

# Implication d'HIF-1 $\alpha$ dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN induites par une irradiation photonique et par ions carbone

**Anne-Sophie Wozny**

Laboratoire de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire

UMR CNRS5822/IP2I

Lyon, France

Assemblée Générale GdR MI2B

27-28 Septembre 2021





# Radiothérapie et Radiorésistance

□ Radiothérapie = utilisation de **rayonnements** induisant la mort cellulaire



# Radiothérapie et Radiorésistance

- ❑ Radiothérapie = utilisation de **rayonnements** induisant la mort cellulaire
- ❑ Mécanismes de **radiorésistance** = enjeu clinique +++



# Radiothérapie et Radiorésistance

- ❑ Radiothérapie = utilisation de **rayonnements** induisant la mort cellulaire
- ❑ Mécanismes de **radiorésistance** = enjeu clinique +++
- ❑ Nombreux mécanismes identifiés:
  - ✓ Systèmes antioxydants
  - ✓ Voies de prolifération et survie
  - ✓ Cellules Souches Cancéreuses
  - ✓ Microenvironnement hypoxique
  - ✓ Efficience des mécanismes de réparation



# Radiothérapie et Radiorésistance

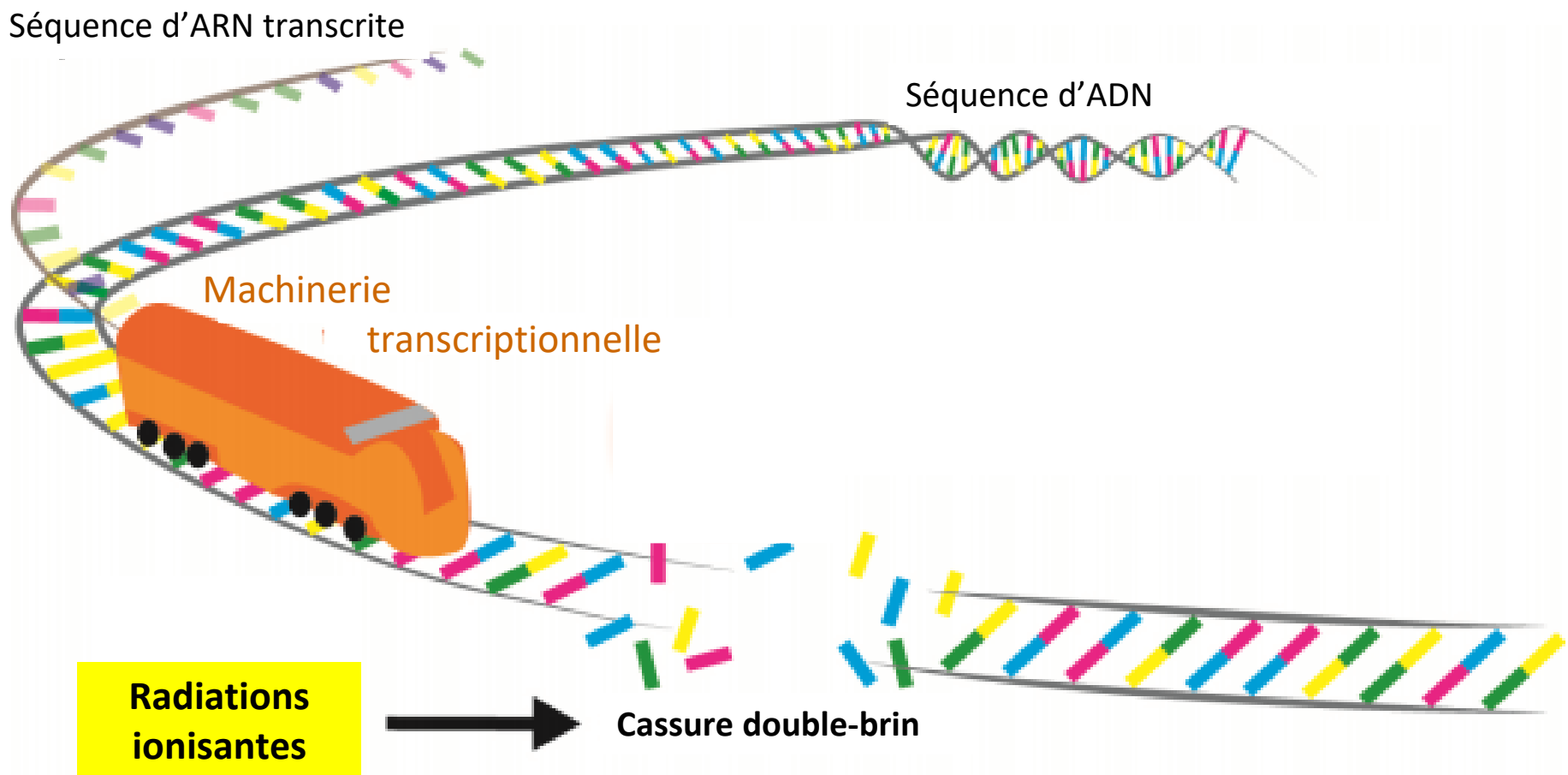
- ❑ Radiothérapie = utilisation de **rayonnements** induisant la mort cellulaire
- ❑ Mécanismes de **radiorésistance** = enjeu clinique +++
- ❑ Nombreux mécanismes identifiés:
  - ✓ Systèmes antioxydants
  - ✓ Voies de prolifération et survie
  - ✓ Cellules Souches Cancéreuses
  - ✓ Microenvironnement hypoxique
  - ✓ Efficience des mécanismes de réparation



