, Canada, 2010			
Type of cancer	Incidence		
	New cases	Rate per 100,000 women	Median age at diagnosis
Uterus	5,191	30.3	62
Ovary	2,465	14.4	62
Cervix	1,390	8.1	47
Type of cancer	Mortality		
	Deaths	Rate per 100,000 women	Median age at death
Uterus	919	5.4	72
Ovary	1,637	9.5	72
Cervix	372	2.2	59

Source: Canadian Cancer Registry, Statistics Canada; Vital Statistics – Death Database, Statistics Canada.

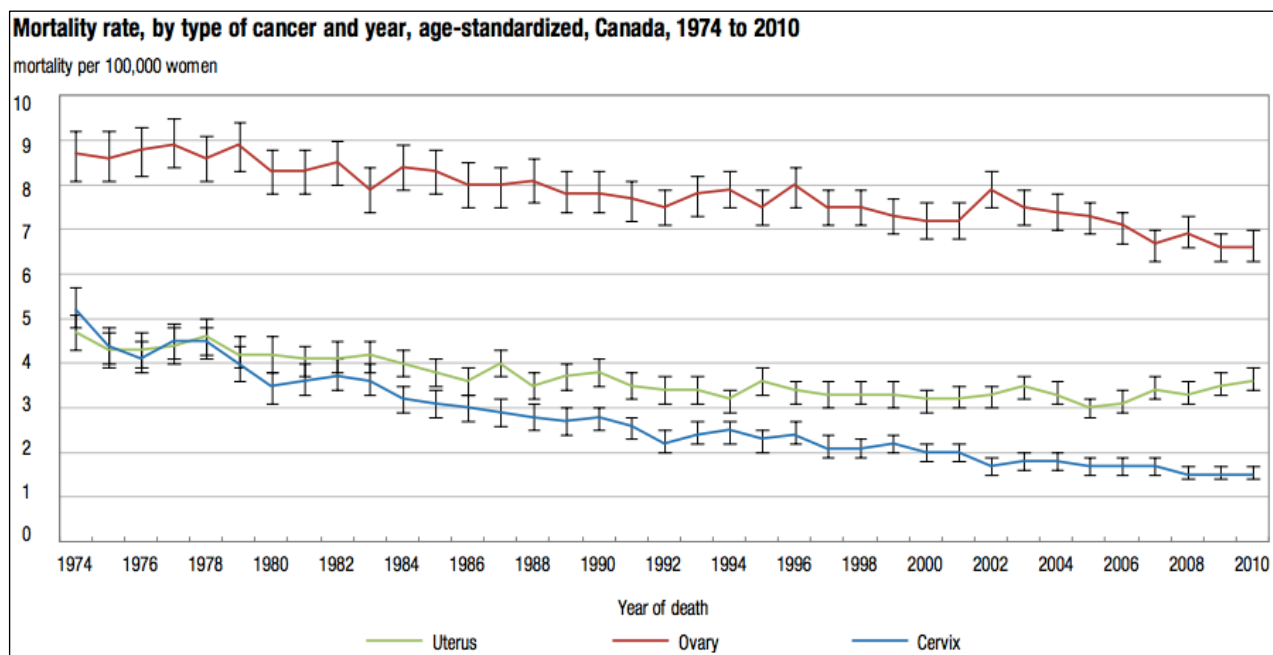


Figure 1. Taux de mortalité des cancers gynécologiques au Canada en 2010. Reprinted from Navaneelan, Tanya. 2015. "Trends in the incidence and mortality of female reproductive system cancers" *Health at a Glance*. Statistics Canada catalogue no. 82-624-X, with permission from Statistics Canada Open Licence Agreement

1.2 Classification des cancers de l'ovaire

a) Classification histopathologique

Les cancers de l'ovaire ont de multiples classifications, parmi les plus importantes nous trouvons la classification histopathologique élaborée par l'Organisation Mondiale de la santé (OMS). Cette classification est basée sur des principes histogénétiques et classifie les tumeurs ovariennes en fonction de leur type cellulaire d'origine [3]. Il existe trois classifications majeures des cancers de l'ovaire (**figure 2**) :

- i. Les tumeurs germinales : Représentent 10-15% des cancers de l'ovaire et sont dérivées des cellules germinales primordiales des ovaires [4], [5].
- ii. Les tumeurs stromales : Cas rares, représentent 8% de toutes les tumeurs malignes de l'ovaire. Proviennent des cellules stromales dérivées de la granulosa [5].
- iii. Les tumeurs épithéliales : Représentent 60% de toutes les tumeurs de l'ovaire et 90% des tumeurs malignes de l'ovaire. Elles sont classifiées en 5 sous-types majeurs (**figure 2**) [5], [6], [7], [3].

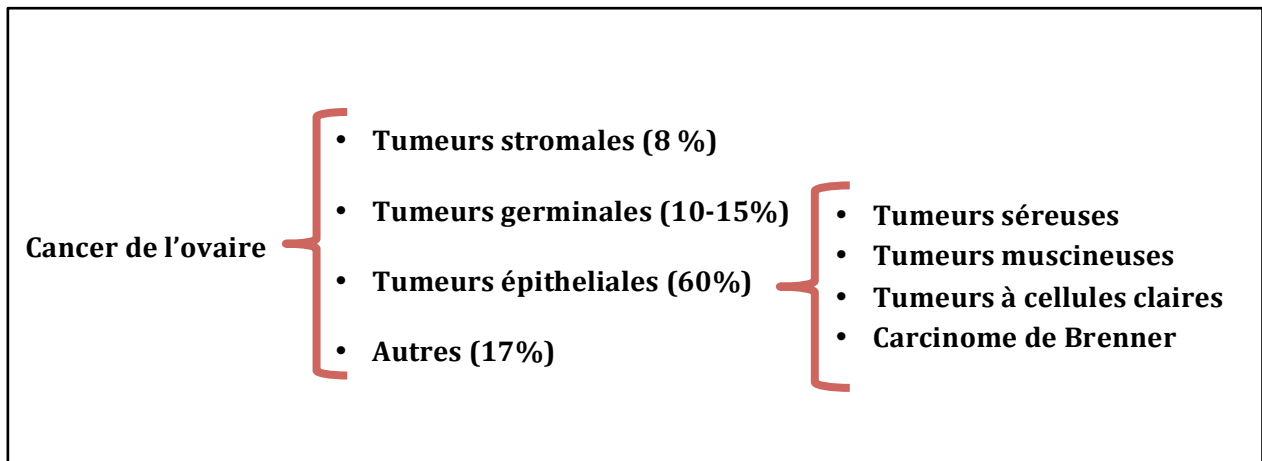


Figure 2. Classification histopathologique des cancers de l'ovaire élaborée par l'OMS.

b) Classification selon le stade (FIGO)

Les cancers de l'ovaire sont aussi classifiés en fonction de leur stade, c'est à dire, le niveau de propagation du cancer dans l'ovaire et dans les autres organes. Le stade est déterminé suite à la chirurgie par le gynéco-oncologue. La classification actuelle utilisée a été élaborée par la Fédération Internationale des Gynécologues et Obstétriciens (FIGO) (stades I à IV) (**tableau 3**). L'actuel système FIGO a été révisé en janvier 2014.

Tableau 2. Stadification du cancer de l'ovaire selon FIGO (2014)

https://www.sgo.org/wp-content/uploads/2012/09/FIGO-Ovarian-Cancer-Staging_1.10.14.pdf

Classification FIGO des cancers de l'ovaire	
Stade	Description
Stade I	La tumeur est limitée aux ovaires
Stade II	On trouve la tumeur dans un ou les deux ovaires / trompes de Fallope avec extension dans la région pelvienne, soit l'utérus, vessie, côlon ou au rectum
Stade III	On trouve la tumeur dans un ou deux ovaires/trompes de Fallope, et elle s'est propagée au-delà du pelvis avec des métastases confirmées à l'extérieur de la région pelvienne jusqu'à l'abdomen et aux ganglions lymphatiques proximaux
Stade IV	Métastases à distance au-delà de la cavité péritonéale. Le cancer a atteint d'autres organes tels que le foie, les poumons ou la rate

c) Classification selon le grade

Le gynéco-oncologue détermine également le grade de la tumeur. Pour cela il compare du *tissu normal* versus du *tissu tumorale* au microscope. Le tissu normal est composé de différents types cellulaires différenciés avec des noyaux réguliers. Lorsque le tissu tumorale rassemble a du tissu normal, peu des mitoses et noyaux avec morphologie normale, la tumeur est classifiée comme *différencié ou de bas grade*. Par contre, si la tumeur a une allure très différente du tissu sain avec des noyaux amorphes et beaucoup des mitoses elle est classifiée

comme *tumeur peu différenciée ou de haut grade*. Cette classification permet de prédire le comportement du cancer et ses chances de propagation. Plus le grade est bas, moins la tumeur pousse et moins sont ces chances de propagation. Le système graduel est divisé en 4 catégories [8] (**tableau 3**).

Tableau 3. Classification graduel du cancer de l’ovaire

Système de classification graduel du cancer de l’ovaire	
Grade	Description
Grade 0	Tumeur borderline c’est à dire propagation très improbable
Grade 1	Tumeurs de bas grade Tumeurs bien différenciées, potentiel de propagation très bas
Grade 2	Tumeurs modérément différenciées Tumeurs dans un stade intermédiaire entre tumeur de bas grade et tumeur de haut grade
Grade 3	Tumeurs de haut grade Ce sont des tumeurs très peu différenciées avec tendance à croître et à se propager plus rapidement

d) Classification selon le type

Kurman et al. ont proposé un modèle dualistique pour classer les cancers de l’ovaire en deux groupes désignés comme carcinomes de type I et carcinomes de type II.

Tableau 4. Classification dualistique proposée par Kurman et Shih, 2010. Reprinted from Ayako Kim et al., Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer, with permission from BioMed Central

	Type I	Type II
Clinical features	indolent	aggressive
Histological features	low-grade serous	high-grade serous
	low-grade endometrioid	high-grade endometrioid
	clear cell	undifferentiated
	mucinous	carcinosarcoma
Molecular features	K-Ras	TP53CCNE1
	BRAF	
	ERBB2	
	PTEN	
	CTNNB1	
	PIK3CA	

Les tumeurs de type I sont cliniquement indolentes et de bas grade, tandis que les tumeurs de type II ont des structures plus complexes, plus agressives et se trouvent à des stades plus avancés de la maladie. Les tumeurs de type I et II sont très différentes aux niveaux génétique, moléculaire et cellulaire. En effet, lorsqu'on parle de cancer de l'ovaire on ne se réfère pas à une maladie, mais à plusieurs maladies différentes qui attaquent un même organe : "l'ovaire" [1], [9]. Les tumeurs de type I sont génétiquement plus stables : les mutations les plus fréquentes sont retrouvées au niveau de KRAS, BRAF et ERBB2. En revanche les mutations au niveau TP53 sont rares. Parmi les tumeurs du groupe II on trouve les tumeurs séreuses de haut grade qui représentent 75% de toutes les tumeurs épithéliales diagnostiquées [1]. Ces tumeurs se caractérisent par un taux élevé de mutation en TP53 (plus de 95%) [10]. Le gène CCNE1 (codant pour la cycline E1) est aussi une autre cible d'altération génétique : on retrouve notamment des amplifications qui confèrent aux cellules cancéreuses un avantage prolifératif. En conclusion, les tumeurs de type II sont génétiquement instables et fortement mutées en TP53 [1], [9].

1.3 L'origine des cancers épithéliaux de l'ovaire (CEO)

Concernant l'étude présentée ici, nous nous intéresserons aux cancers de type épithéliaux, particulièrement à ceux de type séreux de haut grade (COv-SHG). L'origine des CEO ou les mécanismes initiant leur tumorigénèse sont peu connus. L'hypothèse traditionnelle postule que les CEO prennent leur origine des cellules de surface de l'épithélium ovarien (mésothélium) et que des changements métaplastiques subséquents mènent au développement de différents types cellulaires de cancer (cellules claires, endométriales, mucineuses). Cependant ces types cellulaires sont très différents des types cellulaires que l'on rencontre dans l'ovaire normal, par conséquent, une hypothèse alternative fut émise postulant leur origine au niveau extra-ovarien à partir des tissus Müllériens notamment au niveau des trompes de Fallope [1], [9], [11]. Cette hypothèse se base sur des ressemblances morphologiques : les carcinomes ovariens ressemblent morphologiquement à l'épithélium des trompes de Fallope. De plus, les tissus de type Müllérien ont une organisation cylindrique et souvent ciliée, plus en accord avec la structure des cellules tumorales citées [1], [9].

1.4 Le cancer de l'ovaire séreux de haut grade (COv-SHG)

Le cancer de l'ovaire séreux de haut grade est le CEO le plus diagnostiqué au monde et, de ce fait, également le plus étudié. Lorsque l'on dit que le cancer de l'ovaire est la 5ème cause de mortalité pour les cancers chez les femmes il est important de noter que 70% de ces décès sont dus à des COv-SHG [12]. Les patientes canadiennes atteintes d'un COv-SHG subissent une résection chirurgicale invasive des masses tumorales suivie par des sessions de chimiothérapie utilisant des composés à bases de platinium et de taxane. Après la chimiothérapie, 25% des patientes auront une récurrence dans les 6 mois qui suivent, l'espérance de survie au-delà de 5 ans n'excédant pas 31% [13]. Parmi les événements précoces initiant le COv-SHG le plus caractérisé est la mutation de TP53, présente dans plus de 90% des cas [10], [12]. Près de 13% des COv-SHG sont dus à des mutations germinales dans les gènes BRCA1 et BRCA2 [14]. Lorsque une femme naît avec l'un de ces deux gènes mutés (cancer de type familial), ses risques de développer un CEO (notamment un COv-SHG) oscillent entre 30% et 70% [15]. BRCA1 et BRCA2 sont des acteurs majeurs de la machinerie de recombinaison homologue qui répare les cassures double brin de l'ADN. BRCA1 et BRCA2 peuvent aussi être la cible de mutations somatiques [16], [17] ou encore d'inactivation par méthylation dans le cas de BRCA1 [15]. En conclusion, lorsque l'on combine des analyses différents: analyse des mutations somatiques ou germinales et de diminution de l'expression génique soit par méthylation ou par amplification des facteurs trans-activateurs, il apparaît que 50% des COv-SHG ont une dysfonction en BRCA [15], [18]–[23].

Une autre caractéristique des COv-SHG est la variabilité du nombre des copies, c'est à dire un polymorphisme dans lequel le nombre des copies d'un gène ou d'un segment chromosomique dans le génome est altéré, généralement suite à des événements de duplication. On trouve en effet de nombreuses amplifications et délétions dans le génome. Cette instabilité génomique peut être le résultat de la perte de TP53, qui est associée au contrôle de la stabilité du génome. Cette instabilité génomique accrue pourrait être la troisième étape de la série d'événements conduisant à la tumorigenèse du COv-SHG [15] (**Figure 3**).

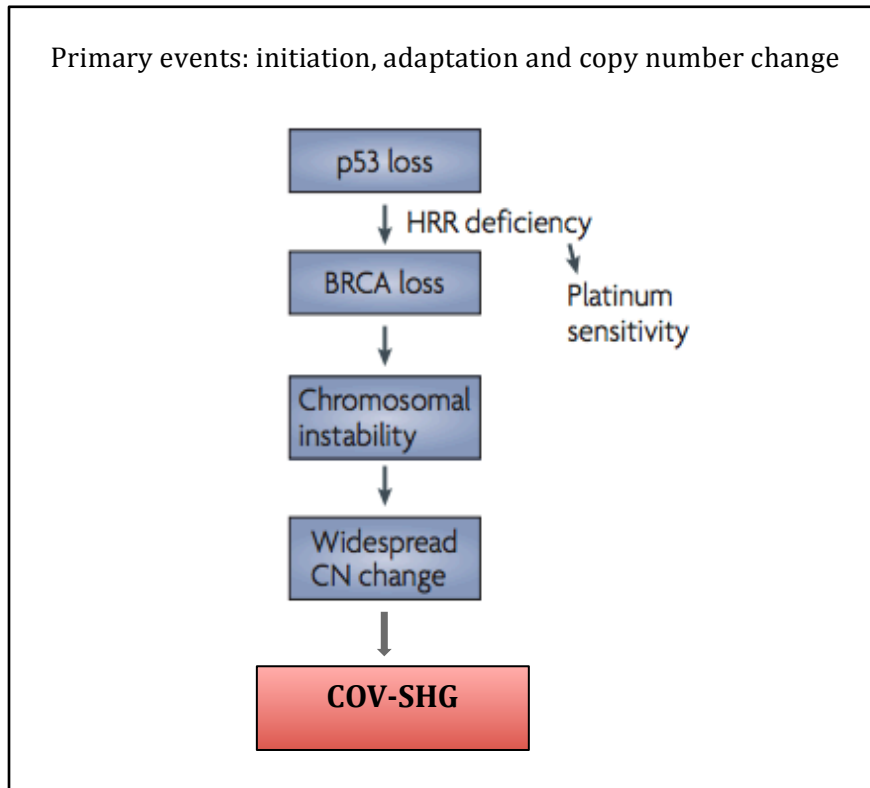


Figure 3. Série d'évènements contribuant au développement des COV-SHG. Adapted from David D. L. Bowtell, The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer, with permission from Nature Publishing Group.

En 2011, le Cancer Genome Atlas Consortium (TCGA) a réalisé une étude génomique comparative sur 489 échantillons de carcinomes séreux, permettant de confirmer le haut taux de mutation de TP53 (96%) mais aussi d'identifier de nouvelles mutations caractéristiques des cancers séreux telles que NF1, CDK12 et RB1 [24], [25]. Toutefois, la force de cette étude ne réside pas dans la découverte de nouvelles mutations somatiques classiques, mais sur la mise en lumière de nombreuses régulations au niveau génomique. Les altérations communément connues (mutations) ne représentent qu'une fraction infime de celles identifiées dans la tumeur. En revanche, on y retrouve principalement des modifications épigénétiques, des changements dans le nombre de copies, et des dérégulations de l'expression génique. Tous ces changements jouent un rôle crucial dans la transformation néoplasique [10], [12].

Étant donné notre mauvaise compréhension de la très grande variété des évènements

moléculaires permettant le développement de cette maladie, peu de thérapies ciblées ont pu être développées ces dernières années pour le CEO. Ainsi, il est primordial de mieux comprendre comment les thérapies actuellement utilisées pour traiter le CEO agissent afin de les rendre plus performantes.

1.5 Statistiques et historique des traitements contre le cancer de l'ovaire

a) Statistique

De nos jours, seulement 20-30% des cas du cancer de l'ovaire sont découverts lorsque le cancer est encore limité aux ovaires (stade I) ce scénario est le plus favorable puisqu'il permet de sauver entre 70% et 90% des femmes via une chirurgie cytoréductrice suivie de la chimiothérapie [2], [26]. Toutefois, la plupart des femmes, environ 70-80%, seront diagnostiquées lorsque le cancer est disséminé (métastatique) [2], [26] et auront des taux de survie n'excédant pas 50% [27]. Ces femmes reçoivent similairement une chirurgie cytoréductrice (toutefois plus invasive) ainsi que la chimiothérapie. Plus récemment une nouvelle étude fut publiée montrant que même 15 ans après le diagnostic initial d'un cancer de l'ovaire de haut grade, le cancer lui-même reste la cause de mort la plus commune chez ces femmes [27].

b) Historique des traitements

À la fin des années 1970 Wiltshaw et Kroner ont rapporté l'efficacité de la cisplatine comme agent chimiothérapeutique [28]. Cette découverte permit l'utilisation de ce composé dans de nombreuses thérapies qui commencèrent aussi à se complexifier jusqu'à l'arrivée des thérapies combinées. Les premiers agents utilisés en combinaison avec la cisplatine furent la cyclophosphamide et le doxorubicine [9], [29], [30]. Dans les années 90, une autre drogue fut introduite : la carboplatine. La carboplatine est un analogue de la cisplatine avec les mêmes propriétés, la même efficacité, mais avec une moindre toxicité, réduisant donc les effets secondaires. Durant la même période (années 90), le taxol (paclitaxel), isolé à partir de l'If de l'ouest (*taxus brevifolia*) un conifère de l'Amérique du Nord [31], est introduit dans les

traitements combinés et de nombreuses études cliniques permettent de conclure que la meilleure combinaison contient du carboplatine et du paclitaxel [9], [29], [30]. Durant ces deux dernières décennies (années 1990-2010), les études cliniques se consacrèrent à améliorer les méthodes d'administration de ces drogues chimiothérapeutiques : la méthode intraveineuse (IV) versus la méthode intrapéritonéale (IP). Lorsque des comparaisons furent menées, la méthode IP améliorait la survie, mais était accompagnée de problèmes de toxicité hématologique. Présentement, dans la plupart des pays la méthode intraveineuse (IV) est préférée à la méthode intrapéritonéale (IP) [9].

1.6 Mode d'action des traitements communément utilisés en chimiothérapie : paclitaxel, cisplatine/carboplatine et irradiation

a) Le paclitaxel

En 1979 le mécanisme d'action du paclitaxel fut élucidé par le groupe de Susan B. Horwitz et en 1994 le paclitaxel fut produit de manière synthétique par Robert A. Holton et son équipe [32], [33]. Le paclitaxel est un composé qui se lie fortement aux extrémités N-terminale des sous-unités β des microtubules permettant la polymérisation de la tubuline en absence de GTP, rendant les microtubules résistants à la dépolymérisation. Les microtubules jouant un rôle crucial dans la phase de mitose du cycle cellulaire, le taxol empêche la division cellulaire en arrêtant le cycle cellulaire en phase M [33]–[35]. Plus précisément, lorsque les cellules entrent en métaphase les chromosomes sont alignés à l'équateur du fuseau mitotique. Les chromosomes (chromatides sœurs) alignés à l'équateur sont attachés par les microtubules kinétochoriens au niveau du kinétochore. La métaphase est suivie de l'anaphase, où les chromatides sœurs se séparent et se dirigent vers les pôles, grâce à plusieurs mécanismes moléculaires, notamment des jeux de dépolymérisation et répolymérisation des microtubules kinétochoriens. La ploïdie des cellules filles dépend du bon déroulement de l'anaphase et de la bonne ségrégation des chromatides sœurs. Par conséquent, si les microtubules, acteurs majeurs dans la ségrégation des chromosomes, ne sont pas capables de raccourcir, le cycle cellulaire est bloqué en métaphase (**figure 4**). En plus d'inhiber le cycle cellulaire, le taxol peut aussi moduler plusieurs voies moléculaires de signalisation dans la cellule. En effet, puisque

plusieurs protéines clefs de la signalisation cellulaire se localisent aux microtubules, le taxol peut jouer sur leur activation [36].

Les kinases ERK1/2 et p38MAPK sont des exemples bien documentés [37]. Leurs activités peuvent être augmentées suite à des traitements déstabilisant la dynamique des microtubules, telle que la présence de taxol. Ces deux cascades de signalisation une fois activées mènent à l'entrée en apoptose des cellules traitées [37]. Un autre mécanisme d'induction de l'apoptose par le paclitaxel serait via l'induction d'un stress au réticulum endoplasmique (RE) qui déclenche le relargage de Ca^{2+} dans le cytoplasme. Le Ca^{2+} cytoplasmique active ensuite la m-calpain qui à son tour active la voie apoptotique caspase-dépendante [35].

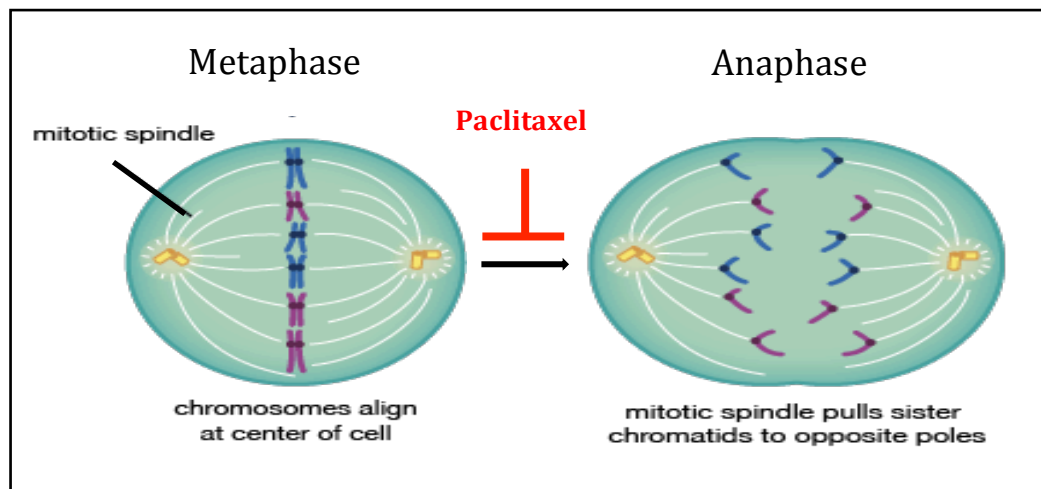


Figure 4. Arrêt du cycle cellulaire en phase métaphase du cycle cellulaire induit par paclitaxel

b) Cisplatine / carboplatine

La cisplatine est la drogue la plus couramment utilisée pour traiter le cancer de l'ovaire. De nos jours, on utilise un de ses analogues : la carboplatine. Lorsque la drogue est administrée aux patientes, elle entre dans la cellule via des transporteurs membranaires tel que le CTR1 [38]. Une fois dans le cytoplasme, la cisplatine devient active via un processus chimique appelé aquation : les atomes de chlore de la molécule sont remplacés par des molécules d'eau. Après l'activation, le produit interagit avec les sites N7 des purines pour former des liaisons

covalentes intra-brin ADN-ADN [39]–[41]. De façon directe, les lésions des bases de l'ADN telles que celles induites par la cisplatine provoquent une distorsion physique de la chaîne d'ADN qui est reconnue comme un dommage par des protéines senseurs, tels que hMSH2 ou hMutS α composantes du complexe de réparation des mésappariements (RMM) ou encore par les protéines HMG1 et HMG2. Le rôle des protéines reconnaissant le dommage est de signaler le problème aux protéines effectrices en amont. Lorsque la machinerie cellulaire détecte la cisplatine, la première mesure prise est l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S, qui va être facilité par la protéine p21^{CIP1/WAF1} (induite via p53). Afin de maintenir le checkpoint, d'autres protéines seront aussi induites notamment CDKi p16^{INK4A} [41], [42]. Alternativement, la cisplatine induit la voie moléculaire ATR/Chk1,Chk2, cette voie cause la diminution de la phosphatase cdc25 ce qui inhibe l'activité de Cdk1 et provoquera un arrêt en G2/M [43]. L'activation de ces divers points d'arrêt du cycle cellulaire donne à la cellule le temps nécessaire à la réparation. Il existe plusieurs possibilités pour réparer ce type de dommage soit par excision des nucléotides (REN), qui permet de remplacer les bases endommagées, ou encore la réparation par recombinaison homologue (RH) en phase S/G2 du cycle cellulaire ou la réparation par recombinaison non homologue (RNH) en phase G1 du cycle cellulaire [44]. Lorsque les dommages à l'ADN sont excessifs et que la réparation est impossible, les cellules doivent activer des destins cellulaires telles que l'apoptose ou la sénescence [41].

Il existe aussi d'autres protéines qui vont être activées lorsque la cellule détecte la cisplatine, tel est le cas de la kinase ATR, c-Abl, CHK2, p73 et aussi Fas/FasL. Par exemple, l'activation d'ATR déclenche la phosphorylation et donc l'activation de p53 qu'elle active des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose tels que p21^{CIP1/WAF1}, gadd45a et bax [41], [45]. La protéine bax activée transloque du cytosol à la mitochondrie, conduisant au relargage du cytochrome C et à la formation de l'apoptosome dans le cytoplasme et à la subséquente activation des caspases [41], [46]. L'apoptose induite par la cisplatine peut aussi impliquer d'autres voies moléculaires telles que la voie Fas/FasL [41], [47] [41], [47], [48]. En outre, ATR peut aussi avoir des effets indépendants de p53, comme l'activation de la cascade des MAPK. Parmi les membres de cette famille qui sont activés on trouve p38MAPK, JNK et ERK qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et l'apoptose [41], [48], [49]. Une autre

voie moléculaire indépendante de p53 fut reportée par Gong et al. (1999). Ils ont démontré que p73, une protéine similaire à p53, pouvait aussi être induite par la cisplatine et était capable d'induire l'apoptose [41], [48], [50], [51] (**figure 5**).

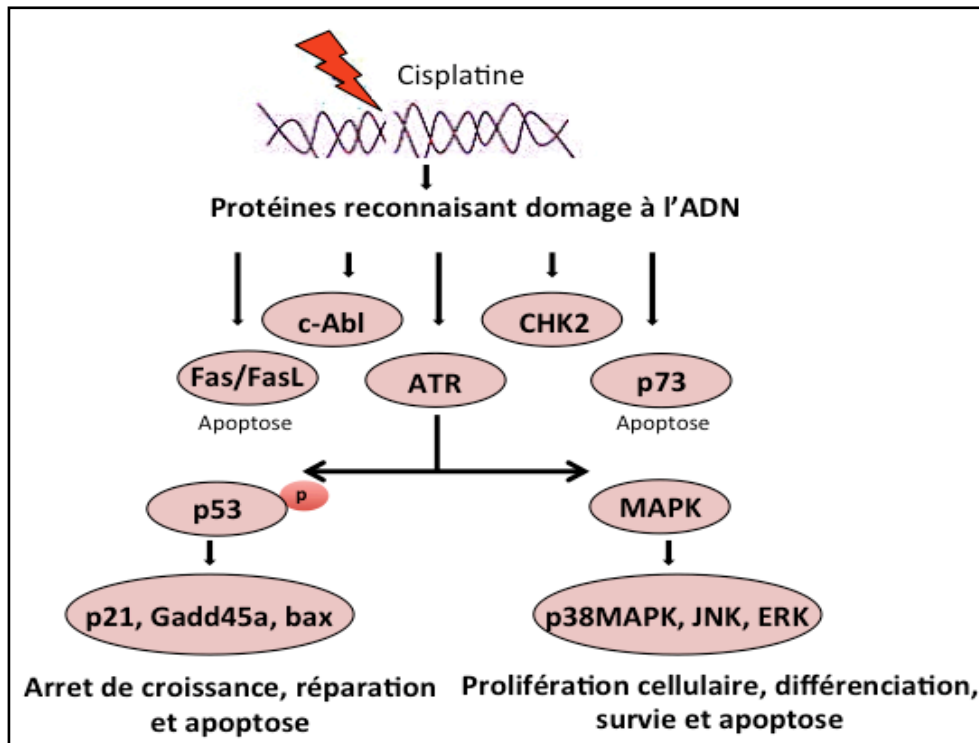


Figure 5. Mécanisme d'action de la cisplatine menant aux différents destins cellulaires. Adapted from Siddik., Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, with permission from Nature Publishing Group.

En outre, la cisplatine, comme déjà dit, est très toxique pour les cellules puisqu'elle provoque des liaisons intra-brin dans l'ADN. Ces liaisons intra brin d'ADN sont réparées via différentes voies de signalisation dans la cellule (cités plus haut). Lorsque la réparation par excision de nucléotides commence des nucléases tels que XPG 3' et XPF-ERCC1 5' sont recrutés au site de dommage pour enlever les distorsions en faisant des incisions à l'ADN [52]. Chez les cellules en dehors de la phase S du cycle cellulaire le dommage est réparé sans problème. Cependant, chez les cellules en phase S du cycle cellulaire ces incisions, cassures simple brins (CSB), sont converties en cassures double brin (CDB) [53]–[55]. En effet, pendant la réplication de l'ADN, lorsqu'une fourche de réplication avance sur l'ADN et qu'elle rencontre une cassure simple brin, cela provoque l'effondrement de la fourche et la subséquente

formation de la CDB. Lorsque l'ADN se trouve avec une cassure double brin, cela peut être réparé via la recombinaison homologue (RH) ou encore la recombinaison non homologue (RNH) [44]. En plus ce type de cassure déclenche l'activation de la RDA [53]–[55].

Dans le contexte du COV-SHG, une étude démontre spécifiquement que les traitements prolongés à la cisplatine et à la carboplatine induisent la conversions des lésions primaires causées par les drogues en cassures doubles brins à l'ADN et donc l'activation de la RDA [56].

1.7 Réponse aux dommages à l'ADN (RDA)

La carboplatine, telle que décrite plus haut, permet la conversion des CSB en CDB. Les dommages à l'ADN de ce type sont des lésions létales pour les cellules, il est donc primordial que les cellules détectent et réparent ce type de dommages et mettent en place des systèmes de réparation telle que la Réponse aux Dommages à l'ADN (RDA) [57], [58] (**figure 6**).

Lorsqu'une cellule normale détecte une cassure double brin à l'ADN, plusieurs protéines dites senseurs reconnaissent le dommage et se fixent au site de cassure. Chez les humains, les premières protéines à arriver au site de dommage sont MRE-11, RAD50 et NSB1 qui forment le complexe MRN. Un autre complexe, le 9-1-1 est composé des protéines RAD9-RAD1-HUS1 et va aussi se rendre au site de cassure. Les complexes senseurs permettent le recrutement des kinases apicales ATM et ATR qui, une fois rendues au niveau du dommage, déclenchent des cascades de phosphorylations. Parmi les cibles d'ATM on trouve le variant d'histone H2AX qui une fois phosphorylé participe au maintien, et à la propagation/amplification de la RDA. BRCA1 et 53BP1 sont aussi des cibles d'ATM qui sont recrutées au site de dommage et qui sont respectivement impliquées dans la réparation de l'ADN et dans la maintenance de la RDA, γ H2AX et 53BP1 peuvent être détectés par immunofluorescence sous forme de foyers au niveau des cassures doubles brins (CDB). Par la suite la cellule essayera de réparer le dommage soit par RH ou par RNH en fonction de la phase du cycle cellulaire où elle se trouve. Si le dommage ne peut pas être réparé, la cellule optera pour la sénescence ou l'entrée en apoptose. Les voies pouvant mener à l'apoptose ou à l'arrêt du cycle cellulaire via l'activation de la RDA sont très redondantes, ce qui peut limiter

l'efficacité des traitements anti-cancéreux en permettant l'apparition de multiples mécanismes de résistance par les cellules cancéreuses [56].

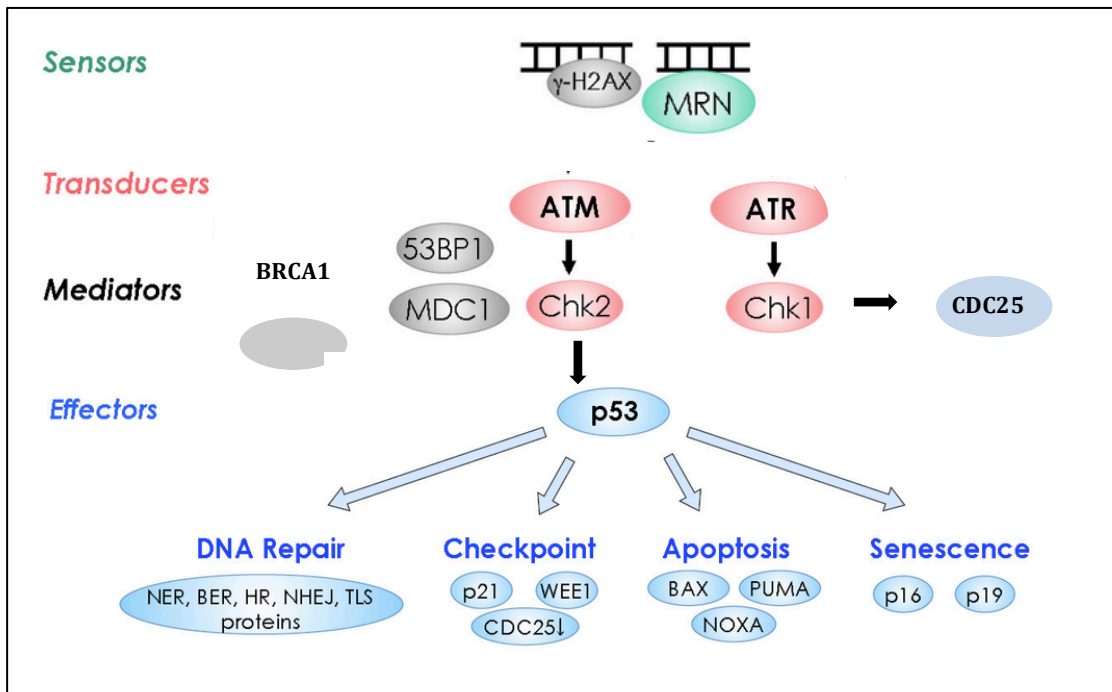


Figure 6. Réponse aux dommages à l'ADN. Adapted from Yoshiyama, DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals, with permission from open access article under the terms of Creative Commons Attribution license.

