



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES INFORMATIQUES

Étude de la voie des Smads en sénescence induite par le TGF- β 1 ou par les UVB dans des fibroblastes de derme

Descamps, Estelle

Award date:
2016

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DE LA VOIE DES SMADS EN SENESCENCE INDUITE PAR LE TGF- β 1 OU
PAR LES UVB DANS DES FIBROBLASTES DE DERME**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Estelle DESCAMPS

Janvier 2016

Etude de la voie des Smads en sénescence induite par le TGF- β 1 ou par les UVB dans des fibroblastes de derme

DESCAMPS Estelle

Résumé

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié la sénescence cellulaire de fibroblastes humains de derme (HDFs) dans trois modèles *in vitro* : la sénescence répliquative (RS), la sénescence induite prématurément par le TGF- β 1 (SIPS-TGF- β 1) et la sénescence induite prématurément par les rayons UVB (SIPS-UVB).

Pour chaque modèle, nous avons validé l'induction de la sénescence par l'analyse de différents biomarqueurs : changements morphologiques, augmentation de l'activité SA- β gal, surexpression de gènes associés à la sénescence, absence de marqueurs prolifératifs et présence de marqueurs d'arrêt du cycle cellulaire.

Cependant, à l'heure actuelle, les voies de transduction du signal qui aboutissent à l'apparition de ces biomarqueurs sont encore mal connues et doivent être investiguées. Or, une des pistes proposées dans la littérature concerne le TGF- β 1. En effet, une implication du TGF- β 1 dans l'établissement de la sénescence a été suggérée dans différents modèles de SIPS. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons donc étudié l'activation de différentes voies dépendantes du TGF- β 1 dans les deux modèles de SIPS. Nous nous sommes d'abord intéressés à la voie des Smads, considérée comme la voie « canonique » du TGF- β 1. Nous avons ensuite étudié les MAPK p38 et ERK ainsi que la PI3K et Rac1, toutes ces protéines étant impliquées dans les voies « non-canoniques » de réponse au TGF- β 1.

Nous avons ainsi pu montrer une activation de la voie des Smads et de p38 au cours de la SIPS-TGF- β 1. A l'inverse, en SIPS-UVB, nous n'avons détecté aucune activation des Smads, ni de p38, ERK et Rac1, seule la voie PI3K/Akt semble être activée dans ce modèle.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je voudrais remercier Florence Debacq-Chainiaux de m'avoir accueillie dans son équipe, de m'avoir fait confiance et d'avoir attentivement supervisé mon travail tout au long de ces 10 mois de mémoire. Tu as toujours été très disponible et à l'écoute, tant pour les aspects scientifiques que personnels. Tes conseils avisés et ton souci du détail m'ont beaucoup appris.

Je voudrais également remercier Marie de m'avoir encadrée et formée. Au-delà des différentes techniques, tu m'as appris la rigueur, l'exactitude et le sens de l'organisation qu'exige la recherche. Tu as aussi toujours répondu présente pour mes questions et mes corrections avec une grande disponibilité. Ce mémoire n'aurait clairement pas été le même sans toi.

Un tout grand merci à François, Kathleen, Emilie, Rodolfo, Maude, Jérôme et Antoine pour leur bonne humeur et leur soutien, vos encouragements m'ont beaucoup touchée et m'ont permis de prendre davantage confiance en moi. Avec un peu de chance, j'aurai l'énorme plaisir de revenir travailler avec la plupart d'entre vous l'année prochaine et je m'en réjouis ! De manière plus générale, je remercie tous les techniciens pour leur aide précieuse et leur patience envers nous, les p'tites mémorantes qui avons toujours mille questions.

Je remercie également Lysianne, Julie, Lisa et Céline d'avoir fait de notre bureau un lieu de papotages entre filles, de grignotage intempestif mais aussi d'entraide et d'étude appliquée quand il le fallait (Ca y est les filles, on l'a fait !).

Merci du fond du cœur à Anaïs, Mathilde, Hélène et Maxime pour avoir partagé mes joies, mes peines, mes fous rires, mes doutes, mes réussites et mes échecs. Cette année n'a pas toujours été facile mais vous étiez présents à chaque instant, merci infiniment pour ça...

Pour terminer, *last but not least*, je remercie mille fois mes parents et mon frère d'avoir été à mes côtés depuis le « Quand je serai grande je serai chercheuse ! » jusqu'à maintenant. Merci de m'avoir toujours épaulée dans mes études, merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur en période de stress (faute avouée à moitié pardonnée), merci de m'avoir rappelé mes objectifs quand je les perdais de vue, merci de croire en moi depuis le début, merci !

...« *If your dreams don't scare you, they are not big enough.* »

ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
(6-4)PPs	Pyrimidine-(6-4)-pyrimidone photoproducts
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
AGAC	= SBE = Smad-binding element
Akt	Protein kinase B
AP-1	Activator protein 1
apoJ	Apolipoprotein J
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATF-2	Activating transcription factor 2
BME	Basal Medium Eagle
BMP	Bone morphogenic protein
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
CBP	CREB (cAMP response element-binding protein)-binding protein
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cm	Centimètre
CO ₂	Dioxyde de carbone
Co-Smad	Common Smad
CPDs	Cyclobutane-pyrimidine dimers
Ct	Cycle threshold
CTGF	Connective tissue growth factor
CTL	Condition contrôle
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR	DNA damage repair
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetal bovine serum
FOX	Forkhead box
g	Gramme
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDP	Guanosine diphosphate
GLB1	Galactosidase β1
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GROα	Growth-related oncogene α
GS	Domaine riche en glycines et sérines de TβRI
GTP	Guanosine triphosphate
h	Heure
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAT	Histone acetyl transferase
HB	Hypotonic buffer
HCl	Acide chlorhydrique
HDFs	Human dermal fibroblasts
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
IGFBP3	Insulin-like growth factor-binding protein 3
IGFBP5	Insulin-like growth factor-binding protein 5

IL1 β	Interleukin 1- β
IL1R	Interleukin 1- β receptor
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
I-Smad	Inhibitory Smad
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Chlorure de potassium
kDa	Kilodalton
L	Litre
LAP	Latency-associated protein
LLC	Large latent complex
LTBP	Latent TGF- β binding protein
M	Molaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	= MAPKK
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MH	MAD-homology
mJ/cm ²	Millijoule par centimètre carré
MKK	= MAPKK
MMP	Matrix metalloproteinase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Na ₂ MoO ₄	Molybdate de sodium
Na ₃ VO ₄	Sodium orthovanadate
NaCl	Chlorure de sodium
NaF	Fluorure de sodium
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NLS-like	Nuclear localisation-like sequence
nm	Nanomètre
NP-40	Nonidet P-40
OIS	Oncogene-induced senescence
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
P-ERK	Phospho-extracellular signal-regulated kinase
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PIB	Phosphatase inhibitor buffer
PIC	Protease inhibitor cocktail
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PNPP	P-nitrophenyl phosphate
P-p38	Phospho-p38
pRb	Retinoblastoma protein
P-Smad2	Phospho-Smad2
P-Smad3	Phospho-Smad3
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RE	Resuspension buffer
REc	Resuspension buffer (complete)

ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revolutions per minute
RS	Replicative senescence
R-Smad	Receptor-regulated Smad protein
RTK	Receptor tyrosine kinase
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SA- β gal	Senescence-associated β -galactosidase activity
SA	Salt buffer
SAc	Salt buffer (complete)
SAHF	Senescence-associated heterochromatin foci
SARA	Smad anchor for receptor activation
SASP	Senescence-associated secretory phenotype
SBE	Smad-binding element
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Shc	SH2 (Src homology 2) domain containing
shRNA	Short hairpin ribonucleic acid
SIPS	Stress-induced premature senescence
SLC	Small latent complex
Sos	Son of sevenless
SSXS	Motif sérine-sérine-X-sérine des Smads
T25	Flasque de 25 cm ²
T75	Flasque de 75 cm ²
T β R	TGF- β receptors
TAK1	TGF- β -activated kinase 1
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxide
TGF- β	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like receptor
TRAF6	TNF (tumor necrosis factor) receptor-associated factor 6
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane
UV	Rayons ultraviolets
UVA	Rayons ultraviolets de type A
UVB	Rayons ultraviolets de type B
UVC	Rayons ultraviolets de type C
V	Volt
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
I. Contexte général	2
II. Vieillessement de la peau	2
1. <i>Structure de la peau</i>	2
2. <i>Vieillessement intrinsèque</i>	4
3. <i>Vieillessement extrinsèque</i>	4
4. <i>Effets des rayons UV sur la peau</i>	4
III. Sénescence cellulaire	5
1. <i>Sénescence répllicative (RS)</i>	6
2. <i>Sénescence induite par les oncogènes (OIS)</i>	7
3. <i>Sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)</i>	7
4. <i>Biomarqueurs de la sénescence</i>	8
Morphologie	8
Arrêt du cycle cellulaire	8
Activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal)	8
Altération de l'expression génique	9
Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)	9
IV. Voies de signalisation impliquées dans l'apparition des biomarqueurs en SIPS	10
1. <i>Le TGF-β1 : généralités</i>	10
Structure et activation du TGF- β 1	10
Récepteurs du TGF- β 1	11
Fonctions biologiques	11
2. <i>TGF-β1 et Smads</i>	11
Les protéines Smads	11
La voie TGF- β 1/Smads	11
Régulation	12
3. <i>TGF-β1 et voies non-canoniques</i>	12
TGF- β 1 et MAPK	12
TGF- β 1 et voie PI3K/Akt	13
TGF- β 1 et Rac1	13
4. <i>Implications du TGF-β1 dans la SIPS</i>	13
V. Objectifs du mémoire	15
MATERIEL & METHODES	16
I. Culture cellulaire	17
1. <i>Matériel</i>	17
2. <i>Méthode</i>	17
II. Exposition aux UVB	17
1. <i>Matériel</i>	17
2. <i>Méthode</i>	17

III. Stimulation au TGF- β 1	18
1. <i>Matériel</i>	18
2. <i>Méthode</i>	18
IV. Détection de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal)	19
1. <i>Matériel</i>	19
2. <i>Méthode</i>	19
V. PCR semi-quantitative en temps réel	19
1. <i>Matériel</i>	20
2. <i>Méthode</i>	20
Extraction d'ARN	20
Rétro-transcription	20
PCR semi-quantitative en temps réel	21
VI. Western Blot	21
1. <i>Matériel</i>	21
2. <i>Méthode</i>	21
Extraction de protéines totales	21
Extraction de protéines nucléaires et cytoplasmiques	22
Dosage protéique	22
Electrophorèse	22
Transfert	22
Blocking et révélation	23
VII. Immunofluorescence	23
1. <i>Matériel</i>	23
2. <i>Méthode</i>	23
VIII. Analyse statistique	25
RESULTATS	26
I. Etude des biomarqueurs de sénescence en RS, SIPS-TGF- β 1 et SIPS-UVB	28
II. Etude de l'activation de la voie canonique du TGF- β 1	30
1. <i>Etude de la voie des Smads après une stimulation unique au TGF-β1</i>	30
2. <i>Etude de la voie des Smads en SIPS-TGF-β1</i>	31
3. <i>Etude de la voie des Smads en SIPS-UVB</i>	33
4. <i>Conclusion</i>	33
III. Etude de l'activation des voies non-canoniques du TGF- β 1	34
1. <i>Etude de l'activation de p38 et ERK en SIPS-TGF-β1</i>	34
2. <i>Etude de l'activation de p38 et ERK en SIPS-UVB</i>	35
3. <i>Etude de l'activation de la PI3K et de Rac1 en SIPS-UVB</i>	35
4. <i>Conclusion</i>	35
DISCUSSION & PERSPECTIVES	36
BIBLIOGRAPHIE	43

INTRODUCTION



Figure I.1 : Les caractéristiques du vieillissement

Neuf caractéristiques du vieillissement ont été proposées : instabilité génomique, raccourcissement des télomères, altérations épigénétiques, perte de la protéostasie, mauvaise perception des nutriments, dysfonctionnement mitochondrial, sénescence cellulaire, épuisement des cellules souches et altérations de la communication cellulaire [López-Otin *et al.*, 2013].

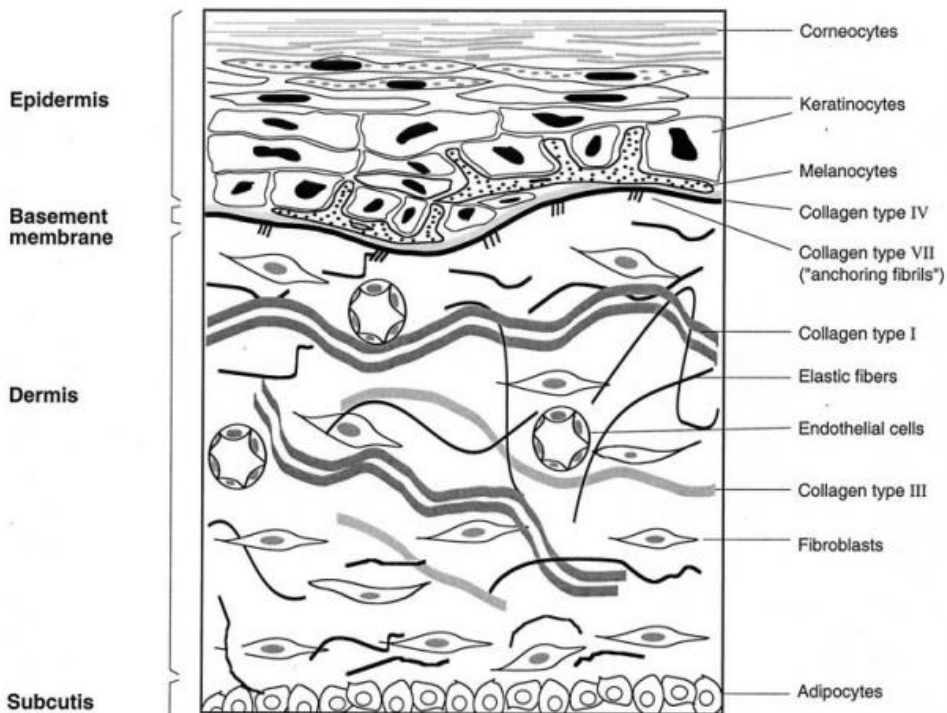


Figure I.2 : Représentation schématique de la structure de la peau
[Scharffetter-Kochanek *et al.*, 2000]

I. Contexte général

Deux milliards. C'est le nombre de personnes âgées de plus de 60 ans que comptera le monde d'ici 2050 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ce qui représentera 22% de la population mondiale¹ [OMS, 2015]. Ce chiffre impressionnant est le reflet du vieillissement de la population, phénomène mondial qui s'accroît d'année en année suite à l'allongement de l'espérance de vie et à la baisse du taux de fécondité. En Belgique, l'espérance de vie à la naissance en 2050 s'élèvera à 85 ans pour un garçon et 88 ans pour une fille, contre respectivement 75 ans et 81 ans en 2000² [Perspectives population 2014-2060, Bureau du Plan, Belgique, 2014]. Si ces chiffres traduisent d'importants progrès dans le domaine médical, le vieillissement de la population constitue néanmoins un énorme défi pour la société. En effet, il soulève de nombreuses problématiques : mise en place de soins de santé et de structures adaptés, définition de la place des seniors dans la société, lutte contre l'exclusion sociale et la maltraitance des personnes âgées, etc.

En particulier, le vieillissement entraîne un déclin fonctionnel progressif de l'organisme et est considéré comme le plus grand facteur de risque associé à de nombreuses pathologies, dégénératives ou hyperplasiques. En plus de présenter des affections telles que de la sarcopénie ou de l'ostéoporose, les seniors ont plus de risque de développer des cancers ou des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. Bien que des divergences de fond existent toujours sur la relation entre « vieillissement » et « pathologies » [Gems, 2015], il est évident que la compréhension des mécanismes biologiques de ce processus universel est d'importance cruciale pour une meilleure prise en charge de nos aînés.

Récemment, neuf caractéristiques du vieillissement ont été proposées [López-Otin *et al.*, 2013] (**Figure I.1**). Elles doivent répondre à trois critères : leur apparition doit être observée durant le vieillissement normal, leur amplification doit accélérer le vieillissement et leur atténuation doit le retarder. Ces caractéristiques sont les suivantes : instabilité génomique, raccourcissement des télomères, altérations épigénétiques, perte de la protéostasie, mauvaise perception des nutriments, dysfonctionnement mitochondrial, épuisement des cellules souches, altérations de la communication intercellulaire et sénescence cellulaire. Durant ce mémoire, nous nous sommes particulièrement intéressés à la sénescence cellulaire. Plus spécifiquement, nous avons centré nos travaux sur l'étude de la sénescence dans des fibroblastes de derme humain, celle-ci constituant un modèle de choix pour étudier le vieillissement cellulaire.

II. Vieillesse de la peau

1) Structure de la peau

La peau constitue une formidable barrière de protection de l'organisme face aux agressions extérieures (chimiques, physiques, microbiennes, etc). Elle possède également des fonctions sensorielle, sécrétrice et thermorégulatrice. Sa structure a été particulièrement bien décrite [Freinkel & Woodley, 2001³][Prost-Squarcioni, 2006]. Ainsi, la peau est subdivisée en 3 couches : l'épiderme, en contact direct avec l'extérieur, le derme, situé sous l'épiderme, et l'hypoderme, en contact avec les organes internes (**Figure I.2**).

¹ <http://www.who.int/ageing/about/facts/fr> (consulté le 12/09/2015)

² http://www.plan.be/databases/database_det.php?lang=fr&ID=35 (consulté le 12/09/2015)

³ Freinkel, R. & Woodley, T. (2001). *The biology of the skin*. The Parthenon Publishing Group.

