





Université de Montréal

**Le rôle de l'autophagie et de la sénescence dans la fibrose  
induit par la radiothérapie**  
**Implications cliniques en reconstruction mammaire prothétique**

par Mostafa El-Diwany

Programme de Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en Sciences Biomédicales

Version révisée  
Décembre 2017

© Mostafa El-Diwany, 2017



## Résumé

La fibrose péri-prothétique est la complication la plus fréquente de la reconstruction mammaire par implant et se manifeste cliniquement par une contracture capsulaire. Cette complication est d'autant plus fréquente et sévère chez les patientes ayant nécessité un traitement de radiothérapie. Les indications de la radiothérapie adjuvante post-mastectomie sont de plus en plus élargies qu'auparavant. Dans un contexte où un nombre croissant de patientes auront recours à la radiothérapie dans le plan de traitement oncologique, la plupart des guides de pratique suggère de retarder la reconstruction mammaire jusqu'après la radiothérapie afin de prévenir les complications fibrotiques à long-terme. Est-ce que la radiothérapie modifie les propriétés cellulaires de façon permanente affectant ainsi les résultats cliniques de la reconstruction mammaire prothétique ? Si oui, y a-t-il un avantage à retarder la reconstruction mammaire post radiothérapie ?

Notre modèle in vitro simulait deux approches de reconstruction mammaire par prothèse où la radiothérapie est nécessaire : l'irradiation de la reconstruction mammaire et la reconstruction mammaire prothétique retardée suite à la radiothérapie. Nous avons procédé à la culture cellulaire de fibroblastes pulmonaires Wi38 et des cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC). Les fibroblastes irradiés simulaient les tissus sains retrouvés autour de l'implant. L'irradiation retardée de la reconstruction mammaire prothétique était simulée par des fibroblastes non-irradiés conditionnés dans un surnageant obtenu de cellules endothéliales irradiées. L'autophagie était induit par la culture cellulaire en milieu sans sérum. L'activation de la sénescence était déterminée grâce à des marqueurs protéiques connus tel que p16 par dosage Western Blot et le marquage histologique à la  $\beta$ -Galactosidase. La diminution

du taux protéique de p62 était utilisée comme marqueur d'autophagie. Le Connective Tissue Growth Factor (CTGF), un activateur de la différenciation myofibroblastique, était dosé dans les lignées Wi38 et HUVEC. Le marqueur protéique de la différenciation myofibroblastique employé était l' $\alpha$ SMA. La Tubuline-A était utilisée comme contrôle positif des Western Blot.

L'irradiation a induit la fibrose par la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes démontrée par une augmentation des taux du  $\alpha$ SMA. Ceci constitue la base de la contraction cicatricielle observée dans la reconstruction mammaire par implant lorsque la radiothérapie est indiquée. L'irradiation des cellules endothéliales a induit la sénescence qui est un arrêt irréversible du cycle cellulaire ; de plus, la sécrétion de l'agent profibrotique CTGF a été observé. Les fibroblastes non-irradiés conditionnés avec un surnageant obtenu de cellules endothéliales irradiées ont démontré une différenciation myofibroblastique en plus de l'expression du phénotype fibrotique caractéristique de la contracture capsulaire. Nous n'avons pas observé d'activation autophagique en réponse à l'irradiation dans notre système.

Nos résultats démontrent que la radiothérapie cause un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Ceci altère le microenvironnement cellulaire en faveur de la fibrose. Étant donné que ces changements sont permanents, retarder la reconstruction mammaire après la radiothérapie ne présente pas d'avantage dans la prévention de la contracture capsulaire.

**Mots-clés** : retarder, reconstruction mammaire par implant, radiothérapie, fibrose, sénescence, autophagie.

## Abstract

The most common complication of irradiated implant-based mammary reconstruction is fibrosis and capsular contracture. The indications for post mastectomy adjuvant radiotherapy have significantly broadened. Facing an increased number of patients who will require radiotherapy, most guidelines recommend delaying reconstruction after radiotherapy to prevent long-term fibrotic complications. Does radiotherapy permanently alter cellular properties which will adversely affect implant-based reconstruction? If so, is there a benefit in delaying reconstruction after radiotherapy?

Our in-vitro model simulates two implant-based mammary reconstruction approaches: the irradiated implant and the delayed implant reconstruction beneath healthy un-irradiated tissue post radiotherapy. We performed cell culture of fibroblasts and endothelial cells, in an attempt to simulate these two surgical conditions. Irradiated fibroblasts simulate the capsular tissue seen around the breast-implant. The delayed reconstruction approach is simulated by non-irradiated fibroblasts conditioned with supernatant culture media obtained from irradiated endothelial cells. Autophagy was induced by serum starvation. Senescence activation was measured through the protein marker p16 by Western Blot and histological  $\beta$ -Galactosidase staining. The decrease in p62 protein marker levels was used as a marker for autophagy activation. Connective Tissue Growth Factor (CTGF), a potent fibrotic activator, was measured in Wi38 and HUVEC cell lines. The protein marker for myofibroblast differentiation used is  $\alpha$ SMA. Tubuline-A was used as a loading control for Western Blots.

Irradiation induced fibrosis through fibroblast differentiation into myofibroblasts, as demonstrated by increased  $\alpha$ -smooth-muscle actin ( $\alpha$ SMA) levels in fibroblasts. This constitutes

the basis for scar tissue contraction observed in irradiated implant-based breast reconstruction. Irradiation of endothelial cells induced irreversible cell cycle arrest known as senescence and secretion of the pro-fibrotic connective tissue growth factor. Non-irradiated fibroblasts conditioned with culture media obtained from irradiated endothelial cells exhibited myofibroblast differentiation and expression of fibrotic phenotype akin to capsular contracture. We did not observe autophagy activation secondary to irradiation in our system.

Our results demonstrate that radiotherapy causes irreversible cellular changes which permanently alter the microenvironment in favor of fibrosis. Given that these changes are permanent, delaying reconstruction does not present an advantage in preventing capsular contracture.

**Keywords** : delay, implant-based mammary reconstruction, radiotherapy, fibrosis, senescence, and autophagy



# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	iii
Table des matières.....	v
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi
Introduction .....	1
1. La reconstruction mammaire et la radiothérapie.....	5
2. La fibrose.....	7
2.1 La cicatrisation aigüe .....	7
2.2 La fibrose chronique .....	9
2.2 Le rôle du CTGF.....	10
3. L'autophagie.....	12
3.1 L'autophagie et la fibrose.....	13
4. La sénescence.....	14
4.1 Détecter l'activation de la sénescence.....	14
4.2 La sénescence et la fibrose .....	15
4.3 Le Senescent Associated Secretory Phenotype .....	15
5. Article soumis au Journal of Plastic, Reconstruction and Aesthetic Surgery .....	17
6. Correspondances et communications.....	27
Discussion.....	33
Perspectives .....	34
Bibliographie .....	i



## Liste des abréviations

4d :	4 days post time zero
4h :	4 hours post time zero
7d :	7 days post time zero
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ATG :	Autophagy Gene
$\alpha$ SMA :	Alpha smooth muscle actin
$\beta$ -Gal :	Beta Galactosidase
CTGF :	Connective tissue growth factor
DDR :	DNA damage response
GP :	Growth phase
Gy :	Gray units
HUVEC :	Human umbilical vein endothelial cell
IL :	Interleukin
LC3-I :	Microtubule-associated protein light chain 3 one
LC3-II :	Microtubule-associated protein light chain 3 two
mTOR	Mammalian (or mechanistic) target of Rapamycin
mTORC :	Mammalian target of Rapamycin complex
p16 :	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21 :	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
p53 :	Phosphoprotein 53
p61 :	Protein 62, also known as sequestosome 1

ROS	Reactive oxygen species
S1 P :	Synthesis 1 phase
SAHF :	Senescence-associated heterochromatin foci
SASP :	Senescence associated secretory phenotype
siRNA :	Small interfering RNA
SS :	Serum starvation
TGF- $\beta$ :	Transforming growth factor beta
WB :	Western blot
Wi38 :	Wi38 human fetal lung fibroblast cell line

*À Zahra*



# Remerciements

## Solitude

Le silence imbibe l'air d'un chant harmonieux  
Qui respire les reflets d'une nature qui meurt.  
Et de l'ombre s'élèvent des teints mystérieux  
Souriant aux regards des mourants qui pleurent.

L'attente murmure à l'herbe la brûlante passion  
Des déserts qui ne font que rêver de la pluie.  
Et dans le repos des nuages s'étouffent les pulsions  
De l'océan qui tanguent et de la perle qui luit.

Le sommeil arrose au pied des arbres l'espoir  
Que la chandelle éteinte avait brûlé la veille.  
La tristesse se réveille, se blottit, se rendort  
Sur l'écume des douleurs et des blessures vieilles.

L'indifférence des fleurs et l'omission du vent  
Dessinent parfaitement cette incomplétude.  
Le silence, la pénombre, le désert, l'océan  
Et les nuits sans sommeil racontent ma solitude.

Mostafa El-Diwany

Tout étudiant de maîtrise peut se remémorer ces moments pénibles où l'on se sent seul devant un obstacle, surtout s'il y a un programme de résidence en parallèle... Dans mon cas, j'ai eu la chance d'être entouré par des individus qui m'ont guidé et supporté tout au long du voyage. J'aimerais ici leur dédier ce poème et les remercier pour tout ce qu'ils m'ont offert lors de cette aventure qui tire à sa fin.

Mes sincères remerciements vont tout d'abord à mon mentor et enseignant Dr Alain Michel Danino qui a été pour moi une source d'inspiration et de motivation dès le début de notre collaboration. Mon projet de maîtrise n'aurait pas pu être réalisé sans le support et la supervision

de Dre Marie-Josée Hébert. Je suis également redevable à Dr Jean-Philippe Giot pour son aide constante et pour tout l'enseignement qu'il m'a fait. Tout comme je remercie Dre Monique Bernard pour sa générosité et pour m'avoir pris sous son aile dans le laboratoire. Je n'aurai jamais pu faire de Western Blot sans la précieuse aide de Dre Bing Yang qui m'a initié aux techniques de la biologie moléculaire. J'ai particulièrement apprécié l'aide et la disponibilité de Dr Francis Rodier qui m'a particulièrement aidé au courant de ce projet. Merci aussi pour l'agréable compagnie et l'aide de tous les membres du laboratoire de Dre Hébert : Julie, Deborah, Luc, Mélanie, Mélissa, Lauriane.

J'aimerais également présenter ma gratitude à ma famille qui a toujours été une source d'énergie sans fond pour moi. Et à mon amour Zahra, tous les mercis du monde! Tu es la lumière de ma vie et sans toi je n'aurais pu accomplir ce projet. J'aimerais donc te dédier ce mémoire.

Mostafa El-Diwany  
Décembre 2016



# Introduction

## Rationnelle :

Le cancer du sein est la néoplasie la plus commune chez la femme<sup>1</sup>, et un nombre croissant de patientes diagnostiquées nécessite une mastectomie totale<sup>2</sup>. Due à une survie accrue de ces patientes, il y a une demande croissante pour la reconstruction mammaire qui a démontré des bénéfices fonctionnelles, psychologiques et sociales pour les survivantes de cancer du sein en plus d'une qualité de vie améliorée<sup>3-5</sup>. Les options de reconstructions incluent les lambeaux autologues, prothèses mammaires, et une combinaison de ces deux approches selon les préférences de la patiente et du chirurgien. Un des éléments thérapeutiques qui a contribué à un taux de survie accru des patientes atteintes du cancer du sein est la radiothérapie adjuvante<sup>6</sup>. Cependant, il a été bien démontré que l'irradiation est associée avec un taux plus important de complications aiguës et chroniques ainsi qu'un risque croissant d'échec de reconstruction<sup>1-4,6-13</sup>. La complication la plus fréquente associée à la radiothérapie est la fibrose et la contracture capsulaire<sup>1,2</sup>. De plus, au courant des deux dernières décennies, les indications de la radiothérapie adjuvante post-mastectomie ont été grandement élargies<sup>12</sup>. Présentée avec un nombre croissant de patientes qui requièrent un traitement adjuvant de radiothérapie, la plupart des guides de pratique recommande de retarder la reconstruction mammaire jusqu'après la radiothérapie afin de prévenir les complications fibrotiques<sup>1</sup>. Est-ce que le retard de la reconstruction mammaire aide réellement à prévenir la contracture capsulaire? Si oui, que devrait être cette intervalle? La littérature n'offre aucune réponse claire à cette question critique, et les guides de pratiques actuels demeurent controversés<sup>4</sup>. La réponse à cette question pourrait permettre aux cliniciens et aux patientes de prendre des décisions plus éclairées quant aux choix

de la reconstruction, à sa planification, et son suivi clinique. Nous avons tenté d'élucider cette question d'un point de vue fondamental en tentant de mieux comprendre la pathophysiologie de la fibrose induit par l'irradiation avec une pertinence clinique quant à la reconstruction mammaire prothétique post mastectomie.