Cassure Double-Brin de l'ADN  
= **déterminants de la létalité  
cellulaire**

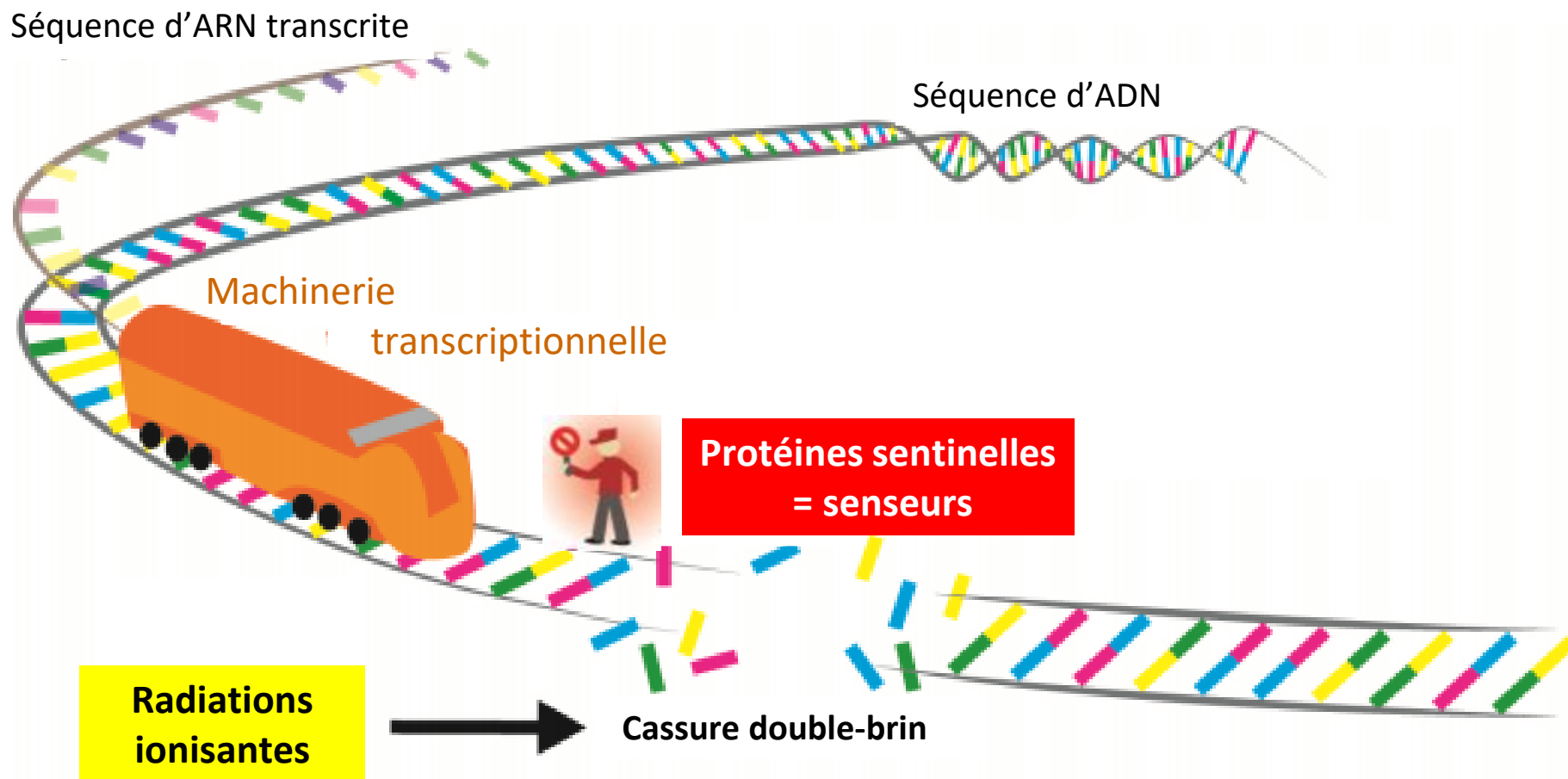


# Rayonnements ionisants et CDBs



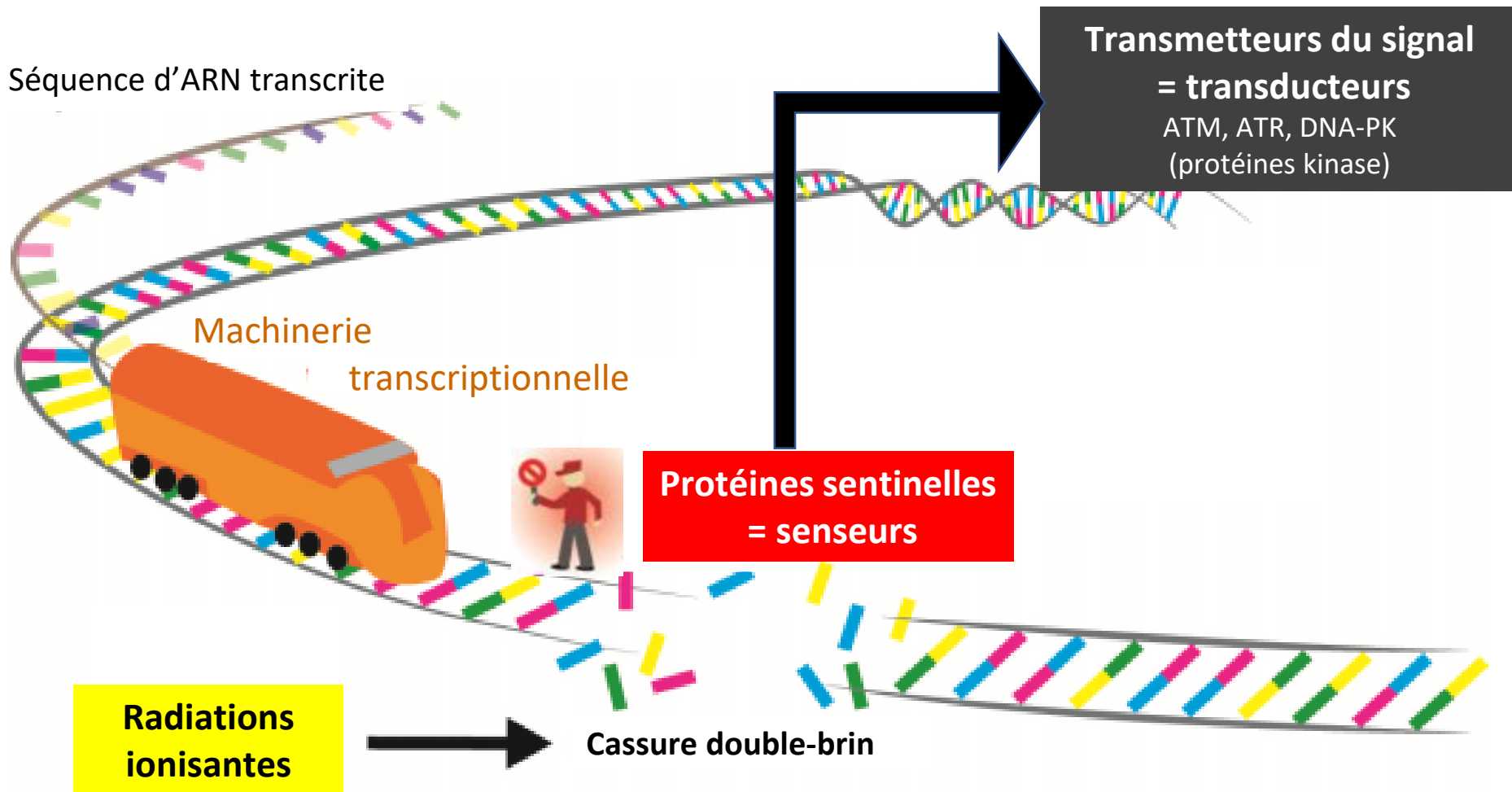


# Rayonnements ionisants et CDBs





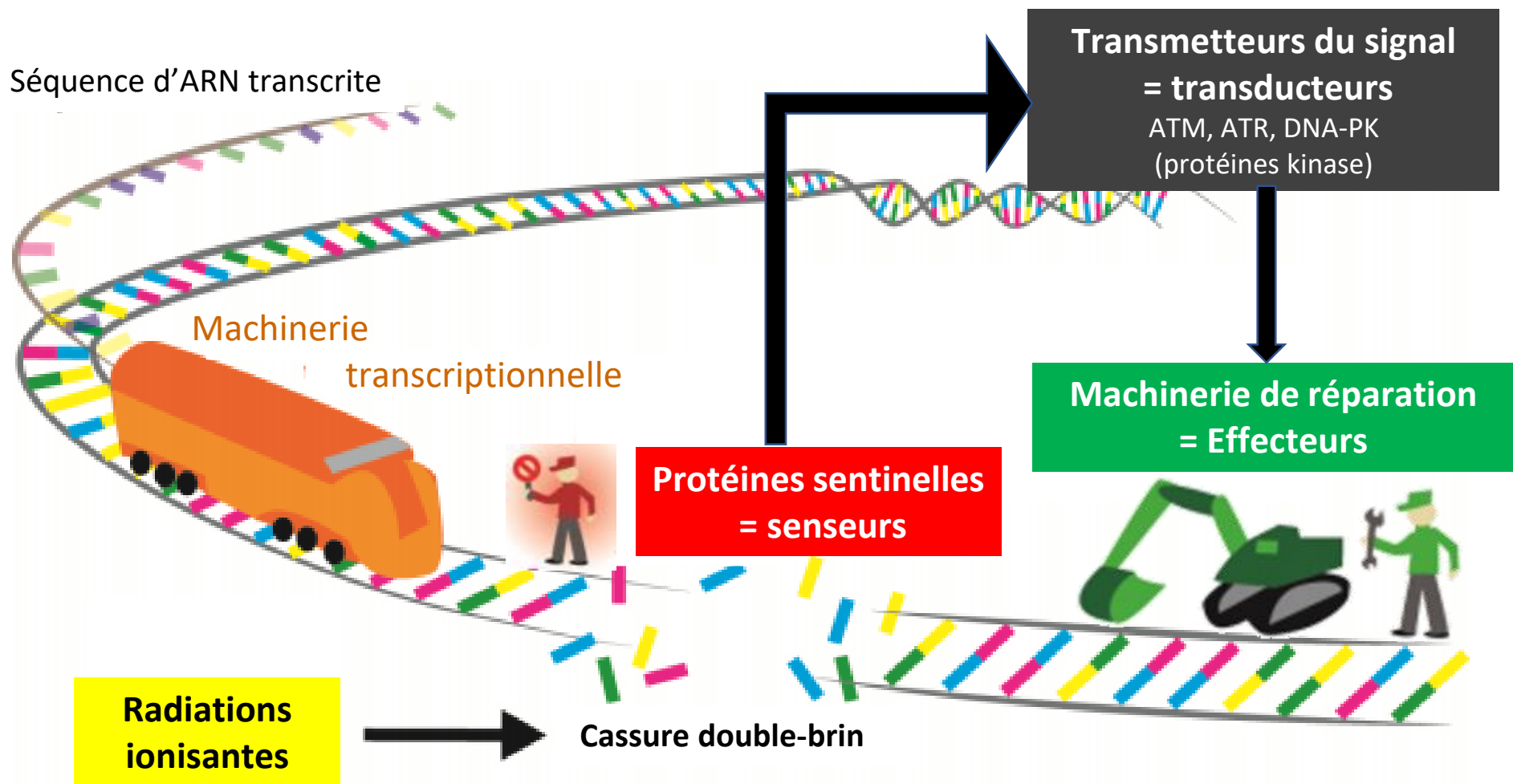
# Rayonnements ionisants et CDBs





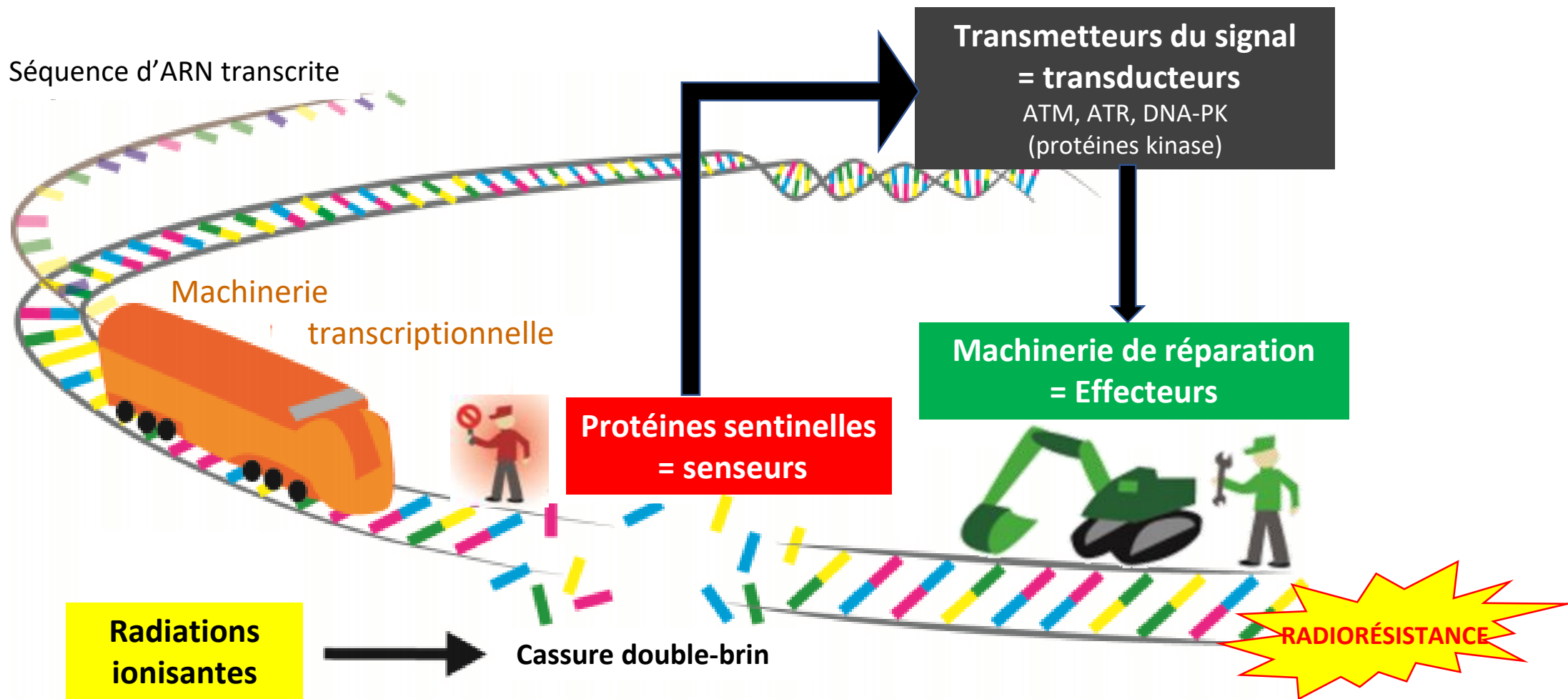


# Rayonnements ionisants et CDBs





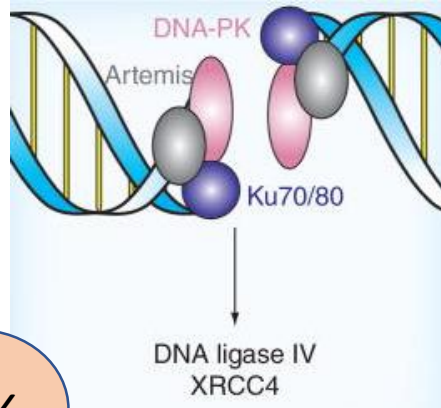
# Rayonnements ionisants et CDBs





# Phase effectrice – Deux voies principales

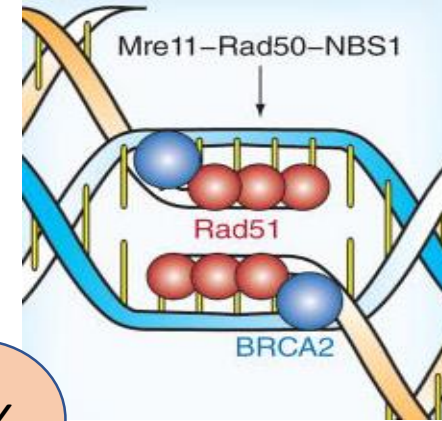
## Voie non homologue (NHEJ)



70%

- ✓ Principal mode de réparation
- ✓ Phase G0/G1
- ✓ Rapprochement d'extrémités lésées
- ✓ Perte de matériel génétique
- ✓ Infidèle

## Recombinaison Homologue (RH)



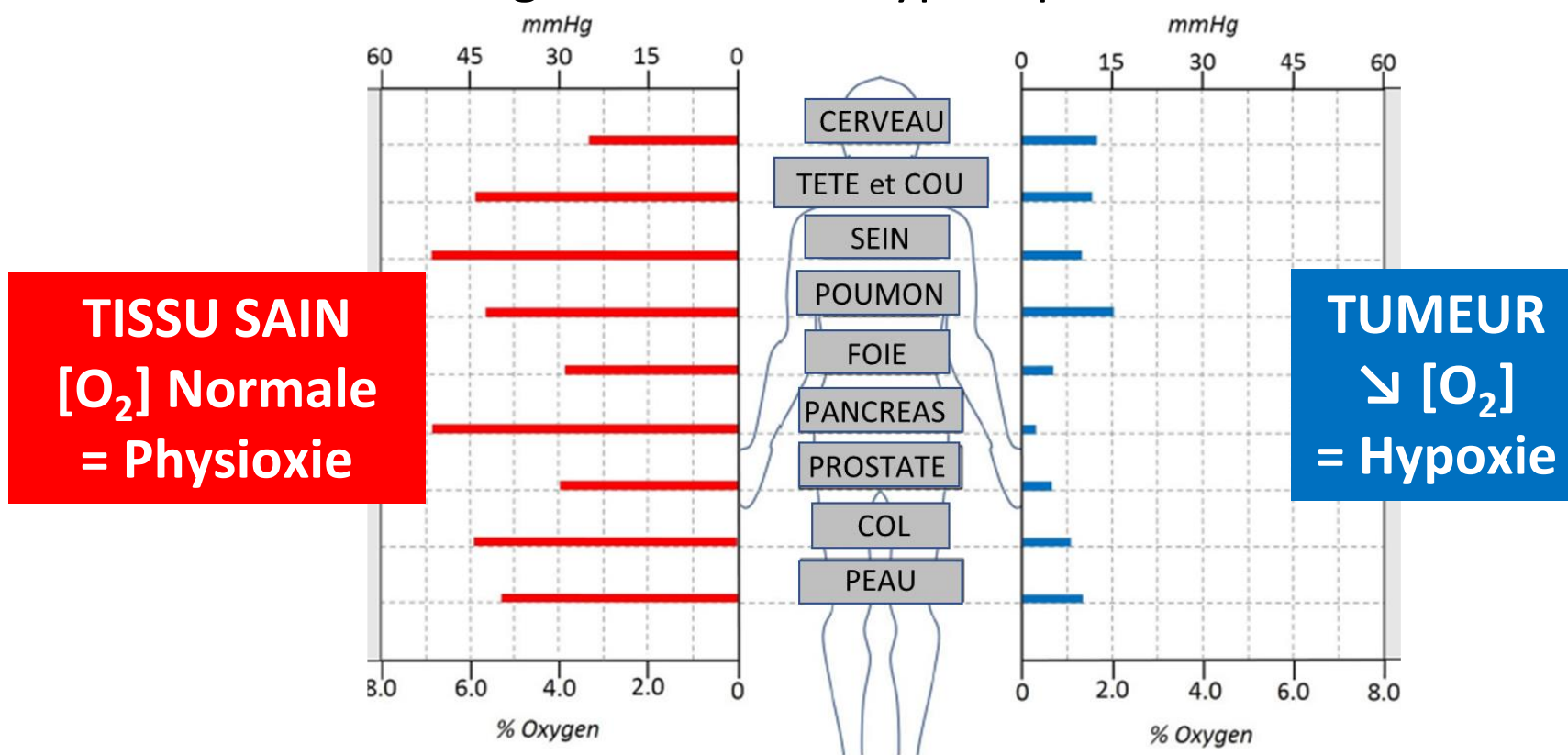
30%

- ✓ Moins utilisée que la NHEJ
- ✓ Phase S/G2
- ✓ Chromatide sœur non endommagée
- ✓ Fidèle/conservatrice



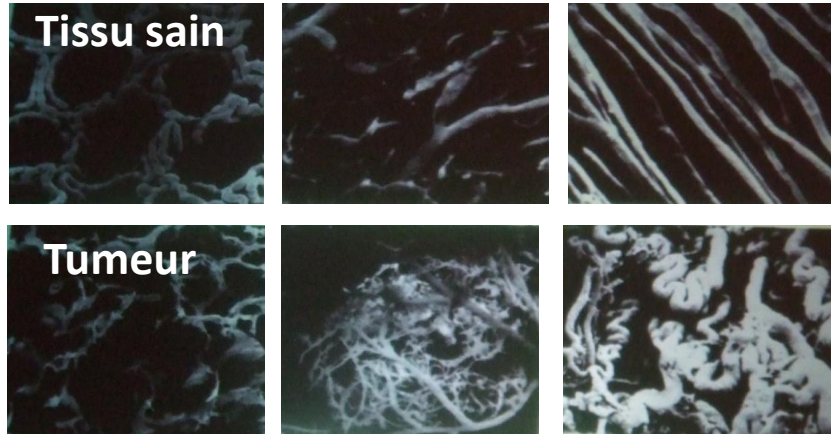
# Hypoxie tumorale

❑ Tumeurs solides généralement hypoxiques





# Hypoxie tumorale et radiorésistance

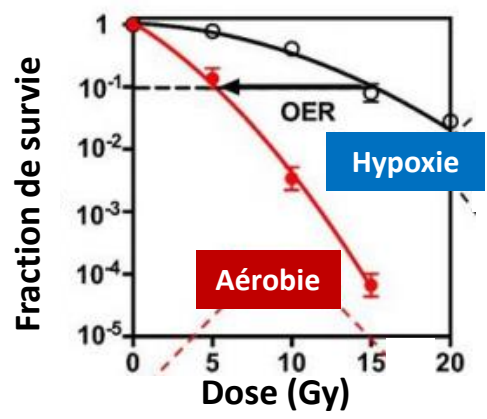
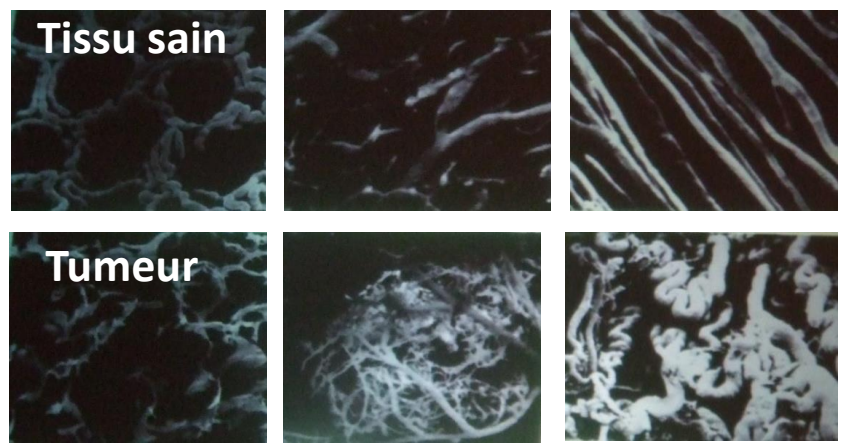