Cependant, tels que l'on a auparavant les cancers de l'ovaire sont fortement mutés en BRCA1 et BRCA 2 (plus de 50% au total), et ces deux protéines sont nécessaires à la réparation par recombinaison homologue par conséquent des nouvelles thérapies exploitent cette propriété et utilisent des inhibiteurs des PARP.

1.8 Les inhibiteurs de PARP et la létalité synthétique

La létalité synthétique a lieu lorsqu'on combine différents mutations que toutes seules sont viables pour la cellule mais que ensembles ont un effet léthal [59]. Tel est le cas lorsque dans une cellule on trouve PARP et BRCA1/2 simultanément mutés. Pour expliquer comment la létalité synthétique marche il faut nous situer dans le contexte d'une cellule qui reçoit des dommages endogènes à l'ADN chaque jour, environ 10 000, étant les DSiB majoritaires. En dépendance du type de dommage la cellule active des systèmes de réparation différents; par exemple les dommages simple brin (DSiB) sont réparés via différents voies dont la réparation

par excision de base (REB). PARP, une ADN glycosylase, est l'enzyme clé de la voie de REB [59]. Par conséquent lorsque nous utilisons des inhibiteurs de PARPs cela bloque la réparation par excision de base et des DSiB s'accumulent. Lors de la réplication de l'ADN, quand la polymérase rencontre des DSiB elle pause, ce qui provoque le effondrement de la fourche de réplication et les DSiB évoluent en DDB qui tel que vu auparavant sont réparés par la RH, ce qui engage la protéine BRCA. Par conséquent, plusieurs thérapies profitent de ce mécanisme et traitent les patients avec des mutations en BRCA avec des inhibiteurs des PARPs afin de provoquer une accumulation des DSiB qu'évoluent en DDB qui ne peuvent pas être réparés et cela provoque la mort des cellules cancéreuses. Il faut noter qu'en outre des dommages endogènes la radiation ionisante et les agents alkylants peuvent aussi provoquer un dommage qui doit être réparés par le REB [59], [60].

1.9 Destin cellulaire

Éventuellement la RDA se répand sur l'ADN au-delà du site initial du dommage, menant à l'activation de p53 et CDC25A (figure 6). Ces deux derniers interviennent dans l'arrêt temporaire du cycle cellulaire (p53 via le CDKi p21^{CIP1/WAF1}), et le déclenchement de l'apoptose. Il est aussi possible que la cellule répare le dommage et ré-entre dans le cycle cellulaire [61]. Comme on peut l'apprécier suite à l'activation de la RDA les cellules ont plusieurs choix : la mort cellulaire programmée (apoptose via BAX, PUMA, NOXA), la mort cellulaire par nécrose, la mort cellulaire associée à l'autophagie, la catastrophe mitotique [62], la réparation et la reprise de la croissance ou encore l'arrêt permanent du cycle cellulaire, aussi connu comme sénescence [63] (**figure 7**). Parmi ces différents destins qui ont tous des modes de régulation moléculaire complexes, celui auquel notre laboratoire s'intéresse particulièrement est la sénescence cellulaire.

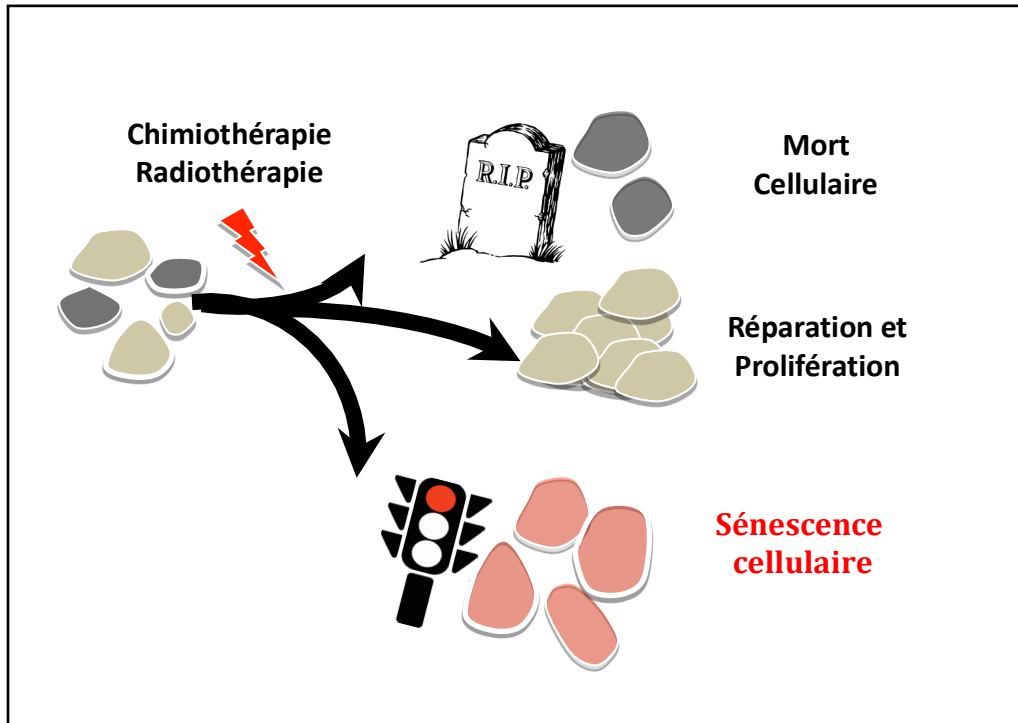


Figure 7. Destin cellulaires induits lors des traitements anti-cancéreux

II. La sénescence cellulaire

1.1 Historique

La sénescence cellulaire fut décrite pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorhead qui ont observé que les fibroblastes primaires humains maintenus en culture cessent de proliférer après un nombre fini de divisions et entrent dans un état d'arrêt de croissance irréversible, baptisé sénescence cellulaire. Ils ont aussi observé que cet arrêt de croissance était accompagné d'importants changements morphologiques et physiologiques. Deux notions importantes ont émergé de cette étude : la sénescence cellulaire comme arrêt permanent de la prolifération et le lien entre la sénescence, le cancer et le vieillissement. Hayflick et Moorhead ont proposé que seules les cellules immortalisées (cancéreuses) peuvent échapper à la sénescence. De plus, ils ont aussi émis l'hypothèse que la sénescence contribuait au vieillissement global de l'organisme. De manière surprenante, ces deux postulats étaient justes

même si les mécanismes moléculaires faisant le lien entre sénescence, cancer et vieillissement étaient encore inconnus à l'époque [64].

Aujourd'hui, la sénescence cellulaire est associée à plusieurs autres processus physiologiques, tels que l'embryogenèse et la réparation tissulaire ainsi qu'à diverses pathologies comme par exemple l'obésité, le diabète, la fibrose et la fibrose kystique [65].

1.2 Mécanismes induisant l'entrée en sénescence

a) Sénescence répllicative

De multiples stress activent les voies moléculaires menant à l'entrée en sénescence des cellules. La sénescence observée par Hayflick et Moorhead n'est qu'une diminution de la longueur des séquences télomériques causée par des passages cellulaires répétés *in vitro* [66], [67]. Les télomères sont des séquences répétitives (TTAGGG) que l'on trouve aux extrémités de chaque chromosome, protégées par un complexe protéique appelé le télosome. Le rôle des télomères est de préserver l'intégrité du génome en empêchant la fusion entre chromosomes, mais aussi d'empêcher que les extrémités télomériques soient reconnues comme un dommage à l'ADN. Pour cela, le télosome, qui est composé de six protéines: TRF1, TRF2, TIN2, POT1, Rap1 et TPP1 va former une T-loop avec les extrémités répétitives de l'ADN et va donc empêcher la reconnaissance des extrémités télomériques libres par les systèmes de détection et de réparation des dommages de l'ADN [68], [69].

Le raccourcissement télomérique s'explique par les mécanismes de réplication de l'ADN, qui est composé de deux brins complémentaires antiparallèles : un brin en direction 5'→3' et l'autre en direction 3'→5'. Au cours de la réplication, l'ADN polymérase ajoute des nucléotides au brin en cours d'élongation en utilisant une amorce ARN. L'ADN polymérase ne sait répliquer l'ADN que dans la direction 5'→3'. Au moment de la réplication, les deux brins d'ADN se séparent : au niveau du brin orienté en 5'→3', l'amorce ARN se fixe au début en 5' et la réplication se fait sans interruption (réplication continue). Par contre, au niveau du brin orienté en 3'→5', la polymérase doit ajouter plusieurs amorces (fragments d'Okazaki) pour pouvoir répliquer des petits fragments d'ADN en direction 5'→3' (réplication discontinue). Toutes les amorces vont ensuite être enlevées et remplacées par de l'ADN

néosynthétisé à l'exception de la première amorce d'ARN en 3'. Cette extrémité sera donc plus courte et cela à chaque division. Ce phénomène est connu comme *The end replication problem* [70]. Éventuellement les télomères vont atteindre une longueur critique qui déstabilise le télosome et déclenche une perte de son organisation. Le télomère sera donc décoiffé dans le noyau [71] et les extrémités télomériques nues seront reconnues comme une cassure à l'ADN et déclencheront la RDA. Les dommages aux télomères ne peuvent pas être réparés par les cellules, cela va donc enclencher la mort cellulaire ou l'entrée en sénescence [72]. Généralement, l'entrée en sénescence répliquative va engager des protéines suppresseurs de tumeurs associées à la RDA telles que p53, Rb et p16^{INK4A} [73], [74].

Afin d'échapper à la sénescence répliquative qui semble condamner les cellules somatiques, les cellules ont développé certains mécanismes. Par exemple, les cellules souches vont activer une enzyme, "la télomérase", une polymérase rétrotranscriptase qui synthétise les répétitions télomériques [75]. De la même façon, 90% des cancers [76], [77] vont réactiver cette enzyme pour pouvoir s'immortaliser, une des étapes nécessaires à la carcinogenèse [78]. 10-15% des cancers vont utiliser un autre mécanisme pour atteindre l'immortalisation, connu comme *Alternative Lengthening of Telomeres* (ALT). Ce mécanisme consiste à une maintenance de la longueur des télomères via la recombinaison homologue [79]–[81].

b) Sénescence prématurée induite par le stress (SIPS)

Lorsque les cellules sont exposées à des dommages génotoxiques tels que le stress oxydatif ou la radiation ionisante, elles peuvent aussi entrer en sénescence. Ces agents endommageant l'ADN déclenchent la RDA et provoquent un arrêt du cycle cellulaire transitoire ou permanent si les dommages sont trop sévères [72], [74], [82]. La sénescence induite par les dommages à l'ADN est fortement régulée par les suppresseurs de tumeurs p53 et p16^{INK4A} et est associée à des structures nucléaires appelées DNA SCARS [83]. Très souvent les stress qui causent des dommages de l'ADN peuvent aussi causer des lésions télomériques qui seront irréparables, tel que décrit plus haut [84].

i. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène sont des molécules réactives chimiquement contenant des atomes d'oxygène. Les ROS peuvent être le résultat du métabolisme endogène de la cellule, ou encore provenir de substances externes telles que la fumée, les polluants ou encore la radiation ionisante. Les ROS sont également des molécules importantes dans la signalisation cellulaire et l'homéostasie des organismes [85]. Cependant lorsque les niveaux de ROS augmentent de manière dramatique dans une cellule, cela peut endommager l'ADN, les protéines et les lipides cellulaires. De façon endogène, les producteurs majeurs de ROS sont les NADPH oxydases (NOX) qui se trouvent dans les membranes biologiques, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique ou encore les peroxysomes [86], [87]. Aujourd'hui, des liens entre les ROS et plusieurs processus biologiques ont été établis. Par exemple, on sait que les ROS sont étroitement liés au vieillissement : d'après la "Théorie des radicaux libres" proposée initialement par Denham Harman en 1956 et révisé par lui-même en 1973 pour ajouter le rôle des mitochondries et des espèces réactives d'oxygène [88], ce sont les dommages oxydatifs initiés par les ROS qui contribuent au vieillissement. Des études menées sur des modèles animaux invertébrés et chez la souris ont démontré que, chez des animaux transgéniques n'exprimant pas d'enzymes antioxydantes (SOD), la durée de vie était diminuée. De même, lorsqu'on surexprimait chez ces animaux ces enzymes, leur durée de vie était augmentée [89], [90]. Dans des conditions physiologiques normales, les cellules régulent la balance entre la production des ROS et leur élimination. Lorsque cette régulation n'est pas effective, les ROS s'accumulent en grand nombre et la cellule va s'en retrouver endommagée. Les ROS, une fois dans la cellule, vont activer la protéine p38MAPK kinase qui régule de nombreux processus dans la cellule, tels que l'inflammation, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Une fois active, elle va notamment cibler la protéine p16^{INK4A}, [91]. P16^{INK4A} est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CDKi) CDK4/6. Lorsque p16^{INK4A} est exprimée, elle empêche CDK4/6 de se lier à la cycline D et donc d'aller phosphoryler Rb. La phosphorylation de Rb par le complexe CDK4/6 et la cycline D est nécessaire pour que celui-ci change sa conformation et libère E2F. E2F libre agit comme un facteur de transcription et permet l'expression des gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire en phase S [92] (**figure 8**).

ii. La radiation ionisante

Depuis la découverte des rayons X en 1895 par l'allemand Wilhem Conrad Ronhgen et de leurs propriétés cytotoxiques, la radiothérapie a été largement utilisée en oncologie. Avec la chirurgie et la chimiothérapie, la radiothérapie reste aujourd'hui un des piliers fondamentaux des traitements. En effet il est estimé qu'au moins 50% de tous les patients avec un cancer vont être soumis à des cycles de radiation ionisante. Lorsque l'on applique la radiation ionisante aux cellules, celle-ci provoque des cassures doubles brins à l'ADN. Ces cassures vont déclencher une réponse aux dommages à l'ADN (RDA) (décrite en détail auparavant) qui active les protéines p53 et Rb, causant un arrêt de la prolifération et l'entrée en apoptose, nécrose, autophagie ou sénescence de la cellule.

Lors de notre projet de recherche, la radiation ionisante fut utilisée comme un analogue fonctionnel de la carboplatine pour causer des dommages directs à l'ADN [93].

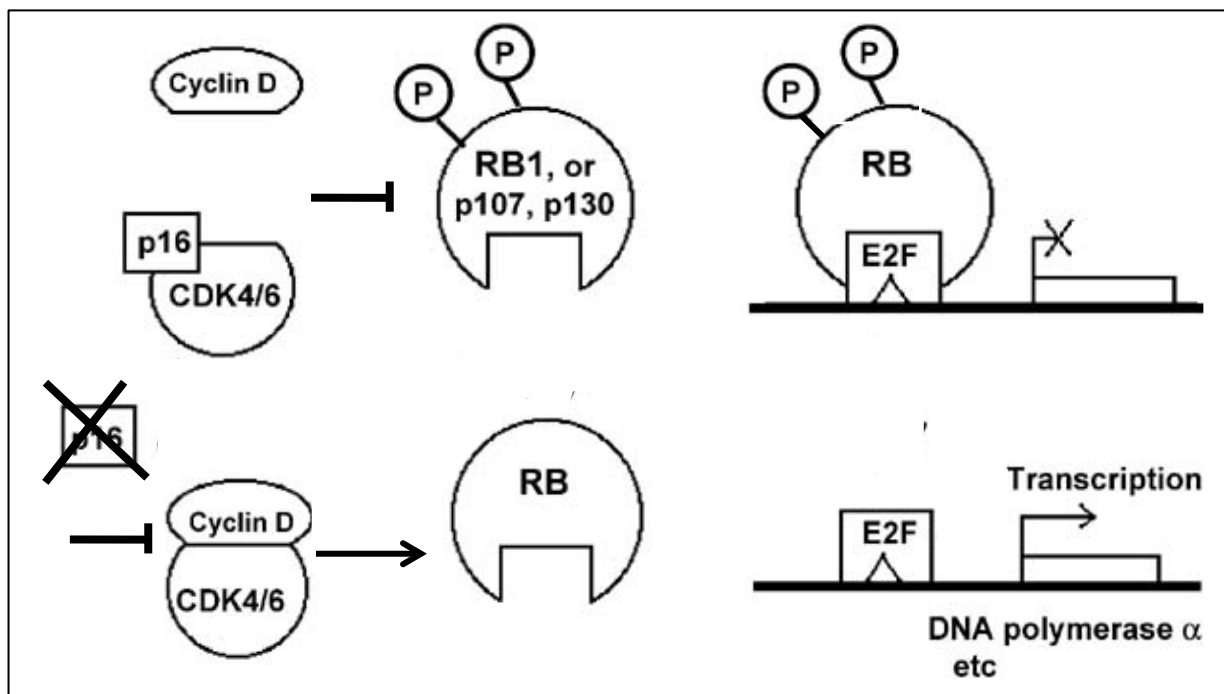


Figure 8. Voie de signalisation de p16^{INK4A} induisant un arrêt de la prolifération en phase G1 du cycle cellulaire. Adapted from Dorothy C Bennett., Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes, with permission from Nature Publishing Group.

c) Sénescence comme barrière à la transformation : Sénescence induite par les oncogènes

Le cancer est une maladie à progression lente, qui trouve à son origine une combinaison d'évènements importants : l'accumulation de mutations et un microenvironnement permissif qui supporte le développement de la tumeur. La carcinogenèse, telle qu'on la connaît aujourd'hui, est un processus graduel où une succession d'évènements se produisent au cours du temps [94], [95]. Durant cette succession d'évènements, il a été proposé que la sénescence induite lors de l'activation d'oncogènes comme Ras ou b-Ras, ait un rôle de barrière en bloquant la prolifération via l'induction de dommages à l'ADN durant la phase S [96], [97]. Dans la littérature, on trouve de nombreux exemples tels que les nævus mélanocytaires : des lésions pré-mélanocytaires, qui sont souvent mutées au niveau d'oncogènes mais qui restent stables, sans évoluer en mélanomes dû à l'induction de la sénescence par b-Raf [98]. Les adénomes du côlon, sont des lésions stables exprimant des marqueurs de la RDA et de sénescence, jusqu'à qu'elles contournent (ou by-pass) la sénescence et deviennent des néoplasies aux stades avancés [99].

1.3 Le phénotype sénescence

La sénescence cellulaire est un phénotype cellulaire complexe et il est difficile de « diagnostiquer » cet état de façon définitive dans une cellule sans mesurer plusieurs paramètres associés à la sénescence. Par exemple, la principale caractéristique des cellules sénescences est l'arrêt de croissance irréversible, cependant cette caractéristique n'est pas suffisante à elle seule puisque des cellules différenciées sont normalement en arrêt de croissance sans toutefois être sénescences. De ce fait, pour déterminer qu'une cellule est sénescence, nous nous servons d'une panoplie de caractéristiques et marqueurs qui, exprimés ensembles, nous permettent de décrire le « phénotype sénescence » [100] (**figure 10**).

a) Arrêt de croissance

Lorsque les cellules sénescence, d'importants régulateurs négatifs du cycle cellulaire sont activés, tels que p53, p21^{CIP1/WAF1}, Rb et p16^{INK4A} [100]. *In vitro*, l'arrêt de croissance peut être

mesuré via différentes méthodes comme le comptage cellulaire, ou encore l'incorporation d'EdU (5-ethynyl-2 deoxyuridine). L'EdU est un analogue de la thymidine qui s'incorpore à l'ADN en cours de synthèse lors de la phase S du cycle cellulaire. Cependant, l'arrêt de synthèse de l'ADN n'est pas spécifique à la sénescence, puisque les cellules quiescentes sont aussi en arrêt de croissance [101].

b) Changement de morphologie

Dans son étude décrivant l'arrêt de prolifération permanent des fibroblastes en culture, Hayflick observa certains changements morphologiques ayant lieu dans les cellules sénescents [64]. Effectivement les cellules sénescents s'élargissent, s'aplatissent et paraissent devenir multinuclées [72], [98]. Les mécanismes régulant ces changements morphologiques restent méconnus, mais il semble qu'ils impliquent des protéines telles que Rb et les fibres de stress d'actine ou encore la redistribution et synthèse de *novo* des protéines [103].

c) Marquage SA- β -Gal

Bien qu'ils soient des caractéristiques des cellules sénescents, les marqueurs précédemment décrits ne leur sont pas exclusifs. A ce jour, le marqueur le plus reconnu et couramment utilisé est le SA- β -Gal (Senescence-Associated- β -Galactosidase) [104]. Ce marquage vise à mesurer par coloration enzymatique *in situ* l'activité de l'enzyme β galactosidase lysosomiale en pH acide (pH 6) [105]. Lorsque les cellules sont sénescents, leurs tailles ainsi que leurs masses lysosomiales augmentent, ce qui explique l'augmentation de l'activité enzymatique [106], [107]. Toutefois, il reste à noter que cette enzyme *per se* n'est pas impliquée dans l'induction ou le maintien du phénotype sénescents [107].

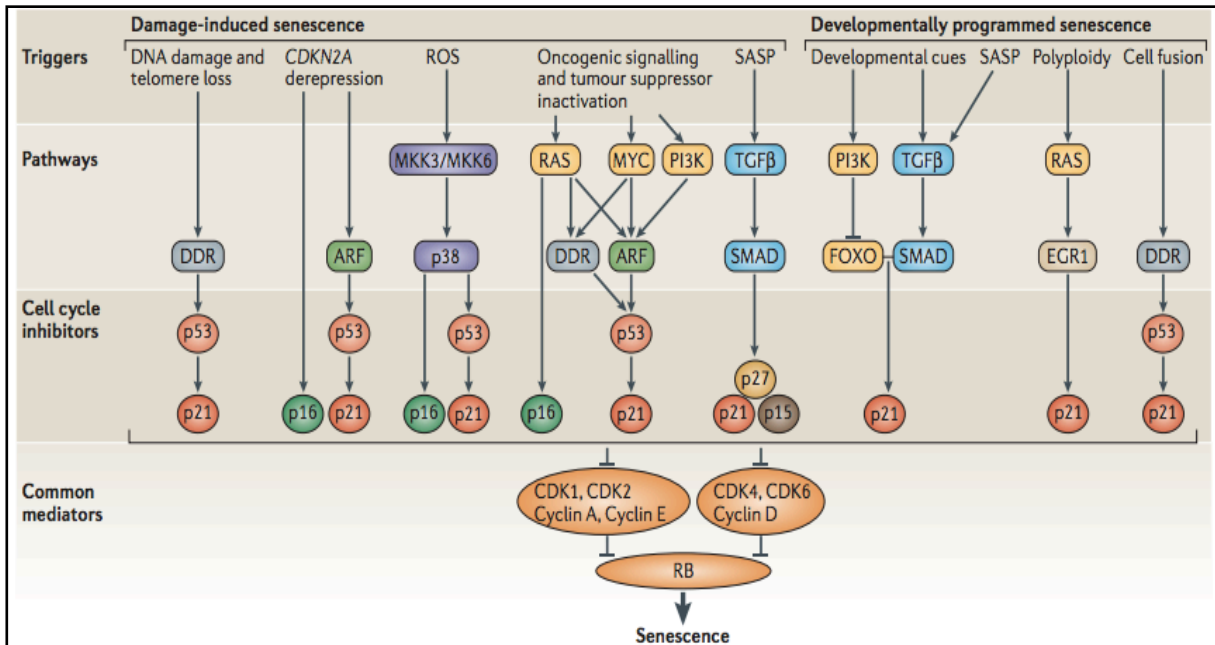


Figure 9. Voies moléculaires induisant l'entrée en sénescence. Reprinted from Daniel Muñoz-Espín et Manuel Serrano., Cellular senescence: from physiology to pathology, with permission from Nature Publishing Group.

d) Expression des gènes suppresseurs de tumeurs

Tel que déjà dit, de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs jouent des rôles cruciaux dans le développement du phénotype sénescence tels que p53, p21^{CIP1/WAF1}, Rb et p16^{INK4A} [100] (**figure 9**), c'est pourquoi nous les utilisons *in vitro* et *in vivo* comme des biomarqueurs. Des protéines telles que p16^{INK4A} et Rb sous sa forme hypophosphorylée s'accumulent dans les cellules sénescence. La protéine p21^{CIP1/WAF1} est un autre inducteur de la sénescence, en bloquant la progression du cycle cellulaire. D'autres inhibiteurs des CDK comme p15 ou p27^{Kip1} seraient aussi des inducteurs potentiels de sénescence moins étudiés [65].

e) DNA SCARS (distinct nuclear structures that sustain damage induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion)

Les DNA SCARS sont une autre marque couramment retrouvée dans les cellules sénescence. Suite à un dommage à l'ADN, la RDA se déclenche et ceci entraîne la formation des foyers de dommage à l'ADN. Lorsque le type de dommage est assez fort pour induire la sénescence,

comme dans le cas de cassures complexes et du raccourcissement ou du bris des télomères, ceci se conclut par des dommages irréparables. Des foyers de 53BP1 et γ H2AX vont s'accumuler et persister. On parle alors de DNA SCARS. Contrairement aux foyers transitoires, les DNA SCARS colocalisent avec les corps nucléaires PML et aussi avec la protéine CHK2 [83], [108].

Ces DNA SCARS auraient un rôle de support dans l'arrêt de croissance et la sécrétion inflammatoire [108].

f) Remodelage de la chromatine

Une autre caractéristique des cellules sénescents est les foyers d'hétérochromatine. L'activation de p16^{INK4A} empêche l'hyperphosphorylation de Rb et donc son activation et la progression dans le cycle cellulaire. Rb hypophosphorylé entraîne la formation des foyers d'hétérochromatine : SAHF [109]. Ces SAHF vont contribuer à la répression transcriptionnelle de plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire, tels que la cible d'E2F : la cycline A, nécessaire à la progression en phase S du cycle cellulaire. A ce jour, de nombreuses protéines présentes dans les SAHF ont été identifiées, comme HMGA qui participent à l'induction et au maintien du SAHF, la forme méthylée de l'histone H3 (H3K9Me2/3) et aussi la protéine HP1 [110]. Nous pouvons détecter les régions condensées de la chromatine *in vitro* à l'aide des marqueurs de l'ADN tels que le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Le rôle du SAHF serait donc de contribuer au maintien de l'arrêt de croissance.

g) Le PSAS (phénotype sécrétoire associé à la sénescence)

Les cellules sénescents secrètent, généralement une panoplie de facteurs connus sous le nom de PSAS. Le PSAS est associé à la présence des dommages à l'ADN dans les cellules sénescents et à l'activation de NF- κ B. La composition du PSAS est très variable et inclue des facteurs solubles, telles que les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8 entre autres, des facteurs insolubles comme la fibronectine [111] et des protéases telle que MMP-1 et -3 [112] que l'on peut quantifier facilement par des expériences d'ELISA ou d'essais V-PLEX. Cette technique permet d'évaluer la sécrétion de plusieurs cytokines de

manière simultanée dans un même essaie.

C'est précisément le PSAS qui donne un côté obscur à la sénescence, puisque la sécrétion de ces facteurs entraîne des changements dans le microenvironnement tissulaire pour le rendre plus permissif au développement et à la prolifération des néoplasies [111]. La sénescence est donc loin d'être un arrêt de prolifération stérile mais plutôt un éternel défi entre la balance anti-tumorale et pro-tumorale.

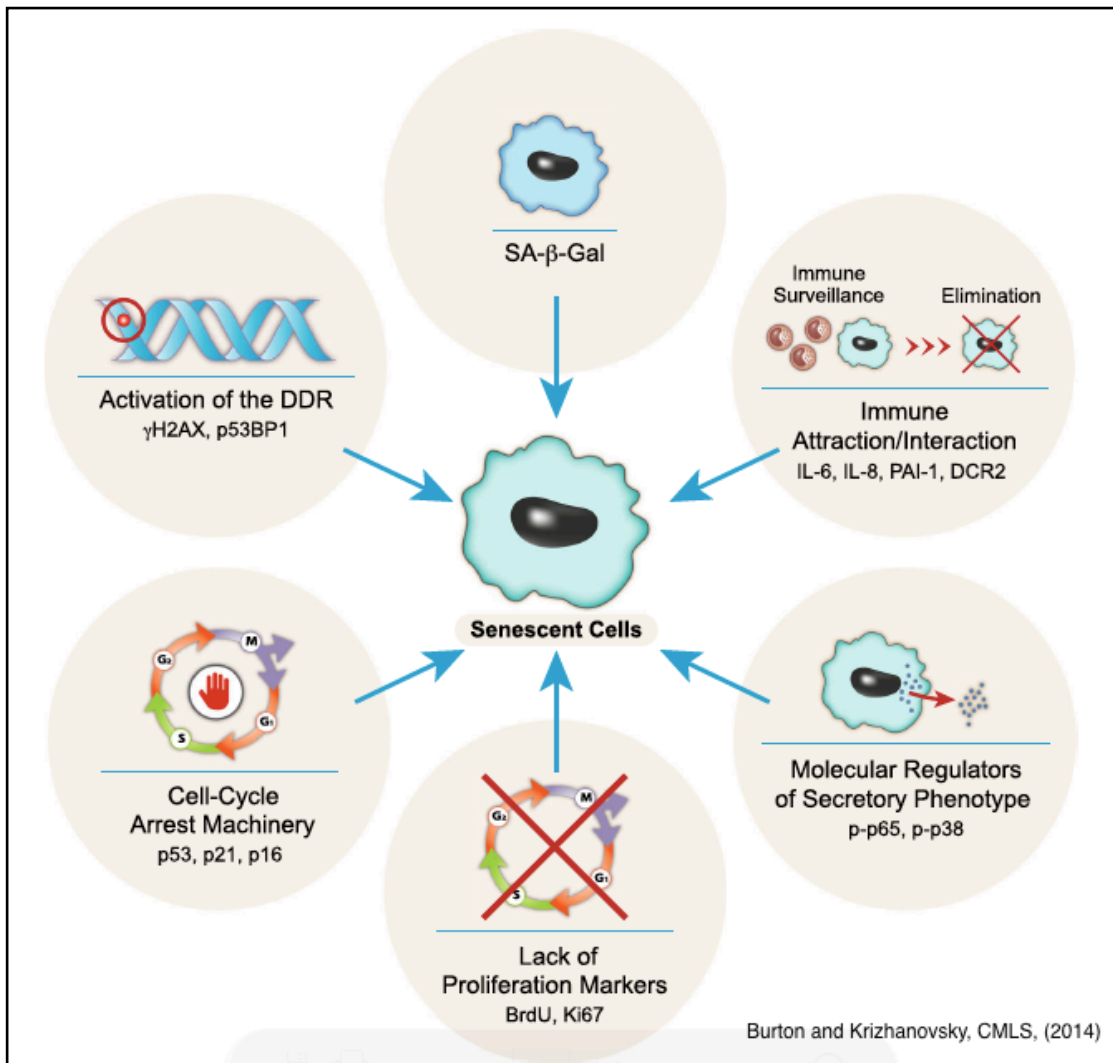


Figure 10. Résumé des marqueurs déterminants le phénotype sénescence. Reprinted from Dominick G. A. Burton., Physiological and pathological consequences of cellular senescence. With permission from Springer.

1.4 La sénescence induite par la thérapie contre le cancer (TIS)

La caractéristique la plus importante des cellules cancéreuses est leur capacité de s'immortaliser et de proliférer de manière incontrôlée. Cela suggère que pendant le processus de carcinogénèse, les cellules cancéreuses ont échappé à la sénescence. En accord avec cette hypothèse, on observe que les gènes suppresseurs de tumeurs les plus importants pour l'induction de la sénescence, tels que p53, p16^{INK4A} et Rb sont souvent mutés dans les cancers [94]. On pourrait donc supposer que la sénescence ne serait pas fonctionnelle dans ces cellules, mais ce n'est pas le cas. En effet, les cellules cancéreuses peuvent aussi entrer en sénescence prématurée (en opposition à la sénescence induite par des stress réplicatifs qui survient à la fin du potentiel prolifératif de la cellule) suite à différents stress. Les voies moléculaires permettant l'entrée en sénescence étant nombreuses, il est peu probable qu'une cellule cancéreuse soit mutée pour la totalité de ces voies. La littérature regroupe de nombreux exemples montrant comment les cellules cancéreuses sénescent suite à des traitements en utilisant des voies dépendantes ou indépendantes de p53. Pour approfondir plus à fonds ce sujet vous pouvez vous référer à l'annexe 1 [113].

1.5 État des connaissances : La sénescence dans le cancer de l'ovaire

Plusieurs évidences dans la littérature démontrent que la sénescence peut être détectée dans des cellules cancéreuses ovariennes. Toutefois, ces études utilisent des lignées cellulaires immortalisées et ne font aucune distinction entre les différents types histologiques/génétiques des cancers ovariens.

Les voies moléculaires conduisant à la sénescence dans les cancers ovariens semblent nombreuses, ce qui, en plus de démontrer la complexité du phénotype sénescent, ouvre la porte vers la découverte de nouveaux acteurs impliqués dans le développement du phénotype. Parmi les différents acteurs induisant l'entrée en sénescence des cellules du cancer de l'ovaire nous retrouvons FOXO1. En effet, lorsque l'on traite avec la progestine des cellules cancéreuses exprimant le récepteur de la progestérone, celles-ci entrent en sénescence et surexpriment la protéine FOXO1. Pour induire l'entrée en sénescence, FOXO1 permet la transcription de plusieurs CDKi tels que p21^{CIP1/WAF1}, p15, p16^{INK4A} et p27^{Kip1} qui induisent

l'arrêt du cycle cellulaire. Nous sommes sûrs que la progestine est en train d'induire de la sénescence et non de la quiescence puisque suite au traitement nous observons dans la cellule une augmentation du marqueur SA- β -gal qu'est spécifique aux cellules sénescents. Curieusement, en clinique, lorsque la tumeur exprime les récepteurs à la progestérone (PR), les femmes ont une survie plus longue sans progression de la maladie. Ces études mènent à la conclusion que l'utilisation de thérapies combinées avec des agonistes de PR pourrait être bénéfique dans les thérapies anti-cancer de l'ovaire, possiblement en induisant la sénescence [114].

Une autre étude démontre que la cisplatine est capable d'induire l'entrée en sénescence des cancers de l'ovaire. Dans cette étude, lorsque la protéine GRP78 était absente ou très peu exprimée, les tumeurs des femmes étaient positives pour des marqueurs de sénescence. GRP78 est une chaperonne induite lors de stress cellulaires et qui se retrouve localisée dans le réticulum endoplasmique. Lorsqu'on traite les cellules avec la cisplatine il se produit une augmentation du calcium dans le cytoplasme chez les cellules du cancer de l'ovaire; ce qui conduit à une induction de la sénescence [50]. GRP78 agirait à ce niveau, lorsque surexprimé, en inhibant l'efflux du calcium du réticulum vers le cytoplasme et donc l'entrée en sénescence [115], [116]. De plus, ils montrent que, *in vitro*, les lignées cancéreuses A2780 traitées avec la cisplatine entraient en sénescence. Ils ont proposé qu'une surexpression de GRP78 rendrait les cellules résistantes à la cisplatine en les empêchant d'entrer en sénescence. Cette sénescence post-traitement serait induite via la voie moléculaire de p21^{CIP1/WAF1} et CDC2. En conclusion, ils suggèrent que GRP78 aurait un rôle anti-sénescence dans le cancer de l'ovaire, et que des futures thérapies invalidant GRP78 pourraient aider à réduire la résistance à la cisplatine dans le cancer de l'ovaire [116].