La fibrose est un processus anormal de réparation tissulaire caractérisée par l'accumulation de myofibroblastes qui par leur sécrétion exagérée de la matrice extracellulaire causent une altération de l'architecture tissulaire et une perte de fonction organique. Ce processus est à la base de la contracture capsulaire qui est une complication bien reconnue de la chirurgie mammaire par prothèse. Tout implant mammaire devient entouré par une capsule fibreuse. L'irradiation a été associée à la rétraction capsulaire qui affecte négativement la symétrie, le volume, et la projection du sein reconstruit tout en engendrant de la douleur<sup>8,9,11</sup>. Au niveau cellulaire, la radiothérapie induit la sénescence cellulaire aussi connue comme un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Le Connective Tissue Growth Factor (CTGF) est un agent pro-fibrotique puissant qui est secrété par plusieurs lignées cellulaires incluant les fibroblastes et les cellules endothéliales. Ce facteur fait aussi partie du Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) qui constitue l'ensemble des facteurs sécrétés par une cellule sénescence<sup>14</sup>. Des études in vivo ont démontré que le CTGF est nécessaire et suffisant au processus fibrotique et peut induire la fibrose par plusieurs voies de signalisation en agissant en aval du *Tissue Growth Factor-beta* (TGF- $\beta$ ) ou indépendamment de celui-ci. Le CTGF induit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes sécrétant la protéine  $\alpha$ SMA<sup>15-17</sup>.

D'autre part, sachant que l'irradiation cause un dommage à la microvascularisation<sup>11</sup>, nous pouvons anticiper une hypoxie tissulaire, une diminution en apport nutritive et en facteurs de croissance, ce qui porte les cellules à digérer leurs organelles afin d'assurer leur survie; ce

phénomène est l'autophagie. Bernard et al. a récemment démontré que l'autophagie soutient le processus de fibrose en induisant la différenciation de myofibroblastes par la sécrétion du CTGF à travers mTORC2<sup>18</sup>.

### **Hypothèse :**

Basé sur les données reliant l'irradiation à la fibrose, la sénescence et l'autophagie, notre hypothèse était que l'irradiation active la sénescence et/ou l'autophagie ce qui induit la sécrétion du CTGF et cause la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes. On croyait que ces changements du microenvironnement cellulaire étaient irréversibles; donc, il n'existerait aucun avantage théorique à retarder la reconstruction mammaire après la radiothérapie.

### **Objectifs :**

Notre objectif principal était d'étudier la fibrose dans le contexte de la reconstruction mammaire en relation avec la radiothérapie d'un point de vue clinique. Nous estimions que notre modèle in vitro nous permettrait de cibler les processus physiopathologiques en lien avec l'induction de la fibrose en réponse à la radiothérapie. Si les processus responsables de l'induction de la fibrose étaient irréversibles, nous pourrions mieux juger de la pertinence d'un délai entre la radiothérapie et la phase reconstructive. Donc, notre objectif premier était de déterminer s'il y aurait un bénéfice à retarder la reconstruction mammaire avec implant lorsque la radiothérapie est indiquée.

Notre objectif secondaire était d'identifier les processus physiopathologiques (sénescence et/ou autophagie) qui expliqueraient le lien clinique entre la radiothérapie et la fibrose tissulaire.

Notre dernier objectif était de définir des pistes de recherche qui pourraient mieux caractériser le lien entre l'irradiation et la fibrose et viser des traitements potentiels pour la fibrose dans le contexte de reconstruction mammaire et potentiellement dans d'autres pathologies systémiques.

# 1. La reconstruction mammaire et la radiothérapie

La reconstruction mammaire a démontré des bénéfices fonctionnels, psychologiques et sociales pour les survivantes de cancer du sein en plus d'une qualité de vie améliorée<sup>3-5</sup>. En 2012, 75% des reconstructions mammaires réalisées aux États-Unis ont été par prothèse ; un portrait qui reflète la réalité Canadienne de la reconstruction mammaire post néoplasie du sein<sup>1</sup>. La radiothérapie est une source majeure de complications pour la reconstructions mammaire prothétique<sup>1-4,6-13</sup>. Suite à la phase inflammatoire aigüe qui s'estompe au bout de quelques mois, les complications à long terme incluent l'atrophie tissulaire, l'érythème chronique, la télangiectasie et la contracture capsulaire découlant de la fibrose périprothétique<sup>9-11,19</sup>. Ces taux de complications sont quatre à dix fois plus élevés en zones irradiées : le taux de contracture capsulaire peut s'élever à plus de 29-68% chez les sujets qui ont eu recours à un traitement de radiothérapie comparé à 10-40% chez des patientes qui n'ont pas eu de traitement d'irradiation<sup>1,20</sup>.

La complication la plus fréquente de la reconstruction mammaire prothétique associée à la radiothérapie est la contracture capsulaire<sup>1,2</sup>. Initialement, tout implant mammaire se trouve enveloppé par une membrane de tissu fibrotique immature composé principalement de fibrine et de phagocytes suite à la stimulation du système immunitaire qui perçoit la prothèse comme un corps étranger. La production progressive de collagène et la résolution de l'inflammation locale mènent à la formation du capsule périprothétique mature qui requiert en moyenne quatre semaines<sup>21,22</sup>. L'irradiation intensifie la production du tissu fibreux périprothétique, ce qui détériore la symétrie, le volume, et la projection de la reconstruction en plus de causer de la douleur : c'est ce que l'on nomme la contracture capsulaire<sup>9-11</sup>. Elle a été classifiée par Baker

sous quatre grades. En grade 1, le sein demeure souple sans changement évident en volume ni en forme ; tandis que le quatrième grade décrit un sein dur et douloureux qui peut impliquer une déformation de la cage thoracique. Les cas sévères requièrent une chirurgie de révision impliquant une capsuléctomie (i.e. l'excision de la capsule périprothétique) et l'emploi d'une technique alternative impliquant un lambeau autologue. La contracture capsulaire se développe au cours des semaines et des mois suivant l'implantation de la prothèse mammaire ; dans 92% des cas, ceci est observé dans la première année suivant la chirurgie<sup>23-26</sup>. Le taux élevé de morbidité découlant de cette complication et les conséquences économiques sociétales associées à la reconstruction mammaire prothétique en fait un réel problème de santé publique<sup>27</sup>.

Cliniquement, dans un contexte où la radiothérapie est de plus en plus nécessaire au plan de traitement des patientes, la reconstruction mammaire par implant est affectée par des taux de complications croissant de 400% à 1000% menant certains auteurs à suggérer d'éviter cette approche reconstructive là où la radiothérapie est indiquée<sup>14,28</sup>. D'autres auteurs ainsi que la plupart des guides de pratique recommandent de retarder la reconstruction mammaire jusqu'après la radiothérapie afin de prévenir les complications fibrotiques<sup>1</sup>. La moindre chose que l'on puisse dire est que cette recommandation est controversée car elle n'est basée sur aucune donnée probante.

## **2. La fibrose**

La fibrose est un processus physiopathologique de réparation tissulaire anormale associée avec l'accumulation de myofibroblastes qui par leur sécrétion exagérée de la matrice extracellulaire engendre une perte de fonction tissulaire<sup>29</sup>. Ce phénomène est à la base de plusieurs pathologies allant de la formation de la plaque d'athérosclérose et ses complications systémiques à l'insuffisance rénale chronique et la cirrhose hépatique<sup>30</sup>. Malgré l'étendu de ce problème, il n'existe aucun traitement contre la fibrose<sup>31</sup>.

### **2.1 La cicatrisation aigüe**

Le processus de la cicatrisation est un exemple physiologique de réparation tissulaire qui assure l'intégrité tissulaire. Ce processus est l'extension de la capacité régénératrice embryologique indépendamment de l'insulte tissulaire<sup>29</sup>. L'organisme perd cependant cette capacité avec son développement normal<sup>29</sup>. Cependant, les organes du corps humain conservent une habileté limitée de régénération tissulaire par le moyen de plusieurs types cellulaires, voies de signalisation intra- et intercellulaires complexes impliquant une réponse immunitaire et l'activation d'un processus inflammatoire fermement régulé<sup>31,32</sup>. L'exemple le plus courant d'un tel processus est la formation d'une cicatrice cutanée suite à une coupure: l'insulte initiale est suivie par un saignement local, une hémostase primaire et secondaire menant à la formation d'un caillot plaquettaire suivi par leurs dégranulation, l'activation du complément, et une dégradation bactérienne directe. Une réponse immunitaire est en suite initiée avec la sécrétion de facteurs de croissance, cytokines et chemokines par les plaquettes en dégranulation, ainsi que par les cellules de la réponse immunitaire initiale incluant les macrophages et les neutrophiles. Ces cellules recrutent les cellules immunitaires humorales et les fibroblastes en proximité. Les

fibroblastes recrutés débutent leur activation et différenciation en myofibroblastes en réponse aux facteurs pro-fibrotiques tels le TGF- $\beta$  et le CTGF en développant des fibres de stress et en adoptant un phénotype d'expression d' $\alpha$ SMA<sup>31,32</sup>.

Morphologiquement, le myofibroblaste se caractérise par la présence d'appareils contractiles composés de microfilaments actiniques associés avec des protéines de myosines non-musculaires; ce complexe contractile donne lieu à la formation de fibres de stress observés chez les fibroblastes en culture. Ces filaments d'actine se lient à la surface du myofibroblaste par le biais d'un complexe d'intégrines transmembranaires afin de transmettre la force tensile des filaments d'actines intracellulaires aux filaments de fibronectines extracellulaires; les signaux mécaniques extracellulaires peuvent également être transmis vers le milieu intracellulaire à travers ce complexe. Les myofibroblastes adjacents peuvent également se contracter en unité à l'aide de jonctions lacunaires. De plus, afin de permettre une contraction efficace du tissu cicatriciel, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes. En addition aux fibres d'actine intracellulaire  $\alpha$  et  $\beta$ , les myofibroblastes sont dotés de fibres d'actine caractéristiques des muscles lisses ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actine). Durant ce processus de différenciation, les fibroblastes passent par un stade intermédiaire dit proto-myofibroblastique. Durant ce stade, le fibroblaste acquiert des fibres de stress mais ne présente pas d' $\alpha$ SMA. C'est seulement sous le phénotype de myofibroblaste différencié que nous observons l'expression d' $\alpha$ SMA<sup>31</sup>.

De concert avec des cellules endothéliales et épithéliales, ces myofibroblastes activés forment un tissu de granulation riche en éléments cellulaires. Dotés d'une capacité contractile, les myofibroblastes exercent une force tensile sur ce tissu de granulation et ainsi modifient son



architecture. Cette étape permet la fermeture de la plaie rendant le myofibroblaste indispensable à ce processus de réparation tissulaire. Ce tissu cicatriciel n'est cependant pas identique à la peau native; il est riche en collagène lui donnant une force tensile augmentée. Cependant, le tissu cicatriciel continue d'évoluer suite à la fermeture de la plaie sous l'effet de plusieurs protéases. Ce processus peut évoluer sur plusieurs mois<sup>32</sup>.