Néo-angiogenèse

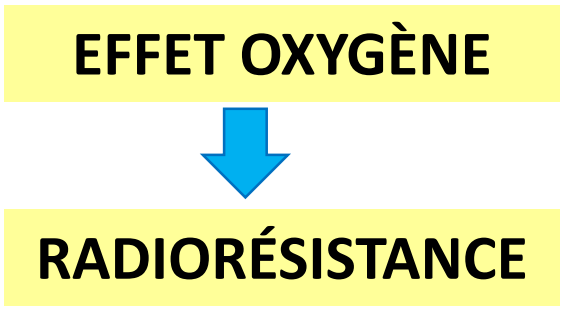


# Hypoxie tumorale et radiorésistance

Néo-angiogenèse

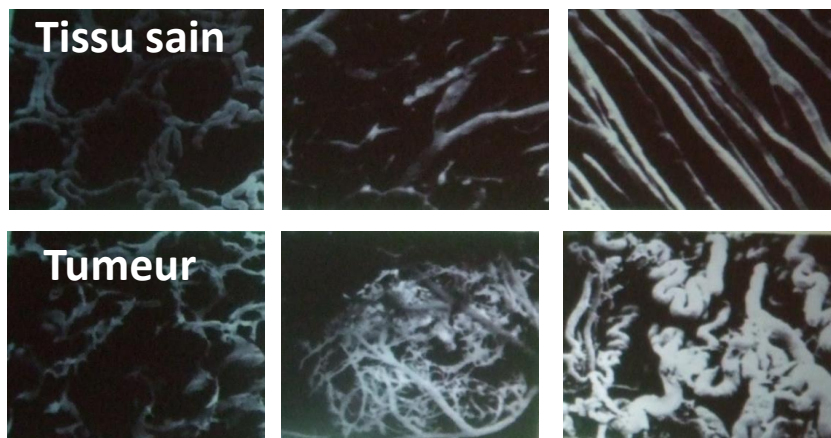


OER =  
Oxygen Enhancement Ratio

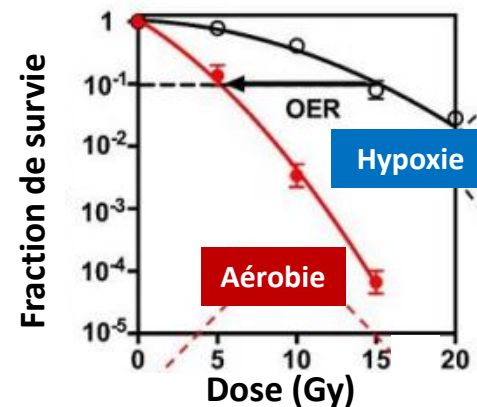




# Hypoxie tumorale et radiorésistance



Néo-angiogenèse



OER =  
Oxygen Enhancement Ratio

**EFFET OXYGÈNE**



**RADIORÉSISTANCE**

## ❑ Ions carbone

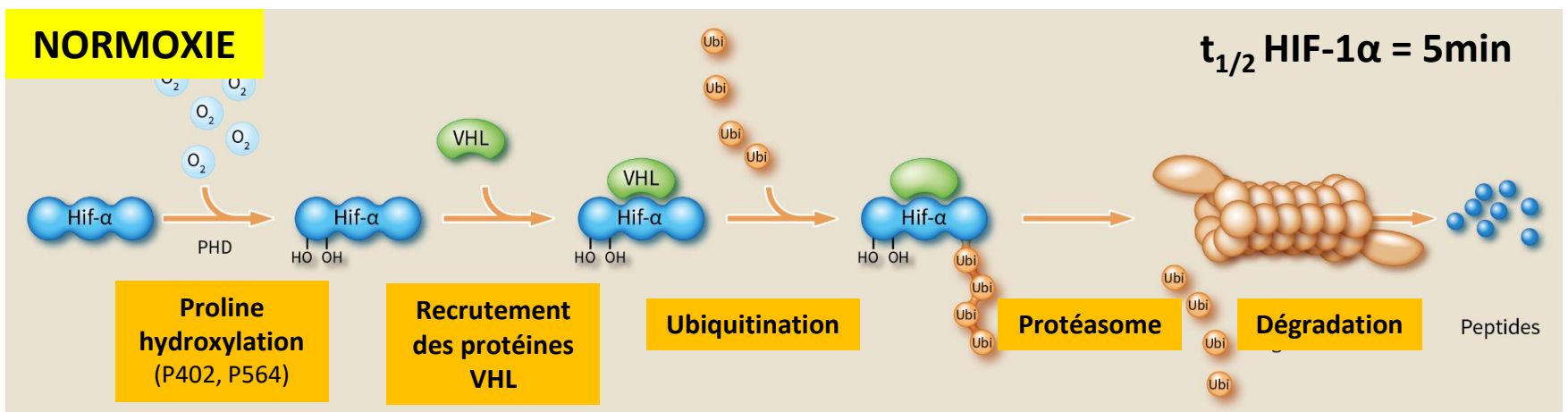
- ✓ Ciblage balistique +++
- ✓ Efficacité biologique +++

➔ Peu/Pas d'effet oxygène (OER~ 1)



# Réponse cellulaire tumorale à l'hypoxie

Senseur de l'hypoxie  
HIF-1 $\alpha$

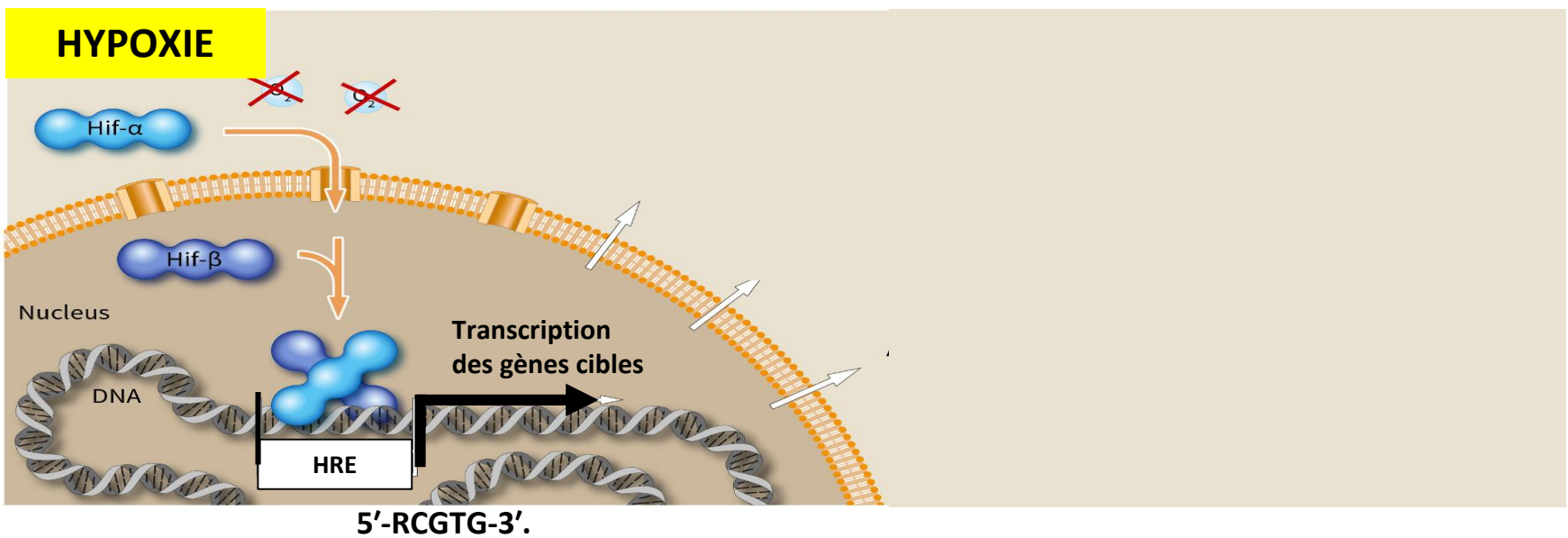
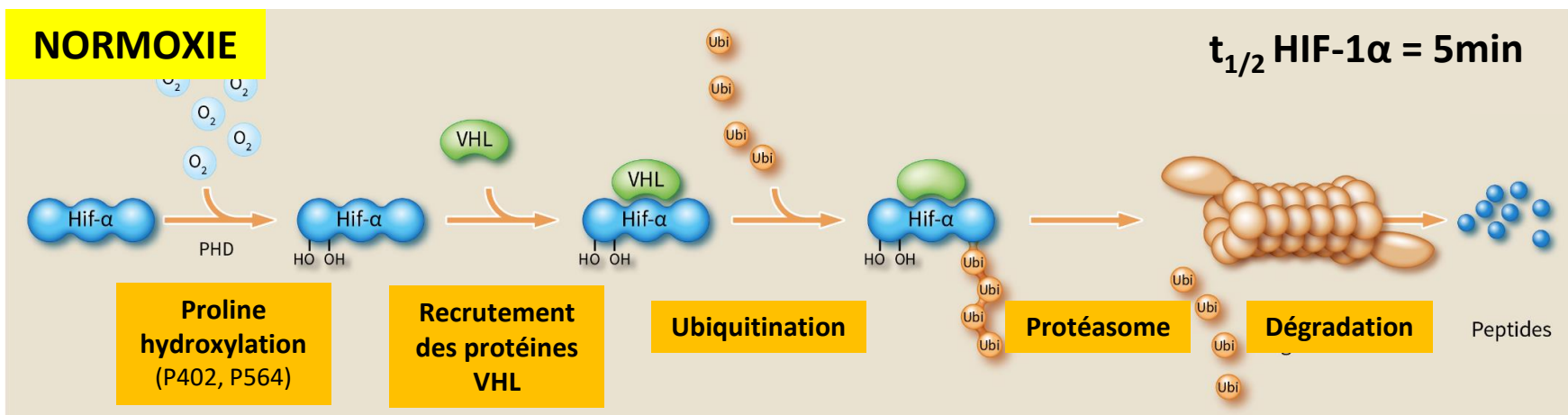