Une autre protéine impliquée dans la sénescence dans le cancer de l'ovaire est Wnt-5. En clinique, une faible expression de Wnt-5 corrèle avec une survie globale réduite. Lorsque l'expression de Wnt-5 est restaurée cela inhibe la prolifération des cellules du cancer de l'ovaire *in vitro* et *in vivo*. Cette étude propose que Wnt-5 est un antagoniste de la voie canonique Wnt/ β -caténine et induit la sénescence en activant la translocation de HIRA aux PML bodies. Ici encore, la restauration de la sénescence chez ces cellules est proposée comme une nouvelle thérapie dans le cancer de l'ovaire [117].

D'autres études ont montré que le resveratrol administré en combinaison avec la cisplatine est capable d'induire la sénescence dans les cellules du cancer de l'ovaire *in vitro* [118].

Deux miR ont aussi été identifiés comme des acteurs de la sénescence : miR-433 [119] et miR-506 [120]. Lorsque miR-433 est surexprimé, il cible CDK6 et empêche la phosphorylation de Rb ce qui inhibe donc la progression en phase S du cycle cellulaire [119]. Mir-506 à son tour, lorsque qu'il est surexprimé *in vitro* cible la voie moléculaire CDK4/6-FOXM1 pour induire l'arrêt du cycle cellulaire et le phénotype sénescence [120]. En outre, les cancers de l'ovaire ont une dépendance "addicted" à la protéine c-MYC qui est surexprimée dans 30-60% des cancers de l'ovaire et qui a été récemment impliquée dans le phénotype sénescence [121]. En effet, lorsque l'on inactive c-MYC, cela provoque l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses en induisant l'entrée en sénescence via l'induction de la protéine p27^{Kip1} et la diminution de l'expression de la cycline A ainsi que de l'activité CDK2. Ces événements combinés empêcheraient la progression de la cellule en phase S et G2 du cycle cellulaire [121].

En somme, ces travaux ont permis de suggérer fortement que les cellules cancéreuses de l'ovaire maintiennent la capacité d'entrer en sénescence. Cependant, la limite de ces études réside dans leurs modèles qui utilisent des méthodes d'inactivation génétique ou de surexpression de certaines protéines, en excluant ainsi la capacité intrinsèque des cellules du cancer de l'ovaire à entrer en sénescence sans manipulations génétiques/moléculaires préalables.

1.6 Bénéfique ou néfaste : impact des cellules cancéreuses sénescences dans le microenvironnement tumoral

Lorsque l'on regarde la caractéristique principale des cellules sénescences qui est un "arrêt permanent de la prolifération", on peut apercevoir l'aspect positif de cette propriété et l'avantage d'un tel arrêt de croissance dans le cas des cancers. Cependant, lorsque l'on regarde plus en détail les autres caractéristiques du phénotype sénescence, comme la sécrétion des facteurs dans le microenvironnement (PSAS), l'impact positif ou négatif est plus ambigu. En effet, le PSAS est composé de plusieurs facteurs avec des rôles souvent antagonistes. Cela

soulève donc la question : le PSAS est-il bénéfique ou préjudiciable dans le contexte du cancer ?

a) Sécrétome supresseur de tumeurs

Les cellules cancéreuses capables d'entrer en sénescence secrètent des facteurs dans le PSAS qui peuvent avoir des rôles bénéfiques sur le résultat de la thérapie. Par exemple, l'effet pro-inflammatoire du PSAS peut attirer des cellules immunitaires tels que les Natural Killers (NK) [122], [123], les macrophages et les lymphocytes T qui aideraient à l'élimination des cellules sénescents cancéreuses et des autres cellules cancéreuses [124]. Le PSAS est aussi composé de maspin, un facteur anti-angiogénique [125]. D'autres facteurs tel que l'IGFBP7 secrété par les mélanocytes induisent et renforcent le phénotype sénescents des cellules avoisinantes [126]. IL-6 et IL-8, les deux facteurs les plus largement caractérisés dans le PSAS, ont aussi été impliqués dans le maintien de la sénescence de manière autonome et non autonome dans des cellules endommagées [127].

b) Sécrétome promoteur de tumeurs

Certains facteurs du PSAS vont avoir des rôles préjudiciables dans le microenvironnement tumoral et sur les cellules avoisinantes, cancéreuses et normales. Les facteurs GROs (Growth Related Oncogenes) [128] et l'amphiregulin vont stimuler la prolifération des cellules dans les cancers du sein et de la prostate respectivement [129]. De plus, la sécrétion des métalloprotéases telles que MMP-3 (matrix métalloprotéase 3) augmente la dégradation de la matrice extracellulaire, promouvant ainsi la migration des cellules cancéreuses [130]. Les deux facteurs les plus "populaires" du PSAS, IL-6 et IL-8, sont aussi connus comme des promoteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) ce qui stimule l'invasion des cellules malignes [131].

Pour l'instant il est donc clair que le rôle du PSAS reste encore à être élucidé rendant ainsi compte que le rôle même de la sénescence reste encore lui aussi à être dévoilé dans le contexte du cancer. Pour approfondir plus à fonds ce sujet vous pouvez vous référer à l'annexe 1 [113].

Hypothèse et Objectifs

I. Prémisse

Les traitements actuels contre le cancer de l’ovaire causent des dommages à l’ADN, déclenchant donc l’activation d’une pléthore de voies de signalisation cellulaire incluant la RDA. Ces différentes voies moléculaires aboutissent à des destins cellulaires différents : la mort de la cellule, sa survie grâce à la réparation du dommage ou encore sa sortie permanente du cycle cellulaire, connue sous le terme de sénescence. Généralement en thérapie anticancéreuse, le but est d’éradiquer la masse tumorale en provoquant la mort des cellules malignes. Malheureusement, cela est bien souvent impossible. Par conséquent, mieux connaître au niveau moléculaire comment les différents destins cellulaires vont impacter sur la biologie des cancers suite au traitement pourrait nous permettre d’optimiser les effets désirables.

II. Hypothèse

Nous postulons que la sénescence cellulaire est la réponse majeure suite aux traitements anticancéreux du cancer de l’ovaire. Afin de mieux comprendre le rôle de la sénescence dans la réponse aux traitements, nous voulons élucider les mécanismes moléculaires d’entrée en sénescence des COV-SHG et essayer de traduire nos résultats *in vivo* pour déterminer le rôle de la sénescence dans la survie et la progression de la maladie chez les patientes. Notre but ultime est de répondre à cette question :

“Quel est l’impact de la sénescence induite par la thérapie dans le cas des traitements contre le cancer de l’ovaire séreux de haut grade ?”

III. Objectifs

Mon projet de recherche se divise en trois parties :

Partie 1. Dans un premier temps, je désire valider la capacité d'entrer en sénescence des cultures primaires du cancer de l'ovaire séreux. Pour ce faire, je désire comparer l'expression de différents marqueurs de sénescence entre des cellules jeunes en prolifération exponentielle (cultures précoces) et des cellules vieilles (cultures tardives), en arrêt de croissance. Ceci dans le but de valider que l'arrêt de croissance préalablement observé dans les cultures de cellules primaires des COv-SHG était bien une entrée en sénescence et non un autre phénomène d'arrêt de croissance tel que la quiescence. Dans un second temps, je désire déterminer quels sont les mécanismes moléculaires permettant cette entrée en sénescence.

Partie 2. Dans la partie translationnelle de mon projet, je désire utiliser des micromatrices tissulaires (MMT) de la banque de tumeurs de l'ovaire du CHUM pour déterminer, si les COv-SHG sont capables d'entrer en sénescence *in vivo*. Je dois donc réaliser des marquages pour les principaux marqueurs de sénescence détectés *in vitro* (partie 1).

Partie 3. Finalement, pour déterminer si les cellules du COv-SHG sénescents en réponse à la thérapie anti-cancéreuse, je dois traiter les cultures primaires de cellules cancéreuses en croissance exponentielle (jeunes) avec des drogues utilisées en chimiothérapie (carboplatine en combinaison avec le paclitaxel) et la radiation ionisante (10Gy). L'Objectif est de déterminer si ces traitements peuvent induire une entrée en sénescence précoce et si cette entrée en sénescence est comparable au phénotype sénescents observé dans la partie 1 de mon projet de recherche.

Chapitre II. Résultats expérimentaux

Epithelial p16^{INK4A}-associated senescence is a major cell fate decision during high-grade serous ovarian cancer chemotherapy and predicts good clinical outcomes

Lilians Calvo Gonzalez^{1*}, Shuofei Cheng^{1*}, Lise Portelance¹, Isabelle Clément¹, Michael Skulimowski¹, Julie Lafontaine¹, Manon Deladurantaye, Anne-Marie Mes-Masson^{1,2}, Diane Provencher^{1,3} and Francis Rodier^{1,4}

¹ Centre de recherche du CHUM (CRCHUM) et Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC, Canada

² Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

³ Division de gynécologie oncologique, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

⁴ Département de Radiologie, Radio-Oncologie et Médecine Nucléaire, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

Keywords: Apoptosis, Carboplatin, Cell death, Cellular senescence, DNA damage response, Genotoxic stress, Mitotic catastrophe, Necrosis, Necroptosis, Paclitaxel, Premature senescence

I. SUMMARY

Human ovarian cancer (OvCa) is the most lethal gynecologic malignancy, with the existing surgical and chemotherapeutic treatment landscape remaining relatively static in the last few decades. High-grade serous (HGS)-OvCa, the most common form of this disease, usually responds to initial treatment, but recurrence is almost inevitable. Understanding cell fate decisions taken by HGS-OvCa cells in response to chemotherapy could guide new therapeutic opportunities. Here, we find that primary cultures of HGS-OvCa cells predominantly activate therapy-induced senescence (TIS) following exposure to DNA damage or platinum/taxane chemotherapy. HGS-OvCa TIS has been found to rely on the cyclin dependent kinase inhibitor p16^{INK4A}/CDKN2A, which is rarely mutated in HGS-OvCa cases (less than 10%). In addition, TIS in HGS-OvCa cells displays most senescence hallmarks, including persistent DNA damage and a senescence-associated secretome (SASP). While TIS is rapidly induced in primary HGS-OvCa cells, surviving cells that emerge from therapy are mostly p16^{INK4a}-negative. Accordingly, analysis of tissue microarrays built from pre- and post-treatment HGS-OvCa tissues (n=139) reveals partially reduced p16^{INK4A} levels in damaged epithelial tumor tissues weeks after chemotherapy, suggesting that current chemotherapies can enrich for p16^{INK4a}-negative cancer cells. Nevertheless, we find that epithelial p16^{INK4a} levels in pre-/post-treatment HGS-OvCa tissues predict increased patient survival (P<0.008), and that p16^{INK4a} levels in pre-treatment HGS-OvCa epithelium also predict reduced disease progression (P<0.005). Together, our data show for the first time that senescence competence in human cancer cells may have a beneficial impact on treatment outcome for patients, implying that senescence reinforcement strategies could synergize with current HGS-OvCa treatments to benefit the 90% of patients with CDKN2A wild-type, senescence-competent HGS-OvCa tumors.

II. INTRODUCTION

Aggressive high-grade serous ovarian cancer (HGS-OvCa) is the most common form of OvCa and the most lethal gynaecological cancer. Currently, advanced HGS-OvCa is debulked surgically, coupled with adjuvant platinum/taxane-based chemotherapy to target any disseminated cancer cells that have evaded surgical removal. Although primary response rates are high, reduced quality of life associated with multiple rounds of chemotherapy and eventual cancer cell drug resistance impede long-term survival, with a 5-year overall survival rate of 40%¹. During the last thirty years, there have been few major improvements for HGS-OvCa treatment or survival, and the high rates of recurrence and mortality (>80%) underscore the need for the development of targeted therapies and/or the optimization of current therapies^{2,3}. Of particular interest, the high response rate to primary treatment suggests that therapy can be improved by achieving a greater understanding of the molecular basis of the cellular responses involved.

Cellular responses to stress, like radiotherapy- or chemotherapy-induced DNA damage, are termed “cell fate decisions,” and include repair or bypass of the damage, cell death (programmed or catastrophic), and cellular senescence (permanent growth arrest)⁴. Among cell fate decisions, cellular senescence is suggested to play an important role in tissue repair/damage, since senescent cells can persist for extended periods of time and harbor a highly bioactive senescence-associated secretory phenotype (SASP) comprised of growth factors, pro-inflammatory cytokines, extracellular proteases, and extracellular matrix proteins⁵⁻⁹. At the biological level, senescence can be described by two major features: the senescence-associated growth arrest (SAGA) and the SASP^{4,10}. Two key tumor suppressor pathways, p53/p21^{WAF1} and p16^{INK4A}/Rb, have been described to largely mediate the SAGA. The transcription factor p53, encoded by the gene *TP53*, is activated by the DNA damage response (DDR), with downstream targets such as p21 or the cyclin dependent kinase inhibitor (CDKi) p21^{WAF1} mediating cell death or SAGA^{11,12}. The presence of persistent phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK)-mediated DDR signaling in senescent cells is essential to maintain a p53-dependent SAGA and to contribute to the regulation of the SASP¹³. Alternatively, p16^{INK4A}, another CDKi encoded by the *CDKN2A* loci, mediates an irreversible

SAGA via inhibition of CDK4/6 and Rb-mediated establishment of repressive heterochromatin at E2F-responsive S phase-associated promoters¹⁴. Interestingly, p16^{INK4A} appears to mostly regulate the SAGA and has no direct influence on the SASP¹⁵.

In relationship to cancer, senescence is undoubtedly beneficial in its role as an early tumor initiation barrier in pre-neoplastic lesions^{11,12,16}. Therapy-induced senescence (TIS) in damaged cancer cells may also be advantageous by preventing tumor cell growth¹⁷⁻¹⁹. However, opposing functions of the modified tissue microenvironment created by the accumulation of senescent cells suggest that the overall impact of TIS must be evaluated contextually. For example, in a mouse model of liver cancer, the senescent microenvironment was shown to help promote the immune clearance of damaged cancer cells, thereby enhancing therapeutic responses²⁰. In contrast, TIS was demonstrated to promote treatment resistance in a mouse lymphoma model by creating survival niches for residual cancer cells^{9,21}. Currently, the molecular pathways underlying the effects of TIS during human cancer therapy are mostly unknown. Most importantly, whether TIS is overall a beneficial or detrimental process remains to be evaluated.

Investigation of the relationship between ovarian cancer and senescence has already begun. For example, evidence of a DDR barrier often associated with senescence has been reported in hyperplastic fallopian tubes, suggesting that senescence is acting as a tumor suppressor mechanism in this context to restrict pre-neoplastic progression of OvCa^{22,23}. Alternatively, the induction of senescence by a variety of external or internal factors after malignant transformation has been shown in immortalized cell lines derived from various OvCa subtypes, demonstrating that OvCa cells can be forced into senescence via drug exposure¹⁷, growth factor overexpression²², steroids exposure²⁴, or select miRNA overexpression^{25,26}. However, recent studies suggest that immortalized OvCa cell lines might not reflect the full spectrum of the human disease, in light of suspected clonal derivation and low spontaneous immortalization rates²⁷.

Here, using human HGS-OvCa tissues and their associated clinical data, we find that culture stress and chemotherapy-induced damage trigger TIS in primary cancer cell cultures.

Furthermore, HGS-OvCa TIS is found to be accompanied by persistent DDR signaling and expression of the SASP. Importantly, this large cohort of HGS-OvCa tissues and associated clinical data allows us to observe firsthand that p16^{INK4a}-associated senescence in epithelial cancer cells may benefit clinical outcome.

III. MATERIAL AND METHODS

Ethics statement

The CHUM institutional ethics committee approved this study. Informed consent from all patients was obtained before sample collection.

Patients and tissue specimens

Tumor samples were obtained from patients who underwent surgery for ovarian cancer in the Department of Gynecologic Oncology at the CHUM. Disease stages were defined following the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). Tumor histopathology and grade of the patient were classified using world health organization (WHO) criteria. Tissue selection criteria for this study were based on both chemotherapy-naïve and -treated patients. Samples were collected between 1993 and 2014. Patient survival and progression were both calculated from the date of diagnosis, which corresponded to the day of surgery for pre-chemotherapy samples, or 3 months prior to surgery for post-chemotherapy samples.

Overall patient survival was defined as the time from diagnosis to death or last follow-up. Additionally, patients known to be alive at the time of analysis were censored at the time of their last follow-up. Progression was defined as the time from diagnosis to the patient's relapse (disease progression).

In the clinic, progression is defined according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) version 1.1 (anatomical assessment of measurable lesions), as well as serum Cancer Antigen 125 (CA125) levels. A CA125 response is defined as at least a 50% reduction in CA125 levels from a pre-treatment sample. Therefore, clinical data on

progression-free intervals were defined according to blood CA125 levels and tumor size, as assessed by medical imaging.

Pre- and post-chemotherapy epithelial ovarian tumor tissue microarray (TMA)

A gynecologic pathologist reviewed all cases. The grade and type of ovarian carcinoma were identified and areas of interest were marked on hematoxylin and eosin–stained slides. Two cores of 0.6-mm diameter for each tissue sample were arrayed onto recipient paraffin blocks. This tissue array was composed of 340 cores from 170 epithelial ovarian tumors (2 cores per patient) and was built on two recipient paraffin blocks. Clinicopathological details of the cohort are summarized in Table 1.

Immunofluorescence staining of TMA

The TMA was sectioned into 4-um thick slices that were processed and stained using the BenchMark XT automated stainer (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ, USA). Antigen retrieval was carried out with Cell Conditioning 1 (Ventana Medical System Inc.; no. 950-124) for 60 minutes. The prediluted mouse anti-p16^{INK4a} monoclonal antibody (JC18) (Santa Cruz #sc56330) was automatically dispensed and incubated for 60 minutes at 37°C. The following steps were manually done on the bench. After blocking with Protein Block serum-free reagent (Dako #X0909), Alexa-Fluor 568 secondary antibody (#A10037 Life technologies Inc., ON, Canada) was added for 45 minutes, followed by washing and blocking overnight at 4°C with diluted Mouse-On-Mouse reagent (Vector #MKB-2213). This was followed by an incubation of 60 minutes with an epithelial mask of 3 mouse monoclonal antibodies (anti-K7 clone OV/TL 12-30 (Thermofisher #MS-1352-P), anti-K18 clone DC-10 (Santa Cruz #sc6259), and anti-K19 clone ab-1 (Thermofisher #MS-198-P). The Alexa-fluor 750 secondary antibody (#A21037 Life technologies Inc., ON, Canada) was incubated for 45 minutes, followed by DAPI staining for 5 minutes. Staining with sudan black 0.1% for 15 minutes to quench tissue autofluorescence was followed by coverslip mounting using Fluoromount Aqueous Mounting Medium (#F4680, Sigma). The TMA was scanned using a 20X 0.75NA objective with a resolution of 0.325 µm (BX61VS, Olympus). Multicolor images

were segmented and quantified using Visiopharm Integrator System version 4.6.1.630 (Visiopharm, Denmark).

Visiomorph analysis

Immunofluorescence scoring was done using the Visiopharm software. The software measures the mean fluorescence intensity (MFI) of all the pixels in the original photo for a chosen region of a tissue sample (punch). Then, the MFIs corresponding to multiple punches from the same patient are used to calculate the mean MFI for this patient.

Statistical analysis for TMA

A total of 31 patients were excluded from the analysis because of poor quality cores (folded or scratched cores) or lack of epithelial material in cores. Survival curves were plotted using Kaplan-Meier analysis and the log-rank test was used to test for significance. All statistical analyses were done using the Statistical Package for Social Sciences software version 21 (SPSS, Inc.), and statistical significance was set at $p=0.05$.

Primary cell culture

Associated clinical data were available for all HGS-OvCa primary cells (TOV) and primary normal epithelial ovarian cells (NOV) used. The only inclusion criteria used to select primary cells for the study was their stage as defined by the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification. All the primary cancer cells used were high-grade serous ovarian carcinoma, with FIGO stage III and tumor grade ranging from 2 to 3.

Unless otherwise indicated, cells were cultured in OSE media supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS) and 5% streptomycin in a 7% O₂ incubator²⁸. Proliferation was assessed using population doubling (PD) according to the following formula: last PD + (Log (final cell number) - Log (initial cell number plated) x 3.32).

SA- β -gal staining

Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) was assessed as described in Dimri et al., 1995. Pictures were taken with a Nikon Eclipse TE300 microscope (Nikon Instruments Inc. Melville, NY, U.S.A).

Irradiation and chemotherapy

Cells were seeded in appropriate vessels. 48 hours after seeding, cells were treated with either 10 Gy of X-irradiation (IR) using a Cesium 137 irradiator, or a combination of carboplatin (10 μ M) and paclitaxel (30 nM). Carboplatin and paclitaxel were removed after 12 hours. Senescence hallmarks were tested 8 days later.

Immunofluorescence staining of primary cell cultures

Cells were cultured in 4- or 8-well chamber slides (Nunc, Penfield, NY, USA). After treatment and incubation, cells were fixed in 10% formalin (Sigma) for 10 minutes and washed 3 times in PBS for 5 minutes at room temperature (RT). After fixation, cells were blocked for 30 minutes in blocking buffer (1% IgG-free BSA, 4% donkey serum [Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA] in PBS) and incubated with primary antibodies diluted in blocking buffer overnight at 4 °C. Cells were then washed and incubated with secondary antibodies and Hoechst for 1 hour at RT. Finally, slides were washed and mounted with Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) or ProLong® Gold Antifade reagent with DAPI (Life Technologies, Willow Creek Road Eugene, OR, USA). Images were acquired using a Carl Zeiss Axio Observer Z1 fluorescence microscope with Axio Vision software (45 Valley brook Drive Toronto, ON, Canada), and processed with Photoshop CS (Adobe, San Jose, CA, USA).

DNA synthesis detection

Cells in chamber slides were pulsed with the modified thymidine analogue EdU for 48 hours before fixation. Cells were processed as per the manufacturer's protocol to detect the

incorporation of EdU into DNA using Click-iT chemistry (Invitrogen C10340) and Alexa fluor® 488 azide (No. A10266) or Alexa fluor® 647 azide (No. A10277). Following washing with PBS, immunofluorescence staining for p16^{INK4a} was performed as described above. Finally, cells were washed with PBS, mounted with Vectashield (Vector Labs) or ProLong® Gold Antifade reagent with DAPI (Life Technologies, Willow Creek Road Eugene, OR, USA), and analyzed as for IF above.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

RNA was extracted from cells or tissues using TRIzol reagent. Reverse transcription was performed using Invitrogen Superscript III (#11752). qRT-PCR using Sybr green (Invitrogen, The SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix kits) was performed with the following protocol: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, 40 cycles of 15 seconds each at 95°C, 30 seconds at 72°C, and 1 minute at 60°C. The primers used are listed in the table below.

p21 Fw	GGGACAGCAGAGGAAGAC
p21 Rev	TGGAGTGGTAGAAATCTGTCA
TBP Fw	GAGCCAAGAGTGAAGAACAG
TBP Rev	ACCTTATAGGAAACTTCACATCAC
b-actin Fw	TTCCTTCCTGGGCATGGA
b-actin Rev	CCAGACAGCACTGTGTTG
p16 ^{INK4A} Fw	CTGCCCAACGCACCGAATA
p16 ^{INK4A} Rev	GCGCTGCCCATCATCATGA

Antibodies and reagents

Antibody against 53BP1 (1 : 2000) is from Novus Biologicals Oakville, ON, Canada (No. NB100-304). Antibodies against PML (N-19) (1:500) goat (No. sc-9862) and p16^{INK4a} (JC8) (1:100 or 1:300) mouse (No. sc-56330) are from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, United States). Antibody against γ H2AX (ser 139) (1: 2000) mouse (No. 05-636-1) is from

Millipore (Temecula, CA, USA). The secondary antibodies used are all Alexa Fluor from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Cy3 donkey anti-goat (1:800) from Jackson Immuno Research Laboratories (Baltimore Pike, West Grove, PA, USA) (No. 705-165-147), Alexa fluor 594 or 647 donkey anti-mouse for p16^{INK4a} staining (1:800) (No. A1203 and No. A31571), Alexa fluor 488 (1:800) donkey anti-mouse for γ H2AX (1:800) (No. A21202), and Alexa fluor 647 anti-rabbit (1:800) for 53BP1 (No. A31573) are all from Life Technologies (Life Technologies, Grand Island, USA).

SASP profiling

Cells were seeded and treated with paclitaxel/carboplatin as described above, followed by incubation in OSE medium with 15% FBS for another 8 days (media was changed every 2 days). Sixteen hours before performing antibody array, the vessels were washed 3 times with PBS, and the media was replaced with serum-free media to generate serum-free conditioned media. Conditioned media were collected and stored on ice for immediate use on multiplex ELISA, and cell numbers were counted. Multiplex secretome detection was performed according to the protocol provided by Meso Scale Discovery V-PLEX Human Biomarker (40-Plex Kit K15209D-2). In brief, 50- μ l samples, diluted 1:2 or 1:4, were added to the wells. Plates were sealed and incubated for 2 hours at RT. After incubation, plates were washed 3 times with 150 μ l of wash buffer per well, and 25 μ l of detection antibody solution were then added to each well. The plates were incubated for another 2 hours at RT, followed by 3 times washing with wash buffer. Before reading, 150 μ l of 2X read buffer T were added to each well. Finally, the plates were read on the MSD instrument, with signals normalized to cell number.

IV. RESULTS

Premature growth arrest in HGS-OvCa primary cultures

To define a human disease model with which to study HGS-OvCa therapy-induced cell fate decisions, we first retrospectively revised data from a long-standing ovarian cancer tissue bank

that was used to establish more than 30 new OvCa cell lines over a period of more than 15 years. Looking at primary culture data, we found that the vast majority of hundreds of cancer cell primary cultures did not spontaneously immortalize into cancer cell lines. The primary cancer cells almost all behaved in a similar manner: after first establishing in culture for at least 2 passages, they slowed their growth, enlarged, and became flat and vacuolated. Interestingly, there was no evidence of extensive cell death upon permanent growth arrest. For example, in 86 cultures originating from HGS-OvCa solid tumors and ascites collected during the year 2000, serial passaging data revealed that only one ascites-derived primary culture spontaneously immortalized (OV866), while all other cultures permanently stopped proliferating after an average passage number of 4.6 (immortalization rate below 2%) (**Figure 1a-b**). From 2006 to 2007, after cell culture conditions were further optimized, only 15 HGS-OvCa cell lines were established out of 187 primary cultures (8.02% of the total). Thus, despite the aggressiveness of this disease, the spontaneous establishment of cell lines in vitro from HGS-OvCa primary cells is a relatively rare event, as is similarly reported for non-HGS OvCa and many other types of cancers^{27,28}. To further examine why these primary cultures failed to proliferate indefinitely, we obtained several very early–passage HGS-OvCa cultures as well as a culture derived from NOV. These cells were serially passaged at 80% confluence, and while both NOV and HGS-OvCa cultures proliferated exponentially during the first 20 to 30 days in culture, all cells eventually underwent a stable growth arrest (**Figure 1c**). Similar to previous observations, when proliferation stopped, cell numbers remained stable with little evidence of dying or floating cells, suggesting permanent growth arrest. Indeed, and in contrast to early cultures, EdU staining indicative of DNA synthesis was markedly reduced or absent in late-passage NOV and HGS-OvCa cultures, confirming stable cell cycle arrest (**Figure 1d-e**).

Evaluating hallmarks of replicative senescence in HGS-OvCa primary cultures

Based on our observations and similar findings in the literature, we hypothesized that primary HGS-OvCa cells undergo replicative senescence after the initial proliferation phase^{4,28}. To validate this hypothesis, we analyzed a panel of primary HGS-OvCa cultures for key hallmarks of senescence. First, we confirmed the appearance of enlarged and flattened morphology in late-passage cells (**Figure 1f**). At the biochemical level, senescence associated

SA- β -gal activity was strongly increased in late-passage cells, confirming the senescent state of these cells (**Figure 1f-g**). Senescent cells also often harbor a variety of other molecular hallmarks. In particular, they typically exhibit persistent DDR signaling emanating from irreparable DNA double strand breaks (DSBs). These structures are visualized as nuclear DNA damage foci, and are often termed DNA-SCARS²⁹. Consistent with previous studies on replicative senescence³⁰, the primary HGS-OvCa cultures tested here contained elevated levels of cells with more than 3 DNA damage foci (**Figure 2**). Taken together, these data demonstrate that spontaneous immortalization is a rare event in HGS-OvCa cells (less than 10% of the cultures), because the overwhelming majority of these cells retain the ability to undergo replication-associated cellular senescence.

HGS-OvCa replicative senescence is associated with p16^{INK4A}

The tumour suppressor gene *TP53* is activated during replicative senescence in response to cellular stress and is often a major regulator of the SAGA. However, *TP53* is the most highly mutated gene in HGS-OvCa (greater than 85% of cases in multiple studies (**Figure 3a**)³⁸, suggesting that the p53-p21 signaling pathway does not mediate the SAGA in primary HGS-OvCa cultures. We thus screened two TCGA HGS-OvCa mutation datasets for senescence-associated genes in the cBioportal, and discovered that less than 10% of patients have a mutation in the locus *CDKN2A*, which encodes the p16^{INK4A} protein. This CDKi is critical in the Rb senescence pathway, and may be even more essential in the event of *TP53* mutation, such as in HGS-OvCa. We thus tested whether p16^{INK4A} expression could be detected in HGS-OvCa cells in various stages of culture, and found that, as expected for a senescence mediator, early-passage cells did not express p16^{INK4A}, while late-passage cells undergoing cellular senescence were highly positive (**Figure 3b-c**). To verify the state of growth arrest in p16-positive cells, we combined a 48-hour EdU pulse with p16^{INK4A} staining and found mutual exclusion for the 2 parameters, confirming that p16^{INK4A} expression in HGS-OvCa cells was associated with SAGA (**Figure 3b**). In addition, we similarly assessed p16^{INK4A} expression in HGS-OvCa primary cultures that underwent a rapid senescence-like growth arrest after only one passage. Not surprisingly, these cells exhibited strong p16^{INK4A} expression (**Figure 3d-e**),

with the few cells lacking p16^{INK4A} expression showing evidence of DNA synthesis (yellow arrowhead in **Figure 3d**), again strongly suggesting a growth arrest in culture induced by p16.

p16^{INK4A} expression levels in pre-treatment HGS-OvCa tissues correlate with disease progression

Since primary cultures of HGS-OvCa cells seem to retain the ability to undergo p16-associated senescence, we hypothesized that senescence could also be an important cell fate decision in HGS-OvCa tumors following exposure to genotoxic stress, such as chemotherapy. To test this idea, we took advantage of the two most common clinical strategies for OvCa treatment in Canada, immediate surgical resection for treatment-naïve tumors (pre-treatment), and neoadjuvant chemotherapy followed by surgical resection of the residual tumor mass (post-chemotherapy)²³, to build an HGS-OvCa tumor TMA containing 139 samples (75 pre-treatment and 64 post-chemotherapy) (see Table 1 for a summary of the clinical data). We then performed multicolour immunofluorescence to measure the expression levels of p16^{INK4A} specifically in the cancerous epithelial compartment of the cancer tissues. While overall decreases in p16^{INK4A} expression were not significant between pre- and post-treatment tissue samples, we were able to distinguish two subpopulations of tissues with either high (above 2000 MFI) or low p16^{INK4A} levels (**Figure 4a**). We chose the 2000 MFI cut-off because this was the most suitable MFI value to separate the two populations. To further validate this, we repeated the calculations using the median (1983) instead of mean fluorescence intensity, with similar results being observed (data not shown).

Comparing pre- and post-chemotherapy samples, the proportion of cases with high p16^{INK4A} expression decreased from 69% to 48%, respectively (**Figure 4c**), indicating a profile shift after treatment. To validate the protein levels observed with the HGS-OvCa TMA, we performed p16^{INK4A} RT-qPCR expression analysis using RNA directly extracted from the parental tumors of 16 samples selected from the TMA as high and low p16^{INK4A} expressers in both the pre- and post-chemotherapy groups (**Figure 4a**). The correlation between p16^{INK4A} protein levels from the TMA data and p16^{INK4A} RNA levels from the corresponding parental tumor samples was significant (p=0.0186, R² value of 0.3358), confirming that the TMA-measured p16^{INK4A} levels reflected true p16^{INK4A} expression in the HGS-OvCa samples (**Figure 4b**). To reveal any association between epithelial p16^{INK4A} expression levels and

clinical outcome, we performed a Kaplan-Meier analysis separating the p16^{INK4A} high and low expression subgroups. When pooling together all patient samples (pre- and post-treatment), we found that lower expression levels of p16^{INK4A} correlated with poorer survival. When we analyzed the pre- and post-treatment groups separately, we found that low p16^{INK4A} expression in pre-treatment samples correlated not only with poor survival, but also with disease progression. However, in post-treatment samples, a significant correlation existed between low p16^{INK4A} levels and poor survival, but not between p16^{INK4A} levels and disease progression (**Figure 4d**). These results suggest for the first time that senescence competence in human cancer cells, as measured via basal levels of p16^{INK4A} expression, may have a beneficial impact on treatment outcomes for patients with HGS-OvCa.

Primary HGS-OvCa cells undergo p16^{INK4a}-associated therapy-induced senescence

The results presented above suggest that in pre-treatment HGS-OvCa tumors, a large subset of the *p53*-mutated cells remain senescence competent because of their ability to modulate p16^{INK4A} expression. During treatment, these cells would proceed to activate p16^{INK4A}-associated cellular senescence. However, our TMA results did not reveal significantly increased levels of p16^{INK4A} in post-treatment samples. In fact, if anything, p16^{INK4A} was slightly reduced (**Figure 4a**, not significant). Because current HGS-OvCa chemotherapy is never completely effective at killing all cancer cells, this could suggest that post-treatment HGS-OvCa tumors, which are surgically debulked 6 to 8 weeks after the last chemotherapy regimen, represent the subset of non-senescent cancer cells that are already replacing the growth-arrested senescent cancer cell population. This mixed population of senescent and emergent treatment-resistant cells is consistent with the significantly reduced proliferation rates measured in post-treatment samples via Ki67 expression (**Figure 4e-f**). Moreover, the lower p16 levels in the post-chemotherapy TMA samples may also be explained by this mixed composition of senescent cells (activated p16) and emergent senescence-escaping cells (inactivated or never activated p16) in HGS-OvCa tumors after exposure to treatment.

Since ethical and clinical considerations preclude the collection of HGS-OvCa tumor tissue earlier during the chemotherapy regimen, we thus set out to use our primary cell culture system to validate the hypothesis that HGS-OvCa cells undergo rapid chemotherapy TIS. To

mimic patient treatment conditions, early-passage primary HGS-OvCa cells were exposed to ionizing IR (10 Gy) or chemotherapy (10 nM carboplatin and 30 μ M paclitaxel) at levels reflecting chemotherapeutic plasma concentration of patients³¹⁻³⁵. Basic senescence hallmarks were then assessed 8 days after treatment. As suspected, IR-treated TOV primary cells became enlarged, flattened, and stained positive for SA- β -gal, with very few cells detaching from the culture plates (**Figure 5a and b**). Akin to our observations for stress-induced replicative senescence, IR therapy-induced senescence was associated with the activation of p16^{INK4A} and the loss of active DNA synthesis, both of which confirmed stable SAGA (**Figure 5c-e**). Similar results were obtained when cells were treated with carboplatin and paclitaxel, further validating cellular senescence as the major response to therapy in primary HGS-OvCa cells (**Figure 5f**).

Chemotherapy induces a persistent DDR and SASP in HGS-OvCa cells

To further characterize important functional hallmarks of TIS in HGS-OvCa cells, we evaluated the DDR and the SASP in these cells. Early-passage primary HGS-OvCa cells were treated with carboplatin/paclitaxel or IR, and immunofluorescence was used to evaluate the presence of DNA damage and DDR activity. Using the recruitment of the protein 53BP1 into nuclear foci as a marker of DNA double-strand breaks^{9,30}, we evaluated the number of cells with three or more DNA damage foci, which was found to be significantly increased in treated populations (**Figure 6a-b**). DNA double-strand breaks can be transient or can persist as permanent structures termed DNA-SCARS, which can be distinguished from transient foci by their association with the PML nuclear bodies (PML-NBs) involved in DNA repair⁹. Indeed, most persistent 53BP1 foci detected in TIS HGS-OvCa cells were associated with PML-NBs, possibly representing long-standing unrepaired DNA double-strand breaks that maintained continual DDR signaling (**Figure 6a**). Notably, more cells with persistent DNA damage were detected in irradiated cells compared to carboplatin/paclitaxel-treated cells due to direct DNA damage in the former (**Figure 6b**).