Il est important d'apprécier la régulation de ce processus qui permet d'atteindre une cicatrisation normale sans quoi nous ferons face au problème de la fibrose chronique.

## **2.2 La fibrose chronique**

La formation de cicatrice hypertrophique est un exemple d'une cicatrisation anormale. La sécrétion exagérée des constituants de la matrice extracellulaire et une contraction supra-physiologique mènent à une altération de l'architecture tissulaire normale ainsi qu'à une perte de fonction organique<sup>31</sup>. Ce phénomène est à la base de la contracture périprothétique dans la reconstruction mammaire post radiothérapie ainsi que plusieurs pathologies pouvant toucher tous les organes de l'organisme<sup>29,30</sup>. Découlant d'une cicatrisation anormale, la fibrose peut être le résultat d'un insulte chronique maintenant une réponse inflammatoire qui entretient l'activation fibroblastique<sup>33</sup>. Le myofibroblaste joue un rôle différent dans la cicatrisation aiguë et la fibrose. Durant la guérison normale de la plaie, suite à l'épithélialisation, on observe une diminution importante du nombre de cellules, en particulier le nombre de myofibroblastes au sein du tissu de granulation. Grâce à l'apoptose des myofibroblastes dans le tissu de granulation, on obtient un tissu cicatriciel faible en éléments cellulaires. Cependant, au sein du tissu fibrotique, on n'observe pas cette diminution attendue du nombre des myofibroblastes activées. L'accumulation de ces cellules et leur sécrétion exagérée d'éléments de la matrice

extracellulaire donnent lieu à la déformation du parenchyme, altérant ainsi l'architecture tissulaire et menant ultimement à une perte de fonction organique. Selon Tomasek *et al*, ce processus pathologique découle donc d'une dérégulation des myofibroblastes activée qui n'entrent pas en apoptose<sup>31</sup>. De plus, l'autophagie et l'arrêt du cycle cellulaire, ou la sénescence, semblent être impliquées dans la fibrose<sup>18,34</sup>.

## **2.3 Le rôle du CTGF**

Le CTGF est une protéine fixée aux constituants de la matrice extra-cellulaire. Cette protéine est sécrétée par plusieurs lignées cellulaires incluant les cellules endothéliales et les fibroblastes. Le CTGF agit sur la prolifération et l'angiogenèse, ainsi que sur la survie et la migration cellulaire. Le récepteur du CTGF n'a pas encore été identifié, mais certains ont émis l'hypothèse qu'il agit à travers des intégrines<sup>35</sup>.

De multiples études animales ont démontré que le CTGF est nécessaire au développement de la fibrose et peut à lui seul induire la différenciation myofibroblastique *in vivo*<sup>36,37</sup>. Laplante *et al.* a démontré que le CTGF est essentiel à la fibrose cutanée chez la souris dans un modèle de fibrose induit par un milieu conditionné par des cellules endothéliales apoptotique en bloquant la fibrose par immunoprécipitation du CTGF dans le milieu endothélial conditionné par carence de sérum avant l'injection sous cutanée<sup>17</sup>. Dans un modèle expérimental de la sclérodémie chez l'humain, l'inhibition du CTGF via siRNA *in vitro* a également démontré que ce facteur joue un rôle central dans la fibrose puisque son inhibition diminue l'expression de collagène 1 et 3 : des protéines de la matrice extracellulaire<sup>38</sup>. De plus, l'expression du CTGF est augmentée dans plusieurs pathologies fibrotiques telles la fibrose

pulmonaire, la cirrhose, la fibrose rénale en insuffisance rénale chronique et la sclérodermie<sup>39,40</sup>.

Le CTGF induit la différenciation myofibroblastique à travers de multiples voies de signalisation indépendamment du TGF- $\beta$ <sup>15-17</sup>. De plus, l'importance du CTGF peut être appréciée non seulement par le fait que son activité peut être augmentée par une activation du TGF- $\beta$ , mais aussi car le CTGF augmente l'interaction du TGF- $\beta$  avec son récepteur renforçant ainsi le signal pro-fibrotique<sup>15,16,41,42</sup>.

Finalement, le CTGF fait partie du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP ou senescence associated secretory phenotype)<sup>14</sup>, et Bernard et al. a récemment démontré que l'autophagie promeut la différenciation myofibroblastique par une voie de signalisation dépendante de mTORC2 en activant la sécrétion du CTGF<sup>18</sup>. Tous ces propriétés du CTGF en font le facteur de prédilection qui mérite d'être examiné dans la fibrose induit par la radiothérapie en reconstruction mammaire.

### 3. L'autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire homéostatique qui permet la dégradation et le recyclage d'entités intracellulaires dysfonctionnelles par les autophagolysosomes; ce sous-type d'autophagie est nommé macroautophagie. C'est sur ce sous-type que nous allons nous attarder étant le sous-type le plus étudié en outre du microautophagie et l'autophagie médiée par un chaperon<sup>43</sup>. En situation de stress cellulaire, l'autophagie présente un moyen de survie en sacrifiant les organelles pour assurer l'intégrité de la cellule en offrant les molécules composant les entités intracellulaires comme source d'énergie. Ce stress cellulaire peut être engendré par une carence de nutriment ou par l'absence de facteurs de croissance<sup>44</sup>. Le signal autophagique est transmis à la machinerie régulatrice de ce processus qui sont exprimées par les gènes liés à l'autophagie (Autophagy-related genes; *ATG*)<sup>45</sup>.

Voici les différentes étapes qui mènent à la formation de l'autophagosome. En présence d'un stimulus autophagique tel que la carence de nutriments, le processus est initié par l'inhibition du mammalian target of Rapamycine (mTOR) qui fait partie du complexe mTORC1. En présence des facteurs de croissances qui activent la voie de signalisation PI3K-AKT, ou tout autre signal de nutriment, mTORC1 inhibe un complexe composé de ULK1, ATG13, ATG101, et FIP200. Inversement, la déplétion énergétique inhibe mTORC1, ce qui permet au complexe incluant ULK1 d'initier le processus d'autophagie. Cette activation permet au complexe Beclin 1 d'initier la nucléation de la membrane d'isolation appelée aussi phagophore. Cette première étape de l'autophagie constitue la phase d'initiation. La phase suivante est l'élongation autophagosomale et dépend de deux systèmes de conjugaisons : ATG5-ATG12 et LC3-ATG8. Cette étape de formation de l'autophagosome implique la protéine LC3 qui est retrouvée dans

le cytosol sous sa forme LC3-I qui se trouve intégrée dans la membrane de l'autophagosome après être lipidée et convertie à sa forme LC3-II<sup>45</sup>. Le ratio LC3-II sur LC3-I peut être utilisé comme marqueur d'autophagie par western blot<sup>43</sup>. Cependant, dans cette étude nous avons eu recours à la protéine p62 comme marqueur d'autophagie. Cette protéine se lie à LC3-II et se trouve dégradée dans l'autophagolysosome menant ainsi à des taux réduits de p62 avec l'activation de l'autophagie pouvant être évalué par western blot<sup>43</sup>. Le *gold standard* de l'évaluation de l'activation autophagique est la visualisation des autophagosomes par microscopie électronique caractérisées par leurs double membranes phospholipides<sup>44</sup>. Ces autophagosomes visualisés en microscopie électronique sont présents lors de la phase de maturation. Cette étape est suivie par la fusion de l'autophagosome avec le lysosome pour donner lieu à l'autolysosome. Cette étape est aussi étroitement régulée par des protéines impliquées dans le processus de l'autophagie. Ce processus se conclue avec la dégradation et la rupture vésiculaire<sup>45</sup>.

### **3.1 L'autophagie et la fibrose**

Des études récentes suggèrent qu'une dérégulation autophagique est liée à l'activation du processus fibrotique. Plusieurs modèles de fibrose hépatique, rénale et pulmonaire ont démontré que l'inhibition de l'autophagie mène à une réduction de la fibrose<sup>18</sup>. Bernard et al. a récemment démontré que l'autophagie promeut la différenciation myofibroblastique par une voie de signalisation impliquant mTORC2 menant à l'expression augmentée du CTGF<sup>18</sup>.

## 4. La sénescence

La sénescence est l'arrêt irréversible du cycle cellulaire. Elle a un rôle dans la prévention de la transformation oncogénique, contribue au vieillissement ainsi que de multiples pathologies associées, et joue un rôle dans la réparation tissulaire<sup>47</sup>. Initialement, ce phénomène a été observé avec un nombre croissant de réplication cellulaire et expliqué par le raccourcissement des télomères appelée sénescence réplivative<sup>46</sup>. D'autres stimuli peuvent induire la sénescence telles des dommages à l'ADN ou des altérations épigénétiques, des signaux mitogéniques par l'expressions de certains oncogènes, des stressés de culture d'origine physique (due à l'utilisation de pétrie en plastique et ou l'emploi de sérum) ou oxydative<sup>46</sup>. L'irradiation entraîne des dommages à l'ADN et par conséquent induit la sénescence<sup>46</sup>. Tous les stimuli inductrices de la sénescence activent les voies de signalisations impliquant p16 et p21, des kinases qui inhibent les cyclines bloquant ainsi le cycle cellulaire entre la phase G et S<sup>47</sup>. Ces kinases peuvent donc servir de marqueurs de sénescence.

### 4.1 Détecter l'activation de la sénescence

Bien qu'il n'y ait pas de marqueurs spécifiques de la sénescence, la majorité des cellules sénescents expriment la protéine suppresseur de tumeur p16 qui bloque la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S par les kinases CDK4 et CDK6<sup>48</sup>. L'augmentation de p16 coïncide souvent avec l'augmentation du Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase qui témoigne d'une activité lysosomale accrue et présente un autre marqueur de sénescence<sup>48</sup>. Ces marqueurs et d'autres ont été utilisé pour étudier la sénescence cellulaire.

## 4.2 La sénescence et la fibrose

La sénescence est un acteur central de la réparation tissulaire à travers la sécrétion de médiateurs activant des cellules immunitaires régulatrices éliminant les cellules fibrotiques et en stimulant la sécrétion de métalloprotéases qui sont responsables du remaniement de la matrice extracellulaire<sup>46</sup>. Cependant, le SASP contient des médiateurs qui ont plusieurs fonctions selon le contexte physiopathologique dont une fonction pro-fibrotiques en cas de stress cellulaire chronique et peut promouvoir un micro-environnement pro-fibrotique. Le CTGF fait partie de ces médiateurs pro-fibrotiques dont l'effets est potentialisé par l'IL-6<sup>16,49</sup>.

## 4.3 Le *Senescent Associated Secretory Phenotype* (SASP)

Les cellules sénescents ne sont pas inactive. Elles démontrent une augmentation de leur expression quant à un nombre de facteurs qui constitue le phénotype sécrétoire associé à la sénescence, ou le SASP. Ces facteurs sont aussi connus sous le nom du *Senescence Messaging Secretome* (SMS)<sup>14,48</sup>. Ce secrétôme inclue des facteurs pro-inflammatoires, des cytokines, des chemokines, des éléments de la matrice extra-cellulaire, des facteurs de croissance, et des protéases<sup>48</sup>.

Comme la sénescence, le SASP est induit par divers stimuli tels le vieillissement, le dommage génétique ou épigénétique, et l'insulte tissulaire<sup>14</sup>. Le SASP a aussi été observé dans certaines pathologies systémiques telles la fibrose pulmonaire chronique, l'athérosclérose et la cicatrisation cutanée. La sécrétion des facteurs inclus dans le SASP a des effets néfastes sur le microenvironnement cellulaire étant donnée sa fonction pro inflammatoire. La raison derrière la sécrétion du SASP par les cellules sénescents demeure inconnue. Cependant, ce processus physiopathologique semble jouer des fonctions différentes dans des contextes divergents

comme a été démontré dans l'embryogénèse où le SASP joue un rôle régulateur en opposition à son rôle chez les personnes âgées<sup>14</sup>. La fonction du SASP est donc dépendante du contexte tissulaire.