# Réponse cellulaire tumorale à l'hypoxie

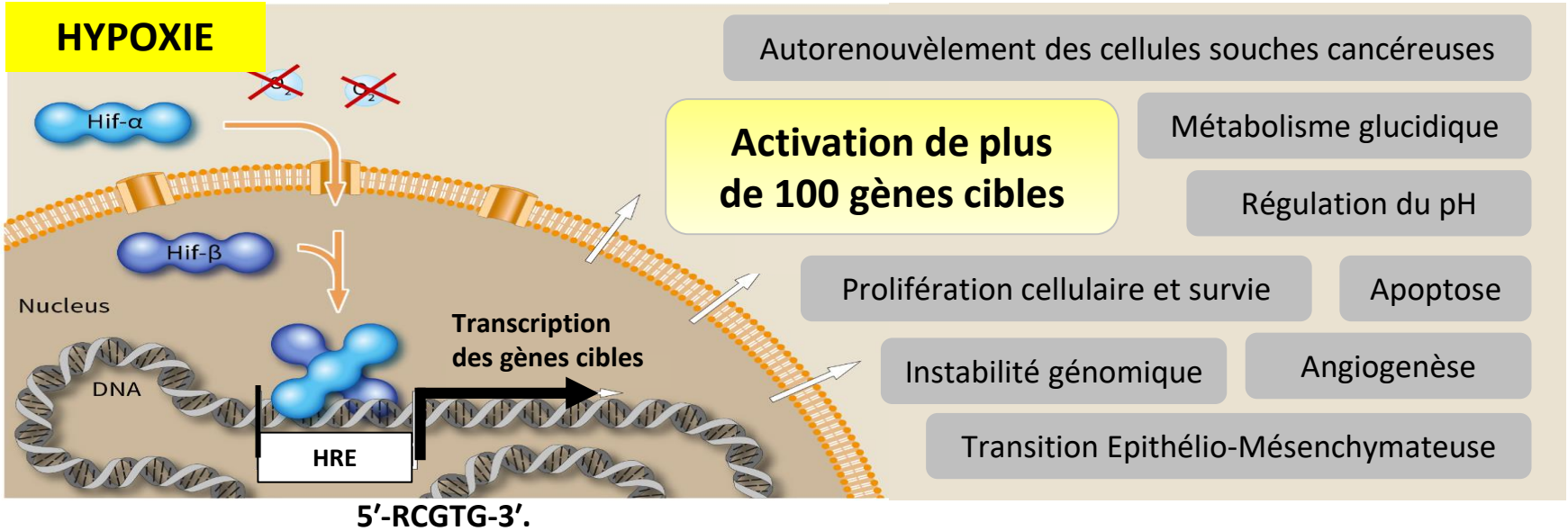
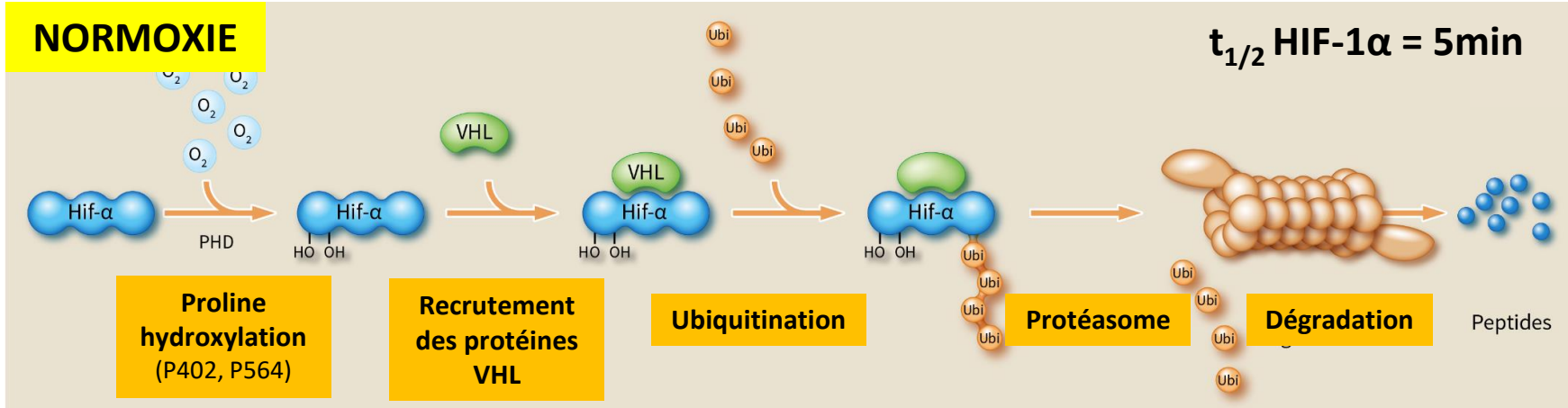
Senseur de l'hypoxie  
HIF-1 $\alpha$





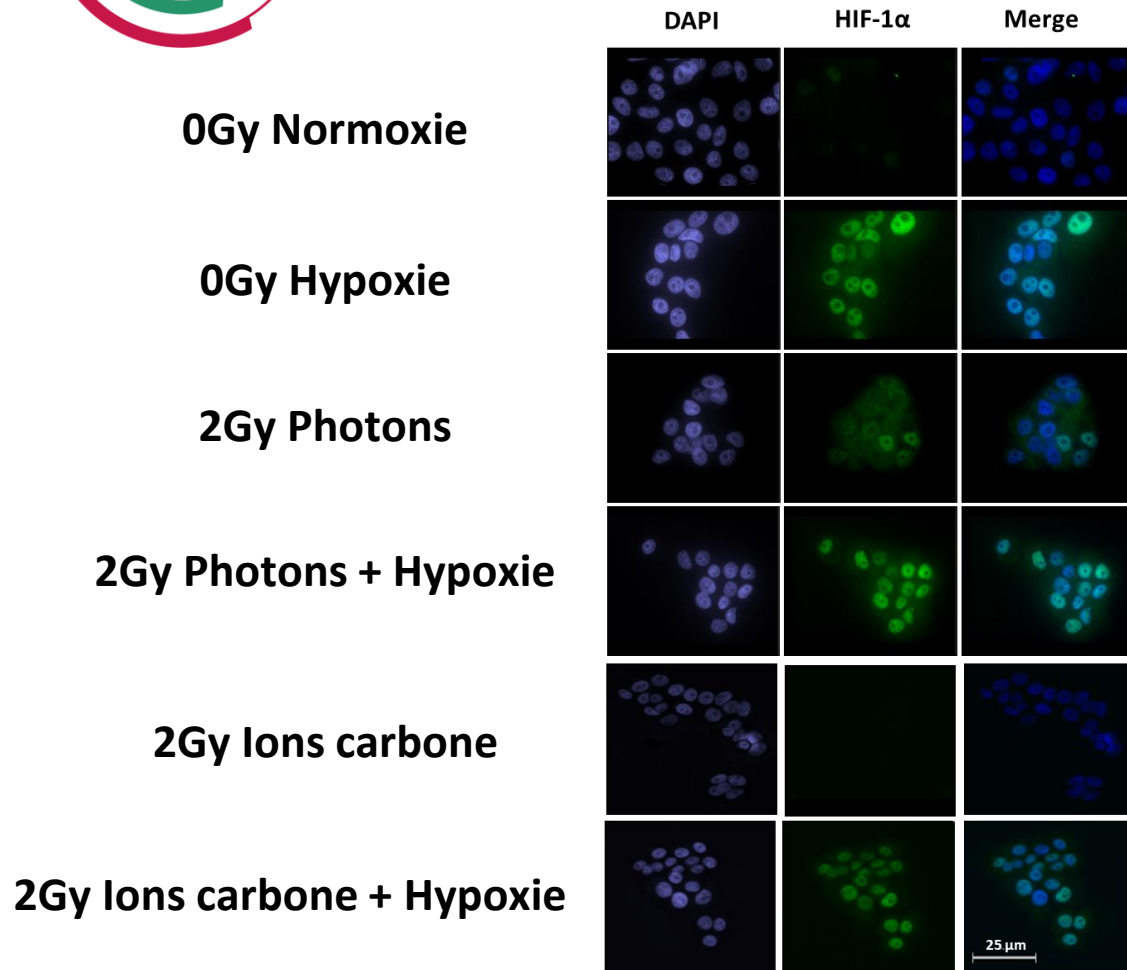
# Réponse cellulaire tumorale à l'hypoxie

Senseur de l'hypoxie  
HIF-1 $\alpha$





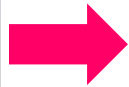
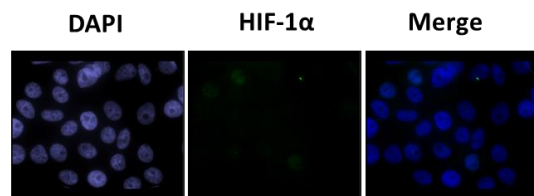
# HIF-1 $\alpha$ et irradiations