The secretome of senescent cells, or SASP, is known to be associated with the presence of persistent DDR signaling, and may have an important impact on the post-treatment tumor microenvironment. We thus evaluated the SASP resulting from HGS-OvCa TIS using Meso

Scale Discovery V-PLEX arrays. TIS-associated behaviours of select secreted factors were evaluated by normalizing the treated/untreated secretion levels to the average value of all samples. As shown in the heat map, carboplatin/paclitaxel treatment increased secretion of SASP factors in all primary cultures tested (**Figure 6c**). These included cytokines (GM-CSF, IL15, IL12), chemokines (MDC, MCP-1, IL8), pro-inflammatory molecules (IL6, IFN- γ , IL4, IL13), angiogenic factors (VCAM-1), and vascular regulators (bFGF), together confirming the presence of a TIS-mediated SASP. Interestingly, the secretome of primary cells treated with IR was different compared to that of the cells treated with carboplatin/paclitaxel, suggesting that different SASPs can be induced in response to varying modes of senescence³⁹. While both carboplatin and IR promote p16-associated senescence, it is possible that other tumor suppressor genes may contribute to the establishment of senescence, thus influencing the variable secretome phenotype. Moreover, IR is capable of promoting more DNA damage, since carboplatin can only induce DSBs during the S-phase of the cell cycle, whereas IR-induced damage is not cell cycle-dependent. Therefore, the two treatments cannot be directly compared.

V. DISCUSSION

In the context of modern, personalized, and precision-focused medicine, understanding cellular responses to the treatment of HGS-OvCa could allow for the manipulation of therapy-induced cancer cell fate decisions to improve patient outcomes.

Altogether, this study demonstrates that primary HGS-OvCa cells treated with IR or chemotherapy drugs rapidly undergo TIS accompanied by persistent DDR signaling (ie, DNA-SCARS) and a SASP-like secretome. These effects not only contribute to the senescent phenotype of the cells, but they also have the potential to alter the post-treatment tumoral tissue microenvironment. The evidence presented here of a p16^{INK4A}-associated replicative senescence combined with the low *CDKN2A* mutation rates in HGS-OvCa patients (3-5%) suggests that the majority of HGS-OvCa tumors retain the ability to undergo TIS in response to chemotherapy. However, several months after treatment, p16^{INK4A}-negative cell populations eventually expand, perhaps prompting the inevitable recurrence and/or resistance to treatment

that occurs in most patients with HGS-OvCa. This suggests that current chemotherapy regimens are indeed efficient at inducing TIS in senescence-competent, p16^{INK4A}-positive cancer cells, but that this TIS induction is suboptimal. A subset of cells is able to survive and potentially emerge from treatment with lower levels of p16^{INK4A}, thus reducing the efficacy of subsequent therapy (**Figure 4f**). In light of this, the enhancement or reactivation of senescence in these cells may be an interesting and novel strategy to pursue in order to harness the curative potential of TIS. For example, the use of a small molecule CDKi may be considered to strengthen p16^{INK4A}-induced activities, or epigenetic regulators to favor increased expression of p16^{INK4A} and other senescence genes.

A few residual questions may arise from this study; for example, can carboplatin/paclitaxel treatments also induce cellular senescence in normal cells or immune cells? While we currently do not have an empirical answer for this question, we can propose some predictions based on our current knowledge. We know that carboplatin induces DSBs during the S-phase of the cell cycle, while paclitaxel can induce a mitotic block only during mitosis (anaphase). Fortunately, since the majority of the cells in the body are quiescent, these two drugs should have little impact on them. As for immune cells, their propensity for apoptosis make them unlikely targets for cellular senescence. However, further investigation is needed to assess the possibility of senescence induction in these two cell populations.

Despite the inefficiency of current treatments to promote a robust and curative TIS, the presence of biologically versatile senescent cells in a treated tumor raises the possibility of influencing other cells within the tumor to positively (or negatively) alter treatment outcomes. For example, the DNA damage–induced secretion of IL6 in the senescent microenvironment of post-chemotherapy murine thymus is sufficient to create a protective niche for a subset of lymphoma cells that can cause cancer recurrence^{9,21}. Similarly, the presence of senescent cells in post-therapy murine breast cancers has been shown to trigger increased SASP levels that are associated with cancer recurrence³⁶. Finally, the secretion of the SASP factor WNT16B (wingless-type MMTV integration site family member 16B) by senescent stromal cells in post-therapy murine prostate provides direct support for continued growth of prostatic epithelial cancer cells. Importantly, increased stromal WNT16B levels have also been detected

in post-therapy human prostate, ovarian, and breast cancers³⁷. Taken together, senescence and its relationship with long-term treatment outcomes must be assessed in a context-dependent manner, which, to our knowledge, remains to be performed in humans.

When we measured senescence competence of HGS-OvCa tumors using p16^{INK4A} expression as a reporter, we found that senescence (or p16^{INK4A} expression) correlated with increased patient survival and decreased disease progression. This correlation was stronger in naïve tumors (non-treated group) than chemotherapy-treated tumors (post-treatment group), perhaps because of the mixed cell composition of a subset of the treated tumors, which may have contained emergent populations of p16^{INK4A}-negative, treatment-resistant cancer cells. The results obtained here using p16^{INK4A} warrant the evaluation of other senescence reporters in the context of HGS-OvCa chemotherapy, with the aim of discovering new predictive biomarkers that would strengthen our ability to stratify patients into high and low responder groups prior to treatment. Similarly, senescence biomarkers should be tested in other types of human cancers to evaluate the role that senescence plays in different contexts. Overall, this dataset represents the first example of a beneficial patient outcome resulting from the induction of senescence in tumor cells during cancer therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank members of the Rodier laboratory for valuable comments and discussions, as well as Suzana Anjos and Christine Tam for language editing. This work was supported by the Institut du Cancer de Montréal and by grants from the Canadian Institute for Health Research [MOP114962] and the Terry Fox Research Institute [1030] to F.R. F.R. is supported by a Fonds de Recherche Québec Santé Junior I career award [22624].

AUTHORS CONTRIBUTIONS

L.CG., S.C., and F.R. designed the study. L.CG., S.C., I.C., M.S., and J.L. performed experiments, while L.CG., S.C., I.C., and F.R. collected and analyzed data. L.P. and M.D. performed tissue banking and provided technical assistance. L.CG., S.C., and F.R. wrote the manuscript. AM.MM. and D.P. provided technical support, molecular pathology expertise, conceptual advice, and revised the manuscript.

VI. REFERENCES

- 1 McGuire, W. P. Maintenance therapy for ovarian cancer: of Helsinki and Hippocrates. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 4633-4634, doi:10.1200/JCO.2009.23.6653 (2009).
- 2 Vaughan, S. *et al.* Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nature reviews. Cancer* **11**, 719-725, doi:10.1038/nrc3144 (2011).
- 3 Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **62**, 10-29, doi:10.3322/caac.20138 (2012).
- 4 Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *The Journal of cell biology* **192**, 547-556, doi:10.1083/jcb.201009094 (2011).
- 5 Coppe, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology* **6**, 2853-2868, doi:10.1371/journal.pbio.0060301 (2008).
- 6 Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in molecular medicine* **16**, 238-246, doi:10.1016/j.molmed.2010.03.003 (2010).
- 7 Hoenicke, L. & Zender, L. Immune surveillance of senescent cells--biological significance in cancer- and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis* **33**, 1123-1126, doi:10.1093/carcin/bgs124 (2012).
- 8 Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO journal* **30**, 1536-1548, doi:10.1038/emboj.2011.69 (2011).
- 9 Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology* **11**, 973-979, doi:10.1038/ncb1909 (2009).
- 10 Beausejour, C. M. *et al.* Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal* **22**, 4212-4222, doi:10.1093/emboj/cdg417 (2003).
- 11 Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 729-740, doi:10.1038/nrm2233 (2007).
- 12 Rodier, F., Campisi, J. & Bhaumik, D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic acids research* **35**, 7475-7484, doi:10.1093/nar/gkm744 (2007).
- 13 Nakamura, A. J. *et al.* Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics & chromatin* **1**, 6, doi:10.1186/1756-8935-1-6 (2008).
- 14 Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-716 (2003).
- 15 Coppe, J. P. *et al.* Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *The Journal of biological chemistry* **286**, 36396-36403, doi:10.1074/jbc.M111.257071 (2011).
- 16 Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. The essence of senescence. *Genes & development* **24**, 2463-2479, doi:10.1101/gad.1971610 (2010).

- 17 Chang, B. D. *et al.* A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer research* **59**, 3761-3767 (1999).
- 18 Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature reviews. Cancer* **10**, 51-57, doi:10.1038/nrc2772 (2010).
- 19 Coppe, J. P. *et al.* A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PloS one* **5**, e9188, doi:10.1371/journal.pone.0009188 (2010).
- 20 Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657-667, doi:10.1016/j.cell.2008.06.049 (2008).
- 21 Gilbert, L. A. & Hemann, M. T. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell* **143**, 355-366, doi:10.1016/j.cell.2010.09.043 (2010).
- 22 Bitler, B. G. *et al.* Wnt5a suppresses epithelial ovarian cancer by promoting cellular senescence. *Cancer research* **71**, 6184-6194, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1341 (2011).
- 23 Coleman, R. L., Monk, B. J., Sood, A. K. & Herzog, T. J. Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **10**, 211-224, doi:10.1038/nrclinonc.2013.5 (2013).
- 24 Diep, C. H. *et al.* Progesterone receptors induce FOXO1-dependent senescence in ovarian cancer cells. *Cell Cycle* **12**, 1433-1449, doi:10.4161/cc.24550 (2013).
- 25 Liu, G. *et al.* MiR-506 suppresses proliferation and induces senescence by directly targeting the CDK4/6-FOXM1 axis in ovarian cancer. *The Journal of pathology* **233**, 308-318, doi:10.1002/path.4348 (2014).
- 26 Weiner-Gorzel, K. *et al.* Overexpression of the microRNA miR-433 promotes resistance to paclitaxel through the induction of cellular senescence in ovarian cancer cells. *Cancer medicine* **4**, 745-758, doi:10.1002/cam4.409 (2015).
- 27 Ince, T. A. *et al.* Characterization of twenty-five ovarian tumour cell lines that phenocopy primary tumours. *Nature communications* **6**, 7419, doi:10.1038/ncomms8419 (2015).
- 28 Sherr, C. J. & DePinho, R. A. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* **102**, 407-410 (2000).
- 29 Fumagalli, M. *et al.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature cell biology* **14**, 355-365, doi:10.1038/ncb2466 (2012).
- 30 Rodier, F. *et al.* DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of cell science* **124**, 68-81, doi:10.1242/jcs.071340 (2011).
- 31 Heijns, J. B. *et al.* Continuous ambulatory peritoneal dialysis: pharmacokinetics and clinical outcome of paclitaxel and carboplatin treatment. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **62**, 841-847, doi:10.1007/s00280-007-0671-9 (2008).
- 32 Sakai, H. *et al.* A phase II study of paclitaxel plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer in Japanese patients. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **48**, 499-503 (2001).
- 33 van der Vijgh, W. J. Clinical pharmacokinetics of carboplatin. *Clinical pharmacokinetics* **21**, 242-261, doi:10.2165/00003088-199121040-00002 (1991).

- 34 Wiernik, P. H. *et al.* Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol. *Cancer research* **47**, 2486-2493 (1987).
- 35 Siddiqui, N. *et al.* A clinical and pharmacokinetic study of the combination of carboplatin and paclitaxel for epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer* **75**, 287-294 (1997).
- 36 Jackson, J. G. *et al.* p53-mediated senescence impairs the apoptotic response to chemotherapy and clinical outcome in breast cancer. *Cancer cell* **21**, 793-806, doi:10.1016/j.ccr.2012.04.027 (2012).
- 37 Sun, Y. *et al.* Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med* **18**, 1359-1368, doi:10.1038/nm.2890 (2012).
- 38 Cancer Genome Atlas Research, N. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609-615, doi:10.1038/nature10166 (2011).
- 39 D. M. Nelson, T. McBryan, J. C. Jeyapalan, J. M. Sedivy, and P. D. Adams, "A comparison of oncogene-induced senescence and replicative senescence: implications for tumor suppression and aging," *AGE*, vol. 36, no. 3, Jun. 2014.

VII. FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1: HGS-OvCa primary cultures undergo replicative senescence. (a) The maximum passage number before growth arrest of 86 HGS-OvCa primary cultures collected during the year 2000. (b) The average number of passages of growth-arrested cultures (85/86) or spontaneously immortalized cultures (1/86) from 2000. (c) Normal epithelial ovarian primary cells (NOV1341G) and primary HGS-OvCa cells (TOV959D, TOV3301D, TOV2356, TOV2267, and TOV3207G) were cultured until they stopped proliferating. The data is reported as population doublings (PD) over time. (d) Representative immunofluorescence images from 24-hour EdU labeling of primary cultures. The quantification of the percentage of EdU-positive nuclei is shown in (e). In both normal ovarian primary culture (NOV1341G) and OvCa primary culture (TOV3011 and TOV959D), DNA synthesis is significantly decreased in later passages. * $P = 0.0106$, as calculated using a ratio-paired two-tailed t -test and the Graphpad Prism 6 software. (f) Representative images of senescence-associated SA- β -gal staining. (g) Quantification of senescence-associated SA- β -gal staining in early- and late-passage NOV1341G, TOV959D, TOV3011D, TOV2356, and TOV2267 primary cultures. * $P = 0.0207$, as calculated using a paired two-tailed t -test and the Graphpad Prism 6 software.

Figure 2: Replicatively senescent HGS-OvCa primary cultures harbor evidence of persistent DDR signaling. (a) At late passages, senescent TOV primary cells scored positive for persistent DNA damage foci (middle panels, detected using 53BP1 immunostaining), and increased PML expression (right panels). DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence (DNA-SCARS) were assessed by counting nuclear foci staining double-positive for both 53BP1 and PML-NBs. (b) Quantification of cells with more than three 53BP1 DNA damage foci. A significant increase is observed in late-passage TOV3011D, TOV2256, and TOV2267, but not in TOV959D cultures.

Figure 3: Replicative senescence in HGS-OvCa primary cultures is associated with p16^{INK4A}. (a) In cBioportal, two large HGS-OvCa cohorts, including 311 cases (provisional) and 316 cases (nature³⁸), display total *TP53* mutation rates of 87% and 95%, respectively. The same cohorts display *CDKN2A* mutation rates of 5% and 3%, respectively. (b) Representative

images of p16^{INK4a} (red) and EdU (green) staining using immunofluorescence in both early- and late-passage primary OvCa cultures. Nuclei are counterstained in blue (DAPI). The quantifications of p16^{INK4a}-positive cells are shown in (c). In TOV3011D, TOV959D, and TOV2356 cells, p16^{INK4a} is significantly increased in later passages * $P = 0.0269$, as calculated using a paired two-tailed t -test and the Graphpad Prism 6 software. (d) Late passage (P5) pre-senescent primary culture TOV3207G is incubated with EdU for 48 hours. Immunostaining of p16^{INK4a} is shown in red and EdU positive cells are marked in green. Arrowheads indicate cells with EdU-positive and p16^{INK4a}-negative signals. (e) Quantification of p16^{INK4a} staining of pre-senescent primary OvCa cells (TOV2965D and TOV3207G); all OV2965D cells are p16^{INK4a}-positive, while 68% of TOV3207G cells are p16^{INK4a}-positive. These cell lines undergo immediate stress-induced premature replicative cellular senescence in one passage.

Figure 4: p16^{INK4a} expression levels in epithelial HGS-OvCa tissues are correlated with disease progression and patient survival. (a) Quantitative p16^{INK4A} protein expression levels are reported in nuclear MFI for pre-treatment and post-treatment HGS-OvCa tissue samples. Single dots represent data from single patients. Multicolor fluorescence immunohistochemistry was performed on HGS-OvCa TMAs consisting of 139 samples (75 pre-treatment and 64 post-chemotherapy). Expression levels of p16^{INK4A} were quantified specifically in the epithelial compartment of the tissues using ViosiomorphDP software. Red-colored dots represent samples that were selected for real-time PCR validation. (b) Real-time PCR results are presented as a heat map using the raw delay Ct values of CDNK2A (p16^{INK4a}), CDNK1A (p21^{WAF1}), and β -actin relative to Ct of TBP. Yellow color represents high Δ Ct, reflecting lower RNA expression, and violet color indicates higher RNA expression (low Δ Ct). Correlation curve between p16^{INK4a} protein expression levels measured using the TMA and RNA expression of p16^{INK4a} measured from the matched tumor tissues are also shown. (c) The red line marking 2000 MFI (4a) divides the tissues into two subpopulations with either high or low levels of p16^{INK4a}. Interestingly between pre- and post-treatment sample, the percentage of high p16^{INK4a} expression decreased from 69% to 48%. (d) Kaplan-Meier analysis of pre- or post- treatment samples with high or low p16^{INK4a} expression levels. (e) Ki67 expression measured in HGS-OvCa epithelial tissues as for p16^{INK4a} in a). *** $P = 0.0006$. (f) A model for the selection of p16^{INK4a}-negative HGS-OvCa cells following chemotherapy

treatment. In the pre-treatment cell population, a large *p53*-mutated cell subset is senescence competent because of high-level p16^{INK4a} expression. During treatment, this majority of cells undergoes p16^{INK4a}-associated cellular senescence. Alternatively, a small subset of cells with low-level p16^{INK4a} or insufficient levels of damage proceeds to death and mitotic catastrophe. Several months after treatment, the p16^{INK4a}-low cell subset that has slowly continued to proliferate in the presence of potential residual DNA damage constitutes the major part of the cell population, allowing the cancer to become more aggressive and malignant. This eventually leads to cancer relapse, possibly accompanied by acquired treatment resistance.

Figure 5: HGS-OvCa primary cultures undergo p16^{INK4a}-associated TIS. (a) Representative images of senescence-associated SA- β -gal staining. The staining is performed 8 days after cells are treated with 10 Gy of IR. (b) Quantification of senescence-associated SA- β -gal staining of TOV primary cultures (TOV3011D, TOV2356, TOV2267, TOV513, and TOV1294G). SA- β -gal staining is significantly increased after treatment. *** $P = 0.0009$. (c) Representative images of EdU labeling (48 hours) and p16^{INK4a} immunofluorescence of TOV2356 following 10 Gy of IR or 12 hours of carboplatin (10 μ M) plus paclitaxel (30nM) treatment. Staining was performed 8 days after treatment. Primary cultures of TOV3011D and TOV959D were similarly treated with 10 Gy of IR. (d) p16^{INK4a} staining in TOV3011, TOV2267, TOV513, and TOV1294G cells is significantly increased 8 days after treatment with 10 Gy of IR. * $P = 0.0213$. (e) EdU labeling quantification reveals a significantly decreased signal after IR treatment. * $P = 0.0128$. (f) Quantification of TOV3011D, TOV2356, TOV513, and TOV1294G 8 days after carboplatin/paclitaxel treatment. EdU labeling, SA- β -gal staining, and p16^{INK4a} staining were increased, while EdU labeling was decreased. * $P = 0.0143$, ** $P = 0.0065$, * $P = 0.0105$ (P values calculated using a paired two-tailed t -test and the Graphpad Prism 6 software). C/P: carboplatin/paclitaxel.

Figure 6: Persistent DDR-associated hallmarks of senescence are detected in primary HGS-OvCa cells after IR/chemotherapy. (a) Immunostaining of 53BP1 (red) and PML nuclear bodies (green) 8 days after treatment with 10 Gy of IR or 12 hours of carboplatin (10 μ M) plus paclitaxel (30nM). Colocalization of 53BP1 and PML (yellow in the zoom panel to the right) reveals the presence of DNA-SCARS. (b) Counts of TOV2356, TOV2267,

TOV513, and TOV3011D cells with more than 3 53BP1 DNA damage foci before and after treatment with IR or carboplatin/paclitaxel. **** $P < 0.0001$, *** $P = 0.005$ (P values were calculated using a two-tailed t -test and the Graphpad Prism 6 software).

(c) Multiplex-based SASP profiling of conditioned media of cells treated with either carboplatin (10 μ M) and paclitaxel (30nM) for 12 hours, or 10 Gy of IR. 6 days following treatment, the conditioned media was prepared (serum-free OSE medium for 16 hours). Fresh conditioned media was used. The heat-map colors indicate the relative fold change in protein levels (yellow for increased levels and blue for decreased levels relative to the average signal). The 17 out of 40 soluble factors with the highest fold changes analyzed are shown here. N.D.: not detectable, C/P: Carboplatin/Paclitaxel, IR: Irradiation, ctrl: Control (non-treated).

Table 1: Patient characteristics of pre- and post-chemotherapy samples in the epithelial ovarian tumor tissue microarray (TMA)

Figure 1: HGS-OvCa primary cultures undergo replicative senescence

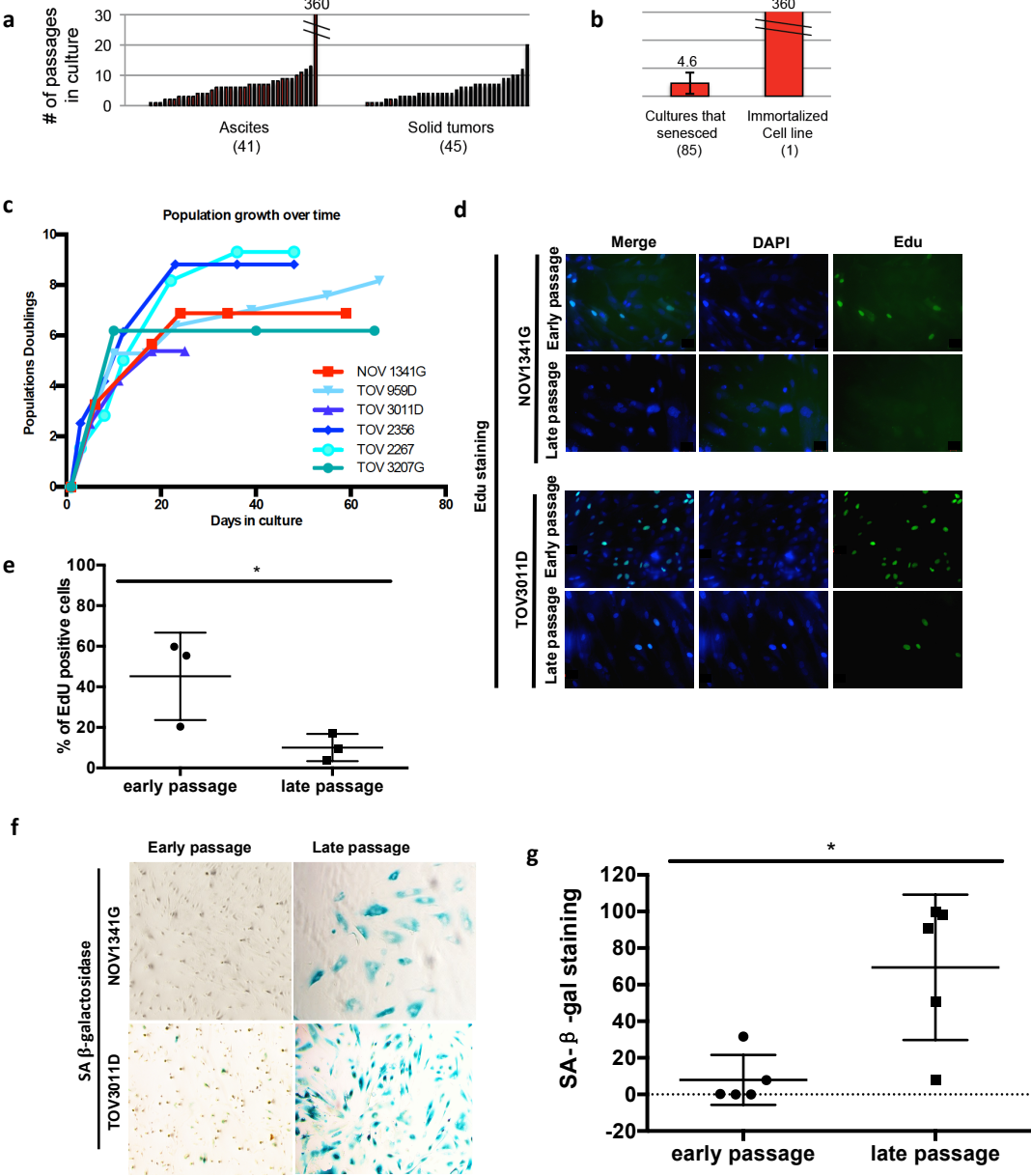
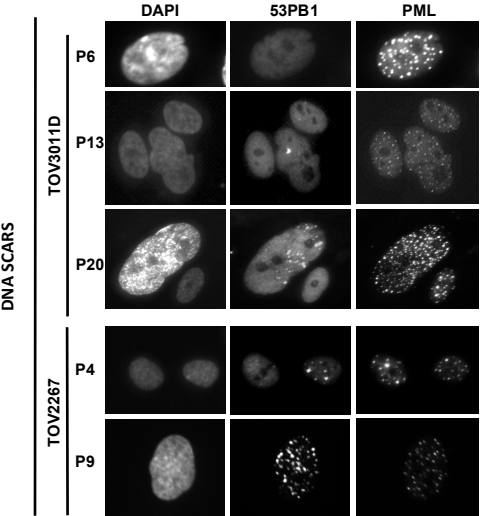


Figure 2: Replicatively senescent HGS-OvCa primary cultures harbor evidence of persistent DDR signaling.

a



b

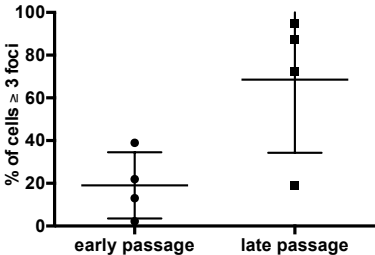


Figure 3: Replicative senescence in HGS-OvCa primary cultures is associated with p16^{INK4a}.

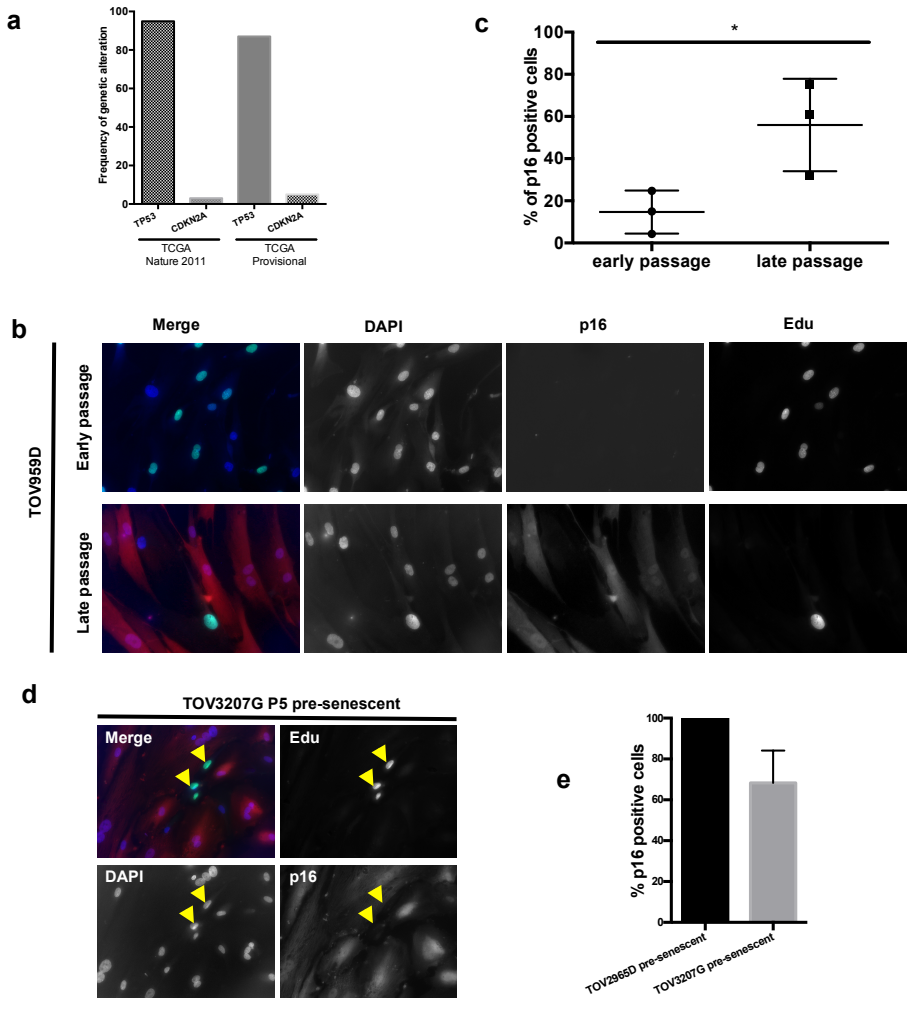


Figure 4: p16^{INK4a} expression levels in epithelial HGS-OvCa tissues correlate with disease progression and patient survival.

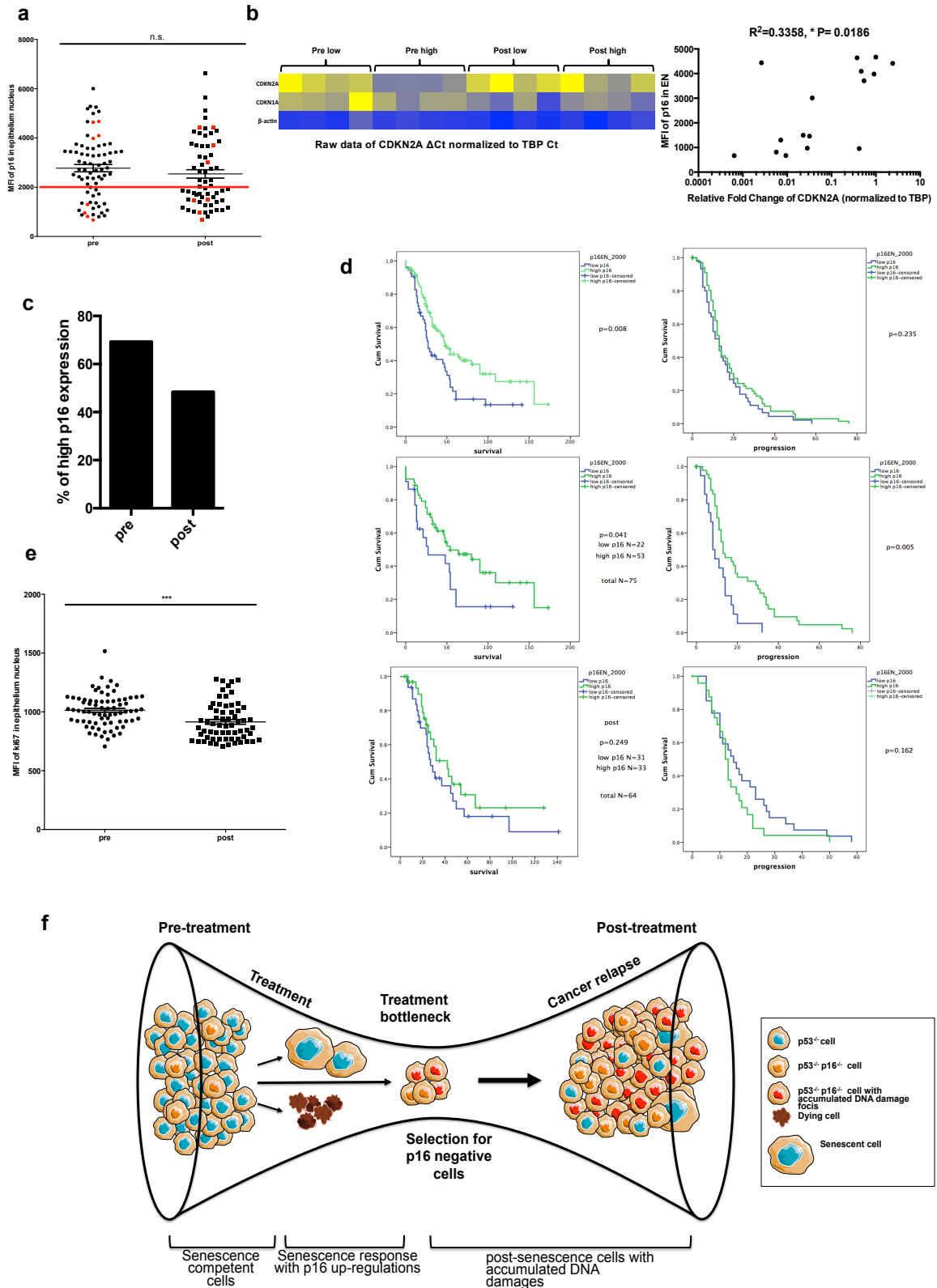


Figure 5: HGS-OvCa primary cultures undergo p16^{INK4a}-associated TIS

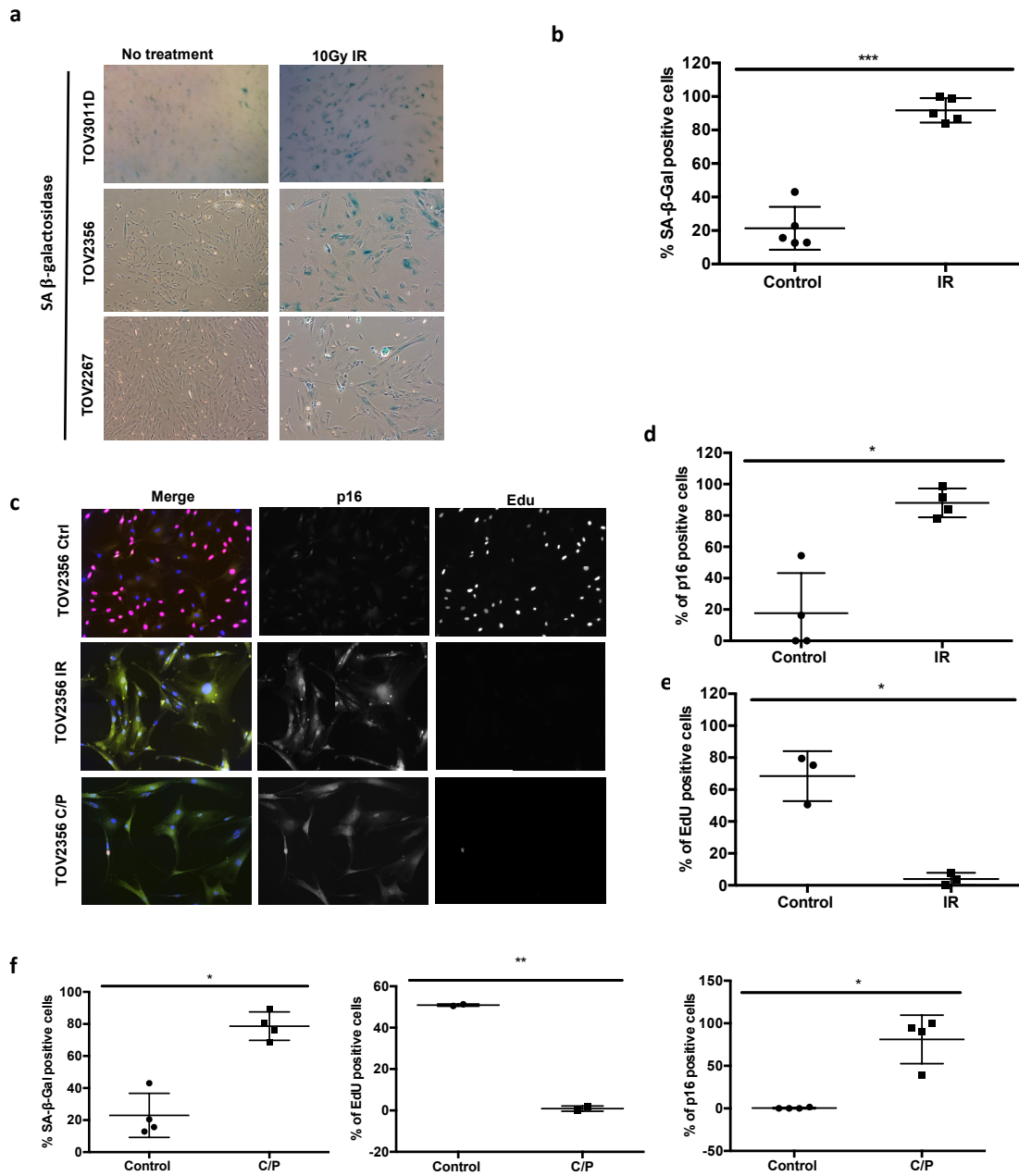


Figure 6: Persistent DDR-associated hallmarks of senescence are detected in primary HGS-OvCa cells after IR/chemotherapy.