## **5. Article publié dans le Journal of Plastic, Reconstruction and Aesthetic Surgery (juin 2017)**

### **Delaying Implant-Based Mammary Reconstruction After Radiotherapy Does Not Decrease Capsular Contracture: An In Vitro Study**

Author list: Mostafa **El-Diwany** (ME), MD, MSc<sup>1,2</sup>; Jean-Philippe **Giot** (JPG), MD, PhD<sup>3</sup>; Marie-Josée **Hébert** (MJH), MD, PhD<sup>2</sup>; Alain M. **Danino** (AMD), MD, PhD<sup>1</sup>

- 1. Department of Plastic Surgery, University of Montreal Health Centre, Montreal, Qc, Canada**
2. Montreal University Health Centre – Research Centre, Montreal, Qc, Canada
3. Grenoble University Health Centre, Grenoble, France

#### **Corresponding author:**

Dr Alain M. Danino, MD, PhD  
Divison of Plastic and Reconstructive Surgery  
Montreal University Health Centre  
1560 Sherbrooke St. Est, Montreal, Quebec, Canada. H2L 4M1  
Tel. : 514-890-8000, ext. : 26808

Preliminary results were presented at the Canadian Society of Plastic Surgery (CSPS) 2015 meeting in Victoria, Canada.

## Summary:

The most common complication of irradiated implant-based mammary reconstruction is fibrosis and capsular contracture. The indications for post mastectomy adjuvant radiotherapy have significantly broadened. Facing an increased number of patients who will require radiotherapy, most guidelines recommend delaying reconstruction after radiotherapy to prevent long-term fibrotic complications. Does radiotherapy permanently alter cellular properties which will adversely affect implant-based reconstruction? If so, is there a benefit in delaying reconstruction after radiotherapy?

Our in-vitro model simulates two implant-based mammary reconstruction approaches: the irradiated implant and the delayed implant reconstruction beneath healthy un-irradiated tissue post radiotherapy. We performed cell culture of fibroblasts and endothelial cells, in an attempt to simulate these two surgical conditions. Irradiated fibroblasts simulate the capsular tissue seen around the breast-implant. The delayed reconstruction approach is simulated by non-irradiated fibroblasts conditioned with supernatant culture media obtained from irradiated endothelial cells.

Irradiation induced fibrosis through fibroblast differentiation into myofibroblasts, as demonstrated by increased  $\alpha$ -smooth-muscle actin levels in fibroblasts. This constitutes the basis for scar tissue contraction observed in irradiated implant-based breast reconstruction. Irradiation of endothelial cells induced irreversible cell cycle arrest known as senescence and secretion of the pro-fibrotic connective tissue growth factor. Non-irradiated fibroblasts conditioned with culture media obtained from irradiated endothelial cells exhibited myofibroblast differentiation and expression of fibrotic phenotype akin to capsular contracture.

Our results demonstrate that radiotherapy causes irreversible cellular changes which permanently alter the microenvironment in favour of fibrosis. Given that these changes are permanent, delaying reconstruction does not present an advantage in preventing capsular contracture.

Keywords: delay, implant-based mammary reconstruction, radiotherapy, fibrosis, senescence, and autophagy

**Introduction:**

Breast cancer is the most common malignancy in women<sup>1</sup>. Due to the increased survival of these patients, there has been a growing demand for breast reconstruction which has shown functional, psychological and social benefits for breast cancer survivors as well as improved quality of life<sup>2-5</sup>. Reconstructive options comprise autologous flaps, breast prosthesis, and a combination of these approaches depending on the patient and surgeon's preferences. One therapeutic element that has contributed to the increased survival of breast cancer patients is the use of adjuvant radiotherapy<sup>6</sup>. However, it has been well established that the use of radiotherapy is associated with increased acute and chronic complications and higher reconstruction failure rates<sup>1-4,6-13</sup>. The most common complication associated with radiotherapy is fibrosis and capsular contracture<sup>1,2</sup>. Furthermore, over the past two decades, the indications for postmastectomy adjuvant radiotherapy have significantly broadened<sup>12</sup>. Facing an increased number of patients who will require radiotherapy, most guidelines recommend delaying reconstruction after radiotherapy to prevent fibrotic complications<sup>1</sup>. The literature offers no clear indication as to the optimal timing of mammary reconstruction and its relation to capsular contracture, and the current guidelines are controversial to say the least<sup>4</sup>. We have attempted to tackle this question from a fundamental perspective aiming to understand the pathophysiology of radiation-induced fibrosis relevant to its clinical application in breast reconstruction.

Fibrosis is an abnormal process of tissue repair associated with an accumulation of myofibroblasts, which by their exaggerated secretion of extracellular matrix components bring about a loss of normal tissue structure and function. This process is at the basis of capsular contracture which is a well-recognized complication of implant-based breast surgery whether cosmetic or reconstructive. All breast implants become surrounded by a fibrous capsule; irradiation worsens the degree of scar tissue production and retraction<sup>8</sup>, negatively affecting symmetry, volume, projection and causing pain<sup>9,11</sup>.

Moreover, radiotherapy induces cellular senescence, also known as an irreversible cell-cycle arrest<sup>14</sup>. Connective tissue growth factor (CTGF) is a potent pro-fibrotic protein secreted by many cell

lines including fibroblasts and endothelial cells. In-vivo studies have shown that CTGF is necessary and sufficient for the fibrotic process and that it can sustain fibrosis through various pathways acting downstream of TGF- $\beta$  or independently of it. It activates fibroblasts and induces their differentiation into  $\alpha$ SMA-producing myofibroblasts<sup>15-17</sup>. CTGF is also secreted by senescent cells and is part of the senescence-associated secretory phenotype, which characterizes cells in this permanent cell-cycle arrest<sup>18</sup>.

Knowing that irradiation brings about permanent damage to the microvasculature<sup>11</sup>, we can expect a state of tissue hypoxia, decreased delivery of nutrients and growth factors, which can induce cellular starvation driving cells to digest their intracellular components to ensure cellular survival- a state known as autophagy. Bernard et al. recently showed that autophagy fosters myofibroblast differentiation through mTORC2-dependent production of CTGF favouring a pro-fibrotic environment<sup>19</sup>.

Based on the published data relating irradiation to fibrosis, senescence and autophagy, we hypothesize that irradiation activates senescence and/or autophagy, stimulating the secretion of CTGF, which causes fibroblast activation and differentiation into myofibroblasts. We hypothesize that these changes to the cellular environment unilaterally alter it towards a pro-fibrotic one, which supports the clinical complications encountered in post-mastectomy radiotherapy breast reconstruction patients; therefore, there is no perceived theoretical advantage in delaying mammary reconstruction.

## **Materials and Methods:**

### **In vitro model of capsular contracture**

Our model attempts to simulate two implant-based mammary reconstruction approaches: the irradiated implant-based reconstruction and the delayed reconstruction using an implant inset beneath healthy non-irradiated tissue, such as a latissimus dorsi flap in an previously irradiated field. We performed cellular culture of two cell lines, namely Wi38 fetal lung fibroblasts (Wi38) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). In vitro irradiation of Wi38 fibroblasts simulates radiotherapy of the implant-based reconstructed breast and its effects on the fibroblast population found within the initially normal peri-prosthetic capsule. Radiotherapy before the reconstruction process affects residual mammary cutaneous and subcutaneous tissues comprising a heterogeneous population of cells. Endothelial cells are among the first cells to be affected by irradiation therapy given their sensitivity<sup>20</sup> and are found to play an important regulatory role in fibrosis<sup>17</sup>. The mammary implant wrapped with a healthy non-irradiated tissue, such as a latissimus dorsi flap or a different autologous flap, in the irradiated field will also become surrounded by a fibrotic capsule similar to the non-irradiated case through the recruitment of undifferentiated fibroblasts. In vivo studies have shown that this process relies on fibroblasts recruited from various sources including local mesenchymal cells, bone marrow progenitors and through epithelial-mesenchymal transition in addition to those present in the non-irradiated flap surrounding the implant<sup>21</sup>. These recruited fibroblasts, which have not themselves been irradiated, will be subjected to the irradiation-induced micro-environmental changes. Consequently, the delayed reconstructive approach is simulated by non-irradiated fibroblasts conditioned with supernatant culture media obtained from irradiated endothelial cells (Figure 1).

### **Cell culture**

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were purchased by Clonetics and were grown in EGM-2MV complete medium (Clonetics) and used between passages 3-4. Wi38 human fetal lung fibroblasts were obtained from American Type Culture Collection, grown in fibroblast basal medium

(FBS) (Lonza) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (Wisent), and used between passages 4-6. Cells were plated at a density of 10,000 cells/cm<sup>2</sup> in culture plates and exposed to different conditions and allowed to reach up to a confluency of 60% at time zero. Media were replaced every other day during cellular culture and conditioning. Cells were subjected to a single dose irradiation at 2Gy, 4Gy, 8Gy or 10Gy using a Gammacell irradiator. The non-irradiated condition (0Gy) served as a negative control for irradiation and serum starvation (SS) as these cells were grown in 10% FBS. This control cell population was seeded at 10,000 cells/cm<sup>2</sup> at day 7 to prevent replicative senescence at day 10 when cells were harvested for protein extraction. We harvested the irradiated cell population 10 days following irradiation because irradiation-induced senescence caused by DNA damage develops over a period of about 10 days<sup>22</sup>. Serum starvation was used to induce autophagy. Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; Wisent) before exposing them to serum-free medium. Previous work at our lab has shown that autophagy is achieved over 4 to 7 days of serum starvation in Wi38 fibroblasts and after four hours of serum starvation in HUVEC<sup>19,23</sup>.

### **Supernatant preparation and cross conditioning**

Culture media of conditioned of HUVEC and Wi38 fibroblasts were collected every second day as described above. Conditioned media were centrifuged at 1200 G during 15 min at 4° Celsius. Supernatants were stored at -20° Celsius for future use. Non-irradiated Wi38 fibroblasts were cultured and plated as described previously, and were permitted to reach a confluency of 60%. They were then conditioned with supernatant obtained from irradiated endothelial cells (HUVEC) at 5, 7 and 9 days after irradiation with a dose of 10Gy. These time points were chosen because the senescent phenotype induced by DNA damage secondary to irradiation is established within approximately 10 days<sup>22</sup>. The control cell population were conditioned with supernatant obtained from non-irradiated endothelial cells (0Gy) at same time points. The conditioned media were changed every second day (Figure 1).

### **Immunoblotting**

Cells were harvested and cellular proteins extracted, separated using electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and subjected to antibody probing, as previously described<sup>19</sup>. The antibodies used for Western blotting were anti-human p62 (Cell Signaling Technology, 8025), anti- $\alpha$ SMA (Sigma-Aldrich, A2547), anti-CTGF (Santa Cruz Biotechnology, sc-14939), and anti-p16 (BD Biosciences, BD551153). These markers were chosen due to their reliability and consistency. CTGF was used rather than other fibrotic activator since it can directly activate and sustain fibrosis independently of TGF- $\beta$ <sup>15-17</sup>.  $\alpha$ SMA is a marker of myofibroblast activation, contraction and fibrosis. p62 is a protein incorporated in the autophagosome during autophagic activation. A decrease in p62 protein levels is a marker for autophagy activation. SA- $\beta$ -gal staining and p16 were used to detect senescence.

Membranes were stained with Ponceau S Red (Sigma, P-3504) as loading control, and after initial probing, they were stripped and re-probed with anti-alpha-tubulin (Calbiochem, CP06). Densitometric analyses were conducted with ImageJ64 (1.48v, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Data are expressed in arbitrary units and compiled with Microsoft Excel.

### **SA- $\beta$ -gal staining**

Cytochemical SA- $\beta$ -gal detection was done as described previously<sup>24</sup>. In brief, cells were washed with PBS, fixed in formalin (Sigma, HT5014), washed, and incubated overnight at 37°C with staining solution containing X-gal at 1mg/ml (Invitrogen, 15520-034), pH 6.0. Cells with a positive signal stain with a light blue color. Approximately 15 microscopic images were obtained using a magnification of x100 per condition, SA-B-Gal positive and negative cells were counted using ImageJ164 (1.48v, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) and the percentage of cells with a positive signal was calculated in GraphPad Prism 7.0a.