- INTRODUCTION -

L'épiderme est un épithélium de revêtement pavimenteux stratifié kératinisé, qui assure le rôle de barrière. Il est constitué de 4 types cellulaires : les kératinocytes (qui représentent à eux seuls 80% des cellules de l'épiderme), les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Les kératinocytes se différencient en migrant du bas vers la surface de l'épiderme, un processus nommé kératinisation. Ainsi, 4 couches successives de kératinocytes peuvent être distinguées de bas en haut : la couche basale (responsable de la régénération de l'épiderme), la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. La différenciation des kératinocytes aboutit à la pycnose et à l'élimination de leur noyau, ce qui entraîne la desquamation de kératinocytes morts dans les couches les plus superficielles de l'épiderme. Si cette desquamation se déroule lentement ou rapidement, la couche cornée sera épaisse (épiderme de type A) ou fine (épiderme de type B). Les mélanocytes, dont les prolongements se fauillent entre les kératinocytes, produisent des organites spécialisés dans la synthèse de mélanine, les mélanosomes. Ces mélanosomes sont ensuite sécrétés et endocytés par les kératinocytes. Notons qu'il existe deux types de mélanine : l'eumélanine (qui assure une protection contre les rayonnements ultraviolets) et la phaémélanine. Les cellules de Langerhans sont impliquées dans l'immunité. Leur rôle est de capturer des antigènes dans l'épiderme puis de migrer dans les ganglions lymphatiques afin de les présenter aux lymphocytes T par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Enfin les cellules de Merkel, en très petit nombre, sont associées au tissu nerveux et servent de mécanorécepteurs.

Le derme assure la triple fonction commune aux tissus conjonctifs : il soutient l'épiderme, permet la nutrition du tissu grâce à sa vascularisation et participe à la défense immunitaire de la peau par l'intermédiaire des cellules qui y séjournent ou y transitent. Il est séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique et est subdivisé en deux parties : le derme papillaire (tissu conjonctif lâche) et le derme réticulaire (tissu conjonctif dense). Le type cellulaire majoritaire du derme est le fibroblaste mais le derme accueille aussi des cellules mobiles telles que des macrophages, des plasmocytes, voire des polymorphonucléaires neutrophiles ou éosinophiles, des lymphocytes, etc. Les fibroblastes sont responsables de la sécrétion de la matrice extracellulaire (MEC). Celle-ci est composée de substance fondamentale (glycoaminoglycanes liés à des protéoglycanes, en particulier l'acide hyaluronique), de glycoprotéines de structure et d'adhésion (fibronectine, laminines, etc) et de fibres (fibres de collagène et fibres élastiques).

L'hypoderme se situe dans la continuité du derme et est en contact avec l'aponévrose des muscles. Il est constitué d'adipocytes regroupés en lobules graisseux séparés par des septa fibreux.

La peau est un modèle de choix pour l'étude du vieillissement car elle est soumise à des facteurs à la fois internes et externes qui entraînent respectivement un vieillissement intrinsèque (déterminé génétiquement) et extrinsèque (résultant de l'influence de facteurs environnementaux). En dépit de leurs différences notamment sur le plan histologique, ces deux types de vieillissement impliquent des mécanismes moléculaires communs [Rittié and Fisher, 2002 ; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2012 ; Kammeyer and Luiten, 2015].

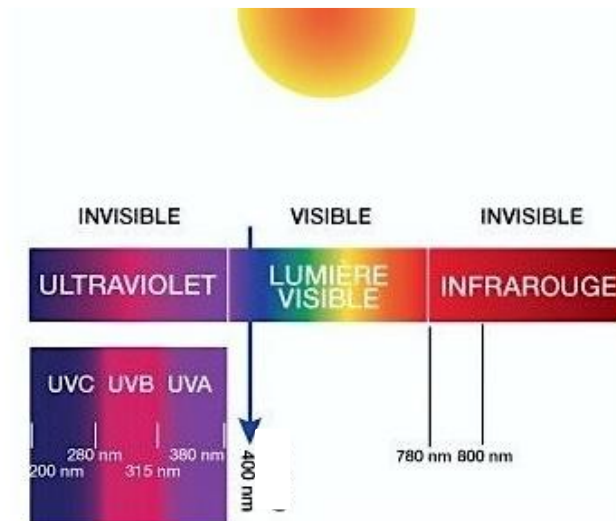


Figure I.3 : Le spectre solaire

Le spectre solaire regroupe 3 types de rayonnement : les rayons ultraviolets (eux-mêmes subdivisés en UVA, UVB et UVC), la lumière visible et les rayons infrarouges (<http://www.guide-vue.fr/glossaire/coupure-uv>, consulté le 15/10/2015).

2) Vieillessement intrinsèque

Le vieillissement intrinsèque est déterminé génétiquement et se déroule donc dans tous les organes. Sur les parties du corps non-exposées au soleil d'un individu âgé, la peau est fine et sèche avec quelques rides peu marquées. Histologiquement parlant, l'épaisseur de l'épiderme et du derme diminue, les quantités de collagène interstitiel et d'élastine sont réduites par rapport aux individus jeunes [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2012]. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) sont considérées comme la principale cause du vieillissement intrinsèque de la peau, en plus de la capacité proliférative diminuée des cellules et de l'augmentation de la dégradation de la MEC par les métalloprotéinases matricielles (MMPs, matrix metalloproteinases) [Kammeyer and Luiten, 2015].

3) Vieillessement extrinsèque

Le vieillissement extrinsèque se superpose au vieillissement intrinsèque, il est causé par des facteurs environnementaux tels que les rayonnements ultraviolets (UV), le tabagisme, la pollution ambiante, etc. L'exposition aux UV constitue le principal déterminant du vieillissement extrinsèque de la peau, ce phénomène porte d'ailleurs le nom de « photovieillessement ». Sa sévérité dépend de l'exposition au soleil (durée, fréquence et intensité du rayonnement) mais aussi du type de peau (une pigmentation foncée offre une meilleure protection qu'une pigmentation claire) [Kammeyer and Luiten, 2015]. Une peau fortement exposée au soleil présente typiquement un aspect de cuir, des rides marquées, une pigmentation irrégulière (apparition de tâches), etc. Ces manifestations sont dues à l'augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et du derme et à la profonde désorganisation de la MEC au niveau du derme [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2012]. Lors de ce mémoire, nous avons particulièrement étudié le photovieillessement dû aux rayons UV de type B dans des fibroblastes de derme.

4) Effets des rayons UV sur la peau

Le spectre solaire comprend 3 types de rayonnements électromagnétiques : les ultraviolets, la lumière visible et les infrarouges (**Figure I.3**). Parmi eux, les UV sont les plus énergétiques (et donc les plus nuisibles pour la santé) car ils possèdent la longueur d'onde la plus courte.

Les rayons UV sont classés selon leur longueur d'onde en UVA (315-380 nm), UVB (280-315 nm) et UVC (200-280 nm). A l'inverse des UVA et des UVB qui peuvent respectivement pénétrer jusque dans le derme inférieur et supérieur, les UVC n'atteignent en pratique pas la peau car ils sont arrêtés au niveau de la couche d'ozone [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2012]. La majorité des études portant sur le photovieillessement a évalué le rôle des UVB dans ce phénomène. En effet, à dose égale, les UVB sont plus nocifs pour la peau que les UVA, car ils peuvent provoquer des dommages directs aux cellules en plus des dommages indirects induits par la production de ROS commune aux UVA et aux UVB. Cependant, l'impact des rayons UVA n'est pas à négliger, d'autant que la peau y est davantage exposée [Kammeyer and Luiten, 2015].

Les UVB provoquent des dommages à la fois directs et indirects au niveau de l'ADN, de l'ARN et des protéines, ce qui explique leur dangerosité.

Les photons des rayons UVB peuvent être directement absorbés par les bases pyrimidiques de l'ADN (thymine et cytosine), ce qui entraîne la formation de liens covalents entre pyrimidines

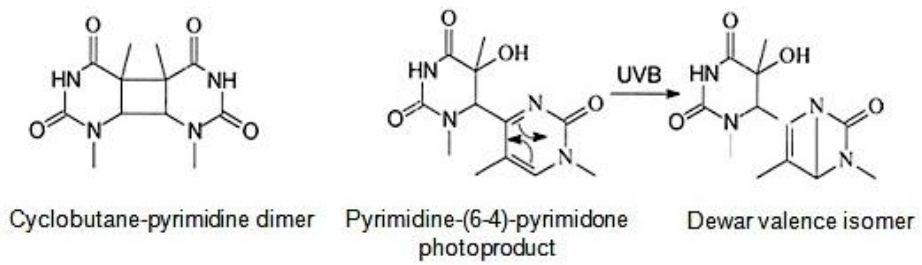


Figure I.4 : Lésions directes induites à l'ADN par les UVB

Lorsque les rayons UVB transmettent directement leur énergie aux bases pyrimidiques de l'ADN, trois types de photoproduits peuvent apparaître : les CPDs (cyclobutane-pyrimidine dimers), les (6-4)PPs (pyrimidine-(6-4)-pyrimidone photoproducts) et les isomères de valence de Dewar (forme stabilisée des (6-4)PPs) [Ravanat *et al.*, 2001].

voisines. Trois types de lésions apparaissent alors : les CPDs (cyclobutane-pyrimidine dimers), les (6-4)PPs (pyrimidine-(6-4)-pyrimidone photoproducts) et les isomères de valence de Dewar (forme stabilisée des (6-4)PPs) [Ravanat *et al.*, 2001] (**Figure I.4**). Si elles ne sont pas réparées et selon leur localisation, ces lésions peuvent soit empêcher la transcription et la réplication, ce qui conduit finalement à la sénescence ou à l'apoptose, soit au contraire stimuler la prolifération cellulaire et ainsi favoriser le développement de tumeurs. Notons que les bases puriques (adénine et guanine) peuvent aussi être touchées mais dans une moindre mesure. Les UVB peuvent aussi être absorbés par l'ARN ou les protéines, ce qui conduit *in fine* à la formation de protéines dysfonctionnelles.

Les rayons UVB peuvent également causer des dommages de manière indirecte. En effet, les UVB peuvent interagir avec des molécules photosensibles présentes dans les cellules. Les réactions de photosensibilisation de type I entraînent l'excitation de la molécule photosensible qui réagit alors directement avec une autre biomolécule. Dans les réactions de type II, la molécule excitée interagit avec l'oxygène, ce qui conduit à la formation de ROS qui peuvent endommager les macromolécules, en particulier l'ADN. Cette production massive de ROS est commune au vieillissement intrinsèque et extrinsèque [Rittié and Fisher, 2002]. Or, un des effets de l'élévation du niveau de ROS et des UV eux-mêmes est d'activer les voies des MAPK (mitogen-activated protein kinases), ce qui mène à l'activation du facteur de transcription AP-1 (activator protein-1). Celui-ci entraîne la transcription des gènes codant pour des métalloprotéinases matricielles (MMP1, MMP3 et MMP9) qui dégradent notamment le collagène du derme. Cette cascade montre un des impacts des UV sur le vieillissement de la peau et est aussi observée lors du vieillissement intrinsèque [Rittié and Fisher, 2002 ; Yaar and Gilchrist, 2007 ; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2012 ; Kammeyer and Luiten, 2015]. Ceci suggère effectivement que les vieillissements intrinsèque et extrinsèque sont médiés par des mécanismes moléculaires communs.

III. Sénescence cellulaire

Le concept de « sénescence cellulaire » voit le jour il y a 50 ans grâce aux travaux de Léonard Hayflick sur la culture de fibroblastes humains [Hayflick and Moorhead, 1961]. En effet, celui-ci observe que des cellules normales cessent définitivement de proliférer après un grand nombre de passages en culture (plus tard nommé « limite de Hayflick »), tout en restant viables et métaboliquement actives. Depuis cette découverte, plusieurs causes de sénescence ont été identifiées, donnant lieu à trois types de sénescence : la sénescence répllicative (RS, replicative senescence), la sénescence induite par les oncogènes (OIS, oncogene-induced senescence) et la sénescence induite prématurément par les stress (SIPS, stress-induced premature senescence).

Lors de cette découverte, Hayflick avait déjà suspecté une relation entre sénescence et vieillissement, le déclin fonctionnel des cellules semblant récapituler celui observé au niveau de l'organisme entier. Au cours des décennies suivantes, différentes études ont conforté cette hypothèse en démontrant une plus forte proportion de cellules sénescents dans les tissus provenant d'individus âgés par rapport à ceux issus d'individus jeunes, de même que dans des sites pathologiques associés aux maladies liées à l'âge comme l'athérosclérose [Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007]. Cependant, si les cellules sénescents semblent effectivement se trouver à l'endroit adéquat au moment adéquat, le lien causal entre sénescence et vieillissement a longtemps été difficile à confirmer. La preuve de cette relation a finalement été apportée grâce à un modèle murin de vieillissement prématuré dans lequel l'élimination sélective des cellules sénescents permet de retarder, voire de prévenir, l'apparition de divers

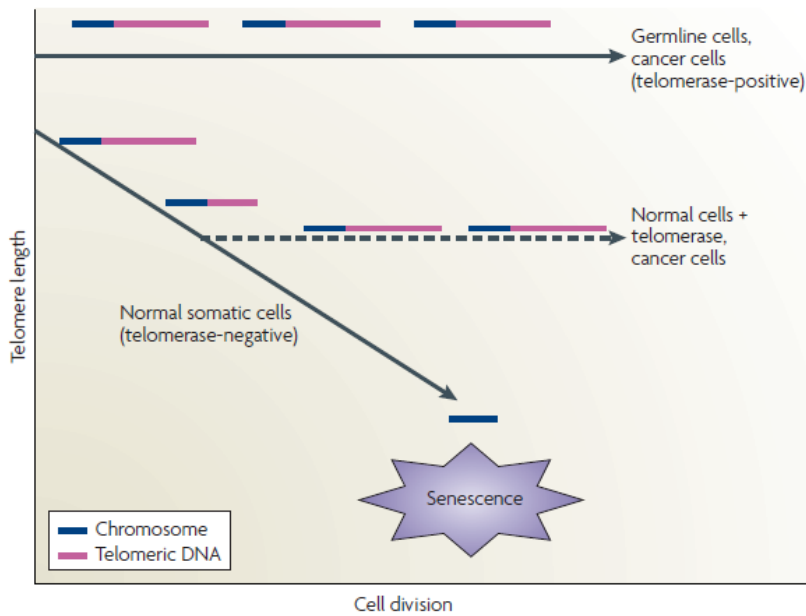


Figure I.5 : Sénescence répliquative et raccourcissement des télomères

La sénescence répliquative est due au raccourcissement télomérique au fil des divisions cellulaires. Cependant, la longueur des télomères peut être restaurée grâce à l'action d'une enzyme spécialisée, la télomérase. Cette enzyme n'est pas présente dans les cellules humaines, à l'exception des cellules de la lignée germinale et des cellules cancéreuses. L'expression ectopique de la télomérase dans des cellules somatiques normales leur permet d'échapper à la sénescence répliquative [Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007].

désordres liés à l'âge chez la souris (sarcopénie, perte de la masse grasseuse, etc) [Baker *et al.*, 2011]. Les mécanismes par lesquels la sénescence contribue au vieillissement de l'organisme sont encore peu connus. Néanmoins, deux pistes sont évoquées : d'une part, la sénescence pourrait toucher les cellules souches, ce qui diminuerait la capacité régénérative des tissus, et d'autre part, certains facteurs sécrétés par les cellules sénescents pourraient perturber l'homéostasie tissulaire (Voir III.4, SASP) [Muñoz-Espín and Serrano, 2014].

Un autre aspect intéressant de la sénescence est sa puissance en tant que mécanisme suppresseur de tumeur, comme l'avait également supposé Hayflick il y a 50 ans. En effet, l'arrêt irréversible du cycle cellulaire présenté par les cellules sénescents est une solide barrière au développement des cancers, basé sur la prolifération excessive de cellules endommagées. Divers modèles de souris au phénotype pro-cancéreux présentent ainsi des cellules cancéreuses exprimant des biomarqueurs de sénescence au niveau des lésions précancéreuses mais ce phénomène n'est pas retrouvé dans les tumeurs malignes, ce qui suggère que la sénescence entrave bien la progression tumorale mais ne constitue cependant pas une barrière insurmontable pour la tumorigenèse [Collado *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2005 ; Campisi, 2005].

Néanmoins, de manière paradoxale, il semble que les cellules sénescents puissent également promouvoir le développement des cancers. En effet, certains facteurs sécrétés par les cellules sénescents (voir III.4, SASP) stimulent la croissance tumorale en créant un microenvironnement permissif, en stimulant l'angiogenèse ou encore en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse [Rodier and Campisi, 2011]. Que la sénescence puisse avoir des effets aussi opposés peut s'expliquer par la théorie de la pléiotropie antagoniste. Celle-ci affirme qu'un processus sélectionné évolutivement parce qu'il est bénéfique aux individus jeunes peut s'avérer avoir des conséquences nuisibles lorsque ces individus vieillissent [Campisi, 2013]. En outre, de manière plus générale, la sénescence est un phénomène complexe dont les effets dépendent du contexte.

1) Sénescence répllicative (RS)

La sénescence répllicative (RS) est le premier type de sénescence à avoir été identifié. Ainsi, Léonard Hayflick observa pour la première fois la capacité de prolifération limitée des fibroblastes cultivés *in vitro* et établit 3 phases successives à la culture cellulaire : la phase I constituant la mise en culture, la phase II, une période de prolifération intense des cellules et enfin, la phase III caractérisée par un ralentissement marqué de l'activité mitotique, une accumulation de débris cellulaires et se terminant par la dégénération complète de la culture [Hayflick and Moorhead, 1961 ; Hayflick, 1965].