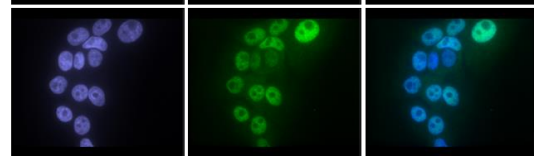
# HIF-1 $\alpha$ et irradiations

0Gy Normoxie

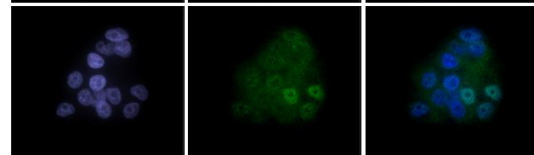


Pas de stabilisation d'HIF-1 $\alpha$

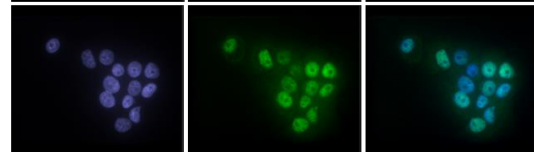
0Gy Hypoxie



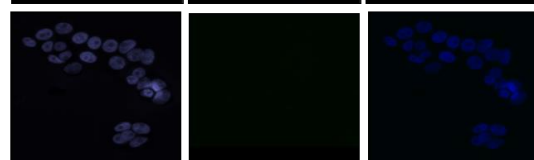
2Gy Photons



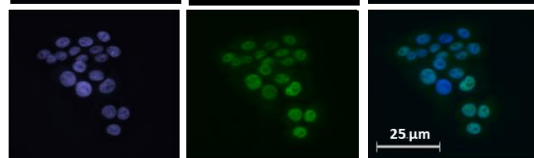
2Gy Photons + Hypoxie



2Gy Ions carbone

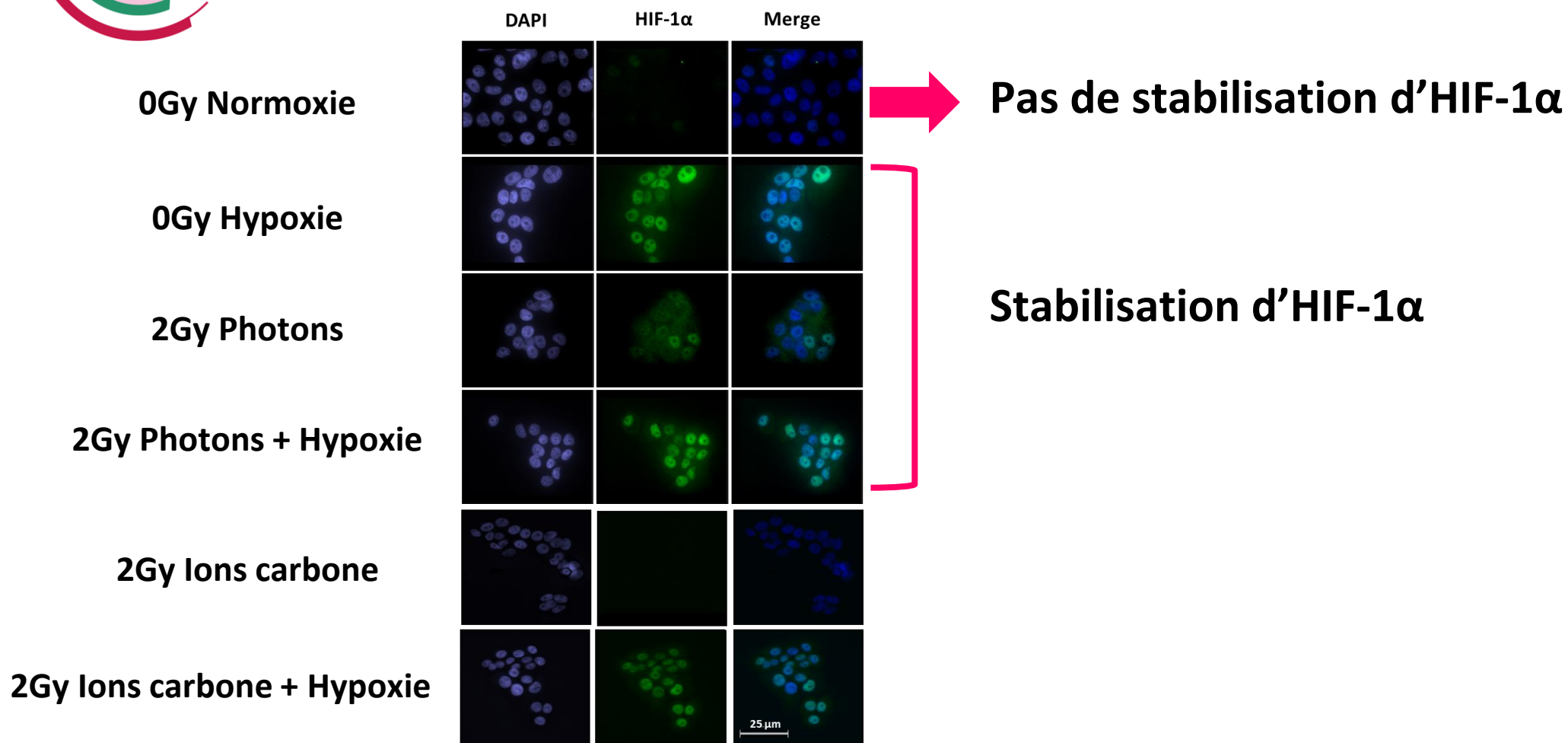


2Gy Ions carbone + Hypoxie



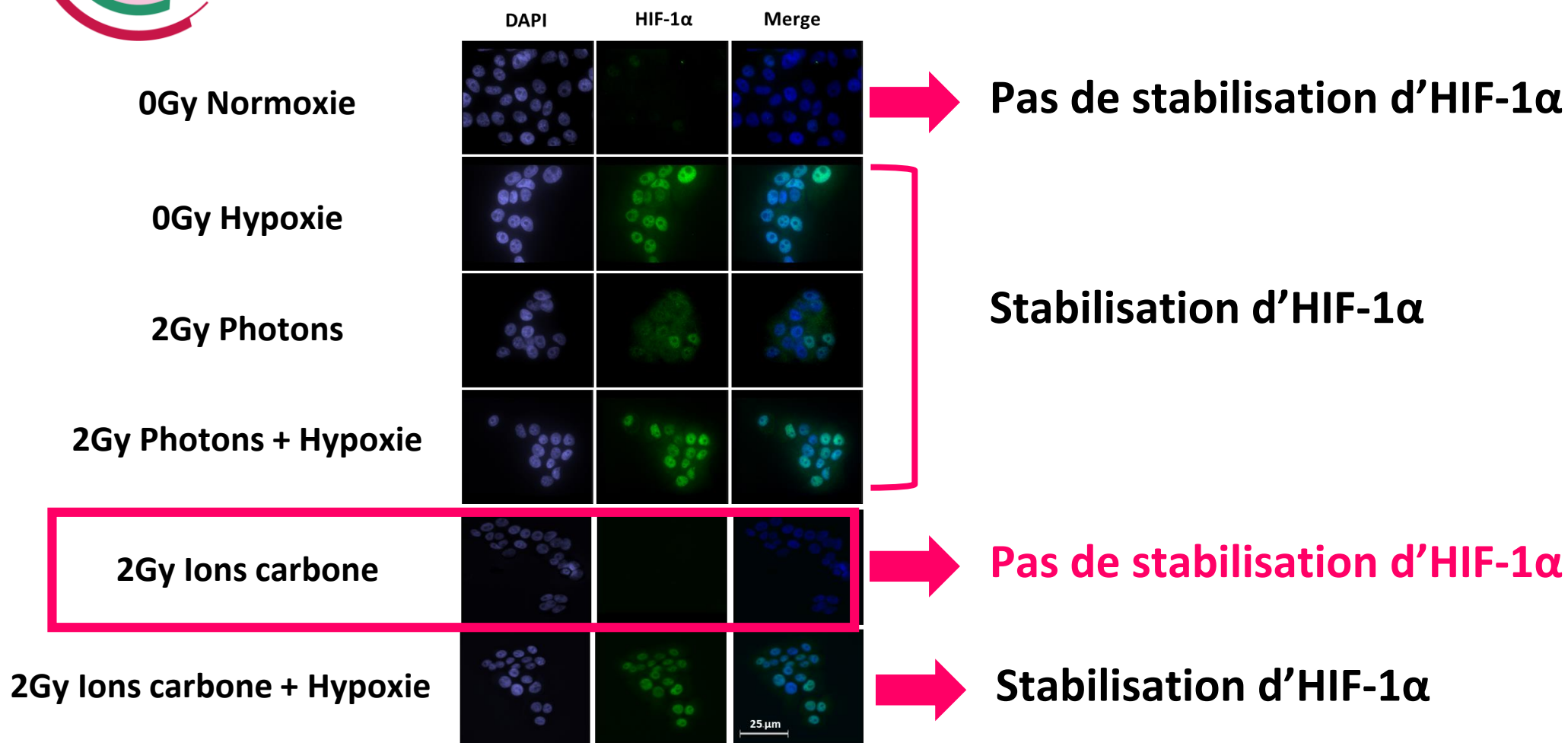


# HIF-1 $\alpha$ et irradiations



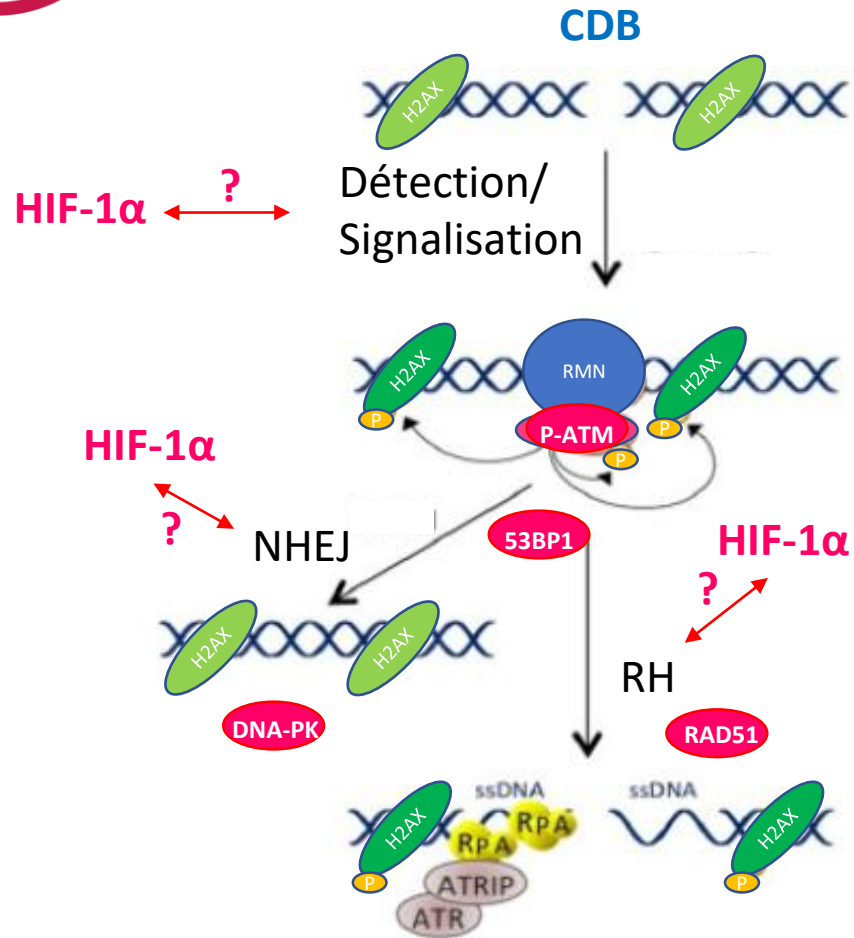


# HIF-1 $\alpha$ et irradiations





# HIF-1 $\alpha$ et réparation des CDBs radio-induites?



Détection/Signalisation  $\rightarrow$  P-ATM,  $\gamma$ H2AX

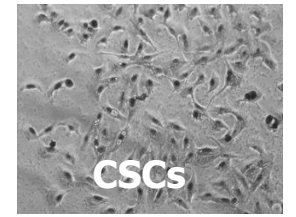
Choix de la voie de réparation  $\rightarrow$  53BP1

Voie NHEJ  $\rightarrow$  P-DNA-PKcs

Voie RH  $\rightarrow$  RAD51



# Matériels et Méthodes

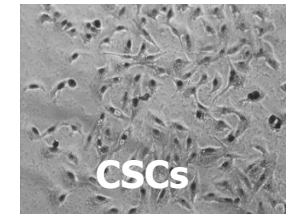
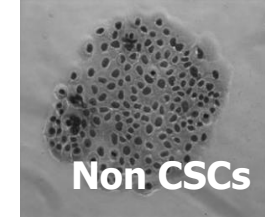


- ❑ SQ20B (Larynx) and FaDu (Pharynx) + SQ20B-CSCs et FaDu-CSCs
- ❑ Normoxie (21% O<sub>2</sub>) vs hypoxie chronique (1% O<sub>2</sub>)
- ❑ Transfection ± siHIF-1 $\alpha$
- ❑ Études protéiques (WB) et par immunofluorescence





# Matériels et Méthodes



- ❑ SQ20B (Larynx) and FaDu (Pharynx) + SQ20B-CSCs et FaDu-CSCs
- ❑ Normoxie (21% O<sub>2</sub>) vs hypoxie chronique (1% O<sub>2</sub>)
- ❑ Transfection ± siHIF-1 $\alpha$
- ❑ Études protéiques (WB) et par immunofluorescence

## Photons

LRCM, Lyon, France, 250 kV



## Ions carbone

HIMAC, Chiba, Japon, 290 MeV/n

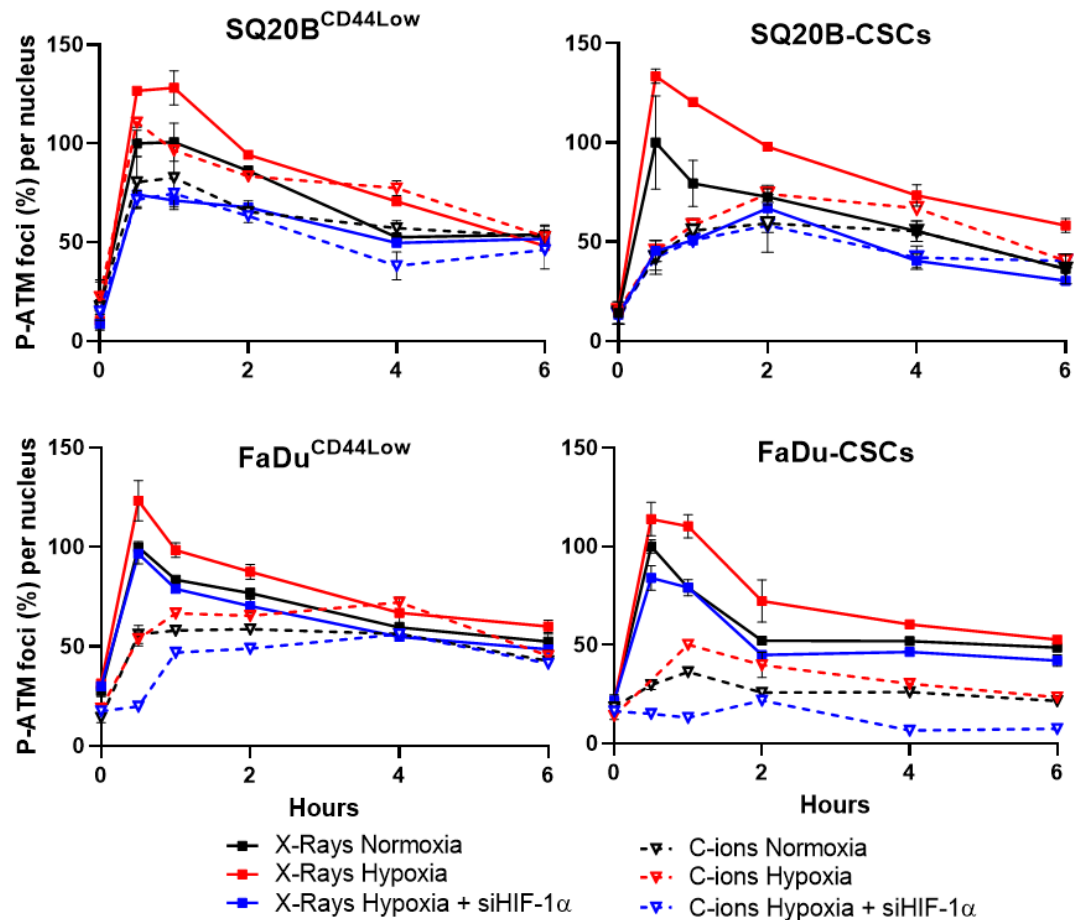
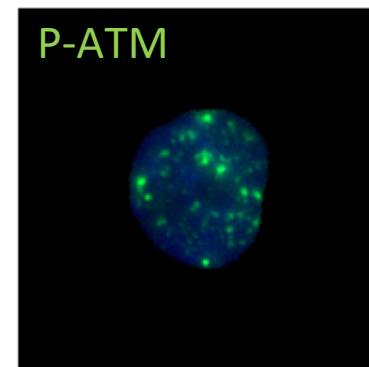


GANIL, Caen, France, 75 MeV/n





# Détection des CDBs

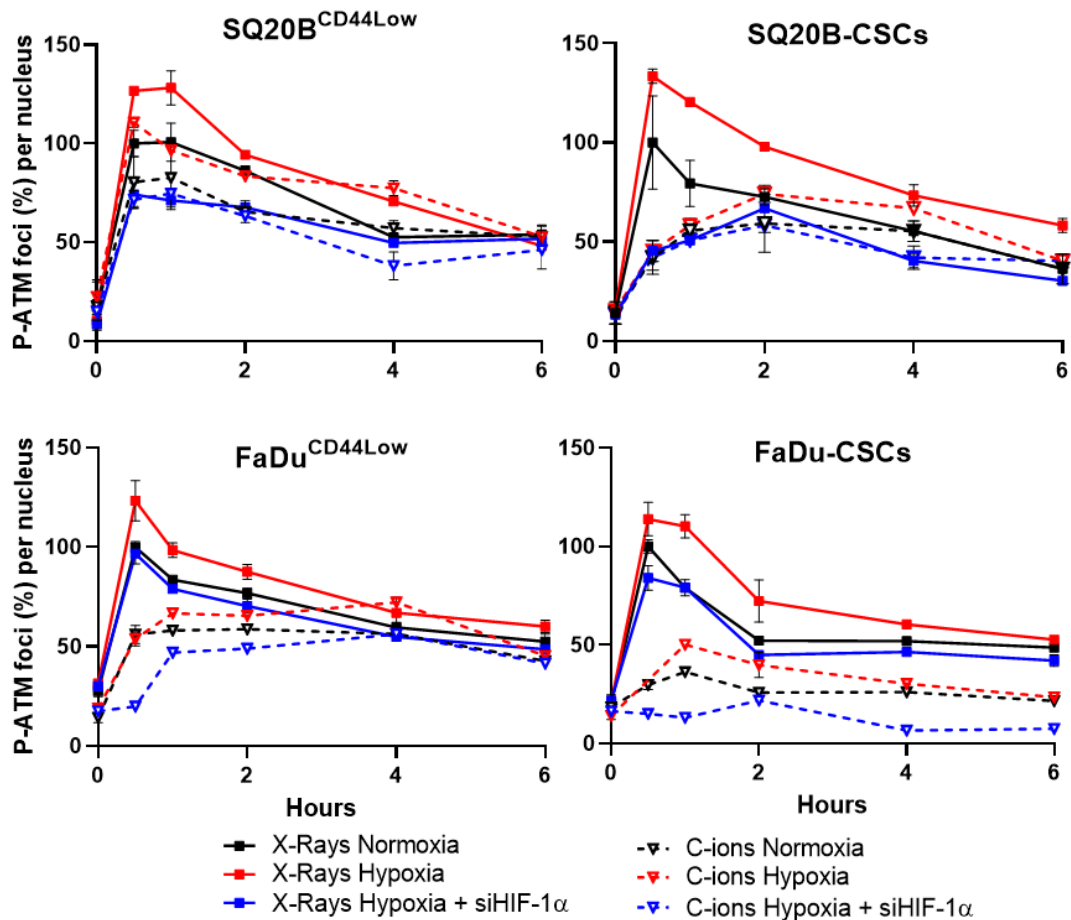
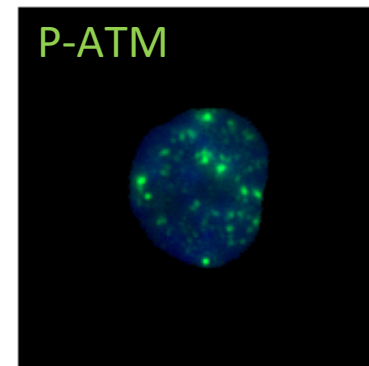