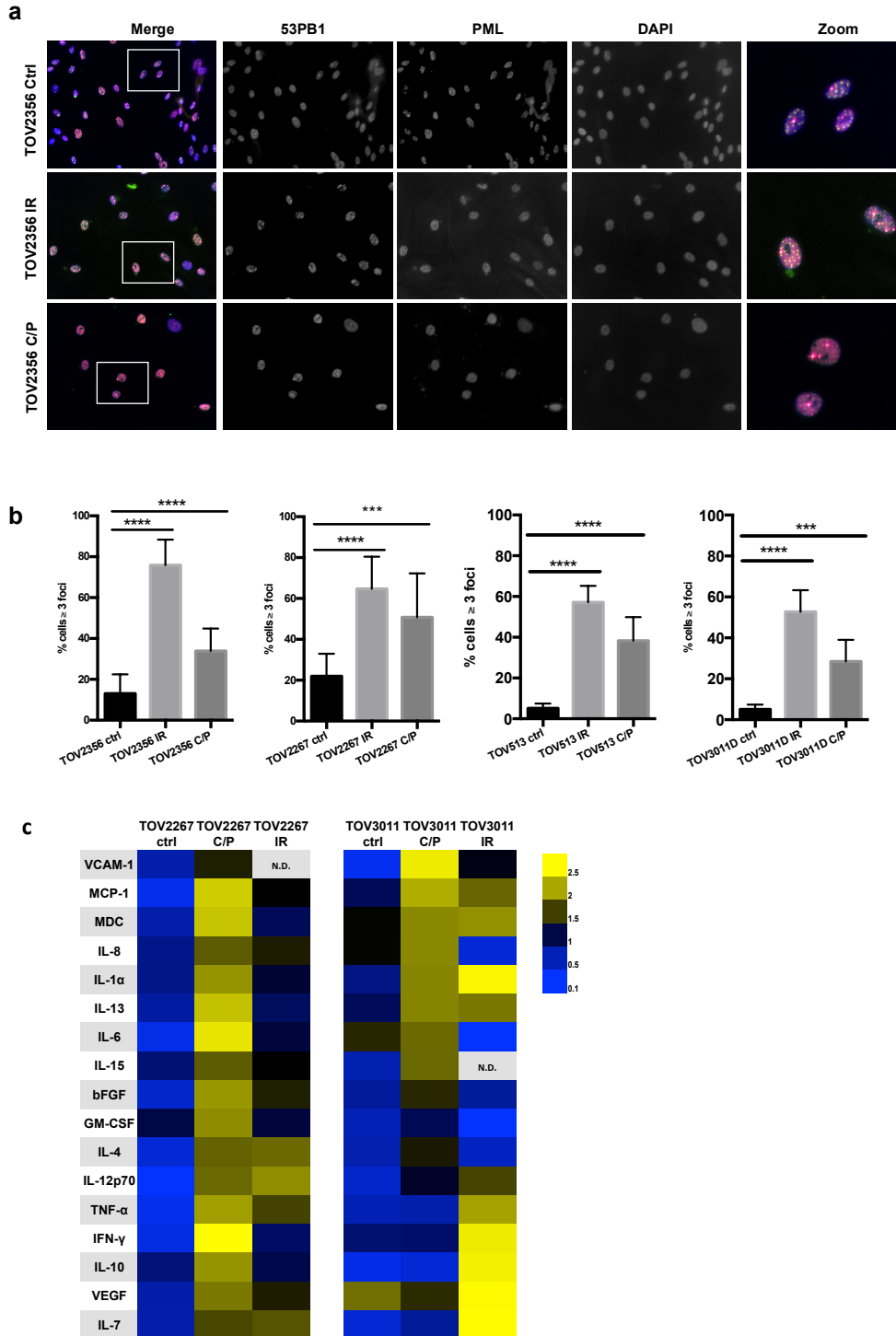


Table 1 : Patient characteristics of pre- and post- chemotherapy samples in the epithelial ovarian tumor tissue microarray (TMA)

		Pre-treatment			Post-treatment		
		low p16 n (%)	high p16 n (%)	overall n (%)	low p16 n (%)	high p16 n (%)	overall n (%)
Age	N	22	53	75	31	33	64
	Mean	58.7	61.1	60.4	60.0	60.4	60.2
	Median	58.5	61.0	60.0	60.0	60.0	60.0
	SD	10.9	9.1	9.7	10.5	9.7	10.0
	Min	34	36	34	38	46	38
	Max	76	79	79	76	81	81
FIGO	unknown	0	0	0	2 (6.5%)	0	2 (3.1%)
	I/II	2 (9.1%)	6 (11.3%)	8 (10.7%)	0 (0%)	1 (3%)	1 (1.6%)
	III/IV	22 (90.9%)	47 (88.7%)	67 (89.3%)	29 (93.5%)	32 (97%)	61 (95.3%)
Residual disease	Unknown	1 (4.5%)	2 (3.4%)	3 (4%)	7 (22.6%)	10 (30.3%)	17 (26.6%)
	<= 1 cm	8 (36.4%)	28 (52.8%)	36 (48%)	18 (58.1%)	15 (45.5%)	33 (51.6%)
	> 1 cm	13 (59.1%)	23 (43.4%)	36 (48%)	6 (19.4%)	8 (24.2%)	14 (21.9%)

Chapitre III : Discussion

La sénescence, mécanisme de “stase cellulaire” découvert il y a presque 50 ans, demeure encore aujourd’hui un sujet très étudié. Originellement, les rôles de la sénescence furent rapidement associés au vieillissement ainsi qu’à la suppression tumorale et plus tard, à d’autres processus physiologiques tels que la cicatrisation et la réparation tissulaire [100]. Plus récemment, l’implication de la sénescence dans le remodelage tissulaire lors du développement embryonnaire a aussi émergé [133]. Depuis très longtemps, nous savons que les traitements anti-cancéreux qui utilisent de fortes doses de composés chimiques ou de radiothérapie sont capables d’induire l’entrée en apoptose ou encore en sénescence des cellules normales. Puisqu’il est maintenant connu que les cellules cancéreuses peuvent quelquefois préserver certains mécanismes suppresseurs de tumeurs régulant ces destins cellulaires dans les cellules normales, notre équipe ainsi que plusieurs groupes internationaux, concentrons nos efforts pour élucider l’impact de la sénescence des cellules cancéreuses induite par la chimiothérapie [134] sur la progression de la maladie et la survie des patients.

Partie 1

“Le stress de culture induit l’entrée en sénescence des cellules primaires du cancer de l’ovaire (COv-SHG)”

Il y a plus d’une dizaine d’années, l’équipe du Docteur Anne-Marie Mes-Massons a mis au point les conditions d’isolation et de maintien en culture des cellules primaires du cancer de l’ovaire [135]. Ces cellules s’avéraient être un puissant outil de recherche puisque à l’époque, la plupart des lignées cellulaires cancéreuses ovariennes décrites provenaient d’ascites, d’infusions pleurales ou de tumeurs ayant déjà reçues de la chimiothérapie/radiothérapie [136]. De plus, les cellules cancéreuses primaires semblaient un bon outil puisqu’elles préservaient certaines caractéristiques de la tumeur de provenance telles que l’expression des cytokératines épithéliales et des délétions chromosomiques spécifiques [135]. Cependant, la culture des cellules primaires s’avéra être plus compliquée que prévu puisqu’il était difficile de maintenir les cellules en culture au-delà de 10 passages ou de les amplifier pendant de longues périodes [135], [136]. Ils ont en effet observé que, après quelques passages, les cellules arrêtaient leur prolifération en culture, mais restaient stables, attachées au support de culture. Cet arrêt de croissance, ressemblant à une entrée en sénescence, ne fut jamais caractérisé. Dans la première partie de mes travaux, j’ai donc réalisé des courbes de croissance pour reproduire le phénotype d’arrêt de croissance originalement observé afin de comparer l’expression de plusieurs marqueurs de sénescence, au sein d’une culture primaire dérivée du même tissu (tumeur): la population jeune (pJN) peu après la mise en culture (en phase de croissance exponentielle) versus la population vieille (pVL) lors du ralentissement, voir l’arrêt, de la croissance (**figure 1c**).

Nous avons choisi de caractériser les empreintes de sénescence suivantes : arrêt de croissance à l’aide du marqueur EdU, SA- β -Gal, marqueurs de dommages persistants de l’ADN (DNA-SCARS), changements de morphologie et aussi expression de CDKi tel que p16^{INK4A}. À noter que la voie de signalisation p53 est l’un des mécanismes moléculaires les plus communs d’entrée en sénescence. Cependant, les cancers de l’ovaire sévères de haut grade sont fortement mutés en p53 (plus de 90%) (**figure 3a**). De ce fait, cette protéine n’était donc pas la bonne cible pour expliquer l’induction de la sénescence dans notre modèle [10], [12].

Nous avons observé (**figure 1**) que lorsque les cellules entrent dans la phase d’arrêt de

croissance, elles devenaient positives pour toutes les empreintes de sénescence analysées, à l'inverse des cellules dans les cultures primaires jeunes en croissance exponentielle. Par exemple, l'activité SA- β -Gal augmentait, et le marqueur de prolifération EdU était diminué. Dans chaque cas (cultures individuelles dérivées de patientes différentes), il y avait des variations significatives entre les deux populations cellulaires testées (pJN versus pVL) suggérant que les vieilles cellules qui étaient arrêtées dans le cycle cellulaire devenaient sénescents.

Nous avons aussi observé une augmentation de l'expression de la CDKi p16^{INK4A} lorsque les cellules étaient dans la phase sénescence (pVL) suggérant que cette CDKi pourrait être responsable du maintien de l'état sénescence (**figure 3**). À ce sujet, il était intéressant de noter que l'expression de p16^{INK4A} ne co-existait jamais avec un marquage EdU positif dans une même cellule. Cette exclusion mutuelle entre les deux marqueurs fut observée grâce à des doubles marquages en immunofluorescence pour EdU et p16^{INK4A} sur des cellules individuelles. En outre, lorsque les cellules entraient dans la phase de sénescence, elles devenaient positives pour des foyers nucléaires du marqueur 53BP1 (**figure 2**), qui est une protéine qui participe à la réparation des dommages de l'ADN et qui s'accumule en foyers dans certaines zones de la chromatine dans les cellules sénescents (DNA-SCARS).

Nous pensons que le déclencheur de la sénescence dans ce modèle est le "choc de culture" connu pour avoir la capacité de générer une réponse chez la cellule face à un stress. La culture cellulaire, même dans des conditions dites "optimales", ne reflète pas l'environnement physiologique des cellules animales. Dans le corps, les cellules sont en étroit contact avec leur microenvironnement et entre elles entraînant des interactions essentielles avec les cellules voisines, ce qui n'est pas possible en culture cellulaire. Pour cette raison, lorsque les cellules sont en culture, il y a plusieurs nutriments essentiels et facteurs de croissance qui manquent à leur environnement. Similairement, les conditions d'hyperoxie sont extrêmement différentes des conditions physiologiques et les cellules sont exposées de façon continue à des facteurs mitogéniques (sérum). Toutes ces caractéristiques de la culture font en sorte que les cellules soient en situation de stress, les poussant donc à déclencher une réponse au stress se concluant par leur entrée en sénescence via l'activation de mécanismes supresseurs de tumeurs [137].

Évidemment, cette entrée en sénescence provoquée par le stress de culture ne reflète pas les stress pouvant potentiellement déclencher la sénescence *in vivo* chez les patientes puisque la culture est un système artificiel. Toutefois, ces premières expériences nous ont dotées d'un modèle démontrant que les cellules du cancer de l'ovaire détiennent des mécanismes intrinsèques pouvant enclencher la sénescence. Ce modèle peut donc nous aider à comprendre qu'elle est la voie moléculaire utilisée par ces cellules cancéreuses primaires pour sénescer et donc établit la base de nos futures expériences sur les voies de signalisation régulant l'entrée en sénescence p16^{INK4A}-dépendante.

Partie 2

“ Détection des marqueurs de sénescence dans les tumeurs des patientes “

Lorsque nous avons observé l'entrée en sénescence *in vitro* des cellules primaires du cancer de l'ovaire, la question suivante naturellement posée fut : “ Est ce que, *in vivo*, les tumeurs des patientes sont positives pour des marqueurs de sénescence ? ”

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé la banque de tissu du CRCHUM qui a mis à notre disposition plus de 80 échantillons de tumeurs de cancer de l'ovaire pré et post-chimiothérapie. Il est primordial de souligner que c'est grâce aux biobanques cancéreuses mises à notre disposition qu'un tel projet de recherche a pu être mené. Pour réaliser cette étude, les échantillons tissulaires de cancer, reliés aux données sur l'historique clinique des patientes, furent organisés sur des micromatrices tissulaires (MMT). Avant de commencer les analyses sur les précieux MMT contenant les échantillons des patientes, nous avons d'abord confirmé la technique sur 4 échantillons pré- et post- chimiothérapie (**voir annexe 2**), qui ont montré une augmentation significative de la protéine p16^{INK4A} après chimiothérapie.

Il faut noter qu'à la différence de nos travaux *in vitro*, les cellules tumorales disponibles pour l'analyse de MMT ne sont pas vivantes. Les marqueurs SA-β-Gal (marquage enzymatique *in situ*) et EdU (incorporation durant la synthèse d'ADN) ne peuvent donc pas être utilisés. Pour les remplacer, nous avons marqué la présence de la protéine ki-67, un marqueur de prolifération, qui peut être détecté chez les cellules en prolifération (détectable dans n'importe quelle phase du cycle cellulaire), mais qui est complètement absente chez des cellules qui sont en arrêt stable de prolifération [138]. Les résultats obtenus pour ce marqueur sont en accord avec notre hypothèse initiale étant que: la chimiothérapie induit un arrêt de croissance des cellules du cancer de l'ovaire. En effet, dans les tumeurs post-traitement, l'intensité moyenne du marqueur ki-67 était significativement diminuée comparée aux tumeurs pré-chimiothérapie (**figure 4e**). Nous avons ensuite analysé l'expression de p16^{INK4A} et de façon surprenante, nous n'avons pas observé l'augmentation attendue associée avec la sénescence (**figure 4a**). De plus, nous n'avons pas observé d'augmentation de la sécrétion des composantes principales du PSAS : IL-6 et IL-8.

Ces résultats, hors du contexte biologique, pourraient être trompeurs et contredire/invalider

notre étude. Cependant lorsqu'on les replace dans le contexte biologique du tissu et du traitement contre le cancer, nous pouvons trouver une explication plausible. Lorsque les cellules sont traitées et subissent des dommages génotoxiques, la RDA est activée et les cellules doivent choisir leur destin : entrer en apoptose ou en sénescence dans les heures qui suivent ces dommages. La sénescence prend un certain temps à se développer. En effet, il a été observé qu'il est nécessaire d'attendre une semaine après le traitement pour observer le développement d'un phénotype sénescence [139] (**figure 10**). Ces cellules sénescence, seront par la suite potentiellement éliminées par le système immunitaire innée et adaptif [140], [141].

Nos échantillons post-chimiothérapie sont collectés lors de chirurgies ayant lieu 4 mois (en moyenne) après le traitement initial, nous pouvons donc proposer que nous ne sommes pas en train de regarder la réponse initiale à la chimiothérapie (sénescence induite par le traitement), mais plutôt une réponse tardive incluant des cellules survivantes au traitement.

En général dans une tumeur, plusieurs sous-populations cellulaires clonales coexistent, et lorsque nous appliquons un traitement, celui-ci peut avoir un effet sur certains clones, alors que d'autres sous-populations peuvent échapper aux traitements, continuer à proliférer et causer la rechute de la maladie quelques mois plus tard. Le cancer de l'ovaire fait parti des cancers où l'hétérogénéité intra-tumorale a été documenté comme étant une des causes de rechute de la maladie [142]. Nous pensons que lors des traitements, certains clones sont incapables d'activer la réponse sénescence, ou encore sont capables de réprimer épigénétiquement les voies de signalisation des CDKi qui mènent à l'arrêt de croissance. Quatre mois après la chimiothérapie, nous serions donc en train de regarder la tumeur qui rechute, plutôt que la réponse directe au traitement. Ces observations nous ont donc permis d'établir un modèle, qui essaye d'expliquer la dynamique intra-tumorale suite aux traitements par chimiothérapie (**figure 4f**). Ce modèle nous permet de suggérer que les cellules ayant la capacité d'entrer en sénescence seront perdues avec le temps suite au traitement puisque les cellules non-sénescence continueront de proliférer.

Partie 3

“La chimiothérapie et la radiation ionisante induisent l’entrée en sénescence des cellules primaires du cancer de l’ovaire (COv-SHG)”

Dans la troisième partie de nos travaux, nous avons décidé, cette fois-ci, de traiter les cellules primaires du cancer de l’ovaire séreux de haut grade avec les composés couramment utilisés en clinique. Si notre hypothèse initiale, et notre modèle (réalisé après avoir fait nos travaux *in vivo*) s’avéraient vrais, une semaine après le traitement, les cellules devraient subir des changements morphologiques et moléculaires impliqués dans l’entrée en sénescence. Notre protocole a été construit pour s’approcher le plus des données cliniques. De ce fait, la dose utilisée de paclitaxel et carboplatine était la même que celle retrouvée dans le plasma des patientes traitées [143]–[147].

Dans cette partie, nous avons donc testé les marqueurs de sénescence 8 jours après avoir exposé les cellules à la chimiothérapie pendant 12h (traitement unique). Cette fois-ci, nous avons comparé les cellules contrôles qui ne recevaient aucun traitement avec les cellules traitées.

Similairement aux données obtenues dans la partie 1, nous avons observé un arrêt de croissance induit par la combinaison du paclitaxel et de la carboplatine ainsi que par la radiation ionisante (10Gy) (**figure 5**). En effet, dans le groupe des cellules traitées, nous avons pu observer un arrêt du cycle cellulaire (absence de marquage EdU) ainsi qu’une augmentation de l’activité SA- β -Gal lysosomiale. Nous avons également observé des changements morphologiques reflétant l’entrée en sénescence : les cellules étaient devenues aplatis et plus grandes. Enfin, nous avons mesuré une accumulation dramatique de la présence de dommages à l’ADN résiduels irréparables (DNA-SCARS) (**figure 6**).

Cette fois-ci et contrairement aux expériences de la première partie, le phénotype sénescence se met en place de manière plus rapide (seulement 8 jours après le traitement) et de manière évidente. Cela s’explique par le fait que les cellules aient été traitées avec des agents endommageant l’ADN : la carboplatine et la radiation ionisante. Ainsi, quelques heures après leur exposition à ces agents, la RDA est déclenchée et les protéines de signalisation et de réparation de dommages sont recrutées aux sites de cassures double brin de l’ADN, notamment 53BP1 et γ H2AX, ce qui explique l’augmentation des foyers de dommage à

l'ADN huit jours plus tard.

Puisque des cancers séreux de haut grade sont mutés pour des protéines essentielles à la réparation des dommages de l'ADN tel que BRCA1 et BRCA2 ou sont inactivés au niveau de la voie moléculaire BRCA via des modifications épigénétiques (plus de 50% au total), il est très probable que la réparation ne puisse pas avoir lieu efficacement dans ces cellules, et que ces cellules cancéreuses doivent plutôt choisir entre la mort, la catastrophe mitotique et l'entrée en sénescence. Nous avons aussi observé que, lors des traitements, il n'y avait pas de cellules flottantes dans le milieu de culture, ce qui aditionné à la présence des marqueurs de sénescence constitue une autre preuve du destin cellulaire préférentiel des cellules du COV-SHG : la sénescence cellulaire.

Encore ici, le mécanisme moléculaire contrôlant l'entrée en senescence semble être l'activation du CDKi p16^{INK4A}. Lors des marquages par immunofluorescence, nous avons observé une augmentation, cette fois-ci encore plus marquée, de l'expression de p16^{INK4A} dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles. Nous concluons donc que la chimiothérapie des cellules du cancer de l'ovaire séreux de haut grade est capable d'induire l'expression de p16^{INK4A} empêchant la phosphorylation de Rb et la libération de E2F. Cela conduirait à l'arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G1 et le développement du phénotype sénescence.

Les mécanismes moléculaires exacts permettant l'induction de p16^{INK4A} suite à un dommage à l'ADN ne sont pas encore bien connus. Cependant une des voies moléculaires qui pourrait expliquer ce phénomène serait la voie MKK3/6-p38MAPK. Lorsqu'un dommage se produit au niveau de l'ADN, la RDA se met en place. La RDA, telle que vue auparavant, permet l'activation des kinases ATM/ATR. Ces kinases vont permettre l'activation des kinases TAO qui, à leur tour vont conduire à l'activation de MKK3/6 qui active les différents isoformes de p38MAPK [148], [149]. C'est l'isoforme p38 α qui, une fois activé, induit l'expression du locus p16^{INK4A} en phosphorylant et activant le facteur de transcription HBP1[150] (**figure 11**).

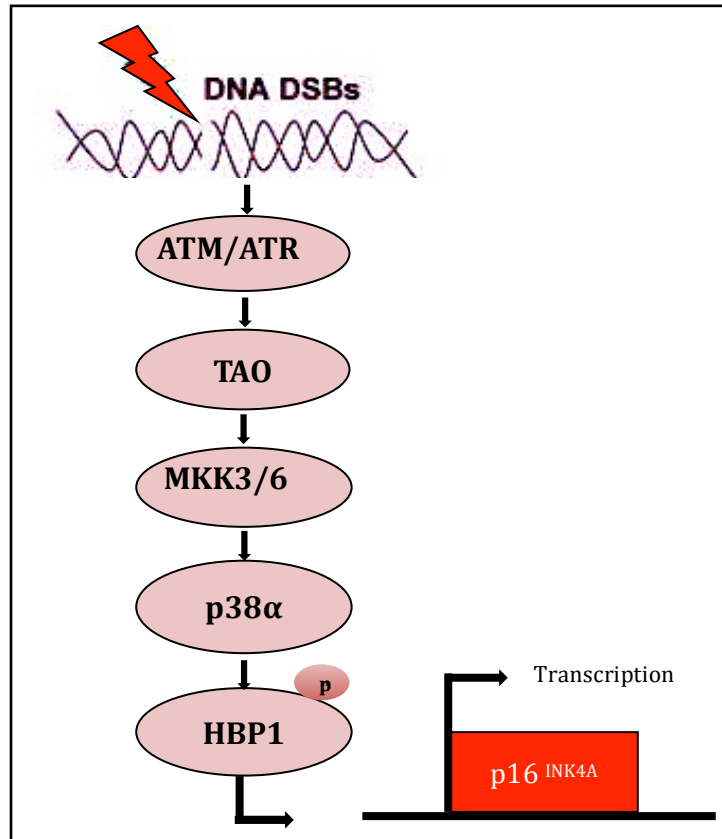


Figure 11. Cascade de signalisation conduisant à la transcription du locus p16^{INK4A} en réponse à un dommage à l'ADN.

Chapitre IV : Conclusions et perspectives

Conclusions

La sénescence a été étudiée dans différents contextes tels que le vieillissement, le développement embryonnaire, la réparation tissulaire et aussi comme barrière à la carcinogénèse. Cependant, son rôle dans le contexte d'une réponse aux traitements anticancéreux reste encore méconnu. Pour essayer de répondre à ce déficit, notre laboratoire s'est penché dans la recherche des voies moléculaires pouvant induire la sénescence des cellules cancéreuses ovariennes lors des traitements et le possible impact de la sénescence sur la survie des patientes et la progression de la maladie.

Pour notre plaisir, en tant que laboratoire intéressé à l'étude de la sénescence, nous avons trouvé une réponse de sénescence dans les cellules de cancer de l'ovaire de haut grade *in vitro*. Cette réponse paraît être très répandue puisque des marqueurs de sénescence ont été trouvés dans toutes les cultures primaires testées, et il semblerait qu'elle soit généralement induite par l'expression du CDKi p16^{INK4A}. *In vivo*, notre équipe a été capable de détecter la présence au niveau basal des marqueurs de sénescence dans les tumeurs des femmes, suggérant ainsi que la plupart de ces cancers de l'ovaire sont encore aptes à exprimer le CDKi responsable du phénotype sénescence : p16^{INK4A}. À ce niveau, le résultat le plus surprenant de ce projet de recherche fut le lien établi entre la présence du marqueur de sénescence p16^{INK4A} avant le traitement et le retardement dans la progression de la maladie ainsi que l'augmentation de la survie des patientes. Autrement dit, c'est une des première fois que la sénescence, dont le rôle dans le cancer a toujours été ambiguë (bon ou mauvais ?), est associé à un résultat bénéfique dans les traitements du cancer, plus précisément le cancer de l'ovaire séreux de haut grade.

Perspectives

Fort probablement, mes travaux de maîtrise ne révèlent que la pointe de l'iceberg et fondent la base pour d'autres projets de recherche qui répondront au grand nombre de questions que nous avons soulevées.

Plusieurs sujets n'ont été que peu évoqués dans notre projet de recherche. Cela n'est pas dû à une négligence de notre part mais plutôt à un manque de temps. Parmi les questions soulevées se trouvent le rôle des CDKi dans la sénescence des cellules cancéreuses. Dans plusieurs études, certaines citées dans le chapitre d'introduction, les chercheurs ont trouvé des mécanismes de compensation et de coopération entre différents CDKi pour induire la sénescence. Dans notre étude, des résultats préliminaires suggèrent que même si p16^{INK4A} semble être un régulateur important de la sénescence des cellules cancéreuses, l'implication d'autres CDKi régulant le cycle cellulaire telle que p27^{Kip1} est importante. Afin d'approfondir sur ce sujet, à court terme, nous aimerions réaliser des expériences d'inactivation de l'expression de p16^{INK4A} et p27^{Kip1} via des shRNA. Nous supposons que si p16^{INK4A} est le seul responsable d'induire la sénescence, lorsque nous l'inactiverons, les cellules continueront à pousser en culture au-delà du nombre de passages que nous avons obtenu dans la partie 1 de mes travaux. Par contre, si p16^{INK4A} est bien nécessaire mais qu'il y a d'autres CDKi qui coopèrent avec lui pour établir le phénotype sénescence, les cellules donc sénesceront tout de même. De la même façon, nous aimerions tester avec une combinaison de shRNA p16^{INK4A} et p27^{Kip1} afin de voir si cela suffit pour contourner la réponse sénescence suite au stress de culture.

Pour les perspectives au niveau translationnel, notre laboratoire a récemment obtenu accès à une très large cohorte de patientes atteintes du cancer de l'ovaire (*Canadian Ovarian Experimental Unified Resource (COEUR)*). Ceci devrait nous permettre de valider le rôle de p16^{INK4A} comme biomarqueur prédictif de sénescence et de survie dans le cancer de l'ovaire, mais aussi d'explorer le rôle de p27^{Kip1} et d'autres marqueurs de sénescence intéressants. En effet, très récemment une nouvelle publication a démontré que des marqueurs de sénescence tels que p16^{INK4A} et p21^{CIP1/WAF1} auraient des rôles prédictifs dans le lymphomes de Hodgkin [151].

Dans une perspective à plus long terme, nous essayons aussi de développer des plateformes de micro-fluidiques pour l'analyse en temps réel du destin cellulaire. L'idée derrière ce projet est de remplacer les cultures primaires traditionnelles que nous avons utilisées par des cultures vivantes de morceaux de tumeurs solides pré-chimiothérapie qui seront traitées et analysées pour les marqueurs de destin cellulaire directement dans un support de culture micro-fluidique. Ce projet a des potentiels énormes ! Il s'agit de traiter la tumeur avant même que la patiente ait reçu le traitement. Cela nous permettra de tester les marqueurs de sénescence, de trouver d'autres voies de sénescence, d'étudier d'autres destins cellulaires, et d'essayer de prédire la réponse de la patiente (résistance à la drogue). Ce projet, qui se profile à plus long terme, serait sans doute l'expression suprême de l'objectif de la recherche aujourd'hui : "la médecine personnalisée". De plus le système de micro-fluidique représente un avantage face à l'actuelle méthode d'étude des tumeurs provenant des patientes "Patient-derived tumour xenografts (PDX)" [152] qui consiste à greffer les tumeurs chez des souris. En effet, cette méthode prend en moyenne 2 à 4 mois, alors que la micro-fluidique prendrait quelques semaines, rendant les temps raccourcis de manière significative.

En conclusion, c'est un jeune projet à suivre qui pourrait avoir un impact sur les traitements actuels du cancer de l'ovaire et sur notre compréhension de la sénescence cellulaire induite par les traitements anti-cancéreux dans les années à venir.

Références

- Navaneelan, Tanya. 2015. "Trends in the incidence and mortality of female reproductive system cancers." *Health at a Glance*. Statistics Canada catalogue no. 82-624-X.
- [1] R. J. Kurman and I.-M. Shih, "The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A Proposed Unifying Theory," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 34, no. 3, pp. 433–443, Mar. 2010.
 - [2] R. C. Bast, B. Hennessy, and G. B. Mills, "The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 6, pp. 415–428, Jun. 2009.
 - [3] T. Kaku, S. Ogawa, Y. Kawano, Y. Ohishi, H. Kobayashi, T. Hirakawa, and H. Nakano, "Histological classification of ovarian cancer," *Med. Electron Microsc. Off. J. Clin. Electron Microsc. Soc. Jpn.*, vol. 36, no. 1, pp. 9–17, Mar. 2003.
 - [4] D. M. Gershenson, "Treatment of ovarian cancer in young women," *Clin. Obstet. Gynecol.*, vol. 55, no. 1, pp. 65–74, Mar. 2012.
 - [5] J. T. Quirk and N. Natarajan, "Ovarian cancer incidence in the United States, 1992–1999," *Gynecol. Oncol.*, vol. 97, no. 2, pp. 519–523, May 2005.
 - [6] C. Le Page, D. Provencher, C. M. Maugard, V. Ouellet, and A.-M. Mes-Masson, "Signature of a silent killer: expression profiling in epithelial ovarian cancer," *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 4, no. 2, pp. 157–167, Mar. 2004.
 - [7] N. Auersperg, "Specific Keynote: Experimental Models of Epithelial Ovarian Carcinogenesis," *Gynecol. Oncol.*, vol. 88, no. 1, Supplement, pp. S47–S51, Jan. 2003.
 - [8] S. B. Edge and American Joint Committee on Cancer, Eds., *AJCC cancer staging manual*, 7th ed. New York: Springer, 2010.
 - [9] A. Kim, Y. Ueda, T. Naka, and T. Enomoto, "Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 31, no. 1, p. 14, 2012.
 - [10] M. Kessler, C. Fotopoulou, and T. Meyer, "The Molecular Fingerprint of High Grade Serous Ovarian Cancer Reflects Its Fallopian Tube Origin," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 6571–6596, Mar. 2013.
 - [11] A. M. Karst and R. Drapkin, "Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution," *J. Oncol.*, vol. 2010, pp. 1–13, 2010.
 - [12] D. Bell, A. Berchuck, M. Birrer, J. Chien, D. W. Cramer, F. Dao, R. Dhir, P. DiSaia, H. Gabra, P. Glenn, A. K. Godwin, J. Gross, L. Hartmann, M. Huang, D. G. Huntsman, M. Iacocca, M. Imielinski, S. Kalloger, B. Y. Karlan, D. A. Levine, G. B. Mills, C. Morrison, D. Mutch, N. Olvera, S. Orsulic, K. Park, N. Petrelli, B. Rabeno, J. S. Rader, B. I. Sikic, K. Smith-McCune, A. K. Sood, D. Bowtell, R. Penny, J. R. Testa, K. Chang, H. H. Dinh, J. A. Drummond, G. Fowler, P. Gunaratne, A. C. Hawes, C. L. Kovar, L. R. Lewis, M. B. Morgan, I. F. Newsham, J. Santibanez, J. G. Reid, L. R. Trevino, Y.-Q. Wu, M. Wang, D. M. Muzny, D. A. Wheeler, R. A. Gibbs, G. Getz, M. S. Lawrence, K. Cibulskis, A. Y. Sivachenko, C. Sougnez, D. Voet, J. Wilkinson, T. Bloom, K. Ardlie, T. Fennell, J. Baldwin, S. Gabriel, E. S. Lander, L. Ding, R. S. Fulton, D. C. Koboldt, M. D. McLellan, T. Wylie, J. Walker, M. O’Laughlin, D. J. Dooling, L. Fulton, R. Abbott, N. D. Dees, Q. Zhang, C. Kandoth, M. Wendl, W. Schierding, D. Shen, C. C. Harris, H. Schmidt, J.