A l'heure actuelle, nous connaissons le mécanisme responsable de l'apparition de la RS : il s'agit du raccourcissement télomérique [Campisi, 2013] (**Figure I.5**). Les télomères sont des structures situées à l'extrémité des chromosomes et constituées de séquences d'ADN répétées associées à des protéines. Leur rôle est de protéger l'ADN de la dégradation et d'empêcher la survenue de fusions interchromosomiques sous l'action des mécanismes de réparation de l'ADN. Cependant, étant donné que l'ADN polymérase est unidirectionnelle et qu'elle a besoin d'une amorce pour fonctionner, les extrémités des chromosomes ne peuvent pas être répliquées entièrement et la longueur des télomères diminue donc à chaque nouvelle réplication. Lorsqu'un télomère devient trop court pour continuer à assurer sa fonction correctement, il est reconnu comme un dommage à l'ADN et active alors la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR, DNA damage repair), qui elle-même aboutit à l'activation de

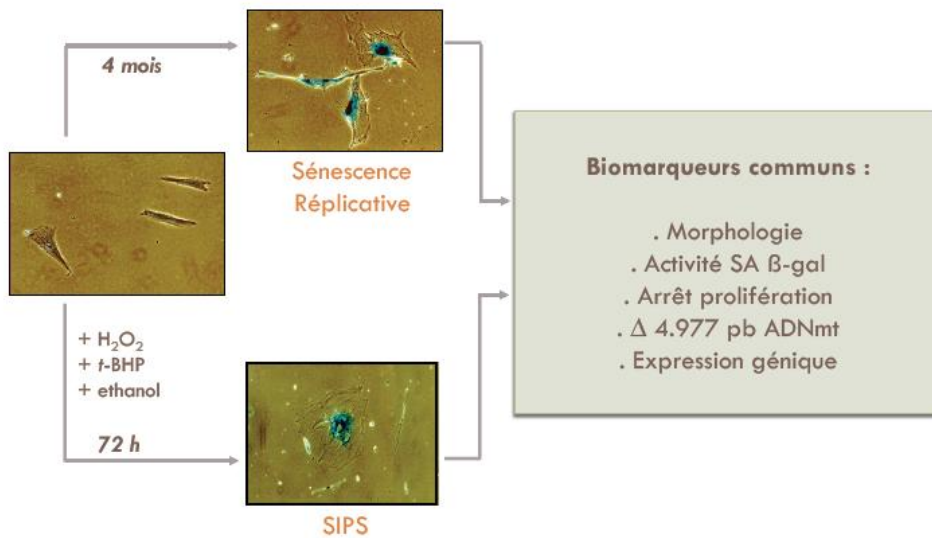


Figure I.6 : Comparaison entre la sénescence réplivative (RS) et la sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)

Obtention de biomarqueurs de sénescence communs entre des cellules en sénescence réplivative ou en sénescence induite prématurément par différents agents stressants (H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène, *t*-BHP : *tert*-butylhydroperoxyde, ou éthanol). Ceci a été montré pour différents types cellulaires [d'après Toussaint *et al.*, 2000].

p53 pour arrêter le cycle cellulaire. En l'absence de réparation, la DDR persiste et résulte *in fine* en l'arrêt permanent du cycle cellulaire. Ce raccourcissement télomérique progressif peut être contré par l'action de la télomérase, une enzyme capable de répliquer les extrémités des chromosomes [López-Otin *et al.*, 2013]. Cependant, la télomérase n'est presque pas exprimée dans les cellules humaines (uniquement au niveau de la lignée germinale et dans de nombreuses cellules cancéreuses), au contraire des cellules murines qui l'expriment généralement. Notons que l'expression de la télomérase protège les cellules de la sénescence répllicative mais non des autres types de sénescence n'impliquant pas l'attrition des télomères [Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007].

2) Sénescence induite par les oncogènes (OIS)

La sénescence peut aussi être causée par l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, un processus nommé OIS. L'OIS a été observée pour la première fois en faisant exprimer à des fibroblastes normaux une forme mutée oncogénique de Ras (H-RasV12), ce qui a abouti à leur entrée en sénescence [Campisi, 2013]. Étonnamment, les cellules en OIS présentent aussi une DDR persistante, probablement due à des dommages à l'ADN causés par une répllication aberrante [Salama *et al.*, 2014]. L'existence de l'OIS a été montrée *in vivo* où elle jouerait un rôle majeur dans la protection contre la tumorigenèse, en bloquant la division des cellules exposées à des signaux prolifératifs excessifs [Muñoz-Espín and Serrano, 2014].

3) Sénescence induite prématurément par les stress (SIPS)

La sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) résulte de l'exposition de cellules à des doses sublétales d'agents induisant un stress cellulaire, en particulier un stress oxydatif et/ou endommageant l'ADN. Après quelques jours de récupération, les cellules exhibent alors certains biomarqueurs communs aux cellules en sénescence répllicative : morphologie typique, arrêt du cycle cellulaire, expression génique altérée, etc (voir III.4) (**Figure I.6**). Différents protocoles ont été mis au point, sur différents types cellulaires (fibroblastes, kératinocytes, mélanocytes, etc) à l'aide de différents agents stressants (hyperoxie prolongée, *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), rayons UV, H₂O₂, éthanol, etc) et leur efficacité à induire la SIPS a été évaluée par l'analyse de différents biomarqueurs de la sénescence [Toussaint *et al.*, 2000].

Durant ce mémoire, nous avons notamment utilisé un modèle de SIPS-UVB développé au laboratoire [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005]. Ce modèle consiste à exposer des fibroblastes de derme (HDFs, human dermal fibroblasts) à une dose subcytotoxique de rayons UVB (250 mJ/cm²), à raison de 2 expositions par jour pendant 5 jours consécutifs. Cette exposition résulte en l'apparition de plusieurs biomarqueurs de la sénescence (voir III.4) : morphologie altérée, arrêt prolifératif, activité β -galactosidase associée à la sénescence, expression génique caractéristique, etc. Ce modèle permet d'étudier de façon simplifiée le photovieillissement du derme. Notons que l'induction de la sénescence par l'exposition chronique aux UVB ne semble pas dépendre du raccourcissement des télomères [de Magalhães *et al.*, 2002]. Il semblerait cependant que l'induction d'une DDR au niveau de ces structures (causée soit par un raccourcissement, soit par des dommages) soit nécessaire pour l'entrée en sénescence des cellules, en RS comme en SIPS [Yaar and Gilchrest, 2007 ; Sikora, 2013].

Nous avons aussi utilisé un deuxième modèle de SIPS qui consiste à stimuler des fibroblastes de derme avec du TGF- β 1, de façon chronique (voir IV.4). Cette procédure entraîne

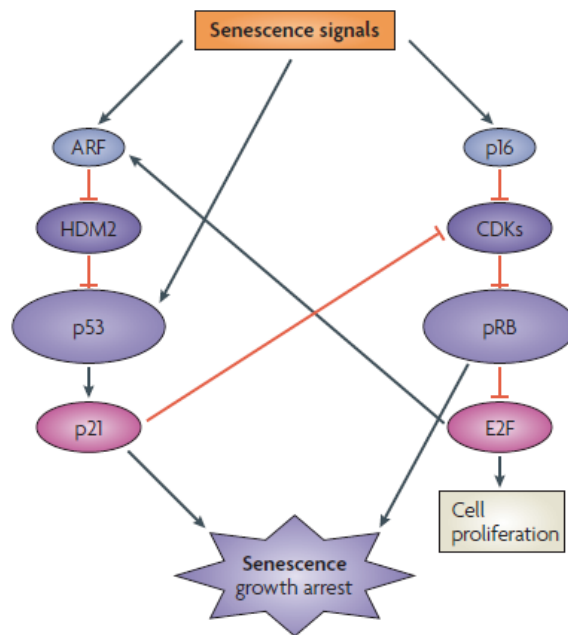


Figure I.7 : Arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence

L'arrêt irréversible du cycle cellulaire dans les cellules sénescents est médié par deux grandes voies de signalisation. La voie p53/p21 aboutit à la transcription de p21 qui agit en inhibant le complexe cycline E-CDK2. La voie p16/pRB aboutit à l'inhibition du complexe cycline D-CDK4/6 par p16. Dans les deux voies, l'inhibition de ces complexes cyclines-CDK résulte en l'hypophosphorylation de pRB qui séquestre alors le facteur de transcription E2F, responsable de la transcription de gènes nécessaires à l'entrée en phase S du cycle cellulaire [Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007].

également l'apparition de certains biomarqueurs de sénescence [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005].

4) Biomarqueurs de la sénescence

Différents biomarqueurs caractérisent les cellules sénescents *in vitro* et *in vivo*. Cependant, certaines limitations sont à relever (non-spécificité à la sénescence, manque de confirmation *in vivo*, etc) d'où la nécessité d'utiliser plusieurs marqueurs indépendants [Sikora *et al.*, 2011].

Nous présentons ici quelques exemples non-exhaustifs de biomarqueurs utilisés.

Morphologie

Au départ fusiformes, les fibroblastes changent de forme au cours de la sénescence en adoptant une morphologie plus large et plus aplatie que l'on peut classifier en 7 morphotypes successifs [Bayreuther *et al.*, 1988]. Des modifications du cytosquelette sont aussi observées, en particulier au niveau de l'actine [Hwang *et al.*, 2009]. Ces changements morphologiques (augmentation de taille) ont aussi été mis en évidence dans d'autres types cellulaires.

Arrêt du cycle cellulaire

Les cellules sénescents présentent, par définition, un arrêt du cycle cellulaire, en général en phase G1. Contrairement à la quiescence, cet arrêt est considéré comme irréversible étant donné qu'aucun stimulus physiologique connu n'est capable de faire proliférer les cellules à nouveau. Dès lors, l'absence de marqueurs prolifératifs tels que les protéines Ki67 et PCNA ou la non-incorporation de 5-bromodéoxyuridine (BrdU) sont des conditions nécessaires (mais non suffisantes) à observer pour déterminer si une cellule est sénescence ou non.

L'établissement et le maintien de cet arrêt prolifératif sont médiés par deux voies de signalisation : la voie p53/p21 et la voie p16/pRb (**Figure I.7**). p16 (aussi appelé INK4a ou CDKN2A) et p21 (aussi appelé WAF1 ou CDKN1A) sont tous deux des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDKI, cyclin-dependent kinase inhibitor) et permettent donc de réguler la progression dans le cycle cellulaire. En effet, lorsque la protéine p53 est activée, elle provoque la transcription de p21 qui inhibe le complexe cycline E-CDK2. Cet événement résulte en l'hypophosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb) qui séquestre le facteur de transcription E2F, dont le rôle est de favoriser l'expression de gènes permettant le passage en phase S du cycle cellulaire. Le même résultat est obtenu par l'activation de p16 qui inhibe le complexe cycline D-CDK4/6. Notons que ces deux voies ne semblent toutefois pas exactement équivalentes et que selon le contexte, la cellule activera tantôt l'une, tantôt l'autre, voire les deux voies [Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007].

Activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal)

L'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal, senescence-associated β -galactosidase activity) est le premier biomarqueur à avoir prouvé l'existence des cellules sénescents *in vivo* et leur accumulation dans la peau avec l'âge [Dimri *et al.*, 1995]. L'analyse de cellules issues de patients atteints de GM1-gangliosidose ainsi que l'utilisation de la technologie shRNA ont permis de démontrer que la SA- β gal est encodée par le gène *GLB1* [Lee *et al.*, 2006]. Ce gène code pour la β -galactosidase, une enzyme lysosomale qui clive les β -galactosides en monosaccharides et dont l'activité est détectée à pH 4,0. Lors de la

sénescence, les lysosomes augmentent en taille et en nombre, le gène *GLB1* est surexprimé et le niveau protéique de β -galactosidase est plus élevé. La combinaison de ces éléments permet de détecter l'activité β -galactosidase à un pH suboptimal de 6,0, ce qui correspond alors à l'activité β -galactosidase associée à la sénescence.

Depuis sa découverte, l'activité SA- β gal est un des biomarqueurs de sénescence les plus utilisés. Cependant, ce marqueur présente quelques défauts. D'une part, l'activité SA- β gal n'est pas nécessaire au développement de la sénescence et d'autre part elle peut être mise en évidence dans différentes situations indépendantes de la sénescence (contenu lysosomal augmenté, inhibition de contact prolongée, etc) [Lee *et al.*, 2006 ; Sikora *et al.*, 2011].

Altération de l'expression génique

Les cellules sénescents présentent d'importants changements au niveau de l'expression génique. Un bon nombre de ces modifications touche des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, les inhibiteurs de CDK p16 et p21 voient l'expression de leurs gènes (respectivement *CDKN2A* et *CDKN1A*) augmenter, à l'inverse de protéines liées à l'activation du cycle cellulaire comme les *cyclines A* et *B* ou *PCNA* dont l'expression est diminuée [Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007]. Cette sous-expression de gènes pro-prolifératifs peut s'expliquer à la fois par la séquestration du facteur de transcription E2F par pRb et d'autre part par une condensation de la chromatine à ces loci, donnant naissance à des structures nommées SAHF (senescence-associated heterochromatin foci). La formation des SAHF dépend de la voie p16/pRb tandis qu'ils semblent se maintenir seuls une fois créés, ce qui laisse penser que les SAHF jouent un rôle dans l'irréversibilité de la sénescence cellulaire [Tigges *et al.*, 2014 ; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007]. Une surexpression au niveau des gènes codant pour l'*apolipoprotéine J* (*apoJ*), la *fibronectine*, l'*ostéonectine* et le *facteur de croissance du tissu conjonctif* (*CTGF*) est aussi observée [Gonos *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2004] ainsi qu'au niveau de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans le SASP (voir III.4, SASP) [Lackner *et al.*, 2014].

Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)

Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP, senescence-associated secretory phenotype) est probablement une des caractéristiques les plus intéressantes des cellules sénescents permettant d'expliquer en partie leur impact sur leur environnement cellulaire et matriciel. Il consiste en la sécrétion d'une vaste gamme de protéines incluant des cytokines, des chémokines, des facteurs de croissance ou encore des protéases, donnant lieu à de multiples effets autocrines et paracrines. Selon le contexte, ces effets peuvent être bénéfiques ou nuisibles [Campisi *et al.*, 2011]. Par exemple, le SASP permet aux cellules sénescents de communiquer leur état aux cellules voisines, de favoriser leur propre élimination par le système immunitaire et de stimuler la réparation et la régénération tissulaires. D'un autre côté, la présence chronique de cellules sénescents (comme c'est le cas au cours du vieillissement) et donc du SASP semble altérer les structures et fonctions des tissus. De plus, un des rôles les plus connus et les plus délétères du SASP est sa capacité à promouvoir le développement tumoral. En effet, il comprend des facteurs qui stimulent la prolifération des cellules cancéreuses (ex : GRO α), qui induisent l'angiogenèse (ex : VEGF), qui permettent la transition épithélio-mésenchymateuse (ex : IL6, IL8) et qui soutiennent l'invasion (ex : MMPs) [Rodier and Campisi, 2011]. Le SASP génère également de l'inflammation. Or, il a été montré qu'un contexte inflammatoire chronique favorise l'apparition de diverses maladies liées à l'âge, dont les cancers [Sikora *et al.*, 2011].

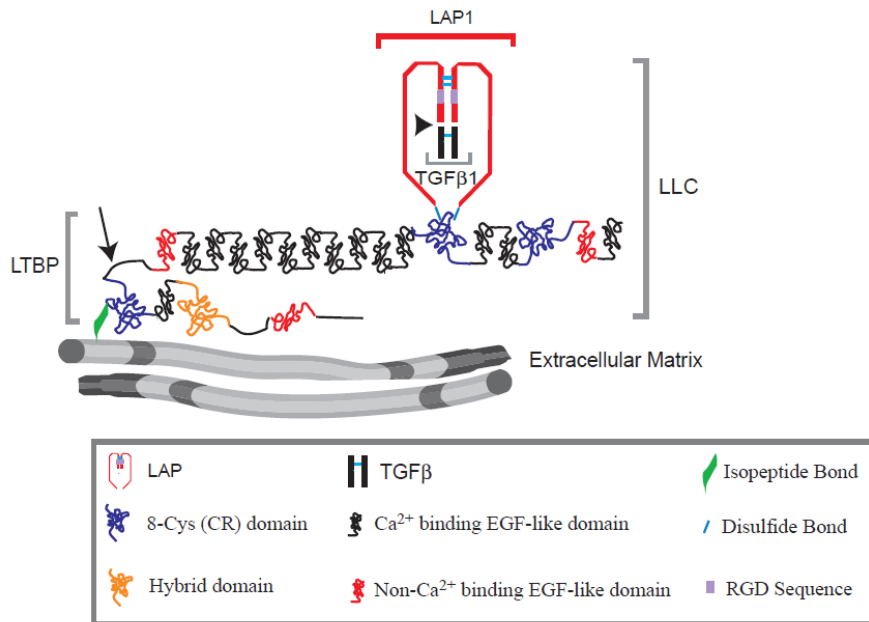


Figure I.8 : Structure du TGF-β1 (forme latente)

La forme latente du TGF-β1 (ou LLC, large latent complex) comprend un homodimère de TGF-β1, le prodomaine LAP (latency-associated protein) et la protéine LTBP (latent TGF-β binding protein). C'est sous cette forme que le TGF-β1 est sécrété par les cellules et stocké dans la MEC [Annes *et al.*, 2003].