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis and result plotting was completed with GraphPad Prism 7.0a using adjusted protein ratios for the Tubulin-A levels. The one directional ANOVA multiple comparison test (Tukey's multiple comparison test) was used for the calculation of confidence intervals at 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

### **Pathological Examination**

Histological preparation was done on two peri-prosthetic capsules of a same patient with unilateral radiotherapy. Capsules were biopsied at the second step of a two-stage implant based mammary reconstruction. Hematoxylin and eosin staining was completed by the pathology department.



## Results:

The fibrotic changes in response to irradiation of normal and irradiated peri-prosthetic capsules are visible on histological preparation from a patient with unilateral radiotherapy, where a loss of normal collagen undulation, cellular, loss of blood vessels and increased fibrous tissue can be visualized (Figure 2).

### Wi38 Fibroblasts

The irradiation of Wi38 fibroblasts induced senescence indicated by an increased level of  $\beta$ -Galactosidase staining (Figure 3-A). This followed a dose-response relationship (Figure 3-B). The percentage of Wi38  $\beta$ -Gal+ cells is significantly greater for an irradiation dose of 10Gy in contrast to non-irradiated (0Gy) Wi38 fibroblasts ( $p=0.0007$ ) and fibroblasts in serum starvation (SS 4d) ( $p=0.0013$ ) (Figure 3-B). Similarly, p16 levels increased with response to irradiation though this increase did not prove to be statistically significant (Figure 3-C).

A decrease in intracellular p62 levels is a marker of autophagy activation. The lack of a significant fall in p62 levels in irradiated Wi38 compared to the negative control (0Gy) reveals that irradiation did not activate autophagy in our model. Cells conditioned in serum starved media served as a positive control for autophagy and demonstrated an expected positive autophagy signal with a significant decrease in p62 levels ( $p=0.0173$ ) for fibroblasts in serum starvation after 7 days (SS 7d) compared to the negative control (0Gy) (Supplemental results Figure 1-A).

We observed an increased tendency of CTGF levels both with irradiation and serum starvation; however, the increase in CTGF levels with greater irradiation dosage was not statistically significant (Figure 4-A). Irradiation increased myofibroblast differentiation with enhanced  $\alpha$ SMA levels for Wi38 irradiated with 8Gy compared to non-irradiated cells (0Gy) ( $p=0.0057$ ) and compared to serum starved cells (SS 7d) ( $p=0.0343$ ) (Figure 4-B).

### HUVEC endothelial cells

The irradiation of endothelial cells induced senescence as demonstrated by a rise in p16 levels for the condition of maximal irradiation dose (10Gy) compared to non-irradiated cells (0Gy) ( $p=0.0157$ ) and serum starvation conditioned endothelial cells (SS 4h) ( $p=0.0245$ ) (Figure 5-A). This senescence activation is accompanied by an increased expression of pro-fibrotic CTGF with rising levels for 8Gy irradiated HUVEC compared to non irradiated cells (0Gy) ( $p=0.0091$ ) and compared to serum starved cells (SS 4h) (0.0488) (Figure 5-B).

Moreover, irradiated HUVEC did not show a decrease of p62 compared to serum starved endothelial cells (8Gy vs SS 4h;  $p=0.0339$ ) (Supplemental results Figure 1-B).

### Conditioned non-irradiated Wi38 fibroblasts in media obtained from irradiated HUVEC

The incubation of normal non-irradiated fibroblasts in conditioned media obtained from irradiated endothelial cells was associated with increased  $\alpha$ SMA protein levels, indicating a greater myofibroblast activation and differentiation, as if they were themselves irradiated (Figure 6). This increase in  $\alpha$ SMA protein levels was statistically significant for conditioned media obtained at 7 and 9 days after irradiation at a 10Gy dosage compared to conditioned media obtained from non-irradiated HUVEC (0Gy) ( $p=0.0241$  and  $p=0.0183$ ).

**Discussion:**

Irradiation-induced fibrosis and capsular contracture are major sources of complications for breast reconstruction<sup>1-4, 6-13</sup>. In the literature, the rate of capsular contracture is as high as 29-68% among patients who underwent radiotherapy compared to 10-40% of those who did not have radiotherapy<sup>2</sup>. Globally, the overall reconstruction failure rate is found to be greater in the setting of prior radiotherapy; this is associated with an increased need for secondary surgeries and decreased satisfaction and psychological outcomes<sup>2</sup>. These complications are particularly severe in implant-based breast reconstruction in the setting of radiotherapy<sup>20</sup> and present an overall complication rate of 63.6%<sup>13</sup>. The use of breast prosthesis in patients who have undergone radiotherapy for breast cancer is thus controversial<sup>10</sup>.

Many authors have attempted to determine the optimal timing of reconstruction when radiotherapy is needed. Planning reconstruction using autologous tissue, implants or a combination of these two methods is particularly difficult in this setting due to the fact that the need for radiotherapy is dependent on the final pathology<sup>1</sup>. Some authors have suggested immediate reconstruction<sup>1,4</sup> and some have suggested delayed procedures<sup>4,9,11</sup>. Most guidelines, however, recommend delaying reconstruction after radiotherapy<sup>1</sup>. Given the high rate of capsular complications with implant-based reconstructions, some authors suggest a preferred use of autologous flaps or a combination of autologous reconstruction with implants aiming for better results<sup>1,4,11</sup>. Despite limited evidence, authors also suggest delaying autologous flap reconstruction 12 months after irradiation to prevent long term fibrotic complications<sup>25</sup>.

First, our data show that irradiation induces senescence. Senescence is known as an irreversible cell-cycle arrest characterized by a rise in p16 and  $\beta$ -Galactosidase levels. It has been associated with increased secretion of pro-fibrotic CTGF, in addition to fibroblast activation and differentiation into myofibroblasts, which are incriminated for causing capsular contraction. This can be the initial fibrotic stimulus. Furthermore, since senescence is a permanent state, delaying reconstruction after irradiation

does not present a long-term benefit, although short-term advantages can be warranted to allow recovery from immediate and reversible effects of radiation injury on skin and subcutaneous tissues.

Radiotherapy-induced capsular contracture is underlain by vascular compromise of tissues post radiation<sup>11</sup>. The use of the endothelial cell line allowed us to simplify the complex interplay between the vascular insult, the resulting micro-environmental changes and the fibroblastic response. Although the time-line in two-staged breast reconstruction post radiotherapy is different from our laboratory conditions, our in vitro model is nevertheless relevant since it isolates the different components of the irradiation-injury and their chronic fibrotic complications: vascular injury, microenvironmental modification brought by the secretion of profibrotic, and fibroblast activation and differentiation.

As we can see in our conditioning experiment, when non-irradiated fibroblasts are placed in the pro-fibrotic environment of irradiated endothelial cells, they act as if they were themselves irradiated. This is especially true about endothelial cells since they are particularly sensitive to and at the basis of irradiation injury. The in vitro delay reconstruction model shows that non-irradiated fibroblasts, when put in a pro-fibrotic environment, end up promoting capsular formation and contraction. In a study by Wong et al., delaying implant-based reconstruction was shown to offer little benefit in limiting post reconstruction complications. Authors evaluated 16 patients who had undergone extensive radiotherapy for Hodgkin lymphoma with a radiotherapy to reconstruction interval of greater than 20 years. Despite this long interval after irradiation, the complication rate was 64% among this select group<sup>13</sup>. This is due to the fact that senescence induced by irradiation is irreversible and its effects cannot be overrun with time. In contrast, a recent study by Santosa et al. investigated the preferred time for radiotherapy in two-stage implant-based mammary reconstruction<sup>26</sup>. They compared complication rates of irradiation during the first step of a two-stage implant-based mammary reconstruction to irradiation of permanent implants. Authors concluded no significant differences with regards to complications between the two groups. This cohort study supports our notion that the timing of reconstruction and radiotherapy does not alter the incidence of fibrotic complications.

Autophagy has been shown to cause fibrosis<sup>18</sup>; thus, we considered it as a potential player in capsular contracture. However, irradiation was not found to be an activator of autophagy in Wi38 fibroblasts nor in HUVEC. Subsequently, its contribution is limited in our model. However, we cannot entirely exclude its contribution from the pathophysiology of irradiation-induced fibrosis. Since vascular loss is a central element of irradiation tissue injury, there follows an autophagy-prone environment similar to the experimental serum starvation model, which has shown to independently cause and sustain fibrosis<sup>19</sup>.

Although our study presents a novel approach at trying to understand the pathophysiology of irradiation induced fibrosis in breast reconstruction, in vivo tissue studies are required to measure the level of senescence and its role in the degree of capsular complications. At our centre, we have proceeded to the creation of a tissue bank of irradiated and non-irradiated peri-prosthetic capsules that can be studied by tissue-microarray, and other histochemistry approaches.

Conflict of interest: none.

## **Bibliography**

1. Berbers J, van Baardwijk A, Houben R et al. 'Reconstruction: before or after postmastectomy radiotherapy?' A systematic review of the literature. *Eur J Cancer* 2014;50:2752-62.
2. Quinn TT, Miller GS, Rostek M et al. Prosthetic breast reconstruction: indications and update. *Gland Surg* 2016;5:174-86.
3. Pestana IA, Campbell DC, Bharti G et al. Factors affecting complications in radiated breast reconstruction. *Ann Plast Surg* 2013;70:542-5.
4. El-Sabawi B, Sosin M, Carey JN et al. Breast reconstruction and adjuvant therapy: A systematic review of surgical outcomes. *J Surg Oncol* 2015;112:458-64.
5. Lagares-Borrego A, Gacto-Sanchez P, Infante-Cassio P et al. A comparison of long-term cost and clinical outcomes between the two-stage sequence expander/prosthesis and autologous deep inferior epigastric flap methods for breast reconstruction in a public hospital. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2016;69:196-205.
6. Lee K, Mun GH. Prosthetic breast reconstruction in previously irradiated breasts: A meta-analysis. *J Surg Oncol* 2015;112:468-75.
7. Rosato R, Dowden RV. Radiation therapy as a cause of capsular contracture. *Ann Plast Surg* 1994;32:342-5.
8. Whitfield GA, Horan G, Irwin MS et al. Incidence of severe capsular contracture following implant-based immediate breast reconstruction with or without postoperative chest wall radiotherapy using 40 Gray in 15 fractions. *Radiother Oncol* 2009;90:141-7.
9. Drucker-Zertuche M, Bargallo-Rocha E, Zamora-Del RR. Radiotherapy and immediate expander/implant breast reconstruction: should reconstruction be delayed? *Breast J* 2011;17:365-70.
10. Hvilsom GB, Hölmich LR, Steding-Jessen M et al. Delayed breast implant reconstruction: is radiation therapy associated with capsular contracture or reoperations? *Ann Plast Surg* 2012;68:246-52.

11. Kim SH, Kim JM, Park SH et al. Analysis of the effects of breast reconstruction in breast cancer patients receiving radiotherapy after mastectomy. *Arch Plast Surg* 2012;39:222-6.
12. Lam TC, Hsieh F, Boyages J. The effects of postmastectomy adjuvant radiotherapy on immediate two-stage prosthetic breast reconstruction: a systematic review. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:511-8.
13. Wong RK, Morrison SD, Momeni A et al. Outcomes of breast reconstruction in breast cancer patients with a history of mantle radiation for Hodgkin lymphoma. *Ann Plast Surg* 2014;72:S46-50.
14. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:472-6.
15. Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* 2004;18:469-79.
16. Booth AJ, Csencsits-Smith K, Wood SC et al. Connective tissue growth factor promotes fibrosis downstream of TGFbeta and IL-6 in chronic cardiac allograft rejection. *Am J Transplant* 2010;10:220-30.
17. Laplante P, Sirois I, Raymond MA et al. Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell Death Differ* 2010;17:291-303.
18. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J et al. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:273-283.
19. Bernard M, Dieudé M, Yang B et al. Autophagy fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF. *Autophagy* 2014;10:2193-2207.
20. Folkman J, Camphausen K. What does radiotherapy do to endothelial cells? *Science* 2001;293:227-8.
21. Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2011;208:1339-1350.
22. Rodier F. Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Senescence: Methods and Protocols*. 2013:165-73.