## Études protéiques:

- ✓ Pas de modulation d'ATM
- ✓ Modulation de la phosphorylation d'ATM



# Détection des CDBs



## Études protéiques:

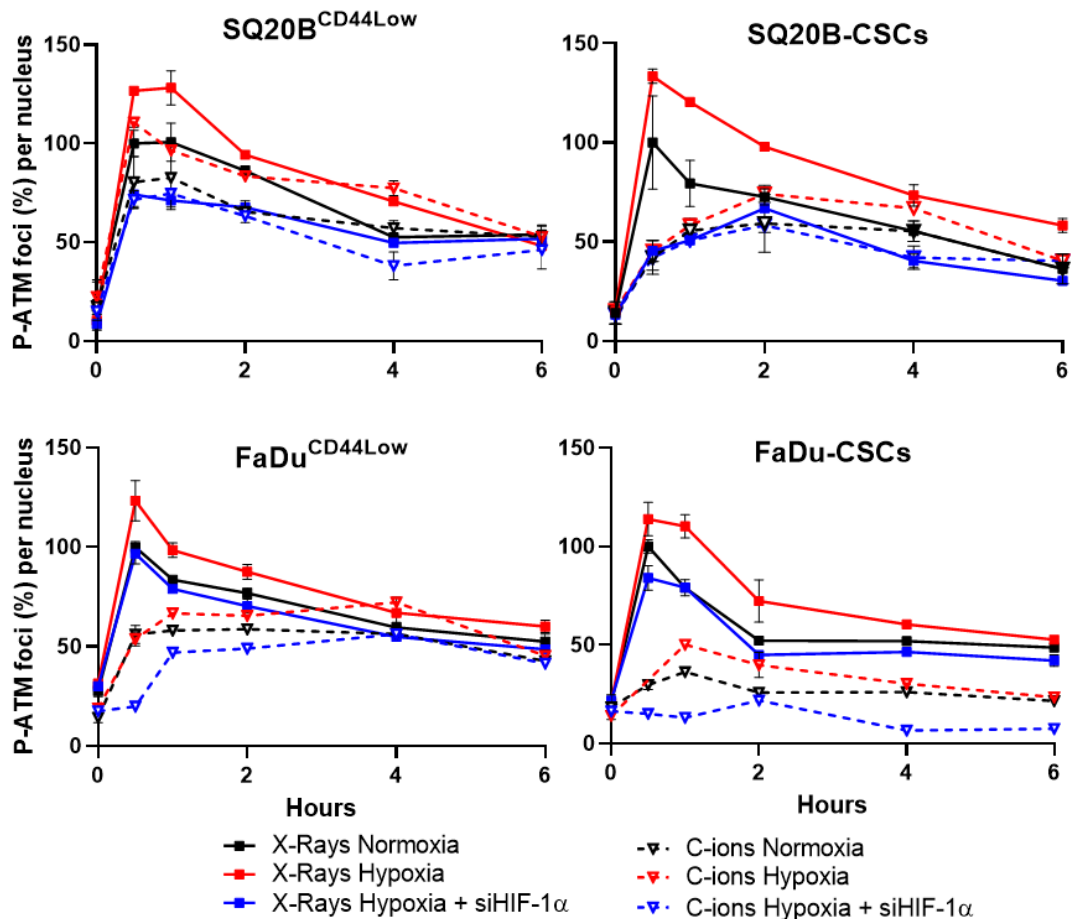
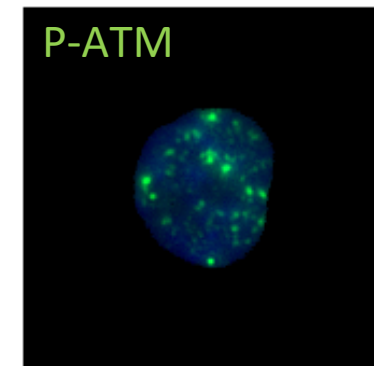
- ✓ Pas de modulation d'ATM
- ✓ Modulation de la phosphorylation d'ATM

## En conditions hypoxiques + IR (IF):

- ✓ ↗ de P-ATM après IR photons et Ions C
- ✓ ↘ de P-ATM après inhibition d'HIF-1α



# Détection des CDBs



## Études protéiques:

- ✓ Pas de modulation d'ATM
- ✓ Modulation de la phosphorylation d'ATM

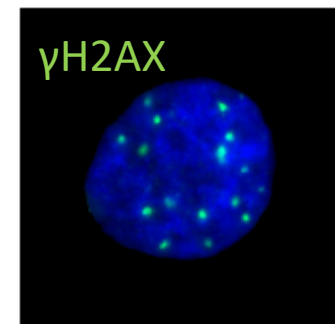
## En conditions hypoxiques + IR (IF):

- ✓ ↗ de P-ATM après IR photons et Ions C
- ✓ ↘ de P-ATM après inhibition d'HIF-1α

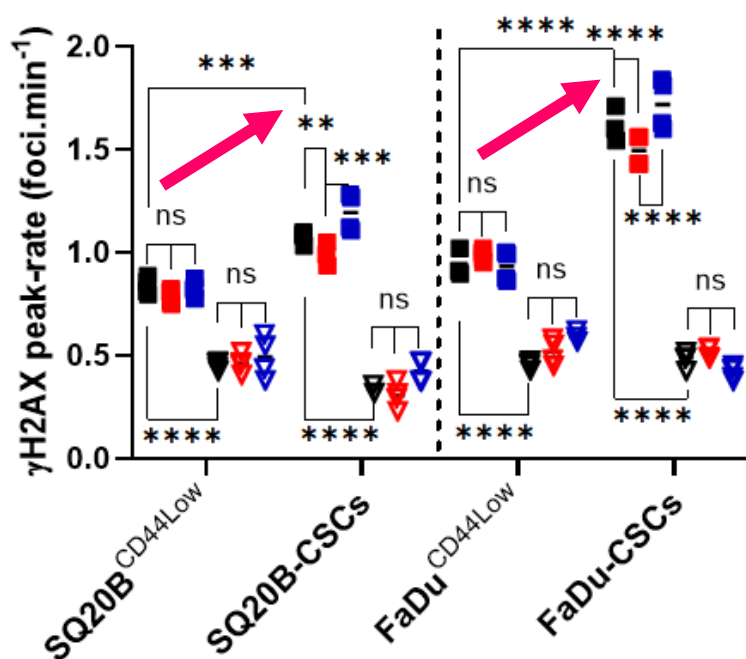
→ Implication d'HIF-1α dans la détection des CDBs (hypoxie + IR Photons et Ions C)



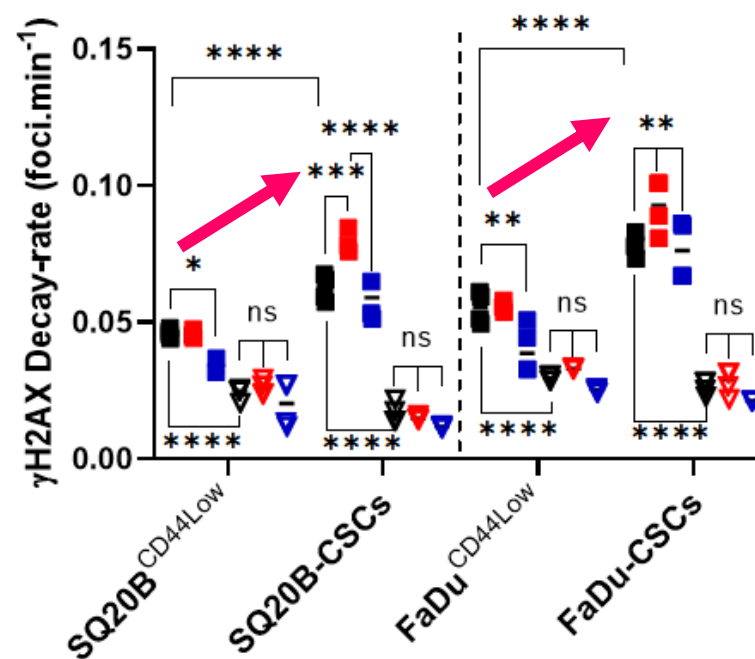
# Signalisation des CDBs



Induction du pic  $\gamma$ H2AX



Décroissance du pic  $\gamma$ H2AX

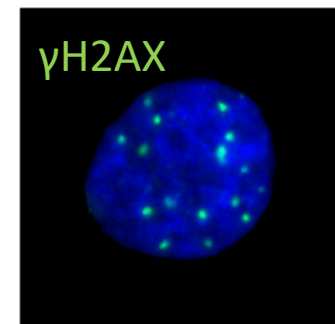


- X-Rays Normoxia
- X-Rays Hypoxia
- X-Rays Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$
- ▼ C-ions Normoxia
- ▼ C-ions Hypoxia
- ▼ C-ions Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$

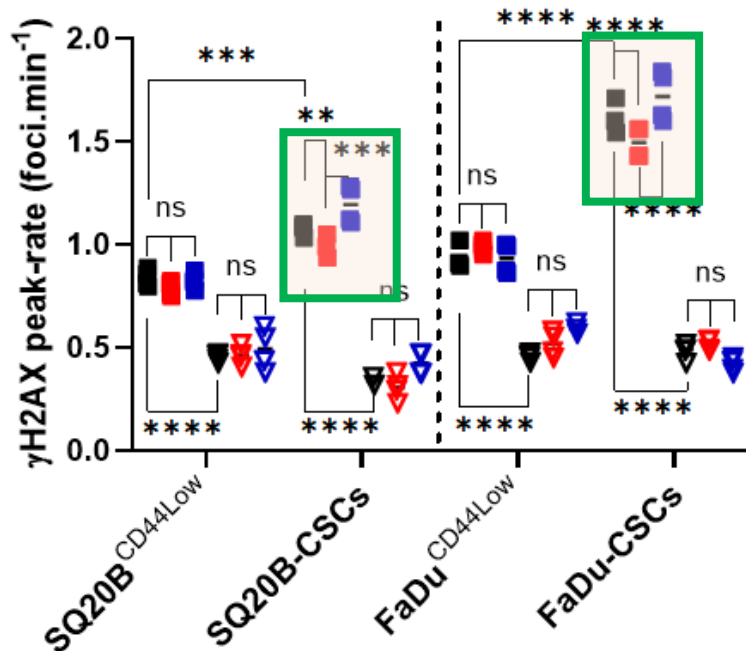
Two-way ANOVA test,  
 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  
 \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ns: non-significant



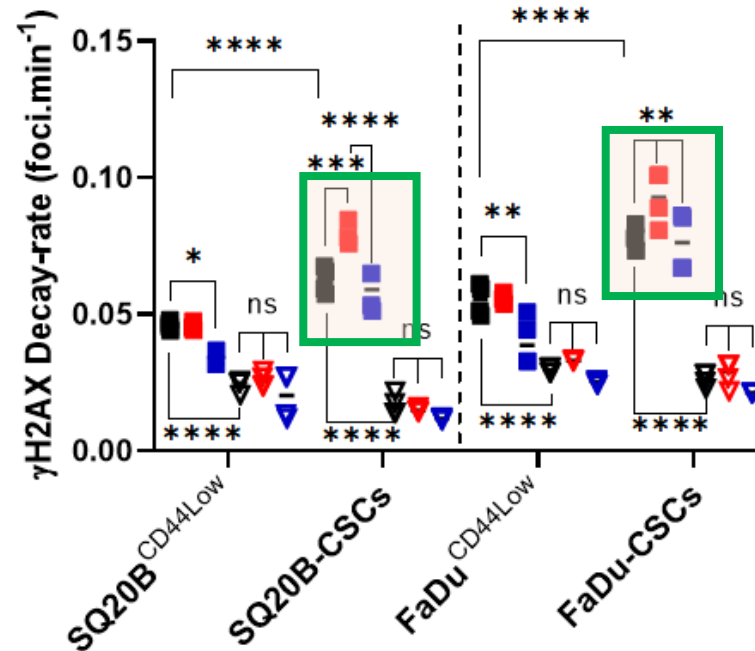
# Signalisation des CDBs



Induction du pic  $\gamma$ H2AX



Décroissance du pic  $\gamma$ H2AX

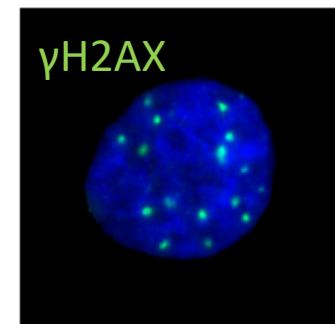


- X-Rays Normoxia
- X-Rays Hypoxia
- X-Rays Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$
- ▼ C-ions Normoxia
- ▼ C-ions Hypoxia
- ▼ C-ions Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$

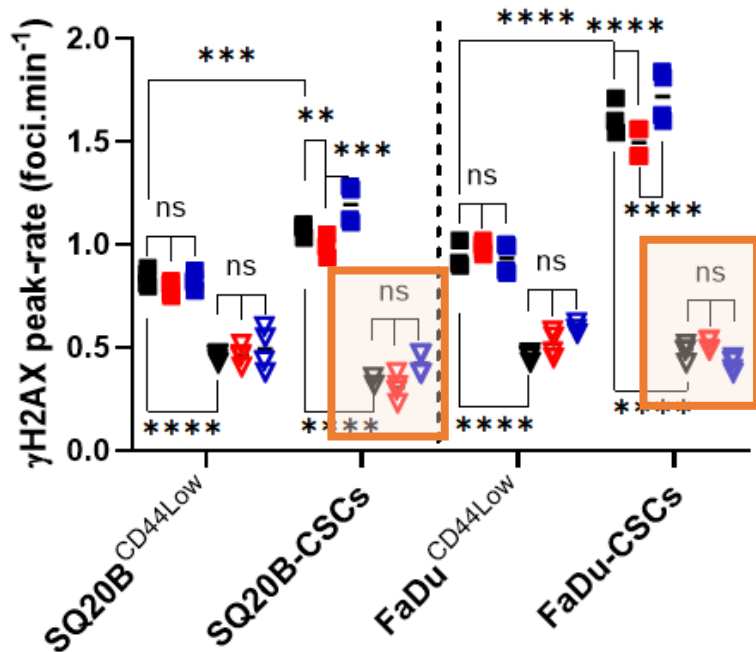
Two-way ANOVA test,  
 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ,  
 \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ns: non-significant