Le SASP est un biomarqueur tardif de la sénescence qui ne se développe qu'après plusieurs jours. En effet, le développement du SASP est cautionné par la présence d'une DDR persistante [Campisi, 2013]. Par ailleurs, il a récemment été proposé que les cellules présentant une DDR propagent le signal aux cellules voisines, notamment par l'intermédiaire du SASP [Malaquin *et al.*, 2015]. Il semblerait aussi que le SASP renforce voire induise la sénescence des cellules voisines de la cellule émettrice [Salama *et al.* 2014].

Le SASP étant le principal responsable de l'impact des cellules sénescents sur leur environnement, la compréhension approfondie de ce phénomène permettrait de lutter contre les effets délétères de la sénescence sur l'organisme. Cependant, le SASP est d'une grande complexité, sa composition et ses effets variant selon le contexte physiologique, le type cellulaire, le stimulus à l'origine de la sénescence, etc. De plus, notons que dans le cas particulier des fibroblastes, un sécrétome bien développé existe déjà à l'état non-sénescents, il y a donc évolution d'un sécrétome vers un autre avec la sénescence plutôt qu'une apparition subite du SASP [Tigges *et al.*, 2014].

IV. Voies de signalisation impliquées dans l'apparition des biomarqueurs en SIPS

L'apparition des biomarqueurs de sénescence observés dans les cellules en SIPS est médiée par des voies de transduction du signal qu'il faut encore caractériser. Parmi ces voies, la signalisation en aval du TGF- β 1 semble être une piste prometteuse (voir IV.4).

1) Le TGF- β 1 : généralités

Structure et activation du TGF- β 1

La superfamille du TGF- β (Transforming growth factor- β) est divisée en 2 sous-familles de ligands : la sous-famille TGF- β /activines/Nodal et la sous-famille des BMP (bone morphogenic proteins) [Massagué, 2012]. Chez l'Homme, il existe 3 isoformes au sein de la sous-famille TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Bien que codés par des gènes différents, ces isoformes présentent des séquences similaires à 70-80% [Ikushima and Miyazono, 2012]. Durant ce mémoire nous nous sommes intéressés au TGF- β 1, l'isoforme la plus abondante.

La voie de synthèse du TGF- β 1 est bien connue [Kubiczkova *et al.*, 2012]. Le TGF- β 1 est produit sous une forme latente (pro-TGF- β 1), c'est-à-dire associée de façon covalente à un prodomaine LAP (latency-associated protein). Ils forment le complexe SLC (small latent complex). Après repliement et dimérisation de la protéine, le prodomaine est clivé dans le *trans*-Golgi, mais reste connecté au TGF- β 1 par des liaisons non-covalentes. A ce complexe se lie par des ponts disulfures la protéine LTBP (latent TGF- β binding protein), formant ainsi le LLC (large latent complex) qui sera sécrété et stocké dans la matrice extracellulaire (**Figure I.8**). Pour libérer la forme active de TGF- β 1, le peptide LAP doit être clivé. Cette activation peut se produire sous l'action de la plasmine, des métalloprotéinases matricielles MMP2 et MMP9, des intégrines α V β 6 et α V β 8, de radiations, des ROS, d'un pH acide, etc. La forme mature du TGF- β 1 est alors disponible. Elle se présente sous une forme dimérique constituée de deux monomères stabilisés par des interactions hydrophobes et par un pont disulfure.

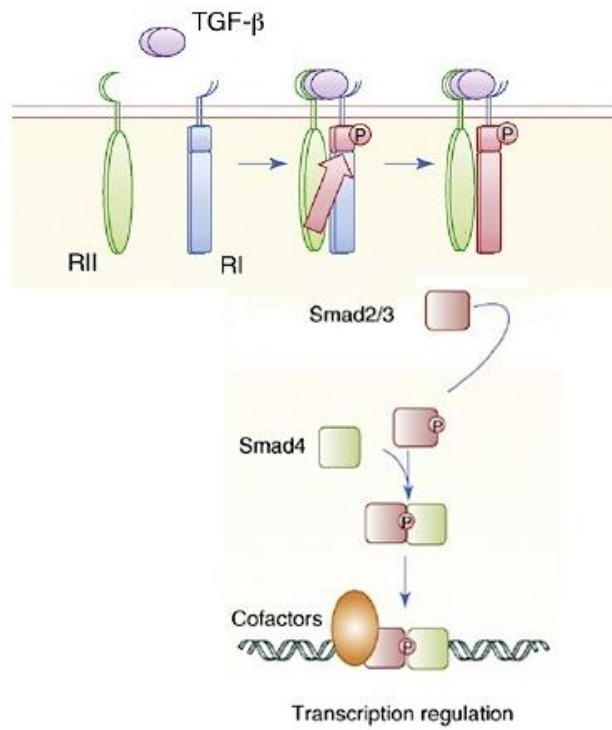


Figure I.9 : Voie canonique TGF-β1/Smads

La liaison du TGF-β1 à ses récepteurs provoque la phosphorylation des TβRI par les TβRII. Les récepteurs TβRI phosphorylent à leur tour les R-Smads Smad2 et Smad3 qui se lient à la Co-Smad Smad4 et transloquent dans le noyau où elles modulent l'expression génique [d'après Kang *et al.*, 2009].

Récepteurs du TGF- β 1

Le TGF- β 1 actif peut alors se lier à ces récepteurs en surface des cellules, les T β R (TGF- β receptors). Il en existe 3 types : les T β RI, T β RII et T β RIII. Ce dernier ne possède pas d'activité kinase. T β RI et T β RII sont constitués d'un domaine de liaison au ligand en N-terminal du côté extracellulaire, d'une région transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire à activité sérine/thréonine kinase en C-terminal. Le récepteur T β RI possède en outre un domaine riche en glycines et sérines (GS) dans sa partie intracellulaire. La phosphorylation de ce domaine permet d'activer T β RI [Kubiczkova *et al.*, 2012].

Fonctions biologiques

La superfamille du TGF- β est impliquée dans de nombreux processus biologiques : prolifération, différenciation, développement, homéostasie tissulaire, régénération, etc. Ses effets dépendent énormément du contexte physiologique, ce qui explique qu'ils soient très différents voire parfois opposés, selon les situations. Ainsi, par exemple, le TGF- β a une activité anti-tumorale dans les cellules précancéreuses mais favorise l'invasion et la dissémination métastatique dans les stades plus avancés de tumorigenèse [Massagué, 2012]. L'influence du contexte sur la réponse cellulaire au TGF- β et la grande diversité de mécanismes régulateurs impliqués rendent l'étude de cette cytokine extrêmement complexe.

2) TGF- β 1 et Smads

L'activation des protéines Smads par le TGF- β 1 est considérée comme la « voie canonique » du TGF- β 1.

Les protéines Smads

Les Smads sont des protéines constituées de 2 domaines globulaires MH1 et MH2 (MAD-homology 1 et 2) connectés par une région de liaison (« linker ») [Massagué, 2012]. Le domaine MH1 est situé du côté N-terminal et contient une structure en épingle à cheveux (« hairpin ») qui assure la liaison à l'ADN. Le domaine MH2 en C-terminal permet aux Smads d'interagir avec diverses protéines du cytoplasme, avec les récepteurs T β R et avec de multiples cofacteurs de transcription. Les Smads sont classées en 3 catégories selon leur fonction [Kubiczkova *et al.*, 2012]. On distingue ainsi les R-Smads (receptor-regulated Smad proteins, principalement Smad2 et Smad3) qui sont activées par les T β R après liaison du ligand, les Co-Smads (common Smad, Smad4) auxquelles les R-Smads s'associent, et les I-Smads (inhibitory Smads, principalement Smad7) qui régulent négativement la voie des Smads en entrant en compétition avec les R-Smads pour la liaison aux T β R.

La voie TGF- β 1/Smads

La voie canonique TGF- β 1/Smads a été bien décrite [Kubiczkova *et al.*, 2012 ; Massagué, 2012] (**Figure I.9**). Le TGF- β 1 (sous forme dimérique) se lie à deux récepteurs T β RII qui vont, grâce à leur activité kinase, phosphoryler la région GS de deux récepteurs T β RI, ce qui résulte en la formation d'un tétramère de récepteurs activés. Les R-Smads Smad2 et Smad3 sont recrutées au niveau de ce tétramère par l'intermédiaire de la protéine SARA (Smad anchor for receptor activation). Les récepteurs T β RI activent alors les Smads en les phosphorylant au niveau d'un motif SXS (sérine-sérine-X-sérine) présent dans leur partie C-terminale [Ikushima and Miyazono, 2012]. Cette phosphorylation permet de diminuer

l'affinité des R-Smads pour SARA, ce qui leur permet de s'en dissocier pour pouvoir se lier à Smad4 sous forme de trimère (2 R-Smads avec 1 Co-Smad). Les Smads, qui font constitutivement la navette entre le cytoplasme et le noyau en interagissant avec les nucléoporines, possèdent une séquence NLS-like (nuclear localisation-like sequence) qui leur permet d'être prises en charge lorsqu'elles sont activées par les importines. Une fois dans le noyau, la structure en hairpin des R-Smads reconnaît le motif AGAC sur l'ADN, aussi appelé SBE (Smad-binding element). Après liaison à l'ADN, les R-Smads régulent la transcription génique de deux façons. D'une part, elles agissent de concert avec de nombreux cofacteurs de transcription de type FOX, HOX, RUNX, zinc-finger, E2F, AP-1, etc. D'autre part, elles modifient la conformation de la chromatine en recrutant par exemple les HAT (histone acetyl transferases) p300 et CBP. Notons que les nombreuses combinaisons de corépresseurs et coactivateurs à ce niveau permettent de générer des réponses très différentes, ce qui explique en partie la diversité d'effets du TGF- β 1.

Régulation

Si la transduction du signal par la voie TGF- β 1/Smads est assez simple en elle-même, ce n'est pas le cas des mécanismes de régulation auxquels elle est soumise [Ross and Hill, 2008 ; Xu *et al.*, 2012]. En effet, ces mécanismes sont présents à tous les niveaux de la voie : récepteurs, protéines Smads, liaison à l'ADN, activation ou répression de la transcription, etc. De plus, la régulation implique différents processus : (dé)phosphorylation, (dé)ubiquitination, (dé)sumoylation, (dé)acétylation, etc. En outre, il a été montré qu'à la phosphorylation du motif SSXS des R-Smads par T β R1 peuvent s'ajouter des phosphorylations au niveau du linker par d'autres kinases (MAPK ou CDK). La combinaison de ces phosphorylations en divers sites du linker avec la phosphorylation en C-terminal permet aux R-Smads de produire des effets différents sur la cellule [Matsuzaki, 2013]. L'association de ces facteurs permet une régulation complexe et extrêmement fine de la voie des Smads.

3) TGF- β 1 et voies non-canoniques

En plus de la voie des Smads, le TGF- β 1 active également d'autres voies de signalisation, dites « non-canoniques » : différentes branches de la voie des MAPK (ERK, JNK, p38), la voie PI3K/Akt, la voie NF- κ B, etc.

TGF- β 1 et MAPK

L'activation de ERK en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK, receptor tyrosine kinase) se produit à l'issue d'une longue cascade de signalisation [Zhang, 2009]. Suite à la liaison d'un facteur de croissance, les RTK dimérisent et s'activent par transphosphorylation. Ceci mène alors au recrutement de différentes protéines : Src, Shc et le complexe Grb2/Sos. Ce dernier active par échange de GDP/GTP la protéine Ras qui va elle-même activer la MAPKKK Raf. Raf initie alors la cascade des MAPK en phosphorylant MEK qui va elle-même finalement phosphoryler ERK. ERK peut ensuite phosphoryler ses propres substrats qui réguleront l'expression génique.

L'activation de p38 et JNK passe aussi par plusieurs intermédiaires [Zhang, 2009]. L'activation de récepteurs tels que le récepteur à l'IL1 (IL1R) ou les Toll-like récepteurs (TLR) induit le recrutement de TRAF6 qui active à son tour la MAPKKK TAK1 (TGF- β -activated kinase 1). TAK1 phosphoryle ensuite MKK4 et MKK3/6 qui activent respectivement JNK et p38.

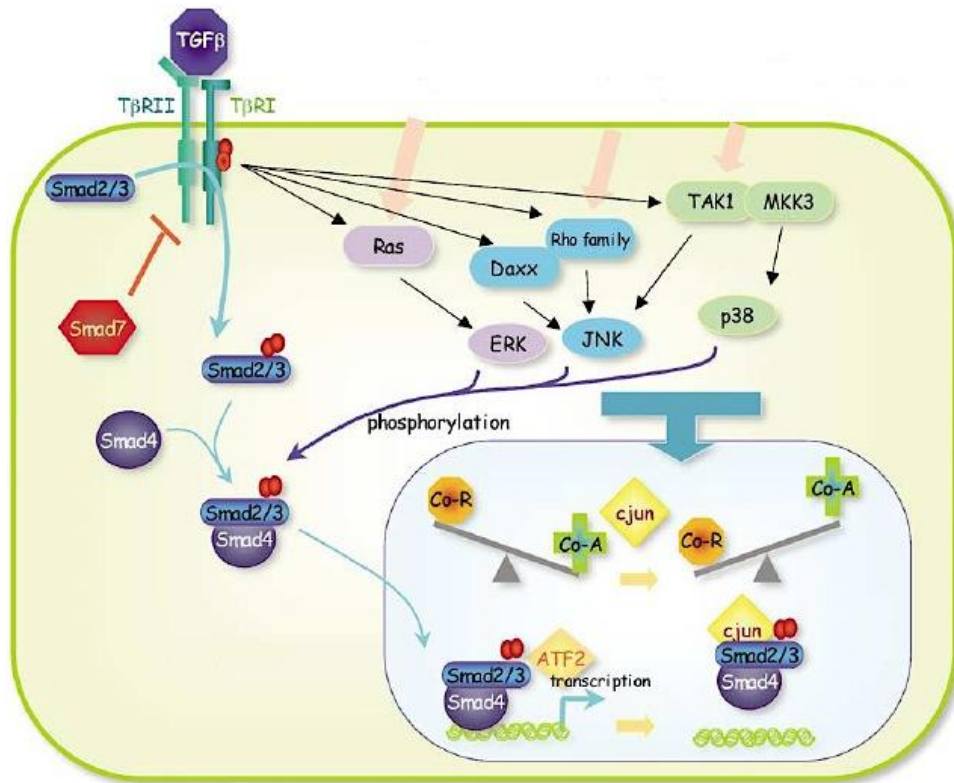


Figure I.10 : Interactions entre la voie TGF-β1/Smads et les MAPK

Le TGF-β1 est capable d'activer les MAPK ERK, p38 et JNK en plus des protéines Smads. Les MAPK peuvent à leur tour influencer la réponse au TGF-β1 par l'intermédiaire de la transcription génique et de la phosphorylation des R-Smads en divers sites de leur région linker [Javelaud and Mauviel, 2005].

Il a été montré que le TGF- β 1 est capable de mener à l'activation de ERK, de p38 et de JNK (**Figure I.10**). Dans certains cas cette activation se produit dans les minutes suivant la stimulation par le TGF- β 1, dans d'autres, quelques heures après. Ces cinétiques différentes suggèrent que le TGF- β 1 peut agir en activant directement les MAPKKK (activation rapide des MAPK) ou *via* la modulation de la transcription génique médiée par les Smads (activation lente des MAPK) [Javelaud and Mauviel, 2005]. Dans le premier cas, l'activation de ERK semble être due à la présence de tyrosines phosphorylées sur les récepteurs T β R (ce qui entraîne le recrutement de Shc/Grb2/Sos, etc) et l'activation de p38 et JNK est issue de la liaison de TRAF6 aux récepteurs T β R après stimulation par le TGF- β 1 [Zhang, 2009]. En retour, les MAPK influencent la voie canonique du TGF- β 1, d'une part *via* leurs substrats qui régulent la transcription génique en association avec les Smads et d'autre part, en phosphorylant les R-Smads au niveau de leur région linker [Javelaud and Mauviel, 2005 ; Guo and Wang, 2009 ; Zhang, 2009].

TGF- β 1 et voie PI3K/Akt

La PI3K (phosphatidylinositide 3-kinase) est une enzyme capable de transformer le PIP₂ (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) en PIP₃ (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Ce dernier permet d'activer la sérine thréonine kinase Akt, ce qui résulte *in fine* en des réponses telles que la survie ou la croissance cellulaires.

Il semblerait que le TGF- β 1 puisse activer la voie PI3K/Akt de façon directe (c.à.d. par l'intermédiaire de ses récepteurs T β R et non par le biais des Smads) tandis que Akt aurait un effet inhibiteur sur l'activité de Smad3 selon des mécanismes encore mal connus [Guo and Wang, 2009 ; Zhang, 2009].

TGF- β 1 et Rac1

Rac1 fait partie des « Rho-like GTPases », qui jouent un rôle important dans l'organisation du cytosquelette. Le TGF- β 1 semble pouvoir activer Rac1 sans recourir aux Smads [Zhang, 2009].

4) Implications du TGF-B1 dans la SIPS

Le TGF- β 1 a été mis en cause dans l'apparition des biomarqueurs de sénescence dans différents modèles de SIPS : H₂O₂ [Fripiat *et al.*, 2001], UVB [Chainiaux *et al.*, 2002 ; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005], éthanol et *t*-BHP [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2008]. En particulier, dans le modèle de SIPS induite par l'H₂O₂ dans des fibroblastes de poumon humain, l'implication causale du TGF- β 1 et de p38 dans l'induction de la sénescence a été clairement démontrée [Fripiat *et al.*, 2001 ; Fripiat *et al.*, 2002]. En effet, l'exposition au peroxyde d'hydrogène entraîne la phosphorylation de p38 qui active alors le facteur de transcription ATF-2. Ceci résulte en la surexpression du TGF- β 1 qui, une fois sécrété, maintient l'activation de p38 à long terme et semble ainsi permettre l'apparition des biomarqueurs de sénescence dans ce modèle.