- Kalicki, K. D. Delehaunty, C. C. Fronick, R. Demeter, L. Cook, J. W. Wallis, L. Lin, V. J. Magrini, J. S. Hodges, J. M. Eldred, S. M. Smith, C. S. Pohl, F. Vandin, B. J. Raphael, G. M. Weinstock, E. R. Mardis, R. K. Wilson, M. Meyerson, W. Winckler, G. Getz, R. G. W. Verhaak, S. L. Carter, C. H. Mermel, G. Saksena, H. Nguyen, R. C. Onofrio, M. S. Lawrence, D. Hubbard, S. Gupta, A. Crenshaw, A. H. Ramos, K. Ardlie, L. Chin, A. Protopopov, J. Zhang, T. M. Kim, I. Perna, Y. Xiao, H. Zhang, G. Ren, N. Sathiamoorthy, R. W. Park, E. Lee, P. J. Park, R. Kucherlapati, D. M. Absher, L. Waite, G. Sherlock, J. D. Brooks, J. Z. Li, J. Xu, R. M. Myers, P. W. Laird, L. Cope, J. G. Herman, H. Shen, D. J. Weisenberger, H. Noushmehr, F. Pan, T. Triche Jr, B. P. Berman, D. J. Van Den Berg, J. Buckley, S. B. Baylin, P. T. Spellman, E. Purdom, P. Neuvial, H. Bengtsson, L. R. Jakkula, S. Durinck, J. Han, S. Dorton, H. Marr, Y. G. Choi, V. Wang, N. J. Wang, J. Ngai, J. G. Conboy, B. Parvin, H. S. Feiler, T. P. Speed, J. W. Gray, D. A. Levine, N. D. Socci, Y. Liang, B. S. Taylor, N. Schultz, L. Borsu, A. E. Lash, C. Brennan, A. Viale, C. Sander, M. Ladanyi, K. A. Hoadley, S. Meng, Y. Du, Y. Shi, L. Li, Y. J. Turman, D. Zang, E. B. Helms, S. Balu, X. Zhou, J. Wu, M. D. Topal, D. N. Hayes, C. M. Perou, G. Getz, D. Voet, G. Saksena, J. Zhang, H. Zhang, C. J. Wu, S. Shukla, K. Cibulskis, M. S. Lawrence, A. Sivachenko, R. Jing, R. W. Park, Y. Liu, P. J. Park, M. Noble, L. Chin, H. Carter, D. Kim, R. Karchin, P. T. Spellman, E. Purdom, P. Neuvial, H. Bengtsson, S. Durinck, J. Han, J. E. Korkkola, L. M. Heiser, R. J. Cho, Z. Hu, B. Parvin, T. P. Speed, J. W. Gray, N. Schultz, E. Cerami, B. S. Taylor, A. Olshen, B. Reva, Y. Antipin, R. Shen, P. Mankoo, R. Sheridan, G. Ciriello, W. K. Chang, J. A. Bernanke, L. Borsu, D. A. Levine, M. Ladanyi, C. Sander, D. Haussler, C. C. Benz, J. M. Stuart, S. C. Benz, J. Z. Sanborn, C. J. Vaske, J. Zhu, C. Szeto, G. K. Scott, C. Yau, K. A. Hoadley, Y. Du, S. Balu, D. N. Hayes, C. M. Perou, M. D. Wilkerson, N. Zhang, R. Akbani, K. A. Baggerly, W. K. Yung, G. B. Mills, J. N. Weinstein, R. Penny, T. Shelton, D. Grimm, M. Hatfield, S. Morris, P. Yena, P. Rhodes, M. Sherman, J. Paulauskis, S. Millis, A. Kahn, J. M. Greene, R. Sfeir, M. A. Jensen, J. Chen, J. Whitmore, S. Alonso, J. Jordan, A. Chu, J. Zhang, A. Barker, C. Compton, G. Eley, M. Ferguson, P. Fielding, D. S. Gerhard, R. Myles, C. Schaefer, K. R. Mills Shaw, J. Vaught, J. B. Vockley, P. J. Good, M. S. Guyer, B. Ozenberger, J. Peterson, and E. Thomson, "Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma," *Nature*, vol. 474, no. 7353, pp. 609–615, Jun. 2011.
- [13] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, and M. J. Thun, "Cancer statistics, 2009," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 59, no. 4, pp. 225–249, Aug. 2009.
- [14] T. Pal, J. Permuth-Wey, J. A. Betts, J. P. Krischer, J. Fiorica, H. Arango, J. LaPolla, M. Hoffman, M. A. Martino, K. Wakeley, G. Wilbanks, S. Nicosia, A. Cantor, and R. Sutphen, "BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases," *Cancer*, vol. 104, no. 12, pp. 2807–2816, Dec. 2005.
- [15] D. D. L. Bowtell, "The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 11, pp. 803–808, Nov. 2010.
- [16] M. J. Callahan, C. P. Crum, F. Medeiros, D. W. Kindelberger, J. A. Elvin, J. E. Garber, C. M. Feltmate, R. S. Berkowitz, and M. G. Muto, "Primary Fallopian Tube Malignancies in BRCA-Positive Women Undergoing Surgery for Ovarian Cancer Risk Reduction," *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 25, pp. 3985–3990, Sep. 2007.
- [17] M. J. J. M. Mingels, T. Roelofsen, J. A. W. M. van der Laak, J. A. de Hullu, M. A. P. C. van Ham, L. F. A. G. Massuger, J. Bulten, and M. Bol, "Tubal epithelial lesions in salpingo-

- oophorectomy specimens of BRCA-mutation carriers and controls," *Gynecol. Oncol.*, vol. 127, no. 1, pp. 88–93, Oct. 2012.
- [18] A. D. D'Andrea, "The Fanconi Anemia/BRCA signaling pathway: disruption in cisplatin-sensitive ovarian cancers," *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 2, no. 4, pp. 290–292, Aug. 2003.
- [19] J. P. Geisler, M. A. Hatterman-Zogg, J. A. Rathe, and R. E. Buller, "Frequency of BRCA1 dysfunction in ovarian cancer," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 94, no. 1, pp. 61–67, Jan. 2002.
- [20] J. L. Hilton, J. P. Geisler, J. A. Rathe, M. A. Hattermann-Zogg, B. DeYoung, and R. E. Buller, "Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 94, no. 18, pp. 1396–1406, Sep. 2002.
- [21] S. L. Lim, P. Smith, N. Syed, C. Coens, H. Wong, M. van der Burg, P. Szlosarek, T. Crook, and J. A. Green, "Promoter hypermethylation of FANCF and outcome in advanced ovarian cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 98, no. 8, pp. 1452–1456, Apr. 2008.
- [22] J. Z. Press, A. De Luca, N. Boyd, S. Young, A. Troussard, Y. Ridge, P. Kaurah, S. E. Kalloger, K. A. Blood, M. Smith, P. T. Spellman, Y. Wang, D. M. Miller, D. Horsman, M. Faham, C. B. Gilks, J. Gray, and D. G. Huntsman, "Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic BRCA1 loss have distinct molecular abnormalities," *BMC Cancer*, vol. 8, no. 1, p. 17, 2008.
- [23] Z. Wang, M. Li, S. Lu, Y. Zhang, and H. Wang, "Promoter hypermethylation of FANCF plays an important role in the occurrence of ovarian cancer through disrupting Fanconi anemia-BRCA pathway," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 5, no. 3, pp. 256–260, Mar. 2006.
- [24] S. J. Ramus, R. A. Vierkant, S. E. Johnatty, M. C. Pike, D. J. Van Den Berg, A. H. Wu, C. L. Pearce, U. Menon, A. Gentry-Maharaj, S. A. Gayther, R. A. DiCioccio, V. McGuire, A. S. Whittemore, H. Song, D. F. Easton, P. D. P. Pharoah, M. Garcia-Closas, S. Chanock, J. Lissowska, L. Brinton, K. L. Terry, D. W. Cramer, S. S. Tworoger, S. E. Hankinson, A. Berchuck, P. G. Moorman, J. M. Schildkraut, J. M. Cunningham, M. Liebow, S. K. Kjaer, E. Hogdall, C. Hogdall, J. Blaakaer, R. B. Ness, K. B. Moysich, R. P. Edwards, M. E. Carney, G. Lurie, M. T. Goodman, S. Wang-Gohrke, S. Kropp, J. Chang-Claude, The Australian Ovarian Cancer Study Group, The Australian Cancer Study (Ovarian Cancer), P. M. Webb, X. Chen, J. Beesley, G. Chenevix-Trench, E. L. Goode, and on behalf of the Ovarian Cancer Association Consortium (OCAC), "Consortium analysis of 7 candidate SNPs for ovarian cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 123, no. 2, pp. 380–388, Jul. 2008.
- [25] N. Sangha, R. Wu, R. Kuick, S. Powers, D. Mu, D. Fiander, K. Yuen, H. Katabuchi, H. Tashiro, E. R. Fearon, and K. R. Cho, "Neurofibromin 1 (NF1) Defects Are Common in Human Ovarian Serous Carcinomas and Co-occur with TP53 Mutations," *Neoplasia*, vol. 10, no. 12, pp. 1362–IN9, Dec. 2008.
- [26] J. A. Rauh-Hain, T. C. Krivak, M. G. Del Carmen, and A. B. Olawaiye, "Ovarian cancer screening and early detection in the general population," *Rev. Obstet. Gynecol.*, vol. 4, no. 1, pp. 15–21, 2011.
- [27] H. E. Dinkelspiel, M. Champer, J. Hou, A. Tergas, W. M. Burke, Y. Huang, A. I. Neugut, C. V. Ananth, D. L. Hershman, and J. D. Wright, "Long-term mortality among women with epithelial ovarian cancer," *Gynecol. Oncol.*, Jun. 2015.

- [28] E. Wiltshaw and T. Kroner, "Phase II study of cis-dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119875) in advanced adenocarcinoma of the ovary," *Cancer Treat. Rep.*, vol. 60, no. 1, pp. 55–60, Jan. 1976.
- [29] M. Cristea, E. Han, L. Salmon, and R. J. Morgan, "Review: Practical considerations in ovarian cancer chemotherapy," *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 2, no. 3, pp. 175–187, May 2010.
- [30] S. Vaughan, J. I. Coward, R. C. Bast, A. Berchuck, J. S. Berek, J. D. Brenton, G. Coukos, C. C. Crum, R. Drapkin, D. Etemadmoghadam, M. Friedlander, H. Gabra, S. B. Kaye, C. J. Lord, E. Lengyel, D. A. Levine, I. A. McNeish, U. Menon, G. B. Mills, K. P. Nephew, A. M. Oza, A. K. Sood, E. A. Stronach, H. Walczak, D. D. Bowtell, and F. R. Balkwill, "Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 10, pp. 719–725, Sep. 2011.
- [31] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail, "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 93, no. 9, pp. 2325–2327, May 1971.
- [32] R. A. Holton, C. Somoza, H. B. Kim, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, and S. Kim, "First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B ring," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 116, no. 4, pp. 1597–1598, Feb. 1994.
- [33] P. B. Schiff, J. Fant, and S. B. Horwitz, "Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol," *Nature*, vol. 277, no. 5698, pp. 665–667, Feb. 1979.
- [34] T. Ganesh, C. Yang, A. Norris, T. Glass, S. Bane, R. Ravindra, A. Banerjee, B. Metaferia, S. L. Thomas, P. Giannakakou, A. A. Alcaraz, A. S. Lakdawala, J. P. Snyder, and D. G. I. Kingston, "Evaluation of the tubulin-bound paclitaxel conformation: synthesis, biology, and SAR studies of C-4 to C-3' bridged paclitaxel analogues," *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 4, pp. 713–725, Feb. 2007.
- [35] J. George, N. L. Banik, and S. K. Ray, "Molecular Mechanisms of Taxol for Induction of Cell Death in Glioblastomas," in *Glioblastoma*, S. K. Ray, Ed. New York, NY: Springer New York, 2010, pp. 283–298.
- [36] G. A. Orr, P. Verdier-Pinard, H. McDaid, and S. B. Horwitz, "Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules," *Oncogene*, vol. 22, no. 47, pp. 7280–7295, Oct. 2003.
- [37] S. S. Bacus, A. V. Gudkov, M. Lowe, L. Lyass, Y. Yung, A. P. Komarov, K. Keyomarsi, Y. Yarden, and R. Seger, "Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53," *Oncogene*, vol. 20, no. 2, pp. 147–155, Jan. 2001.
- [38] S. Ishida, J. Lee, D. J. Thiele, and I. Herskowitz, "Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 22, pp. 14298–14302, Oct. 2002.
- [39] S. Dasari and P. B. Tchounwou, "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 740, pp. 364–378, Oct. 2014.
- [40] L. Kelland, "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 8, pp. 573–584, Aug. 2007.
- [41] Z. H. Siddik, "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance," *Oncogene*, vol. 22, no. 47, pp. 7265–7279, Oct. 2003.

- [42] H. T. Yip, R. Chopra, R. Chakrabarti, M. S. Veena, B. Ramamurthy, E. S. Srivatsan, and M. B. Wang, "Cisplatin-induced growth arrest of head and neck cancer cells correlates with increased expression of p16 and p53," *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 132, no. 3, pp. 317–326, Mar. 2006.
- [43] G. He, J. Kuang, A. R. Khokhar, and Z. H. Siddik, "The impact of S- and G2-checkpoint response on the fidelity of G1-arrest by cisplatin and its comparison to a non-cross-resistant platinum(IV) analog," *Gynecol. Oncol.*, vol. 122, no. 2, pp. 402–409, Aug. 2011.
- [44] J. R. Chapman, M. R. G. Taylor, and S. J. Boulton, "Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice," *Mol. Cell*, vol. 47, no. 4, pp. 497–510, Aug. 2012.
- [45] D. A. Delmastro, J. Li, A. Vaisman, M. Solle, and S. G. Chaney, "DNA damage inducible-gene expression following platinum treatment in human ovarian carcinoma cell lines," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 39, no. 3, pp. 245–253, 1997.
- [46] X. Wang, J. L. Martindale, and N. J. Holbrook, "Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 50, pp. 39435–39443, Dec. 2000.
- [47] O. Micheau, E. Solary, A. Hammann, F. Martin, and M. T. Dimanche-Boitrel, "Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 89, no. 11, pp. 783–789, Jun. 1997.
- [48] S. Tanida, T. Mizoshita, K. Ozeki, H. Tsukamoto, T. Kamiya, H. Kataoka, D. Sakamuro, and T. Joh, "Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment," *Int. J. Surg. Oncol.*, vol. 2012, pp. 1–8, 2012.
- [49] P. Dent and S. Grant, "Pharmacologic interruption of the mitogen-activated extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway: potential role in promoting cytotoxic drug action," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 7, no. 4, pp. 775–783, Apr. 2001.
- [50] S. Al-Bahlani, M. Fraser, A. Y. C. Wong, B. S. Sayan, R. Bergeron, G. Melino, and B. K. Tsang, "P73 regulates cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells via a calcium/calpain-dependent mechanism," *Oncogene*, vol. 30, no. 41, pp. 4219–4230, Oct. 2011.
- [51] J. G. Gong, A. Costanzo, H. Q. Yang, G. Melino, W. G. Kaelin, M. Levrero, and J. Y. Wang, "The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage," *Nature*, vol. 399, no. 6738, pp. 806–809, Jun. 1999.
- [52] J. E. Cleaver, E. T. Lam, and I. Revet, "Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 10, no. 11, pp. 756–768, Nov. 2009.
- [53] K. W. Caldecott, "Single-strand break repair and genetic disease," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 9, no. 8, pp. 619–631, Aug. 2008.
- [54] A. Kuzminov, "Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, no. 15, pp. 8241–8246, Jul. 2001.

- [55] N. Saleh-Gohari, H. E. Bryant, N. Schultz, K. M. Parker, T. N. Cassel, and T. Helleday, "Spontaneous Homologous Recombination Is Induced by Collapsed Replication Forks That Are Caused by Endogenous DNA Single-Strand Breaks," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 16, pp. 7158–7169, Aug. 2005.
- [56] F. T. Unger, H. A. Klasen, G. Tchartchian, R. L. de Wilde, and I. Witte, "DNA damage induced by cis- and carboplatin as indicator for in vitro sensitivity of ovarian carcinoma cells," *BMC Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 359, 2009.
- [57] B. B. Zhou and S. J. Elledge, "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective," *Nature*, vol. 408, no. 6811, pp. 433–439, Nov. 2000.
- [58] K. Yoshiyama, K. Sakaguchi, and S. Kimura, "DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals," *Biology*, vol. 2, no. 4, pp. 1338–1356, Nov. 2013.
- [59] T. A. Cortesi L, "Molecular Mechanisms of PARP Inhibitors in BRCA-related Ovarian Cancer," *J. Cancer Sci. Ther.*, vol. 05, no. 11, 2013.
- [60] S. Banerjee, S. B. Kaye, and A. Ashworth, "Making the best of PARP inhibitors in ovarian cancer," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 7, no. 9, pp. 508–519, Sep. 2010.
- [61] G. Sulli, R. Di Micco, and F. d'Adda di Fagagna, "Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 10, pp. 709–720, Oct. 2012.
- [62] R. S. Hotchkiss, A. Strasser, J. E. McDunn, and P. E. Swanson, "Cell Death," *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, no. 16, pp. 1570–1583, Oct. 2009.
- [63] L. Minafra and V. Bravatà, "Cell and molecular response to IORT treatment," *Transl. Cancer Res. Vol 3 No 1 Febr. 2014 Transl. Cancer Res. Intraoperative Radiother.*, 2014.
- [64] L. Hayflick and P. S. Moorhead, "The serial cultivation of human diploid cell strains," *Exp. Cell Res.*, vol. 25, pp. 585–621, Dec. 1961.
- [65] D. Muñoz-Espín and M. Serrano, "Cellular senescence: from physiology to pathology," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 482–496, Jun. 2014.
- [66] C. B. Harley, A. B. Futcher, and C. W. Greider, "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts," *Nature*, vol. 345, no. 6274, pp. 458–460, May 1990.
- [67] A. M. Olovnikov, "A theory of marginotomy," *J. Theor. Biol.*, vol. 41, no. 1, pp. 181–190, Sep. 1973.
- [68] J. P. Murnane, "Telomere dysfunction and chromosome instability," *Mutat. Res.*, vol. 730, no. 1–2, pp. 28–36, Feb. 2012.
- [69] W. Palm and T. de Lange, "How shelterin protects mammalian telomeres," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 42, pp. 301–334, 2008.
- [70] M. Z. Levy, R. C. Allsopp, A. B. Futcher, C. W. Greider, and C. B. Harley, "Telomere end-replication problem and cell aging," *J. Mol. Biol.*, vol. 225, no. 4, pp. 951–960, Jun. 1992.
- [71] J. D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, and T. de Lange, "Mammalian telomeres end in a large duplex loop," *Cell*, vol. 97, no. 4, pp. 503–514, May 1999.
- [72] J. Campisi and F. d'Adda di Fagagna, "Cellular senescence: when bad things happen to good cells," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 9, pp. 729–740, Sep. 2007.

- [73] T. Kuilman, C. Michaloglou, W. J. Mooi, and D. S. Peeper, "The essence of senescence," *Genes Dev.*, vol. 24, no. 22, pp. 2463–2479, Nov. 2010.
- [74] A. Di Leonardo, S. P. Linke, K. Clarkin, and G. M. Wahl, "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts," *Genes Dev.*, vol. 8, no. 21, pp. 2540–2551, Nov. 1994.
- [75] C. W. Greider and E. H. Blackburn, "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts," *Cell*, vol. 43, no. 2, pp. 405–413, Dec. 1985.
- [76] C. Cifuentes-Rojas and D. E. Shippen, "Telomerase regulation," *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 730, no. 1–2, pp. 20–27, Feb. 2012.
- [77] J. Prescott, I. M. Wentzensen, S. A. Savage, and I. De Vivo, "Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology," *Mutat. Res.*, vol. 730, no. 1–2, pp. 75–84, Feb. 2012.
- [78] J. C. Barrett, "Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment," *Environ. Health Perspect.*, vol. 100, pp. 9–20, Apr. 1993.
- [79] T. M. Bryan and R. R. Reddel, "Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells," *Eur. J. Cancer*, vol. 33, no. 5, pp. 767–773, Apr. 1997.
- [80] A. J. Cesare and R. R. Reddel, "Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 5, pp. 319–330, May 2010.
- [81] A. Muntoni, "The first molecular details of ALT in human tumor cells," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. suppl_2, pp. R191–R196, Oct. 2005.
- [82] Q. Chen and B. N. Ames, "Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, no. 10, pp. 4130–4134, May 1994.
- [83] F. Rodier, D. P. Muñoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik, J.-P. Coppé, E. Campeau, C. M. Beauséjour, S.-H. Kim, A. R. Davalos, and J. Campisi, "DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion," *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. Pt 1, pp. 68–81, Jan. 2011.
- [84] M. Fumagalli, F. Rossiello, M. Clerici, S. Barozzi, D. Cittaro, J. M. Kaplunov, G. Bucci, M. Dobрева, V. Matti, C. M. Beausejour, U. Herbig, M. P. Longhese, and F. d'Adda di Fagagna, "Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation," *Nat. Cell Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 355–365, Mar. 2012.
- [85] T. P. A. Devasagayam, J. C. Tilak, K. K. Bloor, K. S. Sane, S. S. Ghaskadbi, and R. D. Lele, "Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects," *J. Assoc. Physicians India*, vol. 52, pp. 794–804, Oct. 2004.
- [86] D. Han, E. Williams, and E. Cadenas, "Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space," *Biochem. J.*, vol. 353, no. 2, p. 411, Jan. 2001.
- [87] F. Muller, "The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging," *AGE*, vol. 23, no. 4, pp. 227–253, Oct. 2000.
- [88] D. Harman, "Free radical theory of aging," *Triangle Sandoz J. Med. Sci.*, vol. 12, no. 4, pp. 153–158, 1973.

- [89] F. L. Muller, M. S. Lustgarten, Y. Jang, A. Richardson, and H. Van Remmen, "Trends in oxidative aging theories," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 4, pp. 477–503, Aug. 2007.
- [90] J. M. Van Raamsdonk and S. Hekimi, "Deletion of the Mitochondrial Superoxide Dismutase sod-2 Extends Lifespan in *Caenorhabditis elegans*," *PLoS Genet.*, vol. 5, no. 2, p. e1000361, Feb. 2009.
- [91] L. Shao, Y. Wang, J. Chang, Y. Luo, A. Meng, and D. Zhou, "Hematopoietic stem cell senescence and cancer therapy-induced long-term bone marrow injury," *Transl. Cancer Res.*, vol. 2, no. 5, pp. 397–411, Oct. 2013.
- [92] H. Rayess, M. B. Wang, and E. S. Srivatsan, "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16," *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*, vol. 130, no. 8, pp. 1715–1725, Apr. 2012.
- [93] R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, and K.-W. Yeoh, "Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions," *Int. J. Med. Sci.*, vol. 9, no. 3, pp. 193–199, 2012.
- [94] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011.
- [95] B. Vogelstein and K. W. Kinzler, "The multistep nature of cancer," *Trends Genet.*, vol. 9, no. 4, pp. 138–141, Apr. 1993.
- [96] A. Maya-Mendoza, J. Ostrakova, M. Kosar, A. Hall, P. Duskova, M. Mistrik, J. M. Merchut-Maya, Z. Hodny, J. Bartkova, C. Christensen, and J. Bartek, "Myc and Ras oncogenes engage different energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress," *Mol. Oncol.*, vol. 9, no. 3, pp. 601–616, Mar. 2015.
- [97] R. Di Micco, M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre', P. G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. G. Pelicci, and F. d'Adda di Fagagna, "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication," *Nature*, vol. 444, no. 7119, pp. 638–642, Nov. 2006.
- [98] M. Collado, J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A. J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguría, A. Zaballos, J. M. Flores, M. Barbacid, D. Beach, and M. Serrano, "Tumour biology: Senescence in premalignant tumours," *Nature*, vol. 436, no. 7051, pp. 642–642, Aug. 2005.
- [99] J. Bartkova, N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L.-V. F. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V. C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C. L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Ørntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T. D. Halazonetis, J. Bartek, and V. G. Gorgoulis, "Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints," *Nature*, vol. 444, no. 7119, pp. 633–637, Nov. 2006.
- [100] F. Rodier and J. Campisi, "Four faces of cellular senescence," *J. Cell Biol.*, vol. 192, no. 4, pp. 547–556, Feb. 2011.
- [101] M. V. Blagosklonny, "Cell cycle arrest is not yet senescence, which is not just cell cycle arrest: terminology for TOR-driven aging," *Aging*, vol. 4, no. 3, pp. 159–165, Mar. 2012.
- [102] I. Ben-Porath and R. A. Weinberg, "When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence," *J. Clin. Invest.*, vol. 113, no. 1, pp. 8–13, Jan. 2004.

- [103] Q. M. Chen, V. C. Tu, J. Catania, M. Burton, O. Toussaint, and T. Dilley, "Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide," *J. Cell Sci.*, vol. 113 (Pt 22), pp. 4087–4097, Nov. 2000.
- [104] G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, and O. Pereira-Smith, "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 20, pp. 9363–9367, Sep. 1995.
- [105] F. Debacq-Chainiaux, J. D. Erusalimsky, J. Campisi, and O. Toussaint, "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 12, pp. 1798–1806, Dec. 2009.
- [106] D. J. Kurz, S. Decary, Y. Hong, and J. D. Erusalimsky, "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells," *J. Cell Sci.*, vol. 113 (Pt 20), pp. 3613–3622, Oct. 2000.
- [107] B. Y. Lee, J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio, and E. S. Hwang, "Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase," *Aging Cell*, vol. 5, no. 2, pp. 187–195, Apr. 2006.
- [108] F. Rodier, J.-P. Coppé, C. K. Patil, W. A. M. Hoeijmakers, D. P. Muñoz, S. R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A. R. Davalos, and J. Campisi, "Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 8, pp. 973–979, Aug. 2009.
- [109] M. Narita, S. Nuñez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon, and S. W. Lowe, "Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence," *Cell*, vol. 113, no. 6, pp. 703–716, Jun. 2003.
- [110] K. M. Aird and R. Zhang, "Detection of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF)," in *Cell Senescence*, vol. 965, L. Galluzzi, I. Vitale, O. Kepp, and G. Kroemer, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, pp. 185–196.
- [111] J.-P. Coppé, P.-Y. Desprez, A. Krtolica, and J. Campisi, "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression," *Annu. Rev. Pathol.*, vol. 5, pp. 99–118, 2010.
- [112] W. Hornebeck and F. X. Maquart, "Proteolyzed matrix as a template for the regulation of tumor progression," *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie*, vol. 57, no. 5–6, pp. 223–230, Aug. 2003.
- [113] L. C. Gonzalez, S. Ghadaouia, A. Martinez, and F. Rodier, "Premature aging/senescence in cancer cells facing therapy: good or bad?," *Biogerontology*, Sep. 2015.
- [114] C. Diep, N. Charles, C. Blake Gilks, S. Kalloger, P. Argenta, and C. A. Lange, "Progesterone receptors induce FOXO1-dependent senescence in ovarian cancer cells," *Cell Cycle*, vol. 12, no. 9, pp. 1433–1449, May 2013.
- [115] W. Li, W. Wang, Y. Li, W. Wang, T. Wang, L. Li, Z. Han, S. Wang, D. Ma, and H. Wang, "Proteomics Analysis of Normal and Senescent NG108-15 Cells: GRP78 Plays a Negative Role in Cisplatin-Induced Senescence in the NG108-15 Cell Line," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, p. e90114, Mar. 2014.

- [116] W. Li, W. Wang, H. Dong, Y. Li, L. Li, L. Han, Z. Han, S. Wang, D. Ma, and H. Wang, "Cisplatin-induced senescence in ovarian cancer cells is mediated by GRP78," *Oncol. Rep.*, vol. 31, no. 6, pp. 2525–2534, Jun. 2014.
- [117] B. G. Bitler, J. P. Nicodemus, H. Li, Q. Cai, H. Wu, X. Hua, T. Li, M. J. Birrer, A. K. Godwin, P. Cairns, and R. Zhang, "Wnt5a Suppresses Epithelial Ovarian Cancer by Promoting Cellular Senescence," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 19, pp. 6184–6194, Oct. 2011.
- [118] S. Baribeau, P. Chaudhry, S. Parent, and É. Asselin, "Resveratrol Inhibits Cisplatin-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cell Lines," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, p. e86987, Jan. 2014.
- [119] K. Weiner-Gorzal, E. Dempsey, M. Milewska, A. McGoldrick, V. Toh, A. Walsh, S. Lindsay, L. Gubbins, A. Cannon, D. Sharpe, J. O'Sullivan, M. Murphy, S. F. Madden, M. Kell, A. McCann, and F. Furlong, "Overexpression of the microRNA miR-433 promotes resistance to paclitaxel through the induction of cellular senescence in ovarian cancer cells," *Cancer Med.*, vol. 4, no. 5, pp. 745–758, May 2015.
- [120] G. Liu, Y. Sun, P. Ji, X. Li, D. Cogdell, D. Yang, B. C. Parker Kerrigan, I. Shmulevich, K. Chen, A. K. Sood, F. Xue, and W. Zhang, "MiR-506 suppresses proliferation and induces senescence by directly targeting the CDK4/6-FOXO1 axis in ovarian cancer," *J. Pathol.*, vol. 233, no. 3, pp. 308–318, Jul. 2014.
- [121] T. Prathapam, A. Aleshin, Y. Guan, J. W. Gray, and G. S. Martin, "p27Kip1 mediates addiction of ovarian cancer cells to MYC (c-MYC) and their dependence on MYC paralogs," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 42, pp. 32529–32538, Oct. 2010.
- [122] Y. Chien, C. Scuoppo, X. Wang, X. Fang, B. Balgley, J. E. Bolden, P. Premsrirut, W. Luo, A. Chicas, C. S. Lee, S. C. Kogan, and S. W. Lowe, "Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity," *Genes Dev.*, vol. 25, no. 20, pp. 2125–2136, Oct. 2011.
- [123] V. Krizhanovsky, M. Yon, R. A. Dickins, S. Hearn, J. Simon, C. Miething, H. Yee, L. Zender, and S. W. Lowe, "Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis," *Cell*, vol. 134, no. 4, pp. 657–667, Aug. 2008.
- [124] T.-W. Kang, T. Yevsa, N. Woller, L. Hoenicke, T. Wuestefeld, D. Dauch, A. Hohmeyer, M. Gereke, R. Rudalska, A. Potapova, M. Iken, M. Vucur, S. Weiss, M. Heikenwalder, S. Khan, J. Gil, D. Bruder, M. Manns, P. Schirmacher, F. Tacke, M. Ott, T. Luedde, T. Longerich, S. Kubicka, and L. Zender, "Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development," *Nature*, vol. 479, no. 7374, pp. 547–551, Nov. 2011.
- [125] B. J. Nickoloff, M. W. Lingen, B.-D. Chang, M. Shen, M. Swift, J. Curry, P. Bacon, B. Bodner, and I. B. Roninson, "Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 9, pp. 2956–2961, May 2004.
- [126] N. Wajapeyee, R. W. Serra, X. Zhu, M. Mahalingam, and M. R. Green, "Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7," *Cell*, vol. 132, no. 3, pp. 363–374, Feb. 2008.
- [127] J. C. Acosta, A. O'Loghlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D.

- Bernard, E. Hernando, and J. Gil, "Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence," *Cell*, vol. 133, no. 6, pp. 1006–1018, Jun. 2008.
- [128] G. Yang, D. G. Rosen, Z. Zhang, R. C. Bast, G. B. Mills, J. A. Colacino, I. Mercado-Uribe, and J. Liu, "The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 44, pp. 16472–16477, Oct. 2006.
- [129] C. Bavik, I. Coleman, J. P. Dean, B. Knudsen, S. Plymate, and P. S. Nelson, "The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms," *Cancer Res.*, vol. 66, no. 2, pp. 794–802, Jan. 2006.
- [130] D. Liu and P. J. Hornsby, "Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 7, pp. 3117–3126, Apr. 2007.
- [131] J.-P. Coppé, C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Muñoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P.-Y. Desprez, and J. Campisi, "Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor," *PLoS Biol.*, vol. 6, no. 12, p. e301, 2008.
- [132] D. M. Nelson, T. McBryan, J. C. Jeyapalan, J. M. Sedivy, and P. D. Adams, "A comparison of oncogene-induced senescence and replicative senescence: implications for tumor suppression and aging," *AGE*, vol. 36, no. 3, Jun. 2014.
- [133] D. Muñoz-Espín, M. Cañamero, A. Maraver, G. Gómez-López, J. Contreras, S. Murillo-Cuesta, A. Rodríguez-Baeza, I. Varela-Nieto, J. Ruberte, M. Collado, and M. Serrano, "Programmed cell senescence during mammalian embryonic development," *Cell*, vol. 155, no. 5, pp. 1104–1118, Nov. 2013.
- [134] C. A. Schmitt, J. S. Fridman, M. Yang, S. Lee, E. Baranov, R. M. Hoffman, and S. W. Lowe, "A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy," *Cell*, vol. 109, no. 3, pp. 335–346, May 2002.
- [135] H. Lounis, D. Provencher, C. Godbout, D. Fink, M. J. Milot, and A. M. Mes-Masson, "Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies," *Exp. Cell Res.*, vol. 215, no. 2, pp. 303–309, Dec. 1994.
- [136] D. M. Provencher, H. Lounis, L. Champoux, M. Tétrault, E. N. Manderson, J. C. Wang, P. Eydoux, R. Savoie, P. N. Tonin, and A. M. Mes-Masson, "Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines," *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, vol. 36, no. 6, pp. 357–361, Jun. 2000.
- [137] C. J. Sherr and R. A. DePinho, "Cellular Senescence," *Cell*, vol. 102, no. 4, pp. 407–410, Aug. 2000.
- [138] T. Scholzen and J. Gerdes, "The Ki-67 protein: from the known and the unknown," *J. Cell. Physiol.*, vol. 182, no. 3, pp. 311–322, Mar. 2000.
- [139] R. H. te Poele, A. L. Okorokov, L. Jardine, J. Cummings, and S. P. Joel, "DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 6, pp. 1876–1883, Mar. 2002.
- [140] D. G. A. Burton and V. Krizhanovsky, "Physiological and pathological consequences of cellular senescence," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, no. 22, pp. 4373–4386, Nov. 2014.

- [141] M. Serrano, "Cancer: Final act of senescence," *Nature*, vol. 479, no. 7374, pp. 481–482, Nov. 2011.
- [142] R. F. Schwarz, C. K. Y. Ng, S. L. Cooke, S. Newman, J. Temple, A. M. Piskorz, D. Gale, K. Sayal, M. Murtaza, P. J. Baldwin, N. Rosenfeld, H. M. Earl, E. Sala, M. Jimenez-Linan, C. A. Parkinson, F. Markowitz, and J. D. Brenton, "Spatial and temporal heterogeneity in high-grade serous ovarian cancer: a phylogenetic analysis," *PLoS Med.*, vol. 12, no. 2, p. e1001789, Feb. 2015.
- [143] J. B. Heijns, M. E. L. van der Burg, T. van Gelder, M. W. J. A. Fieren, P. de Bruijn, A. van der Gaast, and W. J. Loos, "Continuous ambulatory peritoneal dialysis: pharmacokinetics and clinical outcome of paclitaxel and carboplatin treatment," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 62, no. 5, pp. 841–847, Oct. 2008.
- [144] M. Watanabe, Y. Aoki, M. Tomita, T. Sato, Y. Takaki, N. Kato, M. Kikuchi, H. Kase, and K. Tanaka, "Paclitaxel and carboplatin combination chemotherapy in a hemodialysis patient with advanced ovarian cancer," *Gynecol. Oncol.*, vol. 84, no. 2, pp. 335–338, Feb. 2002.
- [145] W. J. van der Vijgh, "Clinical pharmacokinetics of carboplatin," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 21, no. 4, pp. 242–261, Oct. 1991.
- [146] P. H. Wiernik, E. L. Schwartz, J. J. Strauman, J. P. Dutcher, R. B. Lipton, and E. Paietta, "Phase I clinical and pharmacokinetic study of taxol," *Cancer Res.*, vol. 47, no. 9, pp. 2486–2493, May 1987.
- [147] N. Siddiqui, A. V. Boddy, H. D. Thomas, N. P. Bailey, L. Robson, M. J. Lind, and A. H. Calvert, "A clinical and pharmacokinetic study of the combination of carboplatin and paclitaxel for epithelial ovarian cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 75, no. 2, pp. 287–294, 1997.
- [148] M. Raman, S. Earnest, K. Zhang, Y. Zhao, and M. H. Cobb, "TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage," *EMBO J.*, vol. 26, no. 8, pp. 2005–2014, Apr. 2007.
- [149] T. M. Thornton, "Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival," *Int. J. Biol. Sci.*, pp. 44–52, 2009.
- [150] Y. Xu, N. Li, R. Xiang, and P. Sun, "Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 39, no. 6, pp. 268–276, Jun. 2014.
- [151] A. Caliò, A. Zamò, M. Ponzoni, M. E. Zanolin, A. J. M. Ferreri, S. Pedron, L. Montagna, C. Parolini, V. Fraifeld, M. Wolson, H. Yanai, G. Pizzolo, C. Doglioni, F. Vinante, and M. Chilosì, "Cellular senescence markers p16INK4 and p21CIP1/WAF are predictors of Hodgkin's lymphoma outcome," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, Jul. 2015.
- [152] J. J. Tentler, A. C. Tan, C. D. Weekes, A. Jimeno, S. Leong, T. M. Pitts, J. J. Arcaroli, W. A. Messersmith, and S. G. Eckhardt, "Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 9, no. 6, pp. 338–350, Apr. 2012.

Annexe 1

Premature aging/senescence in cancer cells facing therapy: good or bad?

Liliana Calvo Gonzalez · Sabrina Ghadaouia ·
Aurélie Martínez · Francis Rodier

Received: 18 March 2015 / Accepted: 22 July 2015 / Published online: 2 September 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Normal and cancer cells facing their demise following exposure to radio-chemotherapy can actively participate in choosing their subsequent fate. These programmed cell fate decisions include true cell death (apoptosis-necroptosis) and therapy-induced cellular senescence (TIS), a permanent “proliferative arrest” commonly portrayed as premature cellular aging. Despite a permanent loss of proliferative potential, senescent cells remain viable and are highly bioactive at the microenvironment level, resulting in a prolonged impact on tissue architecture and functions. Cellular senescence is primarily documented as a tumor suppression mechanism that prevents cellular transformation. In the context of normal tissues, cellular senescence also plays important roles in tissue repair, but contributes to age-associated tissue

dysfunction when senescent cells accumulate. Theoretically, in multi-step cancer progression models, cancer cells have already bypassed cellular senescence during their immortalization step (see hallmarks of cancer). It is then perhaps surprising to find that cancer cells often retain the ability to undergo TIS, or premature aging. This occurs because cellular senescence results from multiple signalling pathways, some retained in cancer cells, aiming to prevent cell cycle progression in damaged cells. Since senescent cancer cells persist after therapy and secrete an array of cytokines and growth factors that can modulate the tumor microenvironment, these cells may have beneficial and detrimental effects regarding immune modulation and survival of remaining proliferation-competent cancer cells. Similarly, while normal cells undergoing senescence are believed to remain indefinitely growth arrested, whether this is true for senescent cancer cells remains unclear, raising the possibility that these cells may represent a reservoir for cancer recurrence after treatment. This review discusses our current knowledge on cancer cell senescence and highlight questions that must be addressed to fully understand the beneficial and detrimental impacts of cellular senescence during cancer therapy.