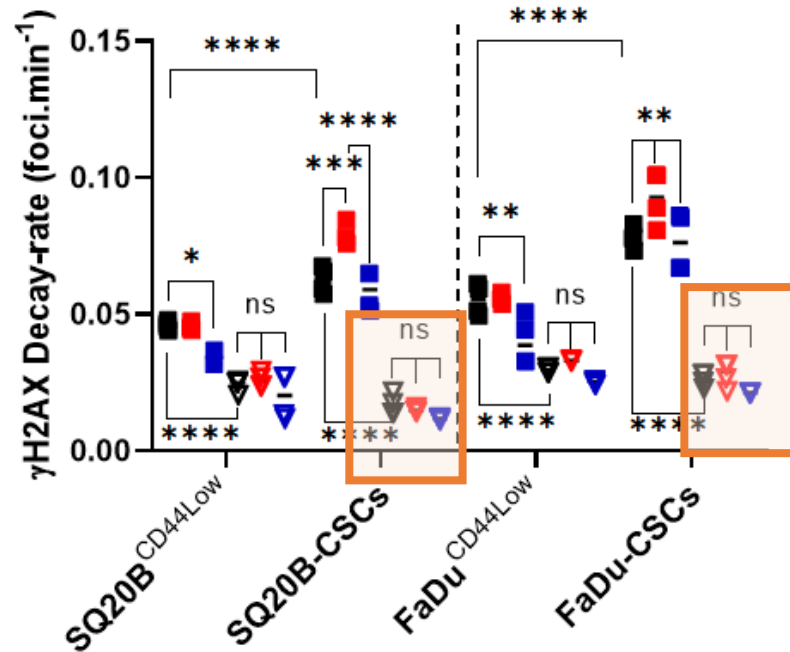
# Signalisation des CDBs



Induction du pic  $\gamma$ H2AX



Décroissance du pic  $\gamma$ H2AX

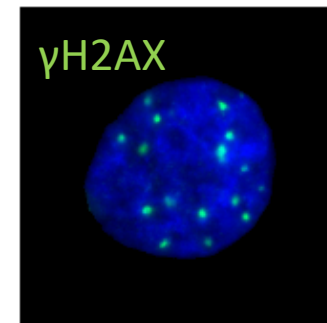


- X-Rays Normoxia
- X-Rays Hypoxia
- X-Rays Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$
- ▼ C-ions Normoxia
- ▼ C-ions Hypoxia
- ▼ C-ions Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$

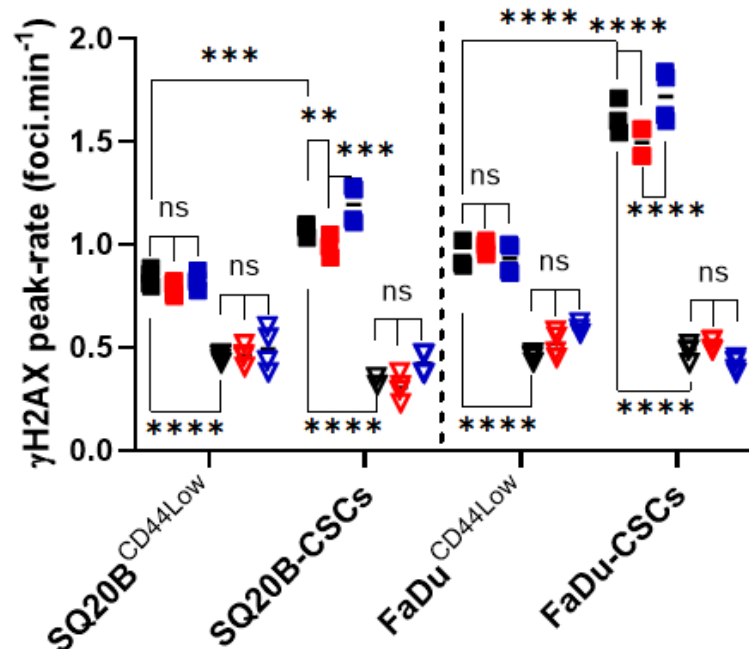
Two-way ANOVA test,  
 \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001,  
 \*\*\*\* p < 0.0001, ns: non-significant



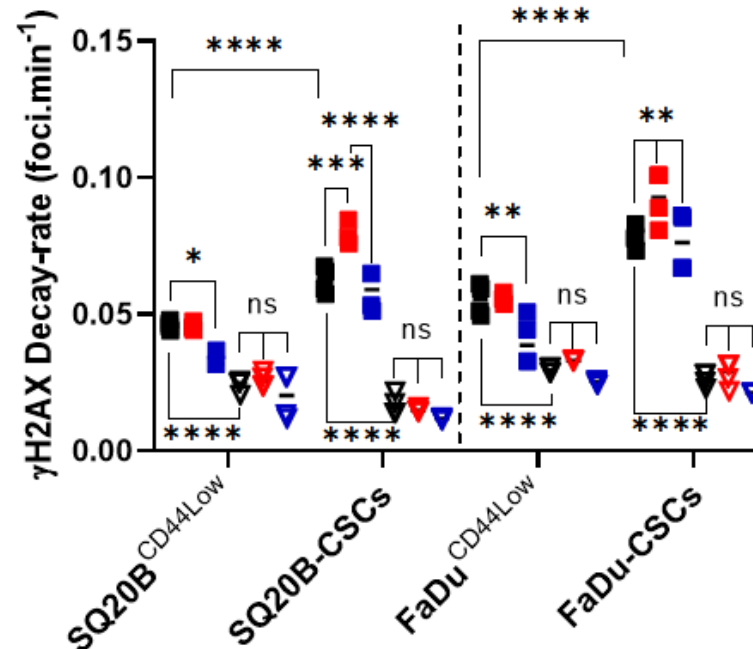
# Signalisation des CDBs



Induction du pic  $\gamma$ H2AX



Décroissance du pic  $\gamma$ H2AX



- X-Rays Normoxia
- X-Rays Hypoxia
- X-Rays Hypoxia + siHIF-1α
- ▼ C-ions Normoxia
- ▼ C-ions Hypoxia
- ▼ C-ions Hypoxia + siHIF-1α

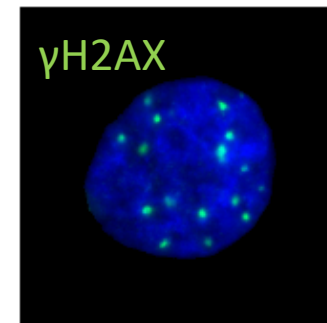
Two-way ANOVA test,  
 \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001,  
 \*\*\*\* p < 0.0001, ns: non-significant

□ **Hypoxie + IR:** ↗ des foci résiduels  $\gamma$ H2AX après inhibition d'HIF-1α

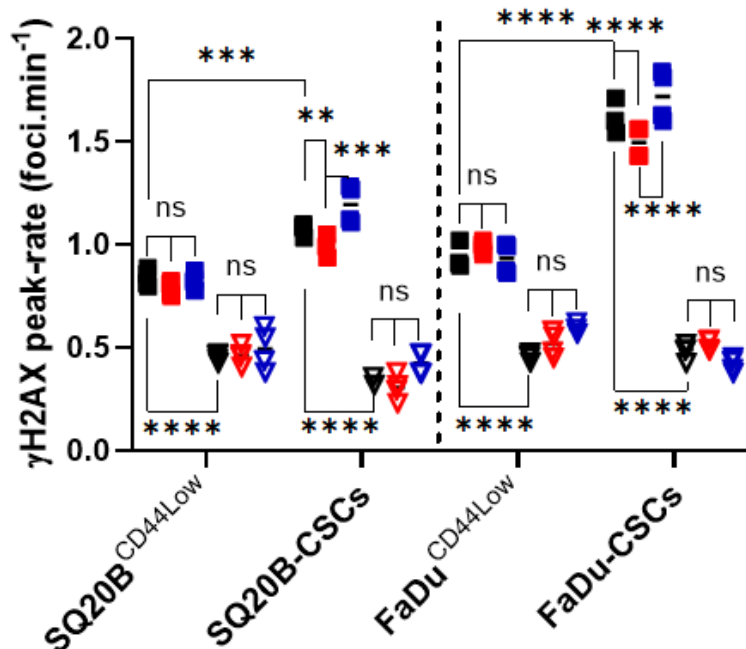




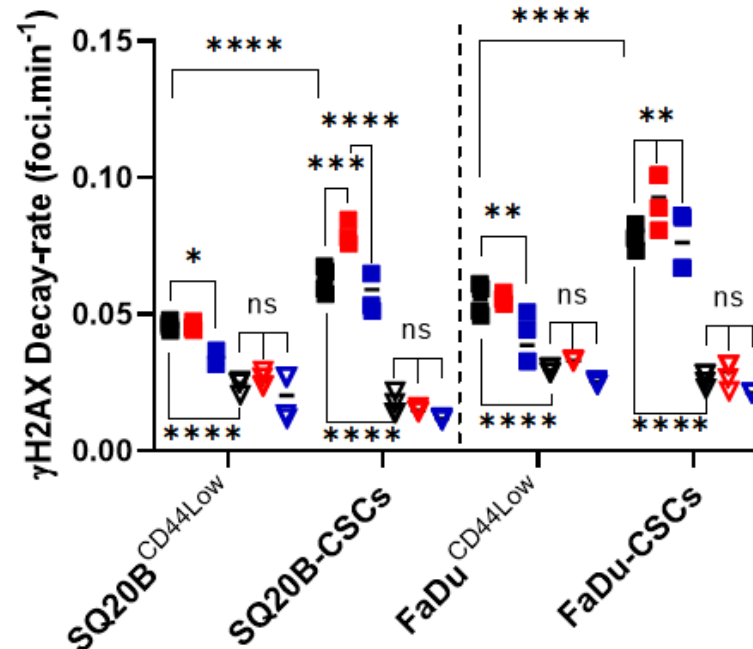
# Signalisation des CDBs



Induction du pic  $\gamma$ H2AX



Décroissance du pic  $\gamma$ H2AX

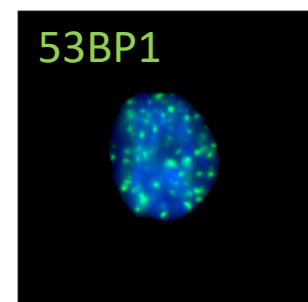


- X-Rays Normoxia
- X-Rays Hypoxia
- X-Rays Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$
- ▼ C-ions Normoxia
- ▼ C-ions Hypoxia
- ▼ C-ions Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$

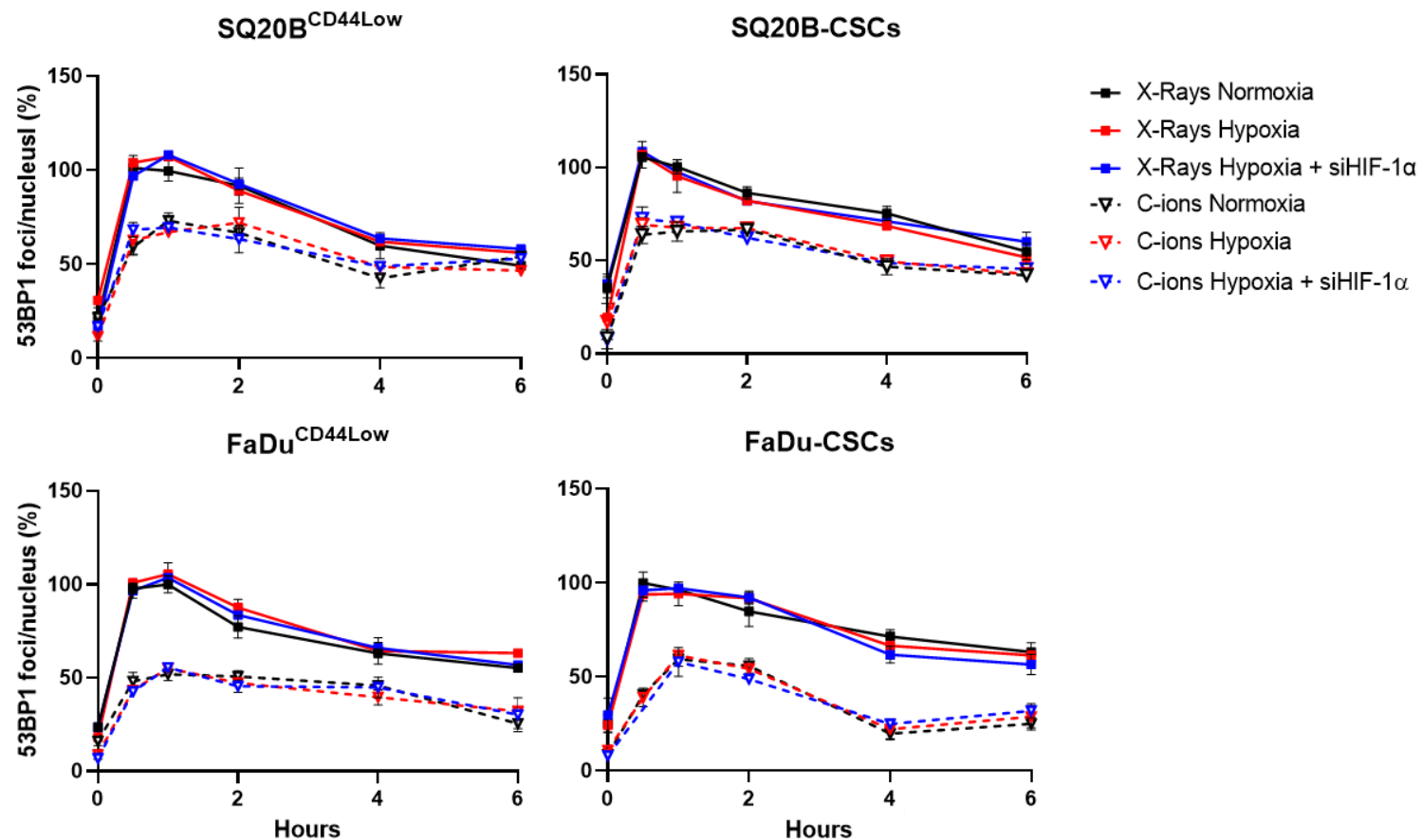
Two-way ANOVA test,  
 \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001,  
 \*\*\*\* p < 0.0001, ns: non-significant