Durant ce mémoire, nous avons utilisé un modèle de SIPS-UVB mis au point au laboratoire [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005]. Dans ce modèle, une surexpression du TGF- β 1 est observée ainsi qu'une augmentation protéique de sa forme latente et active. De plus, l'inhibition des voies dépendantes du TGF- β 1 par l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre le TGF- β 1 ou T β RII empêche l'apparition de certains biomarqueurs de sénescence. Ces données suggèrent que le TGF- β 1 est impliqué causalement dans l'induction de la sénescence après

- INTRODUCTION -

exposition chronique aux UVB. Cependant, il reste à déterminer quelles sont les voies activées en aval du TGF- β 1 responsables de ce phénomène. Pour étudier cette question nous avons également utilisé un autre modèle de SIPS développé au laboratoire et qui consiste à stimuler les fibroblastes au TGF- β 1 de façon chronique [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005]. A l'heure actuelle, les voies de signalisation activées en aval des récepteurs au TGF- β 1 dans ces deux modèles de SIPS ne sont pas connues, le but de notre mémoire est donc de participer à leur identification.

V. Objectifs du mémoire

La sénescence est définie comme l'arrêt irréversible du cycle cellulaire en réponse à un stress endo- ou exogène. En particulier, durant ce mémoire, nous avons étudié la sénescence prématurée induite par les rayons UVB (SIPS-UVB) chez des fibroblastes de derme humain (HDFs), dans le but de mieux comprendre les mécanismes du photovieillissement de la peau.

A l'heure actuelle, les voies de transduction du signal qui aboutissent à l'établissement de la sénescence sont encore mal connues et doivent être investiguées. Une des pistes proposées dans la littérature est celle d'une implication du TGF- β 1 dans l'apparition des biomarqueurs de sénescence. Nous nous sommes donc concentrés sur l'étude des voies de signalisation en aval du TGF- β 1 dans différents modèles de sénescence.

Durant ce mémoire, trois modèles de sénescence cellulaire *in vitro* ont été utilisés. D'une part, nous avons maintenu en culture des fibroblastes de derme (HDFs) jusqu'à la sénescence répliquative (RS). D'autre part, nous avons soumis des HDFs à des stimulations répétées au TGF- β 1 ou à des expositions chroniques aux rayons UVB *via* des protocoles permettant d'induire la sénescence prématurée (SIPS).

Dans un premier temps, nous devons déterminer si l'induction de la sénescence a bien lieu dans chaque modèle. Pour ce faire, nous vérifierons la présence de différents biomarqueurs : morphologie, activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal) et profil d'expression génique. L'expression de marqueurs d'arrêt du cycle cellulaire et de marqueurs de prolifération sera également évaluée.

Ensuite, nous investiguerons différentes voies de signalisation dépendantes du TGF- β 1 dans les deux modèles de SIPS afin de mieux comprendre comment les biomarqueurs de sénescence apparaissent. La majeure partie de ce mémoire sera consacrée à l'étude de la voie des Smads, considérée comme la voie canonique du TGF- β 1. Nous analyserons ensuite l'activation des MAPK p38 et ERK, ainsi que de la PI3K et de Rac1, ces protéines étant impliquées dans les voies non-canoniques de réponse au TGF- β 1.

MATERIEL
&
METHODES

Tableau II.1 : Matériel nécessaire à la culture cellulaire

Nom	Firme, pays
Milieu de culture complet - BME - 2 mM L-glutamine - 10% FBS	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA
PBS	Lonza, Suisse
Trypsine 0,25%	Gibco, USA
Cellule de Neubauer	Marienfeld, Germany
Bleu trypan	Life Technologies, USA
Flasque T25 ou T75	Corning, USA
Plaque 6 puits	Corning, USA

Tableau II.2 : Matériel nécessaire à l'exposition des cellules aux UVB

Nom	Firme, pays
Milieu de culture - BME - 2 mM L-glutamine - 1% FBS	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA
PBS	Lonza, Suisse
Lampes Philips TL20W/01 RS narrowband	Philips, Pays-Bas
Radiomètre	Vilber Lourmat, France
Capteur UVB	Vilber Lourmat, France

I. Culture cellulaire

Les cellules utilisées lors de ce mémoire sont des fibroblastes de derme isolés d'un fœtus humain (15 semaines de grossesse, souche AG04431, Coriell Institute for Medical Research, USA).

1) **Matériel**

Voir tableau II.1

2) **Méthode**

Les cellules sont cultivées en routine dans des boîtes de culture T75 contenant 15 mL de milieu BME (Basal Medium Eagle) contenant 2 mM de L-glutamine et 10% de FBS (Fetal Bovine Serum). Elles sont placées dans un incubateur dont la température est maintenue à 37°C et le taux de CO₂ à 5%. Le milieu est changé deux fois par semaine et les fibroblastes sont repiqués lorsqu'ils deviennent confluents. Dans ce cas, les cellules sont rincées deux fois avec 10 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile, puis incubées avec 1 mL de trypsine pendant 3-4 minutes à 37°C. Une fois les fibroblastes détachés de leur support, la trypsinisation est arrêtée par l'ajout de 9 mL de milieu complet et la suspension ainsi obtenue est distribuée également entre deux nouvelles flasques T75. Enfin, 10 mL de milieu de culture sont ajoutés dans chaque flasque et les boîtes sont replacées dans l'incubateur.

Lorsque les cellules doivent être repiquées à une densité précise, la suspension cellulaire est centrifugée à 1 000 rpm durant 7 minutes afin de culotter les fibroblastes. Le surnageant est ensuite retiré et les cellules sont resuspendues dans du milieu avant d'être comptées à la cellule de Neubauer etensemencées à la densité désirée dans la vaisselle de culture adéquate (flasques T75, T25 ou plaques 6 puits).

Pour information, les fibroblastes en passage 28 par exemple sont considérés comme « jeunes ». Les fibroblastes sont considérés comme « sénescents » au bout de deux semaines d'arrêt prolifératif.

II. Exposition aux UVB

Durant ce mémoire, une des manières utilisées pour induire la sénescence prématurée des fibroblastes est l'exposition répétée aux UVB. Ce protocole a été mis au point au laboratoire et consiste à exposer les cellules à une dose subcytotoxique de rayons UVB deux fois par jour pendant 5 jours [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005].

1) **Matériel**

Voir tableau II.2

2) **Méthode**

Trois jours avant le début des stress, les fibroblastes sont repiqués à une densité de 10 000 cellules/cm² dans du milieu BME supplémenté avec 2 mM de L-glutamine et 1% de FBS. L'exposition aux UVB est généralement réalisée sur des cellules en passage 27-28 (ce qui correspond à des fibroblastes jeunes).

Tableau II.3 : Matériel nécessaire à la stimulation des cellules au TGF- β 1

Nom	Firme, pays
Milieu de culture - BME - 2 mM L-glutamine - 1% FBS	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA
TGF- β 1	R&D Systems, USA
HCl 4 mM	Merck Millipore, USA
BSA	Santa Cruz Biotechnology, USA

Pour cela, les cellules sont rincées une fois avec du PBS puis soumises aux UVB dans une fine couche de PBS (3 mL/T75 ou 1 mL/T25). Les stress sont réalisés dans un caisson contenant 3 lampes émettant des rayons UV dont le pic d'émission se situe à 311 nm et placées 30 cm au-dessus des flasques. Afin de mesurer la dose de radiation réellement reçue par les cellules, un capteur UVB est placé dans une flasque identique à celles utilisées pour l'expérience. Ce capteur est relié à un radiomètre UVR qui permet de mesurer l'intensité des rayons reçus par les cellules en temps réel ainsi que l'intensité cumulée. Lorsque cette dernière atteint la valeur de 250 mJ/cm², l'exposition est arrêtée. Le PBS est retiré et remplacé par du milieu contenant 1% de FBS (10 mL/T75 ou 5 mL/T25) et les flasques sont replacées dans l'incubateur. Les stress sont ainsi réalisés pendant 5 jours, en début et en fin de journée.

Les fibroblastes de la condition contrôle sont traités de la même manière, à l'exception de l'exposition aux UVB.

Les extractions d'ARN ou de protéines, et les repiquages pour les tests SA-βgal et les marquages en immunofluorescence sont généralement réalisés 72 heures après le dernier stress UVB, sauf indications contraires.

III. Stimulation au TGF-β1

Un deuxième modèle de sénescence prématurée des fibroblastes a été utilisé durant ce mémoire. Il consiste à stimuler chroniquement les cellules avec du TGF-β1 durant 72 heures.

1) *Matériel*

Voir tableau II.3

2) *Méthode*

Le TGF-β1, reçu sous forme lyophilisée, est dilué dans une solution d'HCl 4 mM à laquelle est ajouté 0,1% de BSA de façon à obtenir une concentration finale en TGF-β1 de 1 ng/μL. Cette solution est conservée à -20°C durant 3 mois maximum. Trois jours avant le début de la stimulation, les fibroblastes sont repiqués à une densité de 10 000 cellules/cm² dans du milieu BME supplémenté avec 2 mM de L-glutamine et 1% de FBS. La stimulation au TGF-β1 est généralement réalisée sur des cellules en passage 27-28 (ce qui correspond à des fibroblastes jeunes).

Pour cela, le milieu de culture est décanté et remplacé par du milieu contenant 5 ng/mL de TGF-β1. Cette stimulation dure 72 heures et le milieu contenant le TGF-β1 est renouvelé toutes les 24 heures.

Les fibroblastes de la condition contrôle sont traités de la même manière, à l'exception de l'exposition au TGF-β1.

Les extractions d'ARN ou de protéines, et les repiquages pour les tests SA-βgal et les immunofluorescences sont généralement réalisés 24 heures après la dernière stimulation, sauf indications contraires.

De plus, un contrôle positif pour l'activation de la voie des Smads est réalisé en soumettant les cellules à 1 heure de déprivation en sérum suivie d'une stimulation au TGF-β1, à une concentration de 1 ng/mL ou 10 ng/mL, durant 30 minutes ou 1 heure.

Tableau II.4 : Matériel nécessaire à la détection de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence

Nom	Firme, pays
Milieu de culture - BME - 2 mM L-glutamine - 10% ou 1% FBS	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA
Plaque 6 puits	Corning, USA
PBS (1 L) - 9 g NaCl - 20 mL de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 - Eau distillée	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Solution de fixation (1 L) - 2% formaldéhyde - 0,2% glutaraldéhyde - PBS	Carlo Erba Reagents, Italie Sigma-Aldrich, USA
Solution de coloration (7 mL) - 1,4 mL tampon phosphate pH 6 NaH ₂ PO ₄ 0,1 M (13,79 g/L) Na ₂ HPO ₄ 0,1 M (17,79 g/L) - 350 μ L ferrocyanure de potassium 0,1 M - 350 μ L ferricyanure de potassium 0,1 M - 840 μ L NaCl 2,5 M - 14 μ L MgCl ₂ 1 M - 3,7 mL eau distillée - 7 mg X-gal dissout dans 350 μ L N,N-diméthylformamide	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Biosolve, Pays-Bas Sigma-Aldrich, USA
Méthanol	Acros Organics, USA

IV. Détection de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal)

La β -galactosidase est une enzyme lysosomale responsable de l'hydrolyse des β -galactosides en monosaccharides et dont l'activité est normalement détectée à pH 4. Cependant, dans les cellules sénescents, la biogenèse lysosomale est augmentée et le gène codant pour la β -galactosidase est surexprimé, ce qui permet de détecter l'activité de l'enzyme à un pH suboptimal de 6. De plus, cette activité peut être facilement visualisée par le clivage du substrat chromogène X-gal qui résulte en la formation d'un précipité bleu dans les cellules. Cette propriété est considérée comme un des biomarqueurs de la sénescence. Lors de ce mémoire, nous avons suivi le protocole mis au point par Dimri *et al.* [Dimri *et al.*, 1995].

1) **Matériel**

Voir tableau II.4

2) **Méthode**

Les fibroblastes sont ensemencés en plaque 6 puits, à une densité de 1 000 cellules/cm², dans du milieu BME + 10% FBS (en routine) ou BME + 1% FBS (si les cellules ont été exposées aux UVB ou stimulées au TGF- β 1).

Le lendemain, les cellules sont rincées deux fois au PBS, puis fixées durant 5 minutes à l'aide d'une solution de PBS contenant 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde.

Les cellules sont ensuite rincées à nouveau deux fois au PBS puis mises en présence de la solution de coloration. Cette dernière contient notamment du tampon phosphate à pH 6 et le substrat chromogène X-gal qui permettront de visualiser l'activité β -galactosidase associée à la sénescence. L'incubation avec cette solution se réalise à l'abri de la lumière, dans une atmosphère à 37°C et sans CO₂ durant 16 heures. Après ce délai, les fibroblastes sont rincés deux fois au PBS puis deux fois au méthanol et les plaques sont mises à sécher et conservées à l'abri de la lumière.

La proportion de cellules positives pour l'activité SA- β gal est déterminée par le ratio entre le nombre de cellules colorées et le nombre total de cellules par puits. Pour ce faire, environ 400 cellules sont comptées par puits.

V. PCR semi-quantitative en temps réel

La PCR en temps réel permet d'évaluer l'expression génique de façon semi-quantitative. La première étape consiste à extraire l'ARN messager (ARNm) des cellules et à le transcrire en ADN complémentaire (ADNc) par le processus de rétro-transcription. Cet ADNc est ensuite soumis à une PCR (Polymerase Chain Reaction) qui pourra être suivie en direct grâce à la fluorescence émise par un agent intercalant, le SYBR Green. Cette réaction permet de former une quantité exponentielle de produits PCR, donnant lieu à une courbe d'amplification pour chaque gène. Un seuil de fluorescence est fixé à une valeur telle que ce seuil coupe les courbes d'amplification dans leur partie linéaire (dans ce mémoire, il est fixé à 0,2). Au cours de la réaction, la fluorescence émise par les produits PCR dépasse ainsi la valeur seuil et sort du bruit de fond. Le cycle auquel cet événement se produit est appelé « Ct » pour « Cycle threshold ». Plus le gène est exprimé, plus la quantité d'ADNc (et donc d'ARNm) est élevée dans l'échantillon, plus la valeur de Ct

Tableau II.5 : Matériel nécessaire à l'extraction d'ARN

Nom	Firme, pays
SDS 1%	Merck Millipore, USA
PBS	Lonza, Suisse
Racloir	TPP, Suisse
Ethanol	Merck Millipore, USA
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Pays-Bas
Qiacube	Qiagen, Pays-Bas
Spectrophotomètre Nanodrop ND-1000	Isogen, Pays-Bas

Tableau II.6 : Matériel nécessaire à la rétro-transcription

Nom	Firme, pays
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Life Science, Suisse

Tableau II.7 : Matériel nécessaire à la PCR semi-quantitative en temps réel

Nom	Firme, pays
Plaque 96 puits	Greiner Bio-One, Autriche
SYBR Select Master Mix	Applied Biosystems, USA
StepOne Plus	Applied Biosystems, USA
ViiA7	Applied Biosystems, USA

Tableau II.8 : Amorces utilisées lors de la PCR semi-quantitative en temps réel

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>ApoJ</i>	GGATGAAGGACCAGTGTGACAAG	CAGCGACCTGGAGGGATTC
<i>CTGF</i>	CAAGCTGCCCCGGGAAAT	GGACCAGGCAGTTGGCTCTA
<i>Fibronectine</i>	TGTGGTTGCCTTGCACGAT	GCTTGTGGGTGTGACCTGAGT
<i>GAPDH</i>	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	GTCCACCACCCTGTTGCTGTA
<i>IGFBP3</i>	CAGAGCACAGATACCCAGAACTTC	CACATTGAGGAACTTCAGGTGATT
<i>IGFBP5</i>	TGTGACCGCAAAGGATTCTACA	TCCCCGTCAACGTACTCCAT
<i>IL1β</i>	GCCCTAAACAGATGAAGTGCTC	GAGATTCGTAGCTGGATGCC
<i>IL8</i>	TCTGTGTGAAGGTGCAGTTTT	GGGGTGGAAAGGTTTGGAGTA
<i>MCP1</i>	CATTGTGGCCAAGGAGATCTG	AGTGAGTGTTCAAGTCTTCGG
<i>MMP1</i>	CATGCGCACAAATCCCTTCTA	GAACAGCCCAGTACTTATTCCCTTT
<i>MMP2</i>	ATCGCAGATGCCTGGAATG	CTTTGGTTCTCCAGCTTCAGGTAAT
<i>MMP14</i>	TGCCTGCGTCCATCAACA	ACACCCAATGCTTGTCTCCTTT
<i>Ostéonectine</i>	GAGACCTGTGACCTGGACAATG	GGAAGGAGTGGATTTAGATCACAAGA
<i>p16</i>	GCCCAACGCACCGAATAGT	CGCTGCCCATCATCATGAC
<i>p21</i>	CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA	CCAGGACTGCAGGCTTCCT
<i>TGF-β1</i>	AGGGCTACCATGCCAACTTCT	CCGGGTTATGCTGGTTGTACA
<i>VCAM1</i>	TTGGCTCACAATTAAGAAGTTTAACAC	GCAGGTATTATTAAGGAGGATGCAA
<i>VEGF</i>	TGCCCACTGAGGAGTCCAA	TTTGTGTGCTGTAGGAAGCTCAT

sera faible. Il est ainsi possible de déterminer les valeurs de Ct obtenues pour un même gène dans différentes conditions et de comparer son expression en termes d'induction du niveau relatif d'ARNm (« fold induction »).