23. Sirois I, Groleau J, Pallet N et al. Caspase activation regulates the extracellular export of autophagic vacuoles. *Autophagy* 2012;8:927-37.
24. Debaq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols* 2009;4:1798-806.
25. Macadam SA, Bovill ES, Buchel EW et al. Evidence-Based Medicine: Autologous Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2017;139:204e-229e.
26. Santosa KB, Chen X, Qi J et al. Postmastectomy Radiation Therapy and Two-Stage Implant-Based Breast Reconstruction: Is There a Better Time to Irradiate? *Plast Reconstr Surg* 2016;138:761-9.



### **Figure Legends:**

**Figure 1.** Experimental preparation for the conditioning experiment of non-irradiated Wi38 fibroblasts with supernatant obtained from irradiated (A) and non-irradiated HUVEC (B).

**Figure 2.** Histological preparation of a non-irradiated (A) and irradiated mammary peri-prosthetic capsules (B)

**Figure 3.** Senescence is induced by irradiation in Wi38 fibroblasts. **A.** Light microscopy of  $\beta$ -Galactosidase staining of senescent Wi38 at x100 magnification. **B.** Percentage of  $\beta$ -Galactosidase-positive Wi38 fibroblasts for different irradiation dose and serum starvation (SS 4d). **C.** Adjusted p16 protein levels in irradiated and serum starved (SS 7d) Wi38 fibroblasts. p16 and Tubulin Western blots.

**Figure 4.** Irradiation is associated with increased level of pro-fibrotic CTGF leading to myofibroblast differentiation. **A.** Adjusted CTGF protein levels in irradiated and serum starved (SS 7d) Wi38 fibroblasts. CTGF and Tubulin Western blots. **B.** Adjusted  $\alpha$ SMA protein levels in irradiated and serum starved (SS 7d) Wi38 fibroblasts.  $\alpha$ SMA and Tubulin Western blots.

**Figure 5.** Irradiation also induces senescence in HUVEC along with increased secretion of pro-fibrotic CTGF. **A.** Adjusted p16 protein levels in irradiated and serum starved (SS 4h) in HUVEC. p16 and Tubulin Western blots. **B.** Adjusted CTGF protein levels in irradiated and serum starved (SS 4h) in HUVEC. CTGF and Tubulin Western blots.

**Image 6.** Non-irradiated Wi38 fibroblasts conditioned with media obtained from irradiated HUVEC undergo myofibroblast differentiation. Adjusted  $\alpha$ SMA protein levels in non-irradiated Wi38 fibroblasts conditioned with supernatant obtained from non-irradiated (0Gy) and irradiated (10Gy) HUVEC at 5, 7 and 9 days.  $\alpha$ SMA and Tubulin Western blots.

**Supplemental results Figure 1.** Irradiation of Wi38 fibroblasts and HUVEC did not induce autophagy in our model. **A.** Adjusted p62 protein levels in irradiated and serum starved (SS 7d) Wi38 fibroblasts. p62 and Tubulin Western blots. **B.** Adjusted p62 protein levels in irradiated and serum starved (SS 4h) in HUVEC. p62 and Tubulin Western blots.