L. C. Gonzalez · S. Ghadaouia · A. Martínez · F. Rodier
CRCHUM et Institut du cancer de Montréal, Montreal,
QC, Canada

F. Rodier
Département de radiologie, radio-oncologie et médecine
nucléaire, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

Keywords Aging · Apoptosis · Cancer cell fates ·
Cancer cell senescence · Cancer therapy · Cell death

Cellular senescence

Cellular senescence is a state of irreversible growth arrest first described in 1961 following the observation that primary human fibroblasts undergo a finite number of cell divisions in culture before entering a viable state of stable growth arrest (Hayflick and Moorhead 1961). Two seminal notions emerged from this landmark discovery: the first linked cellular senescence to aging, and the second proposed that only immortalized cells and not somatic cells can escape this senescence state; formerly introducing cellular senescence as a potential tumor suppressor mechanism decades before the genes involved in it were identified.

Senescence-associated cellular phenotypes

Cells that undergo senescence usually develop multiple senescence-associated (SA) phenotypes including an enlarged flattened morphology. While the key characteristic of cellular senescence is a permanent cell cycle arrest, quiescent cells are also growth arrested, thus a series of more specific molecular hallmarks were described to differentiate senescence from quiescence. To date the most widely used senescence biomarker is the presence of a SA β -galactosidase activity (SA- β -Gal) (Dimri et al. 1995). SA- β -Gal results from the lysosomal β -Gal enzyme encoded by the GLB1 gene, whose activity is increased in senescent cells alongside increased lysosomal mass. Interestingly, while SA- β -Gal is a good senescence biomarker, it is not required for the establishment of other SA-phenotypes strengthening the idea that multiple senescence hallmarks must be evaluated to define the senescence state (Debacq-Chainiaux et al. 2009; Kurz et al. 2000; Lee et al. 2006). For example, the SA growth arrest (SAGA) is associated with increased activity of various cell cycle regulating tumor suppressor genes including p16^{INK4a}, p53, p21 (p21^{Waf1/Cip1}) or p27^{Kip1} (Brenner et al. 1998; Kuilman et al. 2010; Rodier and Campisi 2011). Another important and recently described SA characteristic is the SASP (senescence-associated secretory phenotype), which is responsible for senescent cells communications with their microenvironment (Acosta et al. 2008; Coppe et al. 2008; Kuilman et al. 2008). Senescent cells also almost always harbor nuclear DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence (DNA-SCARS) that sustain DNA damage

response (DDR) signaling required for damage-induced SAGA and SASP. Unlike transient DNA damage foci that are repaired promptly, persistent DNA-SCARS colocalize with PML nuclear bodies and activated CHK2 (Rodier et al. 2009, 2011). Extensive chromatin remodeling at nuclear DAPI-dense SA heterochromatin foci (SAHF) is another molecular hallmark of senescent cells. More specifically, activated p16^{INK4a} in senescent cells provoke Rb recruitment and heterochromatinization at E2F-responsive promoters, thus silencing important cell cycle progression genes such cyclin A (Aird and Zhang 2013; Narita et al. 2003). Some of these senescence hallmarks are described further in the context of TIS below, and additional SA biomarkers can be found in other reviews specifically covering senescence hallmarks.

The triggers of cellular senescence

Multiple types of cellular stress can activate cellular senescence including oxidative damage, telomere shortening, oncogene activation, or DNA-Damaging agents like ionizing radiation or chemotherapeutic drugs (Ben-Porath and Weinberg 2005; Campisi and d'Adda di Fagagna 2007; Chen et al. 2006; Malaquin et al. 2015; Rodier and Campisi 2011). In this section of the review, a basic overview of cellular senescence is presented with a focus on the most common senescence-inducing stresses and the key downstream SA signalling pathways.

Telomere shortening: As understood later, the replicative senescence observed by Hayflick was the consequence of a decrease in telomere length caused by serial passaging in vitro (Harley et al. 1990; Olovnikov 1973). Telomeres are repetitive sequences (TTAGGG) extending over many kilobases of DNA at the ends of chromosomes and are essential for preserving genomic stability. These telomeric repeats are the basis of a nucleo-proteic complex named “shelterin” that prevents rapid recognition of exposed chromosomal DNA ends as DNA double strand breaks. The shelterin complex thus represses telomeric end fusions that could otherwise occur following activation of the homologous recombination (HR) or the non-homologous end joining (NHEJ) DNA repair pathways (de Lange 2005). Telomere defect-mediated replicative senescence is mostly the result of a chromosome-end replication problem that causes telomeres to shorten slightly following each cell

division; eventually reaching a critically shortened length that prevents effective telomeric binding of the shelterin components (Griffith et al. 1999). Telomere shortening results in an “uncapped” telomere that triggers the DNA Damage Response (DDR) followed by growth arrest (d’Adda di Fagagna et al. 2003). When DNA damage is beyond repair, such as with an uncapped telomere, normal cells must undergo either death or senescence (Campisi and d’Adda di Fagagna 2007). Most often, replicative senescence requires the DDR-associated activation of the tumor suppressor genes TP53 (p53), RB1 (Rb) and p16^{INK4A} (Di Leonardo et al. 1994; Harrington et al. 1998; Kuilman et al. 2010). To escape replicative senescence stem cells and most cancer cells express telomerase, a reverse transcriptase polymerase that synthesizes and replenish telomeric repeats (Greider and Blackburn 1985). Alternatively, some cancer cells can use a telomerase-independent DNA recombination mechanism termed alternative lengthening of telomeres (ALT) (Bryan and Reddel 1997; Muntoni and Reddel 2005). Regardless of the telomere maintenance mechanism, selected, cellular immortalization in potential cancer cells depends on telomere length stabilization.

Stress induced premature senescence (SIPS) is often triggered independently from telomeric erosion in cells exposed to genotoxic substances such as ionizing radiation, oxidative stress or hydrogen peroxide. These DNA damaging agents trigger the DNA Damage Response (DDR) provoking an immediate cell cycle arrest. Often, the DNA is repaired and the cells can resume the cell cycle. However, if the DNA lesions are unrepairable, for example when a break occurs directly in a telomere, cells die or undergo a permanent growth arrest showing hallmarks of senescence (Campisi and d’Adda di Fagagna 2007; Chen and Ames 1994; Di Leonardo et al. 1994; Fumagalli et al. 2012; Goldstein et al. 2005; Malaquin et al. 2015; Parrinello et al. 2003). DNA damage induced cellular senescence is strongly mediated by the tumor suppressors p53 and p16^{INK4A} (Beausejour et al. 2003; Di Leonardo et al. 1994) and is almost always associated with the presence of the nuclear DDR signalling structures termed DNA-SCARS (Rodier et al. 2011). DNA damage caused by reactive oxygen species (ROS) following the addition of hydrogen peroxide to cell culture media is another particularly efficient senescence trigger (Chen et al. 1995). Similarly, in most cell culture systems, cells are also constantly exposed to oxidative stress in the form

of high levels of atmospheric oxygen (20%), which is sufficient to trigger p53-mediated SIPS (Parrinello et al. 2003). Additionally, the DDR and ROS can result in a positive feedback loop where the DDR triggers the production of mitochondrial ROS, resulting in more DNA damage that further sustains DDR activity (Passos et al. 2010).

Oncogene induced senescence (OIS) is a crucial type of senescence for tumor suppression. It was first observed in primary tumors and rodent cells following the acute overexpression of the RAS transforming oncogene (Serrano et al. 1997). In this context, growth-arrested cells showed morphological features typical of senescence including a flat enlarged shape, SA- β -Gal, and increased p53, p21 and p16^{INK4A} expression (Brenner et al. 1998). To trigger OIS, oncogenes like RAF and RAS hyper-activate the MAPK cascade, leading to increased proliferation and to p53 and p16^{INK4A} induction mostly via stress response genes such as the p38 (MAPK) stress kinase (Kwong et al. 2013; Lin et al. 1998; Wang et al. 2002). Alternatively, there is an indirect connection between acute oncogene activation and the DDR, which is activated by replication fork collapses caused by the abnormal repetitive firing of origins of DNA replication in hyper-mitotic cells (Di Micco et al. 2006). This connection holds true not only following direct activation of the MAPK cascade, but also following Mos, cyclin E and cdc6 expression (Bartkova et al. 2006). Strengthening the functional link with the DDR, the depletion of ATM activity using short interfering RNA (siRNA) or chemical ATM inhibitors in cells overexpressing activated oncogenes was sufficient to disrupt SA phenotypes. Much like Ras, the overexpression of the oncogenes Mos and Cdc6 also induced p16^{INK4A} expression (Bartkova et al. 2006; Di Micco et al. 2006).

In summary, OIS highly depends on the p53 and p16^{INK4A} pathways. Cells that are defective for these genes can bypass OIS to continue proliferating, suggesting that strong mitogenic signals (such as overexpression of oncogenes) will trigger senescence as a protective mechanism preventing the progression to carcinogenesis (Serrano et al. 1997). In some cases, sustained exposure of cells in culture to pro-mitogenic signals from serum can similarly trigger SIPS in a way that recalls OIS, suggesting that this senescence response can be activated by endogenous and exogenous signals (Satyanarayana et al. 2004).

Senescence as a barrier to reprogramming in normal somatic cells

Additional evidence supporting senescence as a barrier to cancer progression comes from the observation that an OIS-like senescence response suppresses the creation of induced pluripotent stem cells (iPSC). Indeed, somatic cells can be reprogrammed to acquire a pluripotent ES cell-like state, albeit this reprogramming event occurs at very low frequency (Takahashi and Yamanaka 2006). iPSC cells are pluripotent and they have an enormous potential as cell models in future therapeutic drug screenings and for clinical purposes. Therefore, overcoming the reprogramming inefficiency is a major goal (Banito and Gil 2010). In short, reprogramming involves the expression of 4 pluripotent factors, among which c-myc is already clearly established as a powerful oncogene (Oct4, Sox2, KLF4 and c-myc) (Takahashi and Yamanaka 2006). Following reprogramming, iPSCs derived from somatic cells such as fibroblasts can grow indefinitely and differentiate into all other cells types (Takahashi and Yamanaka 2006). Interestingly, the simultaneous expression of the four reprogramming pluripotent factors in mouse or human cells induce a senescence-like state in most cells through the activation of the classic senescence tumor suppressor genes p53, p21 and p16^{INK4A} explaining the low conversion rate (Hong et al. 2009; Kawamura et al. 2009; Li et al. 2009; Marion et al. 2009; Papp and Plath 2011). Further characterization of this OIS-like event reveals that pluripotency reprogramming indeed triggers a full senescence phenotype. Although the molecular mechanisms explaining why some cells can successfully reprogram to escape senescence remain unclear (Banito and Gil 2010; Banito et al. 2009), new evidence suggests that the absence of SA DNA methylation (SA-DNA_m) in pluripotent cells (Koch et al. 2013) or the inactivation of negative regulators of the cell cycle achieved by the expression of ES cell-specific microRNAs may play a central role (Banito et al. 2009; Hayat 2013).

Senescence as a barrier to transformation in pre-neoplastic lesions

Cancer is a slow progressing disease that arises from the combination of a permissive tissue microenvironment and the accumulation of successive mutations in

a pre-neoplastic cell. Early pre-neoplastic cells are part of a cancer progression timeline that slowly provide these cells with essential cancer hallmarks via multi-step carcinogenesis (Hanahan and Weinberg 2011; Vogelstein and Kinzler 1993). During this multi-step process, it is proposed that premature senescence induced by transforming oncogene like Ras or b-Raf (OIS) halts carcinogenesis by blocking proliferation as well as further accumulation of mutations. This cascade of events has been described since 1997 through multi-step cell culture carcinogenesis models (Serrano et al. 1997), and confirmed in 2005 in human and murine models (Braig et al. 2005; Chen et al. 2005; Collado et al. 2005). In humans, naevi are a prototypical example of tissue OIS. These appear as benign pre-melanoma skin lesions that frequently harbor oncogenic mutations but remain growth arrested rarely progressing into melanomas due to B-Raf induced senescence (Collado et al. 2005). Another barrier to cancer progression is the DDR that can triggers senescence in pre-neoplastic cells at risk for genomic instability. Colon adenomas are examples of this phenomenon as these preneoplastic lesions stain positive for several DDR and senescence biomarkers. When cells have stabilized their genomes bypassing senescence, such as in advanced neoplastic lesions in colon carcinomas, they are then negative for the same DDR markers (Bartkova et al. 2006). Similarly, senescence biomarkers characteristic of barriers to cancer progression have also been detected in pre-neoplastic lesions in the lungs, prostate, and skin (melanocytes) (Braig et al. 2005; Collado et al. 2005; Michaloglou et al. 2005).

Overview of the connection between senescence, tissue dysfunction, and aging

Aging is characterized by the progressive loss of tissue function leading to increased vulnerability to disease eventually resulting in death. Early observations of cellular senescence were rapidly linked to organismal aging (Hayflick and Moorhead 1961). By limiting proliferation, senescence can deplete tissues of stem or progenitor cells, compromising tissue repair as well as regeneration and normal cell turnover (Drummond-Barbosa 2008). In support of this model, the number of tissue resident senescent cells increases with age in both primates and rodents. (Sharpless and DePinho 2004). This accumulation also occurs across multiple

tissues in diseases associated with aging such as osteoarthritis (Price et al. 2002), arthritic joints and atherosclerosis (Fenton et al. 2001; Vasile et al. 2001), skin ulcers and liver cirrhosis (Wiemann et al. 2002), respiratory diseases (Tsuji et al. 2006), and dementia (Flanary et al. 2007). At the molecular level, critical genetic pathways regulating senescence are consistently activated in aging tissues including p16^{INK4A}, a critical senescence-regulating cyclin-dependant kinase inhibitor (CDKi) that modulates pRb activity, which increases in rodent and human tissues with age (Krishnamurthy et al. 2004; Nielsen et al. 1999; Rodriguez-Menocal et al. 2010; Zindy et al. 1997). Similarly, the key DDR gene p53 is a major actor in modulating aging phenotypes. For example, constitutively elevating p53 activity creates cancer free mice burdened with a premature aging phenotype (Tyner et al. 2002) (Maier et al. 2004). To add further complexity, multiple examples also show that the p16^{INK4A} and p53 pathways interact and modulate each other in tissues (Leong et al. 2009; Su et al. 2009; Yamakoshi et al. 2009; Zhang et al. 2006).

In summary, it is clear that senescent cells accumulate during aging and at sites of age-associated pathologies. Current knowledge suggests that, aside from being by-products of the depletion observed in proliferating cell pools, accumulating senescent cells can cause other stresses. For instance, the accumulation of senescent cells in aging or damaged tissues can directly perturb the function of other healthy cells via paracrine communication mechanisms. These effects on tissue function are mediated via the systematic secretion of a large panel of factors that exhibit strong biological effects, the senescence secretome termed SASP (Acosta et al. 2008; Coppe et al. 2008; Kuilman et al. 2008). The SASP is strongly associated with the presence of DNA damage in senescent cells and with the activation of NF- κ B. It includes such diverse factors as the interleukins (IL-6, IL-8), chemokines (GRO α and GRO β), growth factors (TGF β , IGF), proteases (MMP), components of the extracellular matrix (integrins, fibronectins), and reactive oxygen species (Acosta et al. 2008; Coppe et al. 2010a, 2011; Kuilman et al. 2008; Malaquin et al. 2015; Rodier et al. 2009).

The core profile of the SASP (SASP factors) appears quite conserved between human fibroblasts and epithelial cells following large-scale characterization with antibody arrays. (Coppe et al. 2008). The

SASP is also apparently conserved between species as revealed by a human-mouse comparison (Coppe et al. 2010b). Overall, a plethora of different cell types were shown to secrete a SASP at senescence including (but not limited to) fibroblasts, liver stellate cells, endothelial cells, and many epithelial normal and cancer cells suggesting it is a highly conserved senescence response (Schnabl et al. 2003; Schwarze et al. 2005; Shelton et al. 1999; Zhang et al. 2004).

The diversity in the components of the SASP complicates the study of their effects on tissue microenvironments. Nonetheless, to date, a large body of evidence suggests that the SASP induces low-level chronic microenvironment inflammation that may be important for tissue repair, but may also promote age-related diseases by disrupting tissue structure and functions (Chung et al. 2009; Franceschi et al. 2007; Krizhanovsky et al. 2008; Liu and Hornsby 2007; Parrinello et al. 2005). Recently, the strongest demonstrations of this phenomenon have emerged from two studies showing that the ablation of resident tissue senescent cells can rescue selected organ functions in a premature aging model (Baker et al. 2011) while also perturbing normal skin repair (Demaria et al. 2014).

Cancer therapy-induced senescence (TIS)

Two key hallmarks of cancer cells are their capacity to acquire replicative immortality and to proliferate in an uncontrolled manner. These two cancer hallmarks also suggest that during the carcinogenesis process, cancer cells have bypassed tumor suppressive OIS. In line with this hypothesis, key senescence genes like p53, p16^{INK4A} and Rb are among the most mutated in cancer (Hanahan and Weinberg 2011). While the loss of those genes should, in principle, support the prediction that senescence would not be functional in those cancer cells, this is not the case. Apparently, cancer cells remain susceptible to TIS owing to the large functional overlap creating redundancy between the many signalling pathways regulating senescence (Fridman and Tainsky 2008; Munoz-Espin and Serrano 2014; Ross et al. 2011); thus decreasing the probability that all these pathways are simultaneously mutated in the same cancer cell. Alternatively, it remains possible that cancer cells must retain a minimal amount of these important cell cycle regulators to insure proper proliferation. We provide

here examples of TIS in cancer cells that retain p53, or not.

p53-regulated cancer cell TIS

TP53 is the most frequently mutated cancer gene with at least 50% of all human cancers carrying TP53 mutation (Soussi and Wiman 2007). Besides direct TP53 alterations, other key DDR regulators genes like CHK2 are also often mutated, weakening the DDR pathway beyond p53 itself (Bartek and Lukas 2003). Overall, among direct p53 alterations, more than 75 % result in a p53 protein that has lost its function and sometimes behaves like a dominant negative mutant (Muller and Vousden 2013).

Conversely, a sizable fraction of cancers still harbour a functional p53. This raises the possibility that p53 retention could be exploited against at least a subset of cancers. Indeed, early evidence that cancer cells retain the ability to senesce via p53 came from a series of studies demonstrating that many p53 wild-type (wt) cancer cells develop hallmarks of senescence in response to radiation or to other DNA-damaging drugs like doxorubicin, aphidicolin and cisplatin (Chang et al. 1999; Ewald et al. 2010; Joyner et al. 2006). For example, breast cancer cells MCF-7 (p53 wt) show senescence in response to adriamycin/doxorubicin, a drug widely used in breast and ovarian cancer treatment (Elmore et al. 2002). Strengthening the connection with p53, another study reveals that senescence is triggered in cervical carcinoma cell lines following p53 reactivation. Specifically, cervical carcinoma cells often express, and depend on, the human papilloma virus (HPV) oncoproteins E6 and E7 for unregulated growth. These viral oncoproteins disrupt the p53 (E6) and the Rb (E7) pathways without permanently causing gene mutations. Accordingly, the repression of E6 and E7 expression in HeLa and Caski cells via the re-introduction of their viral suppressor E2 leads to p53 and Rb reactivation, resulting in growth inhibition via upregulation of the p53 target p21, a CDKi (Wells et al. 2000). Even in the absence of exogenous damage sources, p53-reactivated cells acquired senescence hallmarks and failed to generate colonies in colony formation assays, suggesting that p53-mediated senescence is effective at preventing long-term cancer cell proliferation (Goodwin et al. 2000). Another study using MCF-7 and MCF-7/hTERT breast cancer cells

explored radiation-induced senescence following E6-mediated p53 disruption and found that, while p53 is essential to trigger the senescence phenotype in these cells, telomerase expression is unable to rescue this growth arrest presumably because radiation-induced TIS is only partly telomeric in nature (Fumagalli et al. 2012; Jones et al. 2005; Rodier et al. 2011). In colon cancer cells HCT116 (p53 wt), which also undergo p53-dependent senescence when treated with camptothecin, p53 pathway inactivation using gene targeting (isogenic HCT116 p53^{-/-} and HCT116 p21^{-/-} cells) prevented camptothecin-induced senescence and redirected these cells to death. This is interesting as it suggests that the CDKi p21 specifically allows the induction of a senescence growth arrest and thus promotes cell survival via growth arrest (Han et al. 2002).

In different contexts, the results also highlight the possibility that some cancer cells retain multiple senescence-associated signalling pathways. For example, cisplatin treatment induces TIS in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells A549 and H292, including an increase in senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) highlighted by the methylation of histone 3 at lysines 9 (triMe H3K9) and 27 (triMe H3K27) (Ge et al. 2012). SAHF are normally associated with the p16^{INK4A}/Rb pathway suggesting the involvement of this pathway or of other chromatin-remodelling pathways in this context (Narita et al. 2003). Drugs like topoisomerase inhibitors also induce senescence in p53 wt cancer cells and were used to probe the relationship between p53 and p16^{INK4a} in senescence establishment and maintenance, much as it occurs in normal cells (Beausejour et al. 2003; te Poele et al. 2002). Similarly, cancer cell senescence induced by the multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor sunitinib is also apparently linked to p53, albeit not necessarily via classic signalling pathways (Yang et al. 2010; Zhu et al. 2013). For example, renal cell carcinoma (RCC) cells (OS-RC-2, ACHN and Renca) exposed to sunitinib underwent p53-dependent TIS without expressing p21. Instead, these cells expressed Dec1, another p53 target gene that can lead to cell cycle arrest in G1 (Qian et al. 2008; Zhu et al. 2013). The ginseng derivative 20(S)-ginsenoside Rg3, a potential potassium channel regulator, also presents another potential non-classical p53-related cancer TIS pathway. This drug triggers TIS in U87 glioma cell lines apparently

orchestrated via the AKT/ROS and p53/p21 signalling pathways (Sin et al. 2012). Overall, these results strongly suggest that cancer cells sometimes retain multiple or varied senescence-inducing pathways.

In addition to cell culture studies, several explored the molecular aspects of p53-dependent TIS in cancer tissues exposed to therapy. For example, breast carcinoma xenografts exposed to retinoid underwent senescence (Chang et al. 1999) and human breast cancer tissues exposed to chemotherapy scored positive for selected SA-hallmarks including SA- β -Gal activity and high p16 levels providing the first evidence that cancer cell TIS is an outcome of chemotherapy in vivo (te Poele et al. 2002). Similarly, primary murine lymphomas respond to cyclophosphamide chemotherapy, an alkylant agent, by engaging a senescence program controlled by the p53 and p16^{INK4A} genes. Mice with tumors capable of TIS had a much better prognosis following chemotherapy, suggesting that in this context, TIS beneficially contributes to the outcome of chemotherapy (Schmitt et al. 2002). In another study, sunitinib treatment of OS-RC-2 RCC xenografts inhibited tumor formation and treated mice showed improved survival. The treated tumor tissues also showed increased p53 and Dec1 levels as well as SA- β -Gal activity, consistent with cell culture data (Zhu et al. 2013). Finally, lung NSCLC xenografts treated with cisplatin also displayed TIS features, including SA- β -Gal activity, the overexpression of p53 and p21, as well as the nuclear translocation of NF- κ B p65. Interestingly, conjugated cisplatin and dexamethasone (DEX) treatments, that are currently used to attenuate chemotherapy side-effects, also partially abolished the senescence response in treated mice compromising the observed beneficial effects on tumor growth and survival. Additional observations carried on 3 groups of human NSCLC patients: (1) without chemotherapy, (2) with cisplatin and (3) with cisplatin and DEX revealed that SA- β -Gal activity correlated positively only with the cisplatin treatment. Indeed, 60 % of the patients in the cisplatin group had tumors that stained positive for senescence (Ge et al. 2012).

In contrast, in an elegant mammary tumor model, p53-dependent TIS can negatively affect treatment success, highlighting the importance of context-dependent effects of TIS in cancer cells (Jackson et al. 2012). In this model, mammary tumors in MMTV-Wnt1 transgenic mice were engineered to express either wt

or mutant p53. Following treatment with doxorubicin, p53 wt tumors that initially underwent senescence eventually relapsed and the tumor re-appeared. Alternatively, p53 null tumors showed size regression following treatment, a phenomenon explained by the continued proliferation of cancer cells in the presence of damage, leading to mitotic catastrophe (Jackson et al. 2012). Thus, depending on the combination of tumor-treatment chosen, TIS has either detrimental or beneficial potential, particularly when considering long-term effects like continued tumor growth.

p53-independent cancer cell TIS

There are multiple examples that highlight the possibility that p53-independent pathways can serve as backups to trigger TIS in cancer cells. These include doxorubicin-induced senescence in cell lines like Saos-2 that completely lack p53, or U251 and SW480 that express a dominant-negative p53 mutant. Similarly, HeLa and HEp-2 cells in which p53 function is compromised via the expression of the HPV-E6 oncoprotein can also undergo senescence in response to damage (Chang et al. 1999).

In light of these results, what other pathways can rescue TIS in the absence of p53? The protein kinase C (PKC) is a family of serine threonine kinases that are involved in several pathways including senescence (Newton 1995; Zurgil et al. 2014). PKC α , one of the 11 currently identified PKC, has been linked to etoposide, doxorubicin, and oxidative stress (H₂O₂)-induced TIS in MCF-7 cell lines (Zurgil et al. 2014). Interestingly, PKC α deletion in cells also formed more colonies following treatment suggesting that PKC α linked TIS stably prevents cancer cell growth. At the molecular level, MCF7 cells are known to be p53 positive, and PKC α -mediated TIS was linked to the upregulation of the CDKi p21 and p27^{Kip1} indeed suggesting a link to p53, which was not directly tested. However, it is interesting to note that p21-dependent senescence can also occur in normal embryonic cells in the absence of p53 (Storer et al. 2013). Additional evidence has also linked p21 and other PKC isozymes to senescence. In lung NSCLC cells (H358, H322 and H441) both p53 and p16 are mutated, yet, treatment with the PKC activator PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) induced PKC α -mediated p21 upregulation and G2/M cell cycle arrest including a senescence-like morphology and SA- β -Gal activity (Oliva et al. 2008).

The gene *Skp2* also shows promising links to TIS. *Skp2* is an E3 ubiquitin ligase that targets proteins like $p27^{Kip1}$ for degradation and is frequently overexpressed in human cancers (Gstaiger et al. 2001). Accordingly prostate cancer cells (PC3) treated with MLN4924, an inhibitor of the *Skp2*-SCF complex, undergo senescence. Treated PC3 xenografts also display tumor growth arrest suggesting senescence. Interestingly, PC3 are *p53* and *Pten* deficient, but retain the CDKi $p27^{Kip1}$. Supporting a role for $p27^{Kip1}$ in *Skp2*-mediated TIS, mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from *Skp2*^{-/-} - *Pten*^{+/-} mice and additionally depleted of *p27*, *Atf4* or *p21* using RNAi have a reduced senescence response (Lin et al. 2010). In another study, low levels of *Skp2* have been found in PC3, LNCaP, and DU145 prostate cancer cells following DNA-alkylating agent exposure (quinone deaziquone (AZQ)). Treated cells also displayed senescence hallmarks weeks after drug removal. Finally, the treatment of DU145 xenografts for 3 weeks decreased tumor growth stably for 9 weeks following the initial treatment. Importantly, SA- β -Gal activity was increased in treated tumors and the proliferation was decreased suggesting TIS. In this context, the growth arrest was mostly mediated by $p27^{Kip1}$ and *p21* expression was not detected in DU145 or PC3 cells (although *p21* was detected in LNCaP). Since *p21* is a direct *p53* target, this is consistent with the fact that both DU145 and PC3 are *p53* deficient. Finally, *Skp2* overexpression could rescue the senescence-inducing effect of AZQ (Ewald and Jarrard 2012).

The family of Aurora kinases are key cell cycle regulators that have also been linked to TIS. Aurora kinase A and B are highly overexpressed in melanoma cells, and in mouse models with either orthotopic implantation of metastatic melanoma tumors taken from patients or Hs294T melanoma cell line xenografts. Their inhibition with MLN8237 inhibited tumor growth and increased SA- β -Gal activity, as well as NF- κ B *p65* expression, suggesting TIS. Further studies performed using melanoma cell lines including Hs294T, SK-Mel-2, SK-Mel-5 and SK-Mel-28 showed that neither *p53*, *p21*, *p63*, *p73* nor *p16* were responsible for this senescence phenotype. In fact, the growth arrest was linked to the ATM/Chk2 DDR pathway as an ATM inhibitor KU55933 impaired senescence phenotypes. Interestingly, although no clear molecular explanation is currently available, the majority of treated tumors

remained growth arrested following drug release suggesting that TIS can mediate long-term growth arrest in cancer cells (Liu et al. 2013). MLN8237 (Alisertib) is a new orally available Aurora kinase inhibitor that is currently in clinical trials, promising to enable the evaluation of aurora-associated TIS responses in humans (Liu et al. 2013; Marxer et al. 2014).

Additional pharmacologic targets potentially regulating TIS outside of the *p53*/*Rb*/*p16* axes continue to be explored. For example, the inhibition of the mammalian NAD⁺ dependent acetylase *Sirt1* using sirtinol in breast MCF-7 (*p53* wt, *p16* deficient) or lung H1299 (*p16* wt *p53* deficient) cancer cells triggered a senescence response that was apparently independent of *p53*, *p21*, or *p16*^{INK4A}. Alternatively, sirtinol did trigger the induction of $p27^{Kip1}$ and decreased *Rb* phosphorylation (Ota et al. 2006). Recently, the histone methyl transferase *Suv39h1* was also shown to regulate TIS following Adriamycin treatment in E μ -myc lymphoma cells transplanted in mice, providing another novel TIS-regulating pathway and potential pharmacological targets (Dorr et al. 2013).

Stromal TIS

Overall, much attention had focused on the induction of TIS directly in cancer cells, but tumor tissues harbor multiple cellular compartments. The core epithelial cancer cells are often supported by a rich tumor microenvironment composed of many types of mesenchymal cells such as fibroblasts, myofibroblasts, endothelial cells and inflammatory cells associated with the immune system (Hanahan and Weinberg 2011; Orimo and Weinberg 2006). Carcinoma/cancer associated fibroblast (CAFs) are particularly important and have been shown to play a role in paracrine communications with epithelial cancer cells regulating their biology. Unlike normal fibroblasts, CAFs often behave like activated myofibroblasts and secrete factors like the stromal derived factor 1 (SDF-1), which enhances tumor vascularization and tumor epithelial growth (Orimo and Weinberg 2006). When co-injected in mice with weakly tumorigenic epithelial cells, CAFs can also promote full tumorigenesis (Olumi et al. 1999). Like the epithelial cells that form the core component of the tumors, CAFs can acquire mutations or loss of heterozygosity (LOH) and have been shown to harbor somatic mutations in senescence genes such *p53* or *PTEN* (Kurose et al. 2002; Moinfar

et al. 2000). CAFs may also undergo epigenetic reprogramming accounting for some of their altered functions when compared to normal fibroblasts suggesting that both genetic and epigenetic changes have a role in the maintenance of the tumor microenvironment (Allinen et al. 2004; Hu et al. 2005).

With the tumor stroma playing such an important role in tumor biology, it seems logical to also assess TIS in this compartment. Interestingly, normal human fibroblasts have been the model of choice to study senescence for decades, and in response to DNA damage, these cells usually display little apoptosis and all the classical hallmarks of senescence (Cristofalo and Pignolo 1993; Goldstein et al. 2005; Kuilman et al. 2010). Perhaps not surprisingly, human CAFs in culture are apparently also prone to undergo senescence in response to stress or damage, but studying tumor sub-compartments in tissues is not so easy. For example, in the context of human prostate cancer chemotherapy, early data revealed evidences of TIS in cancer tissues, but could not differentiate between the epithelial and the stromal sub-compartments (Coppe et al. 2008). In a follow-up study, efficiently separating tumor sub-compartments revealed that TIS was actually mostly occurring in the tumor stroma. Moreover, senescent prostatic CAFs promoted overall tumor resistance to chemotherapy drugs, highlighting a potentially detrimental effect of TIS in this context. Finally, whole-genome gene expression profiling of the SASP from senescent CAFs showed that NF- κ B regulated WNT16B expression was responsible for promoting tumor cell survival and disease progression (Sun et al. 2012).

Good or bad: potential impacts of cancer cell senescence on the tumor microenvironment

Senescent cells are in permanent growth arrest, the consequence of which is the inhibition of the proliferation of transformed cells rendering senescence, by definition, a major tumor suppressor. As discussed, a non-dividing senescent cell is not a neutral cell. Senescent cells are strongly defined by the presence of their SASP, and determining the impact of the SASP on the complex tumor microenvironment is a tremendous task. Indeed, SASP factors often display opposing effects, depending on the context in which they are produced. Thus, it is plausible that senescent cells can create a microenvironment that simultaneously promotes tumor

growth and invasion, but also play a crucial role in the suppression of tumors.

A tumor suppressor SA-secretome

It is expected that the SASP can elicit multiple effects in the tumor microenvironment undergoing therapy that are beneficial for treatment outcome. For example, its proinflammatory nature can attract immune cells to kill and clear their target cells - be it senescent cells or other surviving cancer cells. Demonstrated immune cells recruited in the vicinity of senescent cells or participating to their clearance include macrophages, neutrophils, natural killer cells or T cells tumor (Chien et al. 2011; Kang et al. 2011; Krizhanovsky et al. 2008). More specifically, the innate immune response was shown to be sufficient for the clearance of senescent tumor cells in a liver carcinoma model (Xue et al. 2007). In another liver cancer model, adaptive immune cells (CD4 T cells in particular) have been shown to communicate with senescent cancer cells, playing a crucial role in the suppression of liver cancer progression (Hoenicke and Zender 2012). In this case adaptive immunity cells were found to interact with innate immune cells like monocytes/macrophages to ultimately promote immune-mediated clearance of pre-cancerous senescent hepatocytes (Kang et al. 2011).

The SASP also comprises pro-angiogenic factors such as VEGF that can stimulate endothelial cell migration and invasion influencing the vasculature (Coppe et al. 2006), but factors like maspin, a strong antiangiogenic molecule are modulated with the SASP (Nickoloff et al. 2004). Thus, it remains to be seen whether a TIS-associated SASP would be pro- or anti-angiogenic. It is also clear that the SASP can act directly on other neighbouring cancer cells. In some contexts, this could render them more aggressive (see below), but it can also reinforce or promote their senescence-associated growth arrest when these cells sense damage signals. For instance, senescent melanocytes secrete IGFBP7 (Insulin-like growth factor-binding protein 7), a SASP factor that can induce or reinforce senescence in other melanocytes (Wajapeyee et al. 2008). Similarly, IL-6 and IL-8 can reinforce senescence autonomously and non-autonomously in other damaged cells and PAI1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) reinforces senescence induced by telomeric or oxidative stress (Acosta

et al. 2008; Kortlever et al. 2006; Kuilman et al. 2008). Importantly, in a mouse lymphoma model, a context more relevant to TIS, the SASP and its regulator NF κ B have been identified as critical molecular components of senescence that ensure the sensitivity to chemotherapy (Chien et al. 2011).

A tumor promoting SA-secretome

The tissue remodelling promoted by the proinflammatory nature of the SASP illustrates the ability of a senescence hallmark being detrimental in a tumoral microenvironment context. These effects can act directly on the cancer cells, but also on the surrounding normal cells. With regards to cancer cells, the SASP can stimulate their proliferation through multiple factors including GROs (Growth Related Oncogenes) in breast cancer (Coppe et al. 2010a; Yang et al. 2006), amphiregulin in prostate cancer (Bavik et al. 2006), and GRO α or IL-8 in melanomas (Balentien et al. 1991; Schadendorf et al. 1993). As suggested above for angiogenesis (VEGF/maspin), it is interesting to note the opposing effects that the cytokines IL-6 and IL-8 may have on the tumor microenvironment depending on the context. They can promote cancer via RAS signalling (Ancrile et al. 2007; Sparmann and Bar-Sagi, 2004), but act as tumor suppressors when reinforcing senescence (Acosta et al. 2008; Kortlever et al. 2006; Kuilman et al. 2008). Alongside the balance between VEGF/maspin, these two cytokines with context-dependent functions perfectly illustrate the difficulty in predicting SASP effects on long-term outcomes during cancer therapy (Fig. 1).