Lors de ce mémoire, le gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase (GAPDH) est utilisé comme gène de référence. L'abondance relative de l'ARNm est déterminée selon la méthode décrite par Schefe *et al.*, basée sur la différence de Ct entre deux conditions [Schefe *et al.*, 2006]. Un gène sera considéré comme surexprimé si le « fold induction » obtenu est supérieur à 1,3 et sera considéré comme sous-exprimé s'il est inférieur à 0,77.

1) **Matériel**

Voir tableaux II.5, II.6, II.7 et II.8

2) **Méthode**

Extraction d'ARN

Lors de cette étape, il est impératif de travailler en conditions « RNase-free ». En effet, l'ARN est une molécule bien plus fragile que l'ADN qui peut être dégradée par des enzymes très stables, les ribonucléases (dites RNases), que l'on retrouve quasiment partout, y compris sur la peau. Il faut donc utiliser du matériel et des solutions RNase-free, porter des gants et nettoyer la zone de travail au SDS 1%.

Durant ce mémoire, nous avons extrait l'ARN total des fibroblastes de façon automatisée en utilisant le RNeasy Mini Kit et le Qiacube de Qiagen.

Les cellules en culture dont on veut extraire l'ARN sont d'abord rincées au PBS puis lysées dans le tampon de lyse RLT (350 μ L/T25 ou 500 μ L/T75). Elles sont ensuite grattées dans ce tampon à l'aide d'un racloir et le lysat est collecté. Les échantillons et tout le matériel nécessaire à l'extraction sont placés dans le Qiacube en suivant les instructions du fournisseur. Les lysats sont transférés sur une colonne d'élution et l'appareil exécute ensuite différentes étapes de centrifugation, rinçage et élution qui permettent finalement de récupérer l'ARN purifié de nos cellules, élué dans un volume de 30 μ L d'eau RNase-free.

Ces échantillons d'ARN sont dosés à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop. En plus de déterminer la concentration en ARN, cet appareil permet d'estimer la contamination en sels ou en protéines des échantillons et donc d'évaluer globalement la qualité de l'extraction réalisée.

Les échantillons d'ARN obtenus sont stockés à -80°C.

Rétro-transcription

La rétro-transcription des échantillons d'ARN en ADNc est réalisée à partir d'1 μ g d'ARN total à l'aide du Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit de Roche, en conditions RNase-free.

L'ARN est d'abord mélangé à de l'eau RNase-free afin d'obtenir un volume de 12 μ L, auquel est ajouté 1 μ L d'oligo(dT). Ce mélange est placé à 65°C durant 10 minutes pour dénaturer la structure secondaire de l'ARN. Un mix est ensuite préparé pour chaque échantillon, contenant : 4 μ L de tampon nécessaire à l'activité de la transcriptase, 0,5 μ L d'inhibiteur de RNase, 2 μ L de déoxynucléotides et 0,5 μ L d'enzyme reverse transcriptase. Ce mix est incubé avec l'ARN et les oligo(dT)

Tableau II.9 : Matériel nécessaire à l'extraction de protéines totales

Nom	Firme, pays
PBS (1 L) - 9 g de NaCl - 20 mL de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 - Eau distillée	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Tampon de lyse protéines totales (1 mL) - 500 µL tampon de lyse 2x Tris 80 mM KCl 300 mM EDTA 2 mM - 410 µL eau distillée - 10 µL Triton X100 - 40 µL PIC - 40 µL PIB 25 mM Na ₃ VO ₄ 250 mM PNPP 250 mM β-glycérophosphate 125 mM NaF	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Sigma-Aldrich, USA Roche Life Science, Suisse Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA VWR, USA Merck Millipore, USA
Racloir	TPP, Suisse

Tableau II.10 : Matériel nécessaire à l'extraction de protéines nucléaires et cytoplasmiques

Nom	Firme, pays
Solution de rinçage (60 mL) - 60 mL PBS - 14,4 mg Na ₂ MoO ₄ - 12,6 mg NaF	Sigma-Aldrich, USA Merck Millipore, USA
HB 10x (100 mL) - 210 mg NaF - 242 mg Na ₂ MoO ₄ - 4,75 g HEPES - 37 mg EDTA - Eau distillée Ajuster le pH à 7,9	Merck Millipore, USA Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA Merck Millipore, USA
HB 1x (90 mL) - 9 mL HB 10x - 81 mL eau distillée	

<p>Tampon de lyse protéines cytoplasmiques (100 mL)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 mL HB 10x - 500 µL NP-40 - 89,5 mL eau distillée 	VWR, USA
Racloir	TPP, Suisse
<p>RE (100 mL)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 mL HB 10x - 20 mL glycérol 85% - 70 mL eau distillée 	Merck Millipore, USA
<p>RE complet</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 mL RE - 40 µL PIC - 40 µL PIB 25 mM Na₃VO₄ 250 mM PNPP 250 mM β-glycérophosphate 12 mM NaF 	<p>Roche Life Science, Suisse</p> <p>Sigma-Aldrich, USA</p> <p>Sigma-Aldrich, USA</p> <p>VWR, USA</p> <p>Merck Millipore, USA</p>
<p>SA (100 mL)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 mL HB 10x - 20 mL glycérol 85% - 20 mL NaCl 4 M - 50 mL eau distillée 	<p>Merck Millipore, USA</p> <p>Merck Millipore, USA</p>
<p>SA complet</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 mL SA - 40 µL PIC - 40 µL PIB 25 mM Na₃VO₄ 250 mM PNPP 250 mM β-glycérophosphate 125 mM NaF 	<p>Roche Life Science, Suisse</p> <p>Sigma-Aldrich, USA</p> <p>Sigma-Aldrich, USA</p> <p>VWR, USA</p> <p>Merck Millipore, USA</p>

Tableau II.11: Matériel nécessaire pour le dosage protéique

Nom	Firme, pays
Plaque 96 puits	Greiner Bio-One, Autriche
BSA 1 µg/µL	Santa Cruz Biotechnology, USA
Eau distillée	
Pierce 660 Protein Assay	Thermo Scientific, USA
xMark Microplate Spectrophotometer	Bio-Rad, USA
Logiciel « Microplate Manager 6 software »	Bio-Rad, USA

Tableau II.12 : Matériel nécessaire pour le Western Blot

Nom	Firme, pays
Gels précoulés Mini-PROTEAN TGX, 10 puits, 10% polyacrylamide (et cuve associée)	Bio-Rad, USA
Tampon d'électrophorèse 10x (1 L) - 30 g Tris - 144 g glycine - 10 g SDS - Eau distillée Vérifier $8,4 < \text{pH} < 8,8$	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA MP Biomedicals, USA
Bleu de charge 5x (17,5 mL) - 5 mL Tris HCl 0,5 M pH 6,8 - 5 mL SDS 20% - 2,5 mL β-mercaptoéthanol - 5 mL glycérol 85% - 8,75 mg bleu de bromophénol	Merck Millipore, USA MP Biomedicals, USA Fluka, USA Merck Millipore, USA GE Healthcare, UK
Eau distillée	
See Blue Plus 2 protein standard	Novex, USA
Membrane de PVDF	Immobilon-FL, Merck Millipore, USA
Méthanol	Acros Organics, USA
Tampon de transfert liquide (1 L) - 3,05 g Tris - 8,7 g glycine - Eau distillée Ajuster pH à 8,3 - 200 mL méthanol	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA Acros Organics, USA

Solution bloquante Licor	LI-COR, USA
Tween20	Bio-Rad, USA
PBS (1 L) - 9 g de NaCl - 20 mL de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 - Eau distillée	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA

Tableau II.13 : Anticorps primaires utilisés en Western Blot

Anticorps	Poids moléculaire	Clonalité	Source	Dilution	Référence
P-Smad2	60 kDa	Monoclonal	Lapin	1:1 000	Cell Signaling (USA) #12747
Smad2	60 kDa	Monoclonal	Lapin	1:1 000	Cell Signaling (USA) #12747
P-Smad3	52 kDa	Monoclonal	Lapin	1:1 000	Cell Signaling (USA) #12747
Smad3	52 kDa	Monoclonal	Lapin	1:1 000	Cell Signaling (USA) #12747
Smad4	70 kDa	Polyclonal	Lapin	1:1 000	Cell Signaling (USA) #12747
P-p38	43 kDa	Polyclonal	Lapin	1:1 000	Cell Signaling (USA) #9211
p38	43 kDa	Polyclonal	Lapin	1:1 000	Cell Signaling (USA) #9212
P-ERK	42-44 kDa	Monoclonal	Souris	1:1 000	Cell Signaling (USA) #9106
ERK	42-44 kDa	Polyclonal	Lapin	1:1 000	Cell Signaling (USA) #9102
PI3K	110 kDa	Monoclonal	Lapin	1:1 000	Cell Signaling (USA) #4249
Rac1	21 kDa	Monoclonal	Souris	1:1 000	BD Biosciences (USA) #610651
α -tubuline	55 kDa	Monoclonal	Souris	1:10 000	Sigma-Aldrich (USA) #T5168
Lamine B	67 kDa	Polyclonal	Chèvre	1:200	Santa Cruz Biotechnology (USA) #SC6216
Lamine C	65 kDa	Monoclonal	Souris	1:1 000	BD Biosciences (USA) #612162

Tableau II.14 : Anticorps secondaires utilisés en Western Blot

Anticorps	Clonalité	Source	Dilution	Référence
Anti-lapin (vert)	Polyclonal	Chèvre	1:10 000	LI-COR (USA) #926-32211
Anti-souris (rouge)	Polyclonal	Chèvre	1:10 000	LI-COR (USA) #926-68070
Anti-chèvre (rouge)	Polyclonal	Âne	1:10 000	LI-COR (USA) #926-68074

pendant 30 minutes à 55°C, ce qui permet la polymérisation en ADNc, puis 5 minutes à 85°C, ce qui inhibe les enzymes et déshybride le complexe ARNm/ADNc. Les échantillons d'ADNc obtenus sont stockés à -20°C.

PCR semi-quantitative en temps réel

L'étape de PCR en temps réel est réalisée en plaque 96 puits. Pour chaque gène testé, un mix réactionnel est préparé dont 20 µL sont déposés par puits. Ce mix contient : 2,5 µL d'amorce sens, 2,5 µL d'amorce antisens, 2,5 µL d'eau et 12,5 µL de SYBR Select Master Mix. Notons que les amorces sont utilisées à une concentration finale de 300 nM, excepté pour les amorces du gène de la métalloprotéinase matricielle 2 (MMP2) qui sont utilisées à 900 nM. Aux 20 µL de mix sont ensuite ajoutés 5 µL d'ADNc dilué 100 fois dans de l'eau. Chaque échantillon est analysé en duplicat.

La plaque est scellée avec un film adhésif puis centrifugée à 600 rpm pendant 1 minute avant d'être placée dans l'appareil. Durant ce mémoire, nous avons utilisé deux appareils : le StepOne Plus et le ViiA7. Une fois le run lancé, la température est augmentée jusqu'à 95°C, valeur à laquelle elle est maintenue pendant 10 minutes, puis suivent 40 cycles (15 secondes à 95°C puis 1 minute à 60°C). Enfin la réaction se termine par une session de 15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C puis de nouveau 15 secondes à 95°C avec une pente de + 0,3%.

VI. Western Blot

Le Western Blot est une technique qui permet d'évaluer l'abondance d'une protéine dans un échantillon de façon semi-quantitative.

Les protéines sont extraites des cellules et séparées sur un gel de polyacrylamide sur base de leur taille pour ensuite être transférées sur une membrane. Une fois sur la membrane, la protéine étudiée est reconnue par un anticorps dit « primaire ». Ce dernier est ensuite lui-même reconnu par un deuxième anticorps dit « secondaire » qui est couplé à un fluorochrome. Lorsque ce fluorochrome est excité par une lumière à une certaine longueur d'onde, il réémet dans une autre longueur d'onde, ce qui permet de visualiser la protéine sur la membrane. La taille de la protéine est déterminée grâce à un étalon de poids moléculaire et son abondance peut alors être comparée entre différentes conditions.

1) Matériel

Voir tableaux II.9 à II.14

2) Méthode

Extraction de protéines totales

Les boîtes de culture sont placées sur glace et les cellules sont rincées avec du PBS froid. Ensuite, elles sont lysées avec 100 µL de tampon de lyse par T75 ou 60 µL par T25. Les cellules sont raclées dans ce tampon pendant quelques minutes et le lysat est centrifugé pendant 10 minutes à 13 000 rpm et à 4°C. De cette manière, les protéines totales sont récupérées dans le surnageant. Les échantillons sont conservés à -80°C.

Extraction de protéines nucléaires et cytoplasmiques

Pour ce type d'extraction, 2 T75 sont à prévoir par condition. Ces boîtes sont placées sur glace et le tapis cellulaire est rincé avec 5 mL de solution de rinçage par T75. Ensuite, les cellules sont incubées avec 10 mL de HB 1x (Hypotonic Buffer) pendant 10 minutes. Le gonflement des cellules est surveillé au microscope. Le tampon est ensuite décanté minutieusement et 100 µL de tampon de lyse contenant 0,5% de NP-40 sont ajoutés par T75. Les cellules sont alors raclées dans ce tampon pendant 5 à 6 minutes puis le lysat est centrifugé 30 secondes à 13 000 rpm à 4°C. Les protéines cytoplasmiques sont récupérées dans le surnageant. Le culot est quant à lui resuspendu au tips dans 25 µL de RE complet (Resuspension buffer) puis 25 µL de SA complet (Salt buffer) sont ajoutés. Les tubes sont ensuite placés sur roue pendant 30 minutes à 4°C, ce qui permet de mélanger doucement les réactifs. Après une dernière centrifugation à 13 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes, les protéines nucléaires sont récupérées dans le surnageant. Les échantillons sont conservés à -80°C.

Dosage protéique

La concentration protéique des échantillons est déterminée par Pierce 660 nm Protein Assay, une méthode de dosage par colorimétrie. Le dosage se réalise en plaque 96 puits. La courbe d'étalonnage est réalisée grâce au dosage de 0, 1, 2, 5, 8 et 10 µg de BSA. Dans chaque puits sont déposés 2 µL d'échantillon protéique et 8 µL d'eau distillée. Les tampons de lyse utilisés pour les extractions sont analysés de la même façon. Enfin, 150 µL de Pierce sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est mise à agiter 5 minutes à 100 rpm avant d'être placée dans le spectrophotomètre. L'appareil mesure l'absorbance dans chaque puits à une longueur d'onde de 660 nm. Chaque mesure est effectuée en duplicat. Une fois les valeurs d'absorbance obtenues, la concentration protéique dans chaque puits peut être calculée en se rapportant aux valeurs obtenues pour la BSA.

Electrophorèse

Lors de ce mémoire, tous les WB ont été réalisés à partir de gels précoulés Mini-PROTEAN TGX de Bio-Rad, composés de 10% de polyacrylamide et comportant 10 puits de chargement.

La quantité de protéines chargées (précisée pour chaque WB) est de 8 µg, 10 µg ou 15 µg. Aux échantillons protéiques sont ajoutés du bleu de charge concentré 5x et éventuellement de l'eau afin d'obtenir un même volume pour tous les échantillons. Une fois préparés, ils sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes puis centrifugés à 13 000 rpm durant 10 minutes. Les gels sont placés dans une cuve et celle-ci est remplie avec du tampon d'électrophorèse 1x avant de charger les échantillons. Un étalon de poids moléculaire, ici du See Blue Plus 2, est également chargé afin de déterminer la taille des protéines détectées. La migration se déroule pendant 45 minutes à 70 V puis pendant environ 40 à 45 minutes à 140 V.