Figure 1

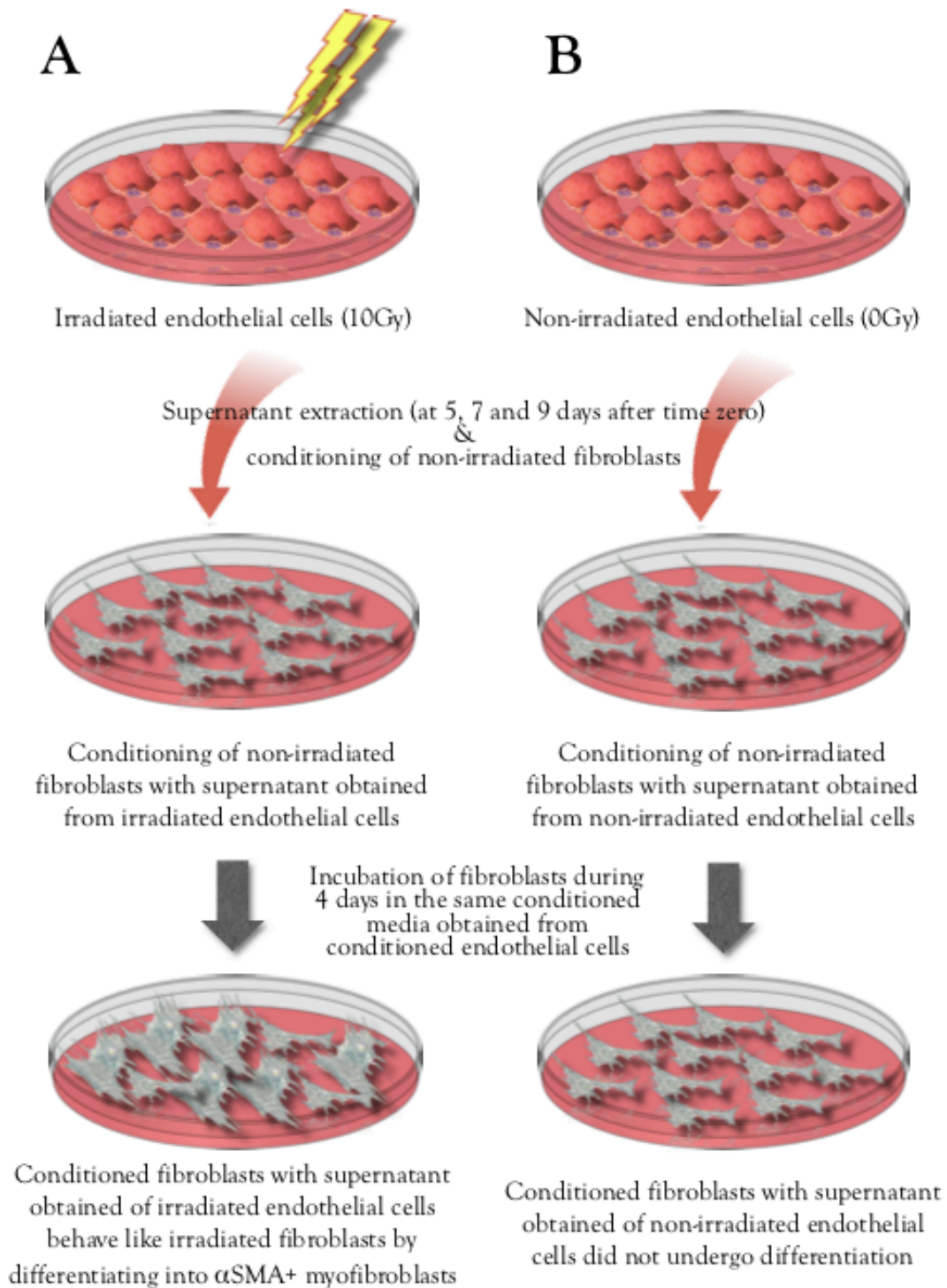


Figure 2

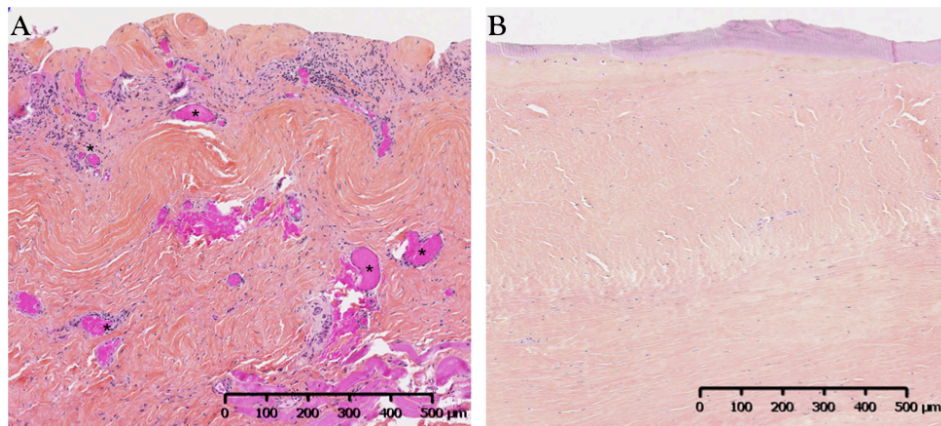


Figure 3

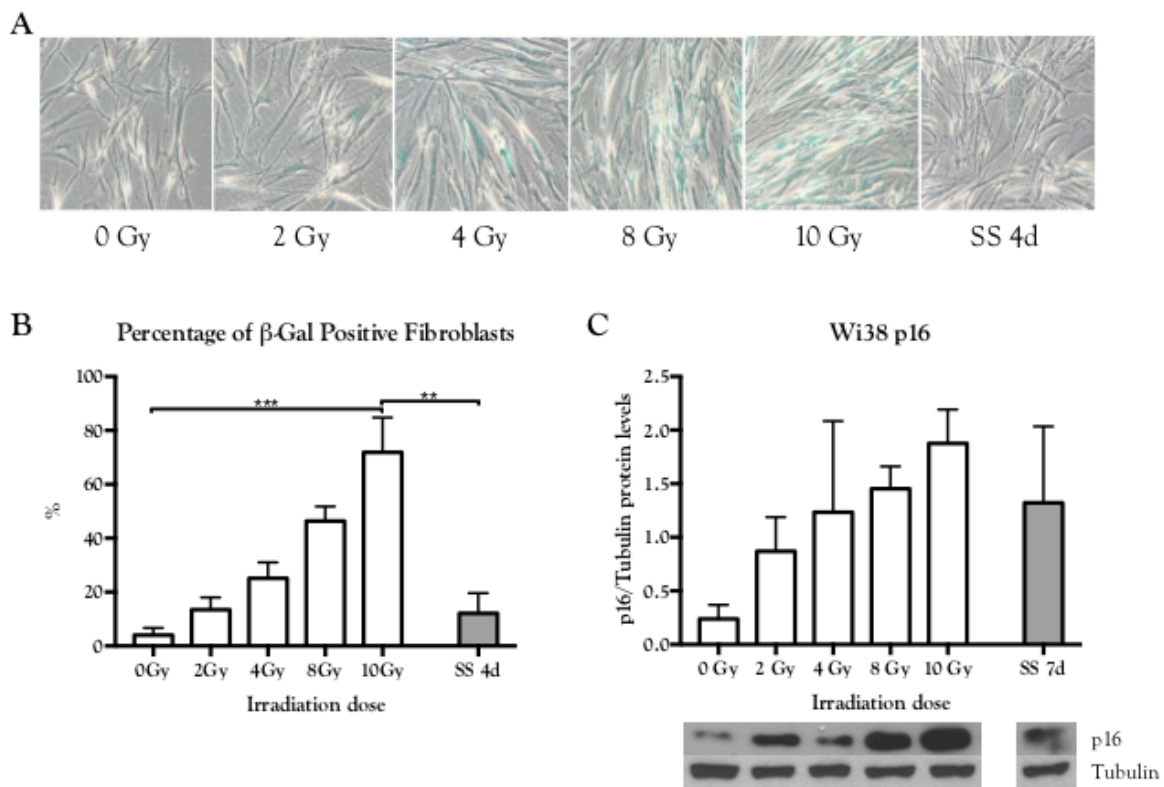


Figure 4

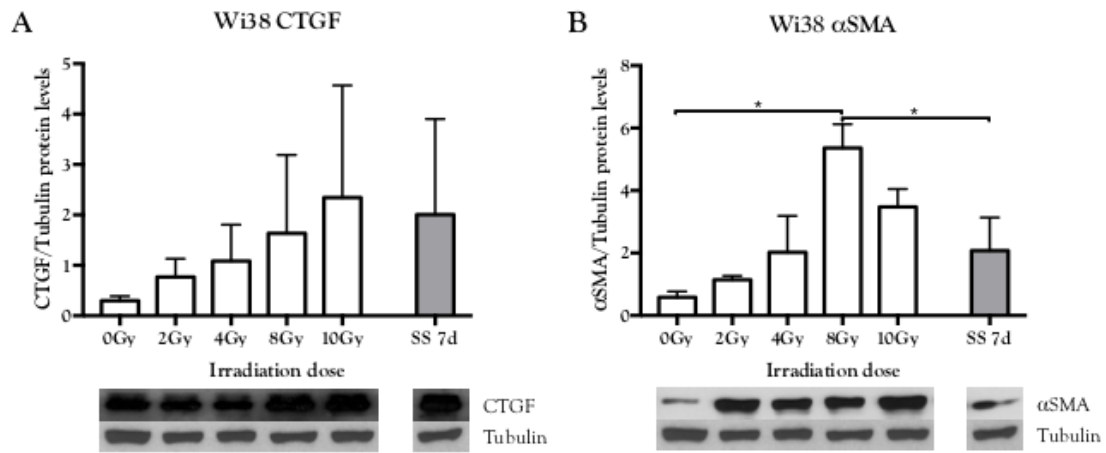


Figure 5

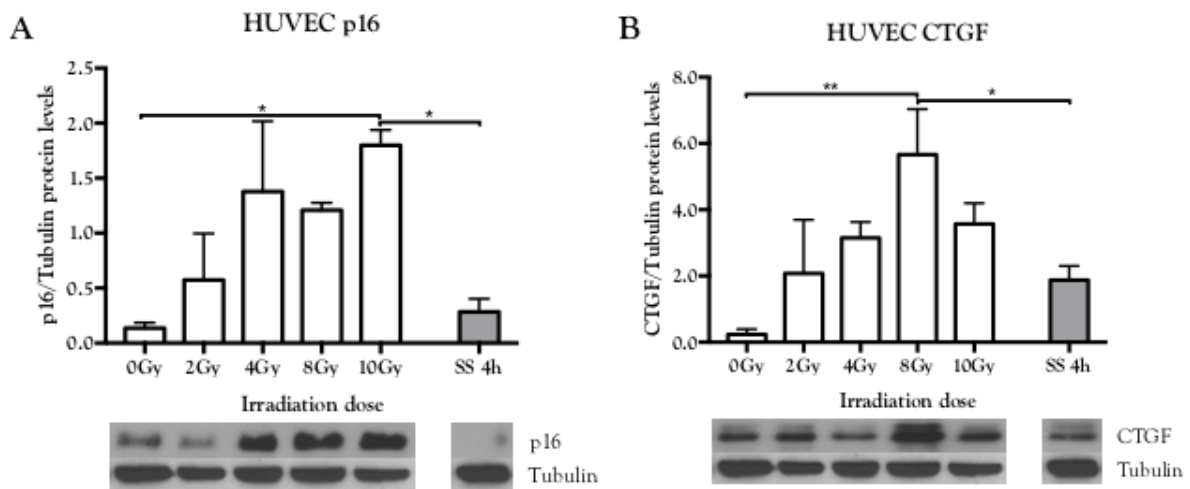
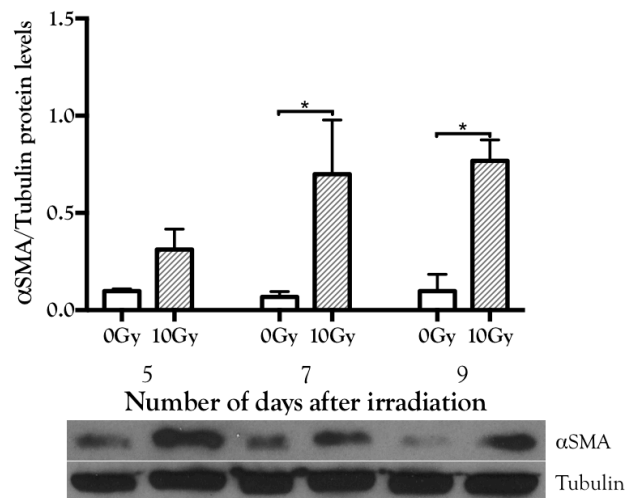
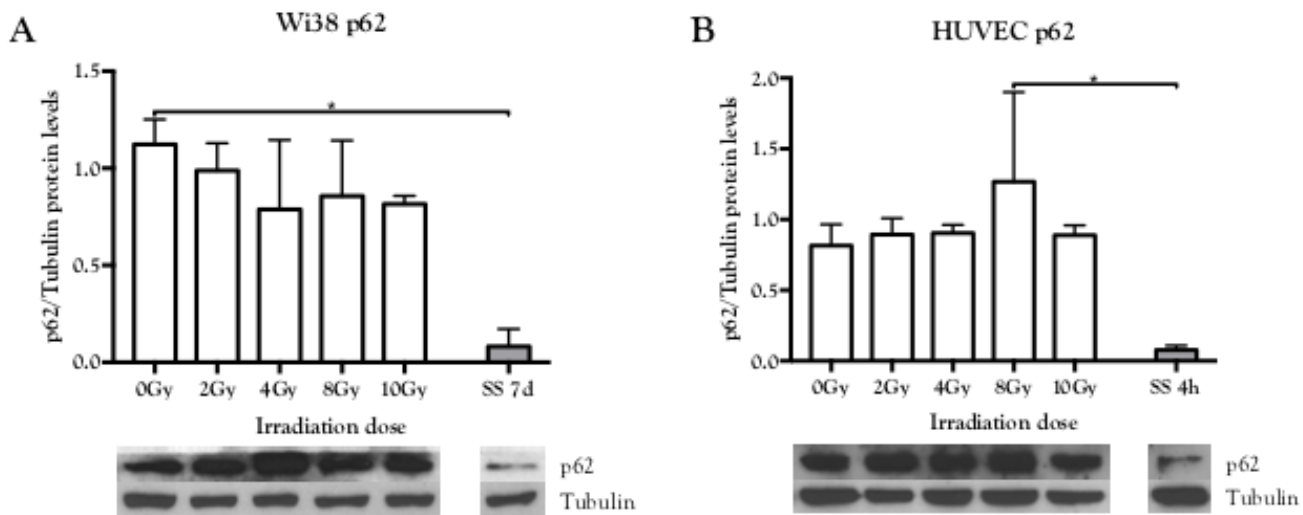


Figure 6

Wi38 treated with irradiated HUVEC conditioned media



Suppl. Figure 1



## **6. Correspondances et communications publiés dans le Journal of Plastic, Reconstruction and Aesthetic Surgery (septembre 2017)**

### **Delaying Implant-Based Mammary Reconstruction After Radiotherapy Does Not Decrease Capsular Contracture: An In Vitro Study**

Author list: Mostafa **El-Diwany** (ME), MD, MSc<sup>1,2</sup>; Jean-Philippe **Giot** (JPG), MD, PhD<sup>3</sup>;

Alain M. **Danino** (AMD), MD, PhD<sup>1</sup>

- 1. Department of Plastic Surgery, University of Montreal Health Centre, Montreal, Qc, Canada**
2. Montreal University Health Centre – Research Centre, Montreal, Qc, Canada
3. Grenoble University Health Centre, Grenoble, France

#### **Corresponding author:**

Dr Alain M. Danino, MD, PhD  
Divison of Plastic and Reconstructive Surgery  
Montreal University Health Centre  
1560 Sherbrooke St. Est, Montreal, Quebec, Canada. H2L 4M1  
Tel. : 514-890-8000, ext. : 26808

*Dear Sir,*

We read with great interest the comment of Lo Toro et al about our in vitro study on radiotherapy and capsular contracture.<sup>1</sup> The authors highlighted two points; first, the irradiation of implants leads to nanostructural modifications which include the release of low-molecular weight fragment which suggests a process of irradiation-induced degradation resulting in main chain scission; and second, they presented a clinical path which can be used in preventing capsular contracture.

Although the exact pathogenic mechanism underlying capsular retraction remains unclear, it is unquestionably a multifactorial process implicating intra- and inter-cellular responses, tissue architecture, tissue-implant interaction, and implant biomaterial properties. Post-mastectomy radiotherapy (PMRT) has been associated with increased capsular retraction and can be acting at any of these physiopathological levels.

In addition to demonstrating that irradiation brings about irreversible cellular changes in favour of fibrosis, our team has demonstrated that PMRT affects capsular tissue macro- and micro- architecture.<sup>2</sup> Since fibroblasts respond to their environment's tensile properties,<sup>3</sup> these micro-environmental changes may prove crucial in determining capsular formation and retraction. Furthermore, fibroblasts secrete various factors which signal using extracellular matrix components; CTGF is one of such factors involved in radiotherapy induced fibrosis.

Ribuffo et al has shown that PMRT alters implants' bio- material properties at the nanoscale, altering the silicone molecular bounds and creating by-products such as low molecular weight fragments.<sup>4</sup> These alterations of silicone implants could alter the cell to implant adhesion, as well as altering nearby cells. This adds a new variable in the complex equation of capsular contracture, implant surface could be

altered enough to trigger a specific response in attached fibroblasts, implants could release silicone degradation products that could also chemically alter the biological response of fibroblast.

Moreover, bacteria could attach and biofilm could spread more easily to an altered surface. Biofilm has been shown to alter significantly the capsular biology toward contracture, currently the trinome biofilm, capsule and implant has not been specifically studied in the biological condition of PMRT.

The approach developed by Ribuffo et al. for reducing capsular contracture by performing fat injections in remaining thoracic tissues is of great interest.<sup>4</sup> But the biological component most useful to prevention of capsular contracture is unknown. Every cell type in fat grafting could contribute to tissue regeneration and reduction of biological scars of radiotherapy. Stem cells could bring an anti-inflammatory balance to the tissue, secrete adequate growth factors as well as differentiating into other cell types.<sup>5</sup> Among others, irradiated tissue is ischemic and more prone to bacterial infection. Restoration of the vascular compartment could also lead to a bacteria and biofilm reduction through better access of white cells to the implant interface.

These hypotheses highlight the poor comprehension of the details, biological events and capsular reaction to breast implants, especially in the setting of radiotherapy. Collaboration effort and large clinical studies are required to raise the scientific evidences, to bring the safest reconstruction to our patients.

### **Conflicts of interest**

None.



## References

1. Lo Torto F, Vaia N, Casella D, Marcasciano M, Cigna E, Ribuffo D. Delaying implant-based mammary reconstruction after radiotherapy does not decrease capsular contracture: an in vitro study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2017 August;pii: S1748- 6815(17)30350-9. doi:10.1016/j.bjps.2017.08.023.
2. Giot JP, Paek LS, Nizard N, et al. The double capsules in macro-textured breast implants. *Biomaterials* 2015;67:65– 72.
3. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(5):349.
4. Ribuffo D, Lo Torto F, Giannitelli SM, et al. The effect of post-mastectomy radiation therapy on breast implants: unveiling biomaterial alterations with potential implications on capsular contracture. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015;C 57:338– 43.
5. Serra-Renom JM, Muñoz-Olmo JL, Serra-Mestre JM. Fat grafting in postmastectomy breast reconstruction with expanders and prostheses in patients who have received radiotherapy: formation of new subcutaneous tissue. *Plast Reconstr Surg* 2010;125(1):12–8.