With regards to the general effects of SASP factors on tissue architecture, the secretion of Matrix Metalloproteinase 3 (MMP3) increases the degradation of the extracellular matrix promoting the migration of cancer cells migration (Liu and Hornsby 2007). Hepatocyte Growth Factor (HGF) has also been shown to increase the invasion of pancreatic cancer cells (Ohuchida et al. 2004). Finally, in addition to stimulating growth, IL-6 and IL-8 can promote epithelial to mesenchymal transition (EMT), stimulating the invasion of premalignant and malignant epithelial cells in the basement membrane (Coppe et al. 2008; Laberge et al. 2012). The SASP can also disrupt the differentiation of other normal epithelial cells. For example, in mammary epithelium, MMP3 inhibits the expression of differentiation markers

(Parrinello et al. 2005) and IL-6/8 stimulate the de-differentiation of the mammary epithelium (Coppe et al. 2008; Parrinello et al. 2005).

In studies performed in mouse models using contexts similar to potential human TIS scenarios, the SASP promoted detrimental chemoresistance properties to neighbouring surviving cancer cells. In a first study, the NF- κ B regulated SASP factor WNT16B secreted from the senescent tumor stroma has been shown to attenuate the effects of cytotoxic chemotherapy in prostate cancer. WNT16B also promoted cancer cell proliferation, invasion and EMT. Importantly, strong correlations were also made using human patient tissues suggesting that WNT16B could be a potential prostatic human SASP target for pharmacologic manipulation (Sun et al. 2012). Similar observations were made in a lymphoma mouse model. In this context, therapy-induced DNA damage triggered senescence and increased the secretion of the SASP factors IL-6 and Timp-1. This created a “chemo-resistant niche” in the thymus that favoured subsequent tumor relapse. In this case, IL-6 and Timp-1 activated Bcl-XL in surviving cancer cells thus promoting apoptosis inhibition in the tumor microenvironment. (Gilbert and Hemann 2010). Similarly, in a human mesothelioma model, unidentified SASP factors secreted from TIS mesothelioma cells converged on STAT3 signalling to promote the survival of a subset of aldehyde dehydrogenase (ALDH)-high mesothelioma cells, which were subsequently responsible for treatment resistance (Canino et al. 2012).

Therapies of the future: inducing and manipulating senescence

Over the past years 60 years, radiotherapy and chemotherapy drugs have improved in their attempt to efficiently kill cancer cells, but the majority of advanced cancers still remain incurable, highlighting a failure to perfectly optimize cancer treatments (Chabner and Roberts 2005; Doroshow and Kummar 2014). Modern strategies obviously include the development of new classes of drugs, but there is also a trend towards understanding treatment responses in a way that would allow us to combine multiple pre-existing drugs to favour beneficial outcomes for patients. Senescence induced by chemotherapy or TIS falls into one of these alternatives that can be used to

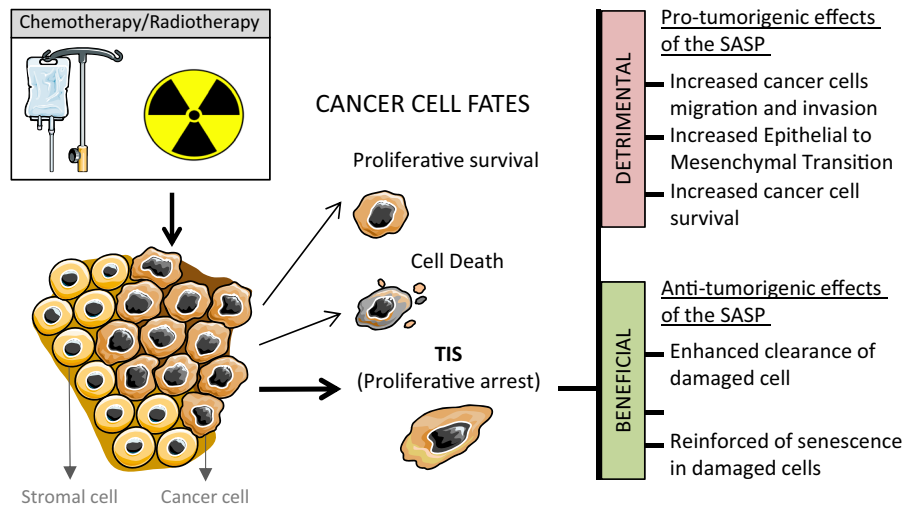


Fig. 1 Cancer cell fates decisions following therapy and effects of the SASP. Following chemotherapy or radiotherapy cancer cells can undergo different cell fates: repair and resumption of the cell cycle (proliferative survival), death (cell death), or

Therapy-Induced Senescence (TIS; proliferative arrest). The SASP generated by senescent cancer cells can have beneficial anti-tumorigenic and/or detrimental pro-tumorigenic effects

enhance current and future cancer therapies. Senescence can also often be achieved using low doses of TIS-inducing drugs, which also means less off-target toxicity for patients (Ewald et al. 2010).

Based on our current knowledge of TIS pathways in cancer cells, it now seem plausible to use existing drugs to target specific pathways that would enhance cellular senescence in specific cancer treatment contexts. For example, inhibition of telomerase activity, inhibition of p53 mutated forms or reactivation of dormant cell cycle checkpoints (Acosta and Gil 2012; Yaswen et al. 2015) However, senescent cells may also have pro-tumoral effects particularly in surrounding cells that have survived the treatment. This problem stems from the capacity of senescent cancer cells to secrete factors that modulate their microenvironment, sometimes in a manner that can promote invasion and proliferation of other surviving non-senescent cancer cells. Interestingly, immune cells may also get invited to the senescent microenvironment by the same pro-inflammatory cytokines, thus participating in eliminating surviving senescent cancer cells. This duality adds complexity to senescence-manipulation approaches and recent new mouse models allowing spatio-temporal visualization and manipulation of senescent cells in tissues should be very helpful to solve these questions (Baker et al. 2011; Cheng and Rodier 2015; Demaria et al. 2014; Laberge et al. 2013).

In the meantime, as it is currently difficult to evaluate the long-term impact of resident senescent cells, a likely strategy would be to simply eliminate these cells following a primary senescence-inducing therapy. Interestingly, senescent cells offer multiple potential targets that could be exploited to promote their elimination. For instance, senescent cells differ metabolically from their non-senescent counterparts, and these differences can be used in synthetic lethal strategies to selectively eliminate them. More specifically, senescent cells increase glucose uptake and glucose conversion as well as the phosphorylation of AMP-activated protein kinases and these features could be exploited using small molecules (Dorr et al. 2013). Along these lines, another study investigates the possibility to selectively kill senescent cells using “senolytics” drugs. Since senescent cells are known to activate anti-apoptotic pro-survival mechanisms, interfering with these protective pathways might achieve selective elimination of senescent cells by inducing apoptosis. Two interesting senolytic drugs arised from this study, dasatinib (D) and quercetin (Q), which showed preferential elimination of senescent cells when compared to their non-senescent counterparts. Dasatinib is an inhibitor of multiple tyrosine kinases known to interfere with EFNB-dependent suppression of apoptosis. Quercetin is a natural flavonol that can inhibits pro-survival PI3 K, among

many other targets (Zhu et al. 2015). Other strategies to selectively kill senescent cancer cells could involve the use of oncolytic viruses like the Measles vaccine virus (MeV), which is currently in clinical trials (Galanis et al. 2010). Indeed, a recent study showed that senescent cancer cells showed greater infection and lysis rates compared to non-senescent cancer cells when infected with MeV (Weiland et al. 2014). The biochemical features of senescent cancer cells supporting their efficient MeV-mediated lysis were not identified, but it was not related to increased levels of the cell surface receptor (CD46) necessary for the entry of the oncolytic virus or to a reduction in antiviral interferon release, two factors that normally sensitize cancer cells to oncolytic viruses (Li and Tainsky 2011; Weiland et al. 2014). Thus, oncolytic viruses selectively killing senescent cancer cells arise as a new opportunity for combined therapies although greater efforts need to be done in this area to clearly identify the biochemical characteristics that make senescent cells susceptible to virus-mediated lysis.

The above examples illustrate the interesting directions that this new field has taken. Overall, the next steps probably include a continued focus on the current question: is TIS good or bad in the context of cancer treatment? In our opinion, the answer may be more complex than a simple binary solution and we will probably need to selectively enhance the beneficial effects of TIS while negating the detrimental ones.

Acknowledgments We thank members of the Rodier laboratory for valuable comments and discussions and Suzana Anjos for language editing. This work was supported by the Institut du Cancer de Montréal and by grants from the Canadian Institute for Health Research [MOP14962] and the Terry Fox Research Institute [1030] to F.R. F.R. is supported by a Fonds de Recherche Québec Santé junior I career award [22624].

References

- Acosta JC, Gil J (2012) Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends Cell Biol* 22:211–219
- Acosta JC, O’Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N, Takatsu Y, Melamed J, d’Adda di Fagagna F, Bernard D, Hernandez E, Gil J (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133:1006–1018
- Aird KM, Zhang R (2013) Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol Biol* 965:185–196
- Allinen M, Beroukhir R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chiu L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K (2004) Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6:17–32
- Ancrile B, Lim KH, Counter CM (2007) Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev* 21:1714–1719
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM (2011) Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479:232–236
- Balentine E, Mufson BE, Shattuck RL, Derynck R, Richmond A (1991) Effects of MGSA/GRO alpha on melanocyte transformation. *Oncogene* 6:1115–1124
- Banito A, Gil J (2010) Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology. *EMBO Rep* 11:353–359
- Banito A, Rashid ST, Acosta JC, Li S, Pereira CF, Geti I, Pinho S, Silva JC, Azuara V, Walsh M, Vallier L, Gil J (2009) Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev* 23:2134–2139
- Bartek J, Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3:421–429
- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpoulis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Orntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444:633–637
- Bavik C, Coleman I, Dean JP, Knudsen B, Plymate S, Nelson PS (2006) The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res* 66:794–802
- Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22:4212–4222
- Ben-Porath I, Weinberg RA (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37:961–976
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dorken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436:660–665
- Brenner AJ, Stampfer MR, Aldaz CM (1998) Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 17:199–205
- Bryan TM, Reddel RR (1997) Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur J Cancer* 33:767–773
- Campisi J, d’Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:729–740
- Canino C, Mori F, Cambria A, Diamantini A, Germoni S, Alessandrini G, Borsellino G, Galati R, Battistini L, Blandino R, Facciolo F, Citro G, Strano S, Muti P, Blandino G, Ciocce M (2012) SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene* 31:3148–3163

- Chabner BA, Roberts TG Jr (2005) Timeline: chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 5:65–72
- Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, Kandel ES, Lausch E, Christov K, Roninson IB (1999) A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 59:3761–3767
- Chen Q, Ames BN (1994) Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4130–4134
- Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4337–4341
- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436:725–730
- Chen J, Huang X, Halicka D, Brodsky S, Avram A, Eskander J, Bloomgarden NA, Darzynkiewicz Z, Goligorsky MS (2006) Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H1575–H1586
- Cheng S, Rodier F (2015) Manipulating senescence in health and disease: emerging tools. *Cell Cycle* 14:1613–1614
- Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, Premrsirut P, Luo W, Chicas A, Lee CS, Kogan SC, Lowe SW (2011) Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* 25:2125–2136
- Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C (2009) Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 8:18–30
- Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Baradad M, Benguria A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436:642
- Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM (2006) Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* 281:29568–29574
- Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6:2853–2868
- Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J (2010a) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5:99–118
- Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beausejour CM, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Desprez PY, Campisi J (2010b) A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS One* 5:e9188
- Coppe JP, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez PY, Campisi J (2011) Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* 286:36396–36403
- Cristofalo VJ, Pignolo RJ (1993) Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol Rev* 73:617–638
- d’Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426:194–198
- de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19:2100–2110
- Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O (2009) Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 4:1798–1806
- Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijj J, Van Steeg H, Dolle ME, Hoeijmakers JH, de Bruin A, Hara E, Campisi J (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31:722–733
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8:2540–2551
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d’Adda di Fagagna F (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444:638–642
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O et al (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9363–9367
- Doroshov JH, Kummar S (2014) Translational research in oncology—10 years of progress and future prospects. *Nat Rev Clin Oncol* 11:649–662
- Dorr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Dabritz JH, Lisek J, Lenze D, Gerhardt A, Schleicher K, Kratzat S, Purfurst B, Walenta S, Mueller-Klieser W, Graler M, Hummel M, Keller U, Buck AK, Dorken B, Willmitzer L, Reimann M, Kempa S, Lee S, Schmitt CA (2013) Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* 501:421–425
- Drummond-Barbosa D (2008) Stem cells, their niches and the systemic environment: an aging network. *Genetics* 180:1787–1797
- Elmore LW, Rehder CW, Di X, McChesney PA, Jackson-Cook CK, Gewirtz DA, Holt SE (2002) Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem* 277:35509–35515
- Ewald JA, Jarrard DF (2012) Decreased *skp2* expression is necessary but not sufficient for therapy-induced senescence in prostate cancer. *Transl Oncol* 5:278–287
- Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF (2010) Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 102:1536–1546
- Fenton M, Barker S, Kurz DJ, Erusalimsky JD (2001) Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:220–226

- Flanary BE, Sammons NW, Nguyen C, Walker D, Streit WJ (2007) Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation Res* 10:61–74
- Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioi S (2007) Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 128:92–105
- Fridman AL, Tainsky MA (2008) Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene* 27:5975–5987
- Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplanov JM, Bucci G, Dobrev M, Matti V, Beausejour CM, Herbig U, Longhese MP, d'Adda di Fagnana F (2012) Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol* 14:355–365
- Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA, Kaur JS, Haluska PJ Jr, Aderca I, Zollman PJ, Sloan JA, Keeney G, Atherton PJ, Podratz KC, Dowdy SC, Stanhope CR, Wilson TO, Federspiel MJ, Peng KW, Russell SJ (2010) Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res* 70:875–882
- Ge H, Ni S, Wang X, Xu N, Liu Y, Wang X, Wang L, Song D, Song Y, Bai C (2012) Dexamethasone reduces sensitivity to cisplatin by blunting p53-dependent cellular senescence in non-small cell lung cancer. *PLoS One* 7:e51821
- Gilbert LA, Hemann MT (2010) DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell* 143:355–366
- Goldstein JC, Rodier F, Garbe JC, Stampfer MR, Campisi J (2005) Caspase-independent cytochrome c release is a sensitive measure of low-level apoptosis in cell culture models. *Aging Cell* 4:217–222
- Goodwin EC, Yang E, Lee CJ, Lee HW, DiMaio D, Hwang ES (2000) Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10978–10983
- Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43:405–413
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97:503–514
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W (2001) Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5043–5048
- Han Z, Wei W, Dunaway S, Darnowski JW, Calabresi P, Sedivy J, Hendrickson EA, Balan KV, Pantazis P, Wyche JH (2002) Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem* 277:17154–17160
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458–460
- Harrington EA, Bruce JL, Harlow E, Dyson N (1998) pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11945–11950
- Hayat MA (2013) Tumor dormancy, quiescence, and senescence: aging, cancer, and noncancer pathologies, vol 1. Springer, Dordrecht/New York
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585–621
- Hoenicke L, Zender L (2012) Immune surveillance of senescent cells—biological significance in cancer- and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis* 33:1123–1126
- Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S (2009) Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460:1132–1135
- Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V, Polyak K (2005) Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet* 37:899–905
- Jackson JG, Pant V, Li Q, Chang LL, Quintas-Cardama A, Garza D, Tavana O, Yang P, Manshoury T, Li Y, El-Naggar AK, Lozano G (2012) p53-mediated senescence impairs the apoptotic response to chemotherapy and clinical outcome in breast cancer. *Cancer Cell* 21:793–806
- Jones KR, Elmore LW, Jackson-Cook C, Demasters G, Povirk LF, Holt SE, Gewirtz DA (2005) p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *Int J Radiat Biol* 81:445–458
- Joyner DE, Bastar JD, Randall RL (2006) Doxorubicin induces cell senescence preferentially over apoptosis in the FU-SY-1 synovial sarcoma cell line. *J Orthop* 24:1163–1169
- Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, Hohmeyer A, Gereke M, Rudalska R, Potapova A, Iken M, Vucur M, Weiss S, Heikenwalder M, Khan S, Gil J, Bruder D, Manns M, Schirmacher P, Tacke F, Ott M, Luedde T, Longerich T, Kubicka S, Zender L (2011) Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479:547–551
- Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Izpisua Belmonte JC (2009) Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460:1140–1144
- Koch CM, Reck K, Shao K, Lin Q, Joussem S, Ziegler P, Walenda G, Drescher W, Opalka B, May T, Brummendorf T, Zenke M, Saric T, Wagner W (2013) Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes. *Genome Res* 23:248–259
- Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 8:877–884
- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114:1299–1307
- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Mielting C, Yee H, Zender L, Lowe SW (2008) Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134:657–667
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133:1019–1031
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS (2010) The essence of senescence. *Genes Dev* 24:2463–2479

- Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou XP, Eng C (2002) Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat Genet* 32:355–357
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113(Pt 20):3613–3622
- Kwong J, Chen M, Lv D, Luo N, Su W, Xiang R, Sun P (2013) Induction of p38delta expression plays an essential role in oncogenic ras-induced senescence. *Mol Cell Biol* 33:3780–3794
- Laberge RM, Awad P, Campisi J, Desprez PY (2012) Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron* 5:39–44
- Laberge RM, Adler D, DeMaria M, Mechtouf N, Teachenor R, Cardin GB, Desprez PY, Campisi J, Rodier F (2013) Mitochondrial DNA damage induces apoptosis in senescent cells. *Cell Death Dis* 4:e727
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5:187–195
- Leong WF, Chau JF, Li B (2009) p53 Deficiency leads to compensatory up-regulation of p16INK4a. *Mol Cancer Res* 7:354–360
- Li Q, Tainsky MA (2011) Epigenetic silencing of IRF7 and/or IRF5 in lung cancer cells leads to increased sensitivity to oncolytic viruses. *PLoS One* 6:e28683
- Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Canamero M, Blasco MA, Serrano M (2009) The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 460:1136–1139
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 12:3008–3019
- Lin HK, Chen Z, Wang G, Nardella C, Lee SW, Chan CH, Yang WL, Wang J, Egia A, Nakayama KI, Cordon-Cardo C, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP (2010) Skp2 targeting suppresses tumorigenesis by Arf-p53-independent cellular senescence. *Nature* 464:374–379
- Liu D, Hornsby PJ (2007) Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* 67:3117–3126
- Liu Y, Hawkins OE, Su Y, Vilgelm AE, Sobolik T, Thu YM, Kantrow S, Splittgerber RC, Short S, Amiri KI, Ecsedy JA, Sosman JA, Kelley MC, Richmond A (2013) Targeting aurora kinases limits tumour growth through DNA damage-mediated senescence and blockade of NF-kappaB impairs this drug-induced senescence. *EMBO Mol Med* 5:149–166
- Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, Sutherland A, Thorne M, Scoble H (2004) Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* 18:306–319
- Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M, Rodier F (2015) DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front Genet* 6:94
- Marion RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, Fernandez-Capetillo O, Serrano M, Blasco MA (2009) A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460:1149–1153
- Marxer M, Ma HT, Man WY, Poon RY (2014) p53 deficiency enhances mitotic arrest and slippage induced by pharmacological inhibition of Aurora kinases. *Oncogene* 33:3550–3560
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peepers DS (2005) BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436:720–724
- Moinfar F, Man YG, Arnould L, Bratthauer GL, Ratschek M, Tavassoli FA (2000) Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res* 60:2562–2566
- Muller PA, Vousden KH (2013) p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* 15:2–8
- Munoz-Espin D, Serrano M (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:482–496
- Muntoni A, Reddel RR (2005) The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Human molecular genetics*. 14 Spec No. 2:R191–196
- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113:703–716
- Newton AC (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270:28495–28498
- Nickoloff BJ, Lingen MW, Chang BD, Shen M, Swift M, Curry J, Bacon P, Bodner B, Roninson IB (2004) Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity. *Cancer Res* 64:2956–2961
- Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Ino Y, Moller MB, Rosenberg AE, Louis DN (1999) Malignant transformation of neurofibromas in neurofibromatosis 1 is associated with CDKN2A/p16 inactivation. *Am J Pathol* 155:1879–1884
- Ohuchida K, Mizumoto K, Murakami M, Qian LW, Sato N, Nagai E, Matsumoto K, Nakamura T, Tanaka M (2004) Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 64:3215–3222
- Oliva JL, Caino MC, Senderowicz AM, Kazanietz MG (2008) S-Phase-specific activation of PKC alpha induces senescence in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 283:5466–5476
- Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41:181–190
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 59:5002–5011
- Orimo A, Weinberg RA (2006) Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5:1597–1601
- Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Akishita M, Ouchi Y, Kaneki M (2006) Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest

- with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* 25:176–185
- Papp B, Plath K (2011) Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res* 21:486–501
- Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J (2003) Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5:741–747
- Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, Campisi J (2005) Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci* 118:485–496
- Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, Saretzki G, Rudolph KL, Kirkwood TB, von Zglinicki T (2010) Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* 6:347
- Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, Clark IM (2002) The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 1:57–65
- Qian Y, Zhang J, Yan B, Chen X (2008) DEC1, a basic helix-loop-helix transcription factor and a novel target gene of the p53 family, mediates p53-dependent premature senescence. *J Biol Chem* 283:2896–2905
- Rodier F, Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192:547–556
- Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11:973–979
- Rodier F, Munoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, Coppe JP, Campeau E, Beausejour CM, Kim SH, Davalos AR, Campisi J (2011) DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* 124:68–81
- Rodriguez-Menocal L, Pham SM, Mateu D, St-Pierre M, Wei Y, Pestana I, Aitouche A, Vazquez-Padron RI (2010) Aging increases p16 INK4a expression in vascular smooth-muscle cells. *Biosci Rep* 30:11–18
- Ross AL, Sanchez MI, Grichnik JM (2011) Nevus senescence. *ISRN Dermatol* 2011:642157
- Satyanarayana A, Greenberg RA, Schaetzlein S, Buer J, Masutomi K, Hahn WC, Zimmermann S, Martens U, Manns MP, Rudolph KL (2004) Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate DNA damage responses and senescence signaling. *Mol Cell Biol* 24:5459–5474
- Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM (1993) IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 151:2667–2675
- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW (2002) A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109:335–346
- Schnabl B, Purbeck CA, Choi YH, Hagedorn CH, Brenner D (2003) Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology* 37:653–664
- Schwarze SR, Fu VX, Desotelle JA, Kenowski ML, Jarrard DF (2005) The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia* 7:816–823
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88:593–602
- Sharpless NE, DePinho RA (2004) Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 113:160–168
- Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD (1999) Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* 9:939–945
- Sin S, Kim SY, Kim SS (2012) Chronic treatment with ginsenoside Rg3 induces Akt-dependent senescence in human glioma cells. *Int J Oncol* 41:1669–1674
- Soussi T, Wiman KG (2007) Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* 12:303–312
- Sparmann A, Bar-Sagi D (2004) Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 6:447–458
- Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, Yosef R, Pilpel N, Krizhanovsky V, Sharpe J, Keyes WM (2013) Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155:1119–1130
- Su X, Cho MS, Gi YJ, Ayanga BA, Sherr CJ, Flores ER (2009) Rescue of key features of the p63-null epithelial phenotype by inactivation of Ink4a and Arf. *EMBO J* 28:1904–1915
- Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, Coleman I, True L, Nelson PS (2012) Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med* 18:1359–1368
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676
- te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP (2002) DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 62:1876–1883
- Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A (2006) Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 174:886–893
- Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415:45–53
- Vasile E, Tomita Y, Brown LF, Kocher O, Dvorak HF (2001) Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J* 15:458–466
- Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138–141
- Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR (2008) Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 132:363–374
- Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S, Sun P (2002) Sequential activation of the MEK-extracellular

- signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* 22:3389–3403
- Weiland T, Lampe J, Essmann F, Venturelli S, Berger A, Bossov S, Berchtold S, Schulze-Osthoff K, Lauer UM, Bitzer M (2014) Enhanced killing of therapy-induced senescent tumor cells by oncolytic measles vaccine viruses. *Int J Cancer (Journal international du cancer)* 134:235–243
- Wells SI, Francis DA, Karpova AY, Dowhanick JJ, Benson JD, Howley PM (2000) Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways. *EMBO J* 19:5762–5771
- Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, Flemming P, Franco S, Blasco MA, Manns MP, Rudolph KL (2002) Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* 16:935–942
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445:656–660
- Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, Mann DJ, Ohmura M, Hirao A, Saya H, Arase S, Hayashi Y, Nakao K, Matsumoto M, Ohtani N, Hara E (2009) Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol* 186:393–407
- Yang G, Rosen DG, Zhang Z, Bast RC Jr, Mills GB, Colacino JA, Mercado-Uribe I, Liu J (2006) The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16472–16477
- Yang F, Jove V, Xin H, Hedvat M, Van Meter TE, Yu H (2010) Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways. *Mol Cancer Res* 8:35–45
- Yaswen P, MacKenzie KL, Keith WN, Hentosh P, Rodier F, Zhu J, Firestone GL, Matheu A, Carnero A, Bilsland A, Sundin T, Honoki K, Fujii H, Georgakilas AG, Amedei A, Amin A, Helferich B, Boosani CS, Guha G, Ciriolo MR, Chen S, Mohammed SI, Azmi AS, Bhakta D, Halicka D, Niccolai E, Aquilano K, Ashraf SS, Nowsheen S, Yang X (2015) Therapeutic targeting of replicative immortality. *Semin Cancer Biol*. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.007
- Zhang H, Herbert BS, Pan KH, Shay JW, Cohen SN (2004) Disparate effects of telomere attrition on gene expression during replicative senescence of human mammary epithelial cells cultured under different conditions. *Oncogene* 23:6193–6198
- Zhang J, Pickering CR, Holst CR, Gauthier ML, Tlsty TD (2006) p16INK4a modulates p53 in primary human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 66:10325–10331
- Zhu Y, Xu L, Zhang J, Hu X, Liu Y, Yin H, Lv T, Zhang H, Liu L, An H, Liu H, Xu J, Lin Z (2013) Sunitinib induces cellular senescence via p53/Dec1 activation in renal cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 104:1052–1061
- Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Gioradze N, Palmer AK, Ikeno Y, Hubbard GB, Lenburg M, O'Hara SP, LaRusso NF, Miller JD, Roos CM, Verzosa GC, LeBrasseur NK, Wren JD, Farr JN, Khosla S, Stout MB, McGowan SJ, Fuhrmann-Stroissnigg H, Gurkar AU, Zhao J, Colangelo D, Dorransoro A, Ling YY, Barghouthy AS, Navarro DC, Sano T, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Kirkland JL (2015) The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14:644–658
- Zindy F, Quelle DE, Roussel MF, Sherr CJ (1997) Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15:203–211
- Zurgil U, Ben-Ari A, Atias K, Isakov N, Apte R, Livneh E (2014) PKCeta promotes senescence induced by oxidative stress and chemotherapy. *Cell Death Dis* 5:e1531

Annexe 2

Résultats préliminaires du MMT pré et post- chimiothérapie. Ces résultats ont été générés par Michael Skulimowski étudiant d'été candidat à la maîtrise (Juin-Aout 2014).

1. Expression de p16^{INK4A}

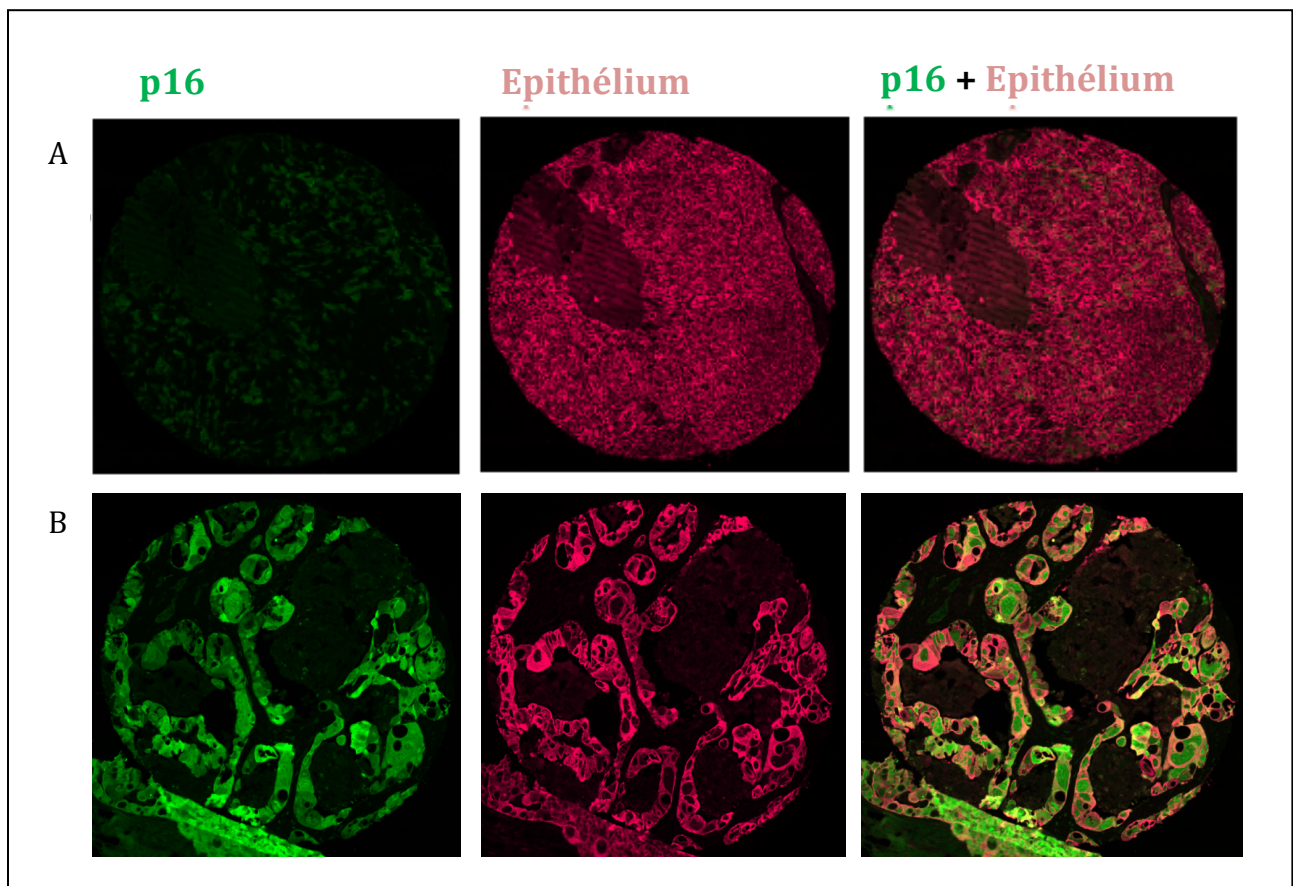


Figure 1. Marquage par immunofluorescence des MMT. En A on observe les données brutes pour l'expression de p16^{INK4A} et le marquage avec les cytokératines pour détecter la partie épithéliale de la tumeur chez une tumeur non traité (pré-chimiothérapie). En B on observe encore le marquage p16 et le marquage épithélial chez une tumeur déjà traité (post-chimiothérapie).

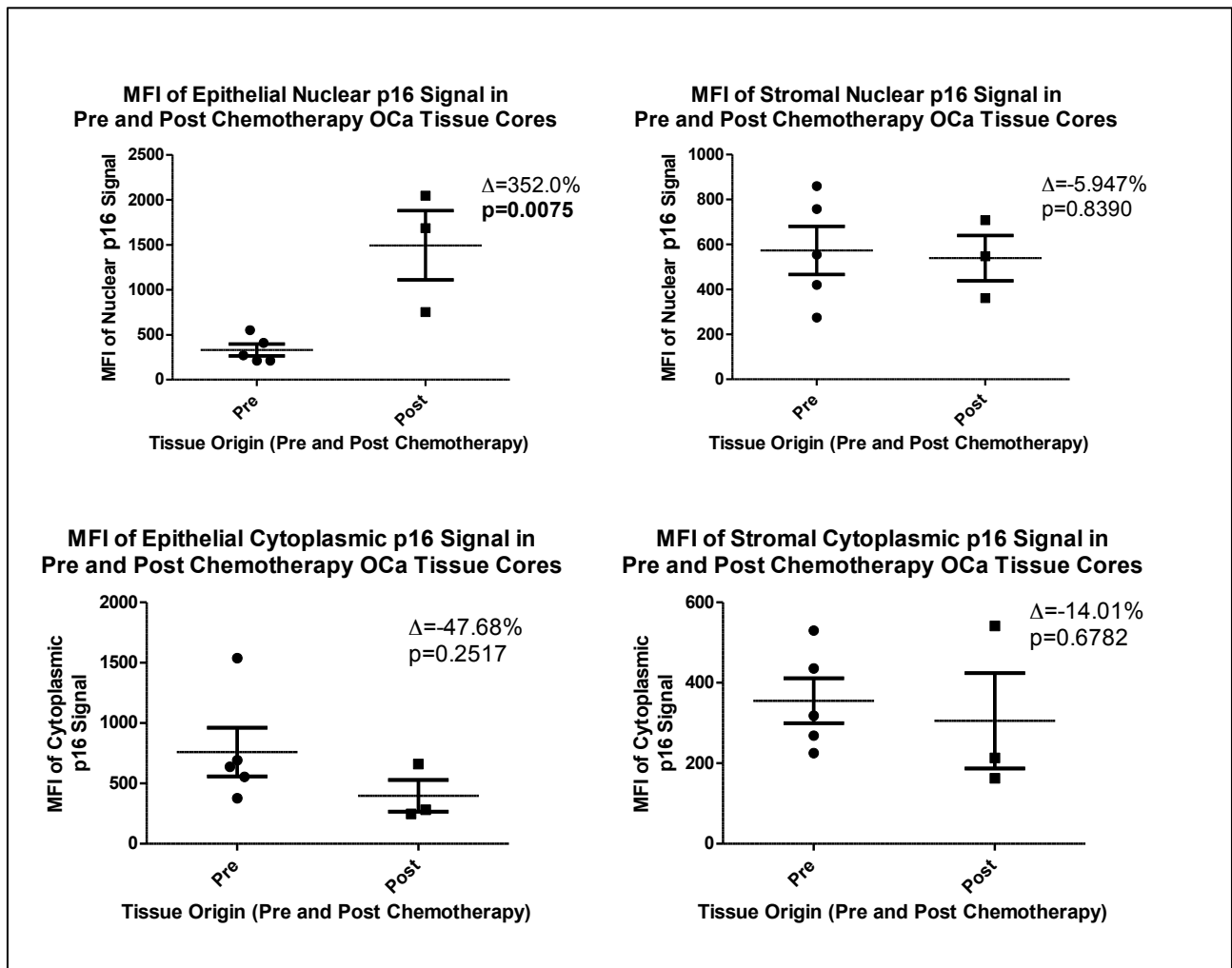


Figure 2. Expression de p16INK4A dans du tissu provenant des patientes. Lorsque les patientes ont reçu des chirurgies pré et post chimiothérapie les tissus ont été récupérés dans la biobanque du CRCHUM et ils ont été mis à notre disposition. Nous avons réalisés des marquages par immunofluorescence et avons analysés les images avec le logiciel AxioObserver. En A nous observons l'intensité moyenne de l'expression de la protéine p16INK4A dans le cytoplasme des cellules épithéliales et stromales des tumeurs ovariennes pré et post-chimiothérapie. En B nous observons l'intensité moyenne de l'expression de la protéine p16INK4A dans le noyau des cellules épithéliales et stromales des tumeurs ovariennes pré et post-chimiothérapie.

La conclusion à laquelle nous sommes arrivés avec ce résultat c'est que l'expression nucléaire de p16INK4A est significativement augmentée dans le noyau des tumeurs post-chimiothérapie. De manière très surprenant nous avons aussi observé que l'expression de la protéine p16INK4A n'est pas augmentée dans le cytoplasme après la chimiothérapie. Ceci démontre qu'il s'agit d'une induction spécifique de p16INK4A dans le noyau post-chimiothérapie.