Transfert

Lors de ce mémoire, nous avons utilisé la technique d'électrotransfert liquide. Lorsque la migration est terminée, les gels sont délicatement démoulés et placés dans un « sandwich ». Ce sandwich est composé de : une éponge humide, deux papiers

Tableau II.15 : Matériel nécessaire pour les marquages en immunofluorescence

Nom	Firme, pays
Milieu de culture - BME - 2 mM L-glutamine - 10 % ou 1% FBS	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA
Lamelles couvre-objets	Assistent, Allemagne
Etoposide	Sigma-Aldrich, USA
HBSS	Gibco, USA
PBS (1 L) - 9 g de NaCl - 20 mL de tampon phosphate 0,5 M pH 7,4 - Eau distillée	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Paraformaldéhyde	Merck Millipore, USA
Méthanol	Acros Organics, USA
Acétone	Merck Millipore, USA
Triton X100	Sigma-Aldrich, USA
HCl 2M	Merck Millipore, USA
BSA	Santa Cruz Biotechnology, USA
TO-PRO-3	Molecular Probes, USA
Hoechst	Molecular Probes, USA
DAPI	Molecular Probes, USA
Lames porte-objets	VWR, USA
Mowiol	Sigma-Aldrich, USA
Microscope confocal	Leica, Allemagne

Tableau II.16 : Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence

Anticorps	Clonalité	Source	Dilution	Référence
Ki67	Monoclonal	Souris	1:800	Cell Signaling (USA) #9449
p21	Monoclonal	Lapin	1:400	Cell Signaling (USA) #2947
p16	Monoclonal	Lapin	1:400	LifeSpan BioSciences (USA) #LS-B8693
CPDs	Monoclonal	Souris	1:300	Cosmo Bio (Japon) #NM-DND-001
(6-4)PPs	Monoclonal	Souris	1:300	Cosmo Bio (Japon) #NM-DND-002
Phalloïdine 555	/	<i>Amanita phalloides</i>	1:100	Molecular Probes (USA) #A34055
P-Smad2	Monoclonal	Lapin	1:100	Cell Signaling (USA) #12747
Smad2	Monoclonal	Lapin	1:100	Cell Signaling (USA) #12747
P-Smad3	Monoclonal	Lapin	1:100	Cell Signaling (USA) #12747
Smad3	Monoclonal	Lapin	1:100	Cell Signaling (USA) #12747
Smad4	Polyclonal	Lapin	1:100	Cell Signaling (USA) #12747

Tableau II.17 : Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence

Anticorps	Clonalité	Source	Dilution	Référence
Anti-lapin (vert)	Polyclonal	Chèvre	1:1 000	Molecular Probes (USA) #A11008
Anti-lapin (rouge)	Polyclonal	Chèvre	1:1 000	Molecular Probes (USA) #A11036
Anti-souris (vert)	Polyclonal	Chèvre	1:1 000	Molecular Probes (USA) #A11001
Anti-souris (rouge)	Polyclonal	Chèvre	1:1 000	Molecular Probes (USA) #A11004

Whatman humides, le gel, une membrane de PVDF (polyvinylidène difluorure), deux papiers Whatman humides et une éponge humide. La membrane de PVDF sur laquelle seront transférées les protéines a été préalablement immergée 1 minute dans du méthanol puis 10 minutes dans du tampon de transfert. Lorsque le sandwich est terminé, il est placé dans une cuve remplie de tampon de transfert, elle-même entourée de glace pour que le système reste bien froid. Le transfert des protéines du gel vers la membrane dure 2h à 70 V.

Blocking et révélation

Une fois le transfert terminé, la membrane sur laquelle se trouvent maintenant les protéines est récupérée. Elle est plongée dans une solution de Licor diluée 2 fois dans du PBS durant 1 heure à température ambiante. Cette étape vise à « bloquer » la membrane afin d'éviter par la suite les liaisons aspécifiques des anticorps. Lorsque la membrane est bloquée, elle peut alors être incubée dans une solution de Licor contenant 0,1% de Tween20 dans laquelle est dilué l'anticorps primaire. L'incubation se déroule toute la nuit à 4°C (ou 30 minutes à température ambiante pour le marquage de l' α -tubuline). Le lendemain, la membrane est rincée 4 fois avec du PBS auquel est ajouté 0,1% de Tween20 puis elle est incubée avec la solution d'anticorps secondaire, lui aussi dilué dans du Licor + 0,1% Tween20. Cette incubation dure 1 heure à température ambiante (ou 30 minutes pour le marquage de l' α -tubuline). La membrane est ensuite rincée à nouveau 4 fois avec du PBS + 0,1% Tween20 puis 2 fois avec du PBS avant d'être séchée entre deux feuilles de papier Whatman à l'abri de la lumière. Une fois sèche, elle est scannée à l'aide de l'appareil Odyssey Infrared Imaging System. Le fluorochrome de l'anticorps secondaire est excité et la fluorescence qu'il réémet est détectée par le système, ce qui permet de visualiser la protéine d'intérêt sur la membrane. La quantification des résultats obtenus est réalisée à l'aide du logiciel Odyssey. Notons que durant ce mémoire, nous avons utilisé l' α -tubuline comme contrôle de charge totale/cytoplasmique et la lamine B comme contrôle de charge nucléaire. La membrane peut ensuite être conservée entre deux feuilles de papier Whatman puis réhydratée, bloquée à nouveau et réincubée pour d'autres marquages.

VII. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique qui permet de visualiser une protéine d'intérêt dans la cellule. La protéine étudiée est reconnue par un anticorps dit « primaire ». Ce dernier est ensuite lui-même reconnu par un deuxième anticorps dit « secondaire » qui est couplé à un fluorochrome. Lorsque ce fluorochrome est excité par une lumière à une certaine longueur d'onde, il réémet dans une autre longueur d'onde, ce qui permet de visualiser le signal et donc de localiser la protéine étudiée.

1) Matériel

Voir tableaux II.15, II.16 et II.17

2) Méthode

Les cellules sont repiquées sur des lamelles couvre-objets stériles en verre à une densité de 8 000 cellules/cm² dans du milieu BME + 10% FBS (en routine) ou BME + 1% FBS (pour les cellules exposées aux UVB ou stimulées au TGF- β 1). Dans le cas

- MATERIEL & METHODES -

des stimulations au TGF- β 1, le repiquage est généralement effectué 24 heures après la dernière stimulation et dans le cas des expositions aux UVB 72 heures après le 10^{ième} stress (sauf indications contraires). La fixation des cellules et les marquages sont réalisés le lendemain (sauf indications contraires).

Le protocole général est détaillé ci-après.

Les cellules sont fixées 10 minutes dans du PBS auquel est ajouté 4% de paraformaldéhyde. Elles sont ensuite rincées 3 fois au PBS et perméabilisées pendant 5 minutes dans du PBS contenant 1% de Triton X100. Cette étape est importante pour permettre aux anticorps d'accéder aux protéines intracellulaires. L'étape suivante consiste en un « blocking », un processus qui vise à empêcher les liaisons aspécifiques des anticorps. Pour ce faire, les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS contenant 3% de BSA. Ensuite, chaque lamelle est incubée avec 30 μ L d'anticorps primaire (lui-même dilué dans du PBS + 3% BSA). L'incubation se réalise à 4°C durant toute la nuit (ou à température ambiante pendant 2 heures), en chambre humide. Cette chambre humide est confectionnée à partir d'une boîte de Petri dans laquelle on place un morceau de papier Whatman humidifié et est fermée hermétiquement à l'aide de parafilm. Ce système permet d'éviter l'assèchement des couvre-objets durant l'incubation. Le lendemain, les cellules sont rincées 3 fois au PBS + 3% BSA puis incubées avec 30 μ L d'anticorps secondaire (lui-même dilué dans du PBS + 3% BSA) durant 1 heure à température ambiante en chambre humide et dans l'obscurité. Après l'incubation, les cellules sont rincées 2 fois au PBS + 3% BSA puis 2 fois au PBS avant de procéder au marquage des noyaux. Au cours de ce mémoire, nous avons utilisé du TO-PRO-3 (dilué 80 fois dans du PBS + RNase 2 mg/mL, incubation de 35 minutes à température ambiante), du Hoechst (dilué 10 fois dans de l'eau puis 1 000 fois dans du PBS, 15 minutes à température ambiante) et du DAPI (dilué 1 000 fois dans du PBS, 15 minutes à température ambiante). Enfin, les cellules sont rincées 3 fois au PBS avant de monter les couvre-objets sur des lames à l'aide de Mowiol préchauffé à 60°C. Les lames sont stockées à 4°C en attendant d'être observées par microscopie confocale.

Ce protocole a été suivi pour tous les marquages réalisés, à une exception près.

Pour le marquage des CPDs et (6-4)PPs, les cellules sont fixées dans du PBS + 4% paraformaldéhyde pendant 10 minutes. Elles sont ensuite rincées 3 fois au PBS et perméabilisées pendant 5 minutes dans du PBS contenant 0,5% de Triton X100. Après 2 nouveaux rinçages au PBS, l'ADN est dénaturé en incubant les cellules dans une solution d'HCl 2M pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont alors rincées 3 fois au PBS puis bloquées dans du PBS + 20% FBS durant 30 minutes à 37°C. Après 3 rinçages au PBS, les lamelles sont incubées avec 30 μ L d'anticorps primaire (dilué dans du PBS + 5% FBS) durant la nuit à 37°C. Ensuite, les cellules sont à nouveau rincées 3 fois au PBS puis incubées avec 30 μ L d'anticorps secondaire (dilué dans du PBS + 5% FBS) durant 30 minutes à 37°C et dans l'obscurité. Après 3 nouveaux rinçages au PBS, les noyaux sont marqués et les lames sont montées comme décrit ci-avant.

VIII. Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été réalisée par ANOVA One Way (non significatif : $P > 0,05$; * : $0,05 > P > 0,01$; ** : $0,01 > P > 0,001$, *** : $P < 0,001$) grâce au logiciel SigmaPlot 12.5.

RESULTATS

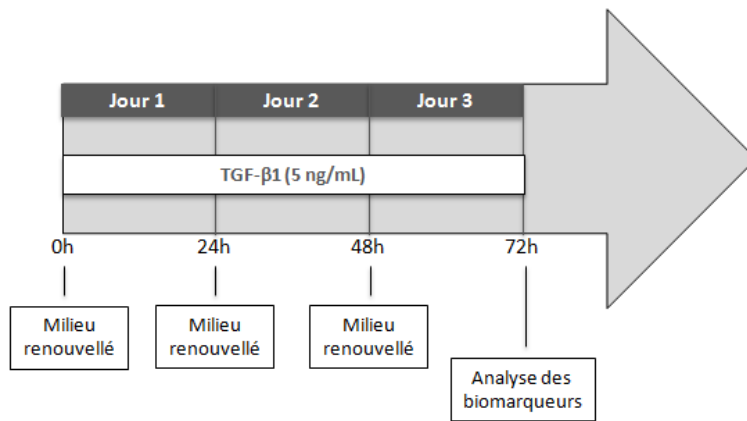


Figure III.1 : Protocole suivi pour la SIPS-TGF-β1

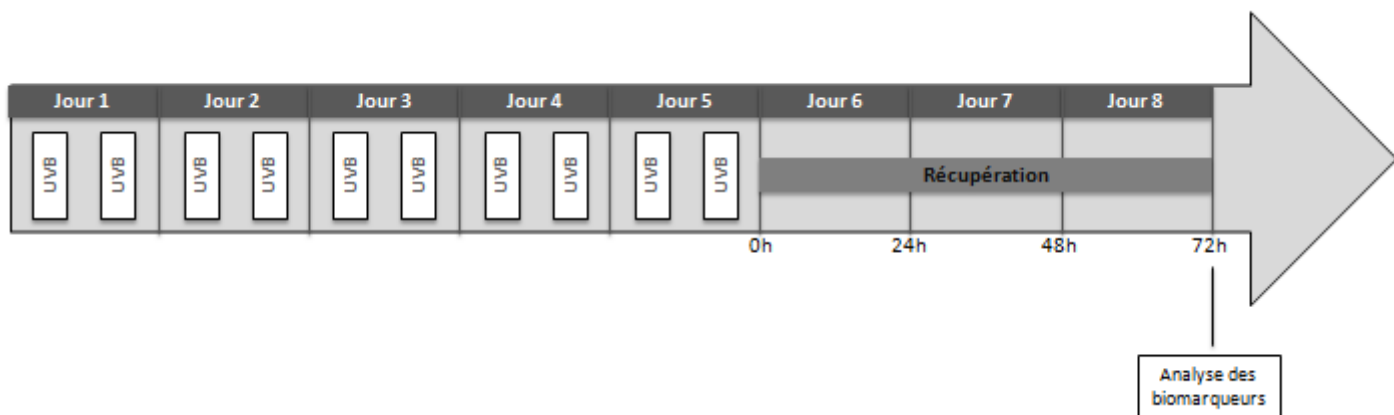


Figure III.2 : Protocole suivi pour la SIPS-UVB

- RESULTATS -

Durant ce mémoire, trois modèles *in vitro* ont été utilisés afin d'étudier la sénescence cellulaire : la sénescence répliquative (RS), la sénescence prématurée induite par le TGF- β 1 (SIPS-TGF- β 1) et la sénescence prématurée induite par les rayons UVB (SIPS-UVB).

Afin d'étudier la sénescence répliquative de fibroblastes humains de derme (HDFs), ceux-ci ont été maintenus en culture dans du BME + 10% FBS jusqu'à ce qu'ils cessent de proliférer. Les modèles de SIPS-TGF- β 1 et SIPS-UVB que nous avons utilisés dans ce mémoire ont été mis au point au laboratoire [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005]. Pour la SIPS-TGF- β 1, les fibroblastes ont été stimulés au TGF- β 1 à une concentration de 5 ng/mL dans du milieu BME + 1% FBS durant 72 heures, avec renouvellement du milieu toutes les 24 heures. De cette façon, au terme de 3 jours de stimulation, les HDFs entrent en sénescence prématurée (**Figure III.1**). Pour la SIPS-UVB, nous avons soumis les cellules à 2 expositions aux UVB par jour, à une dose de 250 mJ/cm², durant 5 jours consécutifs. La sénescence prématurée est ainsi obtenue 72 heures après le dernier stress UVB (**Figure III.2**).

Pour chaque modèle, l'induction de la sénescence a été vérifiée par l'analyse de différents biomarqueurs. Cependant, à l'heure actuelle, les voies de transduction du signal qui aboutissent à l'établissement de la sénescence sont encore mal connues et doivent être investiguées. Dans la littérature, une des pistes proposées concerne le TGF- β 1. En effet, une implication du TGF- β 1 dans l'apparition des biomarqueurs de sénescence a été suggérée dans différents modèles de SIPS [Fripiat *et al.*, 2001 ; Chainiaux *et al.*, 2002 ; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005 ; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2008]. En particulier, une surexpression du TGF- β 1 ainsi qu'une augmentation protéique de sa forme latente et active sont observées dans le modèle de SIPS-UVB utilisé dans ce mémoire [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005]. De plus, l'inhibition des voies dépendantes du TGF- β 1 par l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre le TGF- β 1 ou son récepteur T β RII après le dernier stress UVB empêche l'apparition des biomarqueurs de sénescence dans ce modèle. Ces données suggèrent que le TGF- β 1 est impliqué causalement dans l'induction de la sénescence après exposition chronique aux UVB. Toutefois, il reste à déterminer quelles sont les voies activées en aval du TGF- β 1 responsables de ce phénomène.

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons étudié l'activation de différentes voies dépendantes du TGF- β 1 dans nos deux modèles de SIPS. Dans ce mémoire, nous nous sommes particulièrement intéressés à la voie des Smads, voie canonique du TGF- β 1, aux MAPK p38 et ERK, ainsi qu'à la PI3K et à Rac1.

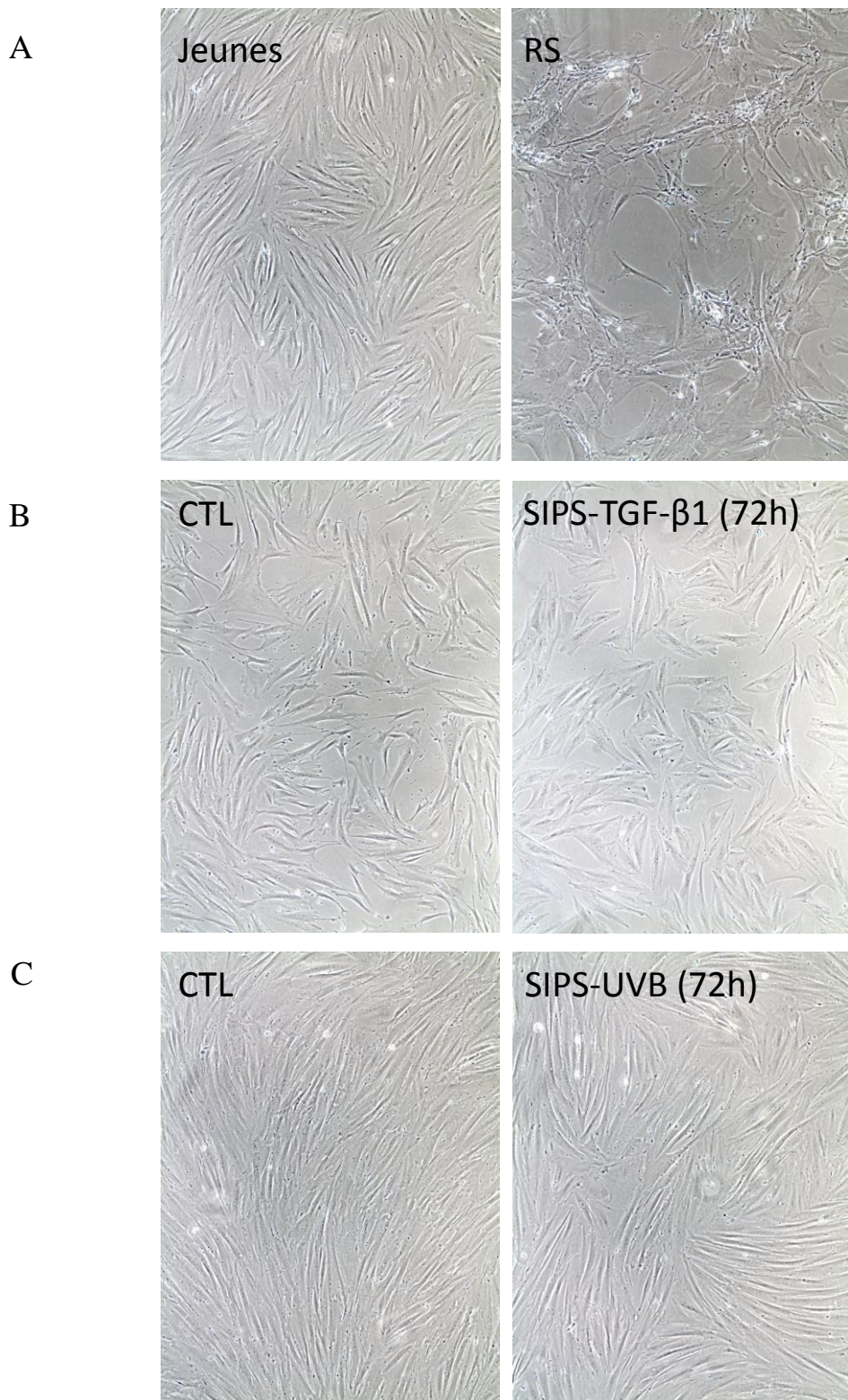


Figure III.3 : Morphologie des HDFs en condition de RS, de SIPS-TGF- β 1 (72h) et de SIPS-UVB (72h)

A) Comparaison de la morphologie de HDFs jeunes et en sénescence réplivative. B) Comparaison de la morphologie de HDFs soumis (ou non) à une stimulation chronique au TGF- β 1 durant 72 heures, à une concentration de 5 ng/mL. C) Comparaison de la morphologie de HDFs soumis (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm².
Microscope à contraste de phase, grossissement 63x.