□ **Hypoxie + IR:** ↗ des foci résiduels  $\gamma$ H2AX après inhibition d'HIF-1 $\alpha$

➔ Implication d'HIF-1 $\alpha$  dans la signalisation des CDBs (hypoxie + IR Photons et Ions C)



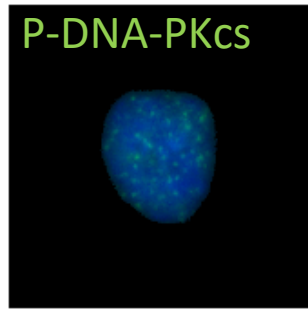
# Choix de la voie de réparation



→ Pas de modulation de 53BP1 par HIF-1α



# Voie de réparation NHEJ



## ❑ Études protéiques:

- ✓ Pas de modulation de DNA-PKcs
- ✓ Modulation de la phosphorylation de DNA-PKcs



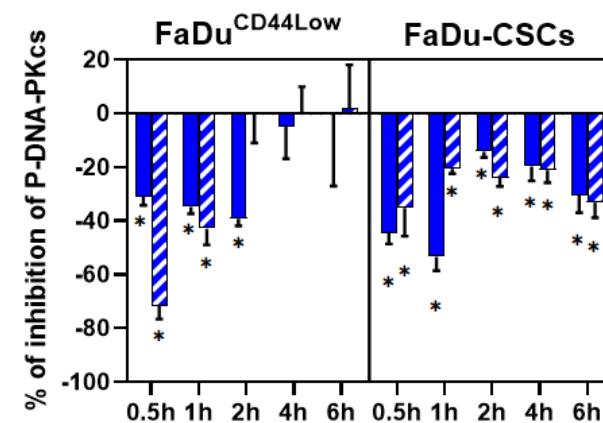
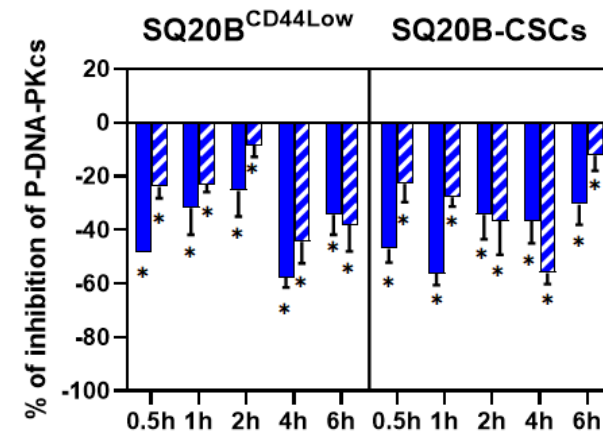
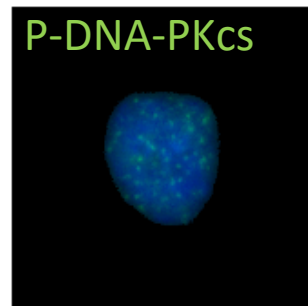
# Voie de réparation NHEJ

## □ Études protéiques:

- ✓ Pas de modulation de DNA-PKcs
- ✓ Modulation de la phosphorylation de DNA-PKcs

## □ Hypoxie + IR (IF):

- ✓ ↘ de P-DNA-PKcs après inhibition d'HIF-1 $\alpha$



■ X-Rays Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$   
▨ C-ions Hypoxia + siHIF-1 $\alpha$



# Voie de réparation NHEJ

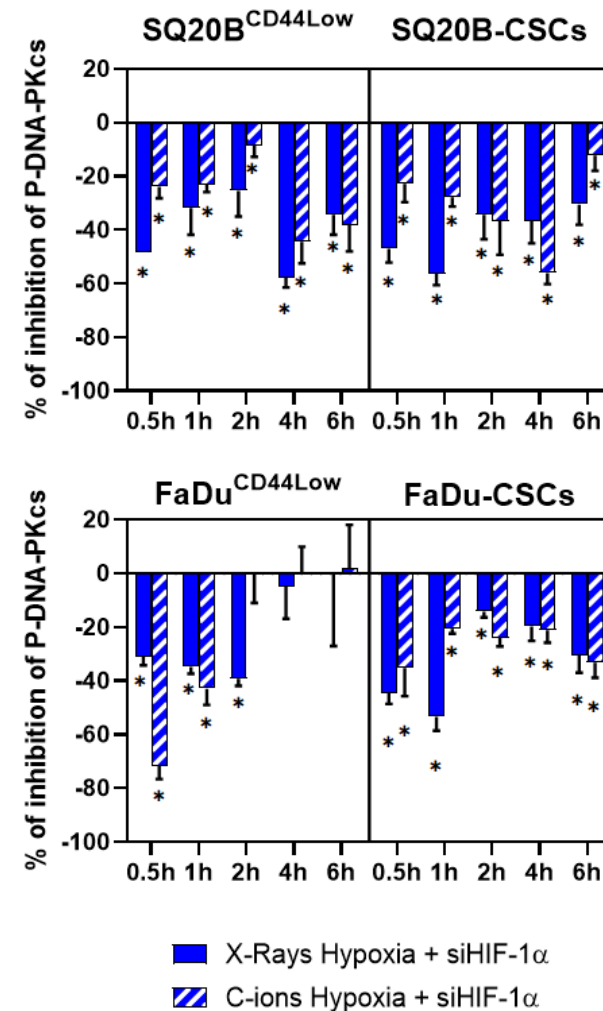
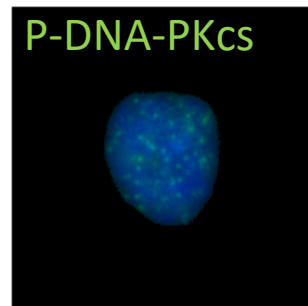
## □ Études protéiques:

- ✓ Pas de modulation de DNA-PKcs
- ✓ Modulation de la phosphorylation de DNA-PKcs

## □ Hypoxie + IR (IF):

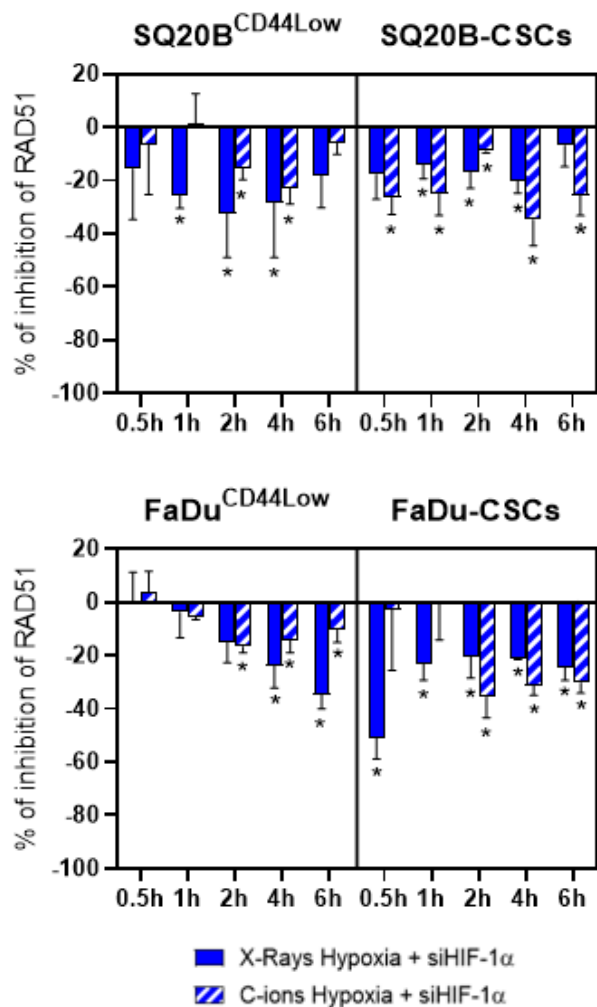
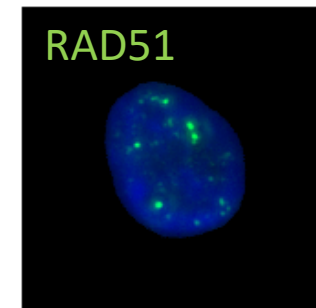
- ✓ ↘ de P-DNA-PKcs après inhibition d'HIF-1 $\alpha$

➔ Implication d'HIF-1 $\alpha$  dans la voie NHEJ  
(hypoxie + IR Photons et Ions C)





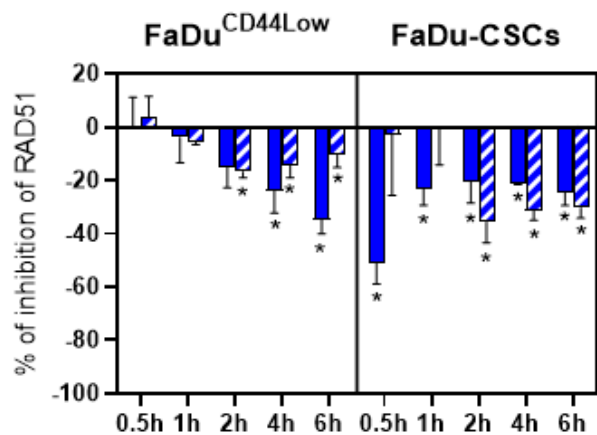
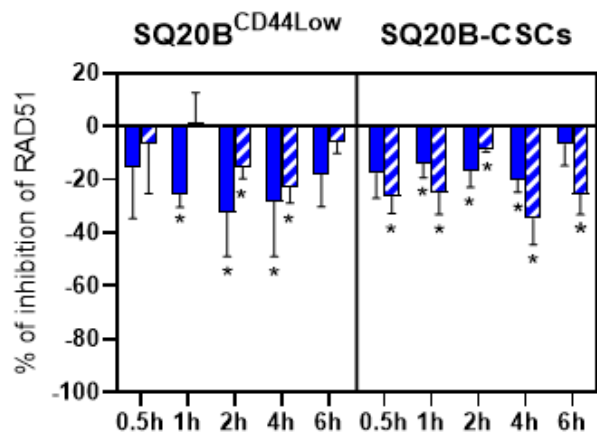
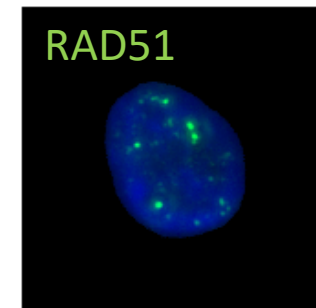
# Voie de réparation RH



□ Hypoxie + IR =  $\searrow$  RAD51 après inhibition d'HIF-1 $\alpha$



# Voie de réparation RH



■ X-Rays Hypoxia + siHIF-1α  
▨ C-ions Hypoxia + siHIF-1α

□ Hypoxie + IR =  $\searrow$  RAD51 après inhibition d'HIF-1 $\alpha$

→ Implication d'HIF-1 $\alpha$  dans la voie RH  
(hypoxie + IR Photons et par ions C)



# Conclusion

- ❑ Hypoxie → ↗ détection, signalisation et réparation des CDBs
- ❑ Inhibition d'HIF-1 $\alpha$  → ↘ détection, signalisation et réparation des CDBs
- ❑ Pas de modulation de 53BP1 par HIF-1 $\alpha$





# Conclusion

- ❑ Hypoxie → ↗ détection, signalisation et réparation des CDBs
- ❑ Inhibition d'HIF-1 $\alpha$  → ↘ détection, signalisation et réparation des CDBs
- ❑ Pas de modulation de 53BP1 par HIF-1 $\alpha$

**→ Implication d'HIF-1 $\alpha$  dans la réparation des CDBs**



# Conclusion

- ❑ Hypoxie → ↗ détection, signalisation et réparation des CDBs
- ❑ Inhibition d'HIF-1 $\alpha$  → ↘ détection, signalisation et réparation des CDBs
- ❑ Pas de modulation de 53BP1 par HIF-1 $\alpha$

## → Implication d'HIF-1 $\alpha$ dans la réparation des CDBs

- ❑ Inhibition d'HIF-1 $\alpha$  + IR = stratégies thérapeutiques?



# Remerciements

## UMR CNRS 5822

### LRCM : Pr C. Rodriguez-Lafrasse

- M-T Aloy
- G. Alphonse
- D. Ardail
- D. Averbeck
- A. Gauthier
- P. Lalle
- S. Louati
- N. Magné
- C. Malésys
- C. Perrin
- P. Philouze
- S. Sebaï
- V. Varoquier
- D. Vernos

### PHABIO: Pr M. Beuve

- E. Testa
- C. Monini



### Collaborations

- F. Chevalier (IRCM-DSV-CEA)
- T. Nakajima (NIRS)

### Financements

- Mobilité jeune chercheur Cancérôpole Auvergne Rhône Alpes
- Bourse Jean Walter Zellidja (Académie Française)
- Philip Foundation