## Discussion

La radiothérapie est un moyen thérapeutique nécessaire dans le traitement du cancer du sein. Les dommages collatéraux infligés aux cellules résidentes du tissu cutané et sous cutané sont importants et entraînent à long terme une inflammation du tissu cutané, un œdème et une fibrose qui peut être rétractile. L'utilisation de prothèses de reconstruction est la technique utilisée dans 75% des cas ce qui ne restitue que le volume. La qualité trophique de la reconstruction reste faible. Après la radiothérapie, la morbidité et le taux d'échec sont fortement augmentées et associées à la contracture autour de l'implant. Une amélioration des techniques de reconstruction par prothèse s'impose et les guides de pratiques suggèrent de retarder la reconstruction mammaire jusqu'après la fin de la radiothérapie. Cette proposition n'est pourtant pas basée sur des données probantes et la durée optimale de ce retardement reste inconnue. À travers notre étude, nous avons pu atteindre nos trois objectifs permettant de présenter quelques clarifications au sujet du lien entre la radiothérapie et la fibrose.

Premièrement, nous avons observé que le milieu conditionné par les cellules endothéliales irradiées induit la différenciation myofibroblastique de fibroblastes non-irradiés. De plus, l'augmentation de production du CTGF par les cellules endothéliales irradiées suggère que le CTGF produit par les cellules endothéliales favorise cette différenciation myofibroblastique. Cependant, des études additionnelles inhibant la production et l'activité du CTGF à l'aide de siRNA et anticorps anti-CTGF sont nécessaires pour confirmer le rôle du CTGF dans l'induction de la fibrose post radiothérapie. Nos résultats suggèrent que la radiothérapie induit un processus de sénescence menant à un arrêt irréversible du cycle cellulaire dans le tissu périprothétique associé à une augmentation de l'expression du CTGF et l'induction

de la fibrose. Nous pouvons donc conclure qu'il ne semble pas y avoir d'avantage à retarder la reconstruction mammaire. En effet, dans une étude récente, les reconstructions précoces et retardées présentent le même taux de complications fibrotiques <sup>50</sup>.

Deuxièmement, bien que notre étude identifie la sénescence comme un médiateur important de la fibrose induit par la radiothérapie, le rôle de l'autophagie n'est pas complètement élucidé, et nous ne pouvons pas écarter sa contribution. Par exemple, puisque l'irradiation entraîne une raréfaction vasculaire, l'hypoxie et la carence en nutriments et d'autres facteurs de croissance pourraient très bien présenter des circonstances propices à la fibrose similaires aux conditions simulées par le milieu de culture sans sérum. Dans notre modèle, l'autophagie pourrait jouer un rôle d'entretien de la fibrose, renforçant ainsi le maintien de ce processus fibrotique.

## **Perspectives**

Finalement, notre étude présente une approche nouvelle au problème de la contracture capsulaire permettant une meilleure compréhension physiopathologique; cependant, notre approche in vitro constitue une faiblesse évidente. Des études inhibitrices employant des méthodes siRNA et anticorps anti-CTGF sont nécessaires pour confirmer le rôle du CTGF au sein de notre modèle in vitro. Si l'inhibition de la production et de l'activité de CTGF par les cellules endothéliales ne bloque pas l'activation des fibroblastes en myofibroblastes, il faudrait évaluer le rôle des corps apoptotiques, des caspases et autres régulateurs de l'apoptose, ainsi que le rôle de TGF- $\beta$ , IL-6, IL-17, et les ROS par une approche in vitro. Des études in vivo sont également nécessaires pour mieux caractériser les mécanismes en jeu dans la fibrose induit par la radiothérapie. Ayant procédé à la construction d'une banque de tissu provenant de capsules périprothétiques irradiées et non-irradiées, une étude employant la technique Micro-Array

tissulaire et ou d'immunohistochimies pourront établir le rôle des mécanismes physiopathologiques proposées (autophagie et sénescence). De plus, un modèle animal de fibrose tissulaire post radiothérapie est aussi nécessaire. Ce modèle pourrait inclure le placement d'une prothèse sous cutanée qui serait irradiée; on pourra préparer plusieurs groupes expérimentaux avec des prothèses traitées ou pas avec des anticorps anti-CTGF afin d'évaluer le rôle in vivo du CTGF dans la fibrose post radiothérapie ainsi que le potentiel thérapeutique de son inhibition spécifique. Un modèle in vivo est aussi nécessaire à l'évaluation de l'élimination des cellules sénescents par le système immunitaire et considérer une approche thérapeutique employant des agents sénolytique. Ces pistes de recherche pourront ouvrir la porte vers l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques pharmacologique aux maladies de fibrose systémiques telles la fibrose rénale, pulmonaire, hépatique, et le syndrome de CREST.



## **Bibliographie**

1. Berbers J, van Baardwijk A, Houben R et al. 'Reconstruction: before or after postmastectomy radiotherapy?' A systematic review of the literature. *Eur J Cancer* 2014;50:2752-62.
2. Quinn TT, Miller GS, Rostek M et al. Prosthetic breast reconstruction: indications and update. *Gland Surg* 2016;5:174-86.
3. Pestana IA, Campbell DC, Bharti G et al. Factors affecting complications in radiated breast reconstruction. *Ann Plast Surg* 2013;70:542-5.
4. El-Sabawi B, Sosin M, Carey JN et al. Breast reconstruction and adjuvant therapy: A systematic review of surgical outcomes. *J Surg Oncol* 2015;112:458-64.
5. Lagares-Borrego A, Gacto-Sanchez P, Infante-Cassio P et al. A comparison of long-term cost and clinical outcomes between the two-stage sequence expander/prosthesis and autologous deep inferior epigastric flap methods for breast reconstruction in a public hospital. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2016;69:196-205.
6. Lee K, Mun GH. Prosthetic breast reconstruction in previously irradiated breasts: A meta-analysis. *J Surg Oncol* 2015;112:468-75.
7. Rosato R, Dowden RV. Radiation therapy as a cause of capsular contracture. *Ann Plast Surg* 1994;32:342-5.
8. Whitfield GA, Horan G, Irwin MS et al. Incidence of severe capsular contracture following implant-based immediate breast reconstruction with or without postoperative chest wall radiotherapy using 40 Gray in 15 fractions. *Radiother Oncol* 2009;90:141-7.

9. Drucker-Zertuche M, Bargallo-Rocha E, Zamora-Del RR. Radiotherapy and immediate expander/implant breast reconstruction: should reconstruction be delayed? *Breast J* 2011;17:365-70.
10. Hvilson GB, Hölmich LR, Steding-Jessen M et al. Delayed breast implant reconstruction: is radiation therapy associated with capsular contracture or reoperations? *Ann Plast Surg* 2012;68:246-52.
11. Kim SH, Kim JM, Park SH et al. Analysis of the effects of breast reconstruction in breast cancer patients receiving radiotherapy after mastectomy. *Arch Plast Surg* 2012;39:222-6.
12. Lam TC, Hsieh F, Boyages J. The effects of postmastectomy adjuvant radiotherapy on immediate two-stage prosthetic breast reconstruction: a systematic review. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:511-8.
13. Wong RK, Morrison SD, Momeni A et al. Outcomes of breast reconstruction in breast cancer patients with a history of mantle radiation for Hodgkin lymphoma. *Ann Plast Surg* 2014;72:S46-50.
14. Jun, Joon-II, and Lester F. Lau. "The Matricellular Protein CCN1/CYR61 Induces Fibroblast Senescence and Restricts Fibrosis in Cutaneous Wound Healing." *Nature cell biology* 12.7 (2010): 676–685.
15. Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* 2004;18:469-79.
16. Booth AJ, Csencsits-Smith K, Wood SC et al. Connective tissue growth factor promotes fibrosis downstream of TGFbeta and IL-6 in chronic cardiac allograft rejection. *Am J Transplant* 2010;10:220-30.

17. Laplante P, Sirois I, Raymond MA et al. Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell Death Differ* 2010;17:291-303.
18. Bernard M, Dieudé M, Yang B et al. Autophagy fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF. *Autophagy* 2014;10:2193-2207.
19. S. R. Hymes, E. A. Strom, and C. Fife, "Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 54, no. 1, pp. 28–46, Jan. 2006.
20. Marques M, Brown SA, Oliveira et al. Long-term follow-up of breast capsule contracture rates in cosmetic and reconstructive cases. *Plast. Reconstr. Surg* 2010;126:769–778.
21. Adams WP, Haydon MS, Ranieri J et al. A rabbit model for capsular contracture: development and clinical implications. *Plast. Reconstr. Surg* 2006;117:1214–21.
22. Kronowitz SJ. Delayed-immediate breast reconstruction: technical and timing considerations. *Plast. Reconstr. Surg* 2010;125:463–474.
23. M. Danino, P. Basmacioglu, S. Saito, F. Rocher, C. Blanchet-Bardon, M. Revol, and J. M. Servant, "Comparison of the capsular response to the Biocell RTV and Mentor 1600 Siltex breast implant surface texturing: a scanning electron microscopic study," *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 108, no. 7, pp. 2047–2052, Dec. 2001.
24. W. P. Adams Jr, "Capsular contracture: what is it? What causes it? How can it be prevented and managed?," *Clin. Plast. Surg.*, vol. 36, no. 1, pp. 119–126, vii, Jan. 2009.
25. S. Giordano, H. Peltoniemi, P. Lilius, and A. Salmi, "Povidone-iodine combined with antibiotic topical irrigation to reduce capsular contracture in cosmetic breast augmentation:



- a comparative study,” *Aesthetic Surg. J. Am. Soc. Aesthetic Plast. Surg.*, vol. 33, no. 5, pp. 675–680, Jul. 2013.
26. A. Araco, R. Caruso, F. Araco, J. Overton, and G. Gravante, “Capsular contractures: a systematic review,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 124, no. 6, pp. 1808–1819, Dec. 2009.
  27. A. Tweed and BC Centre of Excellence for Women’s Health, *Health care utilization among women who have undergone breast implant surgery*. Vancouver, B.C.: British Columbia Centre of Excellence for Women’s Health, 2003.
  28. O. Momoh, R. Ahmed, B. P. Kelley, O. Aliu, K. M. Kidwell, J. H. Kozlow, and K. C. Chung, “A Systematic Review of Complications of Implant-based Breast Reconstruction with Preconstruction and Postreconstruction Radiotherapy,” *Ann. Surg. Oncol.*, Oct. 2013.
  29. Powell, D.W., et al., Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999;277:C1-9.
  30. Herzog, E.L. and R. Bucala, Fibrocytes in health and disease. *Exp Hematol* 2010;38:548-56.
  31. Tomasek, J.J., et al., Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:349-63.
  32. Van De Water L, Varney S, Tomasek JJ. Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; 2:122-41.
  33. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012; 18:1028-40.
  34. van Deursen, Jan M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 2014;509:439-446.
  35. Lipson KE, Wong C, Teng Y et al. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and

- fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibro & tissue repair* 2012;5: S1-S24.
36. Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P et al. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis and rheumatism* 2010;62:1523-32.
  37. Liu S, Shi-wen X, Abraham DJ et al. CCN2 is required for bleomycin-induced skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism* 2011; 63:239-46.
  38. Xiao R, Liu FY, Luo JY, et al. Effect of small interfering RNA on the expression of connective tissue growth factor and type I and III collagen in skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2006; 155:1145-53.
  39. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, et al. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 1996; 106:729-33.
  40. Leask A, Sa S, Holmes A, et al. The control of CCN2 (CTGF) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *Mol Pathol* 2001; 54:180-3.
  41. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996; 7:469-80.
  42. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nature cell biology* 2002; 4:599-604.
  43. Mizumura K et al. The Emerging Importance of Autophagy in Pulmonary Diseases. *CHEST J* 2012;142:1289-99.

44. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6: 439-448.
45. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(7):651-62.
46. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J cell biol* 2011;192:547-56.
47. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:472-6.
48. Demaria, Marco et al. "An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA." *Developmental cell* 31.6 (2014): 722–733.
49. Coppe JP, Patil CK, Rodier F et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology* 2008; 6:2853-68.
50. Santosa KB, Chen X, Qi J et al. Postmastectomy Radiation Therapy and Two-Stage Implant-Based Breast Reconstruction: Is There a Better Time to Irradiate? *Plast Reconstr Surg* 2016;138:761-9.