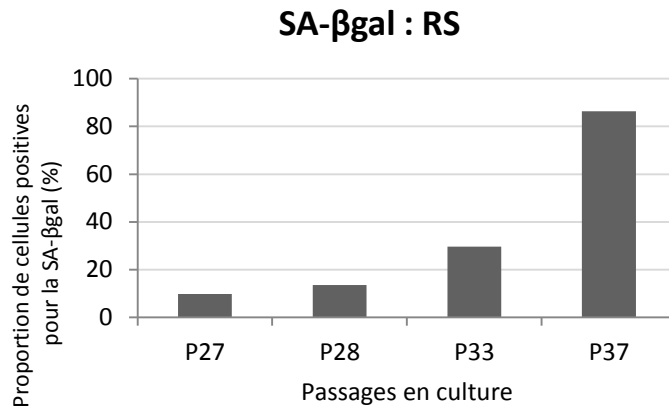
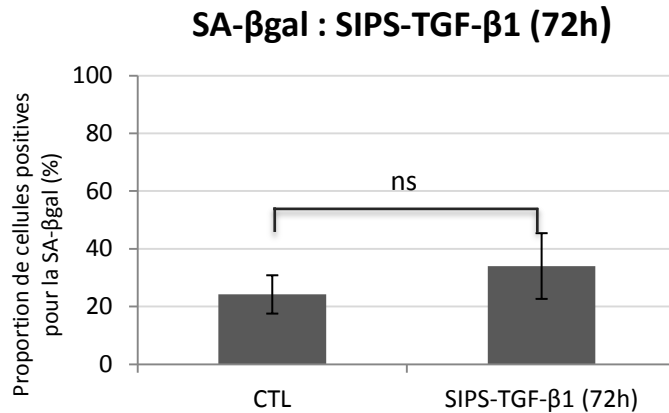
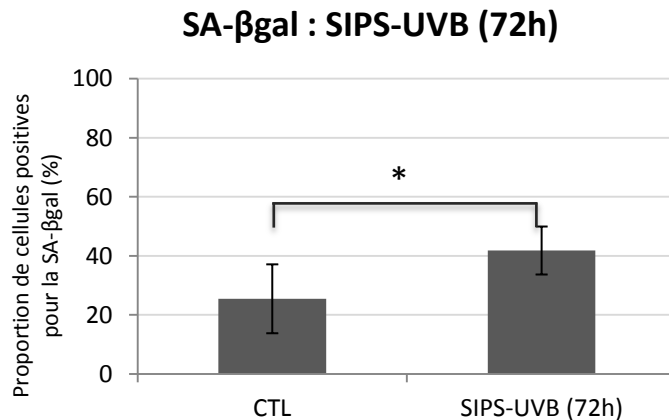
A**B****C**

Figure III.4 : Proportion de HDFs positifs pour l'activité SA-βgal en condition de RS, de SIPS-TGF-β1 (72h) et de SIPS-UVB (72h)

A) Proportion de HDFs positifs pour l'activité SA-βgal lors de différents passages en culture (n=1). Les cellules ont été repiquées pour le test d'activité SA-βgal et incubées le lendemain avec la solution de coloration durant 16 heures. **B)** Proportion de HDFs positifs pour l'activité SA-βgal soumis (ou non) à une stimulation chronique au TGF-β1 durant 72 heures, à une concentration de 5 ng/mL. Les cellules ont été repiquées pour le test d'activité SA-βgal après 72 heures de stimulation et incubées le lendemain avec la solution de coloration durant 16 heures. Les résultats sont présentés comme la moyenne de 4 expériences indépendantes (n=4) ± écart-type. **C)** Proportion de HDFs positifs pour l'activité SA-βgal soumis (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². Les cellules ont été repiquées pour le test d'activité SA-βgal 72 heures après la dernière exposition et incubées le lendemain avec la solution de coloration durant 16 heures. Les résultats sont présentés comme la moyenne de 5 expériences indépendantes (n=5) ± écart-type.

Environ 400 cellules sont comptées par puits. Une analyse statistique par ANOVA One Way a été réalisée en **B** et **C** (ns : non significatif, * : 0,05 > P > 0,01).

Gènes	RS			SIPS-TGF-β1 (72h)			SIPS-UVB (72h)		
	Moyenne (n=3)	Ecart-type	P value	Moyenne (n=4)	Ecart-type	P value	Moyenne (n=3)	Ecart-type	P value
<i>CTGF</i>	1,63	0,79	ns	2,38	1,86	ns	1,47	0,36	ns
<i>Fibronectine</i>	1,31	0,32	ns	1,47	0,55	ns	1,52	0,22	*
<i>Ostéonectine</i>	1,27	0,39	ns	1,65	0,28	**	1,51	0,02	***
<i>Apolipoprotéine J</i>	1,22	0,80	ns	2,29	1,26	ns	1,67	0,41	*
<i>TGF-β1</i>	0,89	0,26	ns	1,47	0,46	ns	1,24	0,18	ns
<i>CDKN2A</i>	2,03	0,26	**	1,70	0,79	ns	1,82	0,08	***
<i>CDKN1A</i>	1,19	0,40	ns	1,45	0,42	ns	1,86	0,27	**
<i>MMP1</i>	0,87	0,62	ns	0,21	0,13	***	2,81	1,19	ns
<i>MMP2</i>	0,60	0,19	*	1,33	0,47	ns	1,62	0,48	ns
<i>MMP14</i>	0,78	0,26	ns	2,14	1,27	ns	1,95	0,94	ns
<i>IL8</i>	0,72	0,97	ns	1,83	0,71	ns	3,38	1,22	*
<i>IL1β</i>	3,48	4,46	ns	0,61	0,60	ns	2,46	0,18	***
<i>VEGF</i>	0,81	0,18	ns	1,57	1,13	ns	1,15	0,09	*
<i>VCAM1</i>	3,30	3,87	ns	0,83	0,76	ns	0,84	0,16	ns
<i>MCPI</i>	2,18	1,44	ns	0,80	0,57	ns	1,59	0,21	**
<i>IGFBP3</i>	1,26	0,34	ns	1,07	0,79	ns	1,31	0,04	***
<i>IGFBP5</i>	0,58	0,32	ns	0,78	0,43	ns	1,57	0,67	ns

Figure III.5 : Profil d'expression génique de HDFs en condition de RS, de SIPS-TGF-β1 (72h) et de SIPS-UVB (72h)

A) Profil d'expression génique de HDFs en RS. Les résultats sont présentés comme la moyenne de l'abondance relative en ARNm lors de 3 expériences indépendantes (n=3). B) Profil d'expression génique de HDFs soumis à la SIPS-TGF-β1. Les cellules sont soumises (ou non) à une stimulation chronique au TGF-β1 durant 72 heures, à une concentration de 5 ng/mL et l'ARN total est extrait après les 72 heures de stimulation. Les résultats sont présentés comme la moyenne de l'abondance relative en ARNm lors de 4 expériences indépendantes (n=4). C) Profil d'expression génique de HDFs soumis à la SIPS-UVB. Les cellules sont soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm², et l'ARN total est extrait 72 heures après la dernière exposition. Les résultats sont présentés comme la moyenne de l'abondance relative en ARNm lors de 3 expériences indépendantes (n=3).

GAPDH a été utilisé comme gène de référence. Nous avons considéré que le gène était surexprimé si l'abondance relative en ARNm était supérieure à 1,3 (vert) et réprimé si elle était inférieure à 0,77 (rouge). L'écart-type a été calculé pour chaque valeur. Une analyse statistique par ANOVA One Way a été réalisée (ns : non significatif, * : 0,05 > P > 0,01 ; ** : 0,01 > P > 0,001, *** : P < 0,001).

I. Etude des biomarqueurs de sénescence en RS, SIPS-TGF- β 1 et SIPS-UVB

Il n'existe pas de biomarqueur unique déterminant la sénescence cellulaire, c'est la combinaison de plusieurs biomarqueurs qui permettra d'estimer l'état de sénescence. L'établissement de la sénescence a donc été vérifié dans chacun de nos modèles par l'analyse de différents biomarqueurs : changement morphologique, activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal) et profil d'expression génique caractéristique. Nous avons également observé la présence de différentes protéines impliquées dans le cycle cellulaire par comarquages en immunofluorescence. Dans nos modèles de SIPS, ces biomarqueurs ont été analysés après 3 jours de stimulation au TGF- β 1 ou 72 heures après le 10^e stress UVB.

Morphologie

Alors que les fibroblastes jeunes sont fusiformes, les HDFs en sénescence répliquative présentent un changement de morphologie important, caractérisé par un élargissement et un étalement notables des cellules (**Figure III.3A**).

Les fibroblastes soumis à la SIPS-TGF- β 1 exhibent une morphologie nettement plus étalée par rapport aux fibroblastes de la condition « contrôle » qui conservent leur aspect fusiforme (**Figure III.3B**).

Enfin, les fibroblastes en SIPS-UVB présentent une légère augmentation de taille. Celle-ci est toutefois moins marquée que dans les deux conditions précédentes (**Figure III.3C**).

Activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal)

L'évaluation de l'activité SA- β gal est à ce jour un des biomarqueurs de sénescence les plus couramment utilisés, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

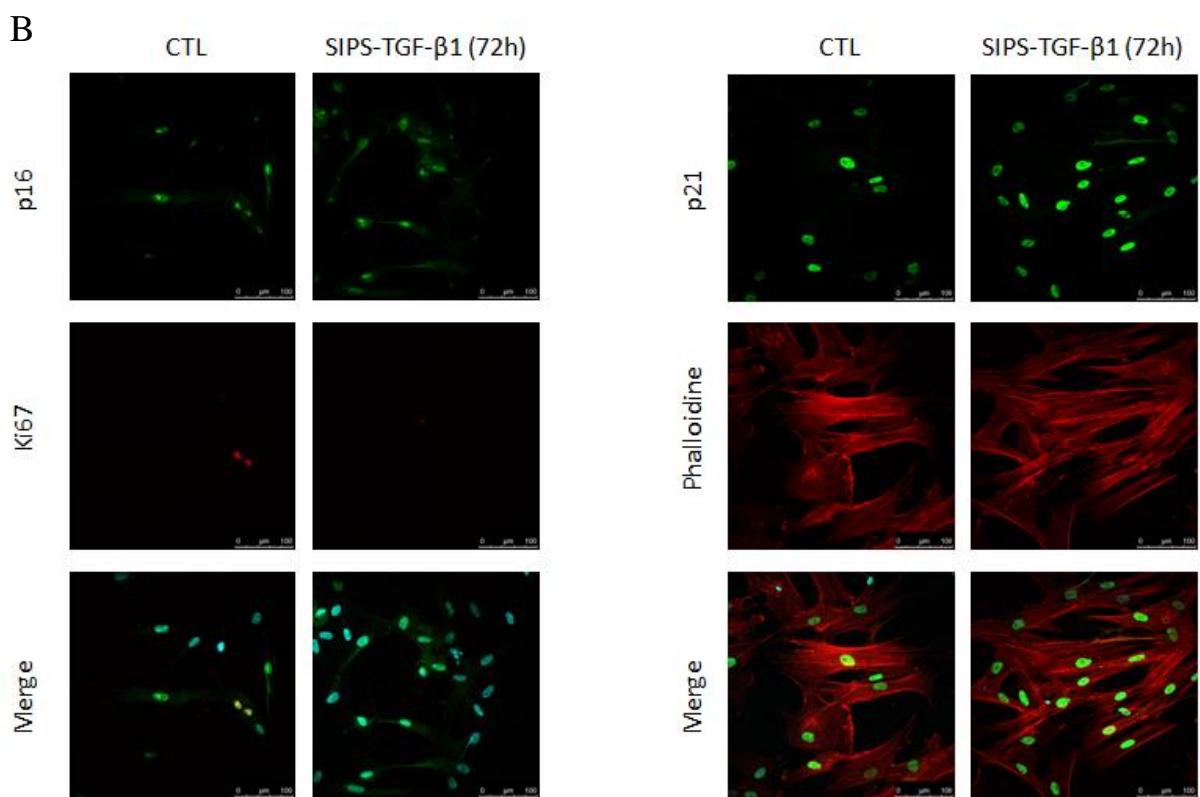
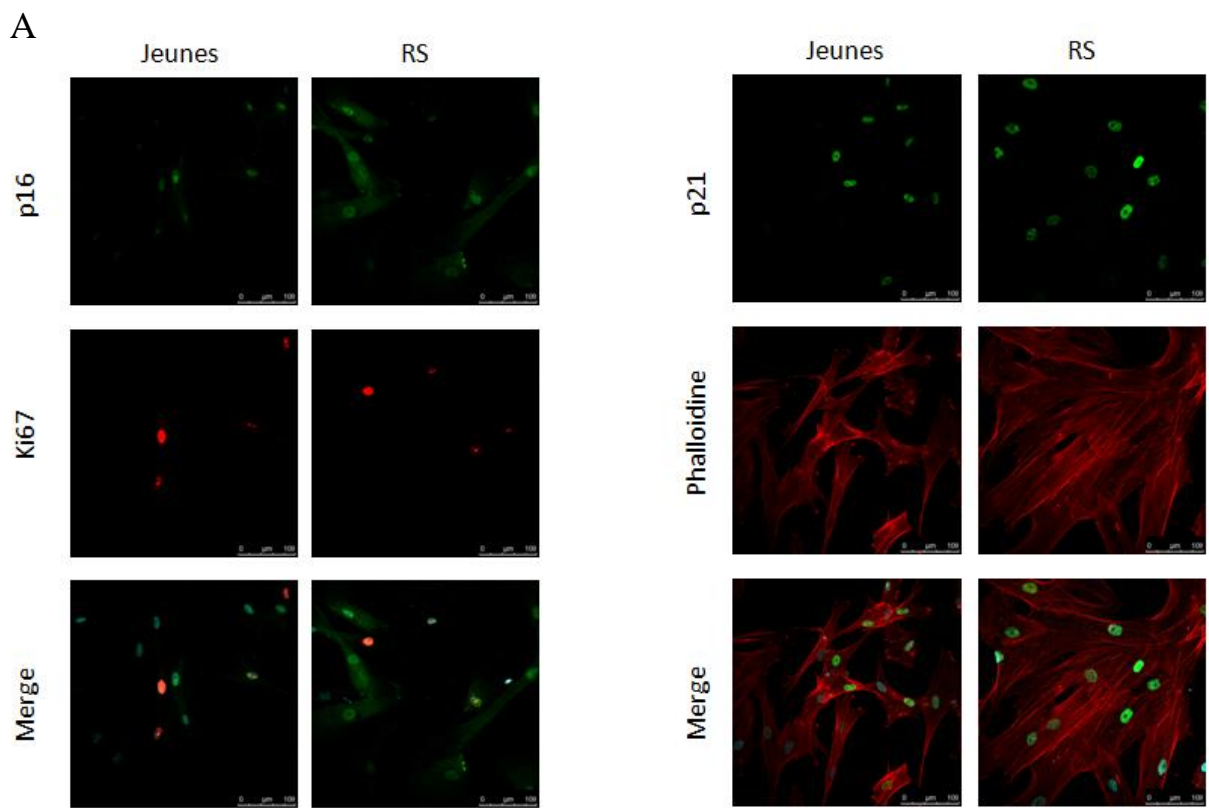
La proportion de HDFs positifs pour cette activité enzymatique augmente régulièrement au fil des passages en culture (**Figure III.4A**). Nous avons ainsi dénombré proportionnellement 9 fois plus de cellules positives en passage 37 (86,4%) qu'en passage 27 (9,7%).

Pour évaluer l'activité SA- β gal des fibroblastes après la SIPS-TGF- β 1, ceux-ci sont repiqués 24 heures après la dernière stimulation puis fixés et incubés avec la solution de coloration le lendemain. Nous avons ainsi observé que la proportion de cellules positives pour l'activité SA- β gal était 1,4 fois plus élevée dans les HDFs stimulés au TGF- β 1 durant 72 heures (34%) que dans les HDFs contrôles (24,2%) (**Figure III.4B**). Cette augmentation n'est toutefois pas significative.

Pour évaluer l'activité SA- β gal des fibroblastes après la SIPS-UVB, ceux-ci sont repiqués 72 heures après le dernier stress UVB puis fixés et incubés avec la solution de coloration le lendemain. De cette façon, nous avons montré que la proportion de cellules positives pour l'activité SA- β gal était 1,6 fois plus élevée dans les HDFs exposés aux UVB (41,8%) que dans les HDFs contrôles (25,4%) (**Figure III.4C**). Cette différence est statistiquement significative.

Profil d'expression génique

Les cellules sénescents sont également caractérisées par un profil d'expression génique particulier. Durant ce mémoire, nous avons donc analysé l'expression de différents gènes liés à la sénescence par PCR semi-quantitative en temps réel dans des fibroblastes en sénescence répliquative, en SIPS-TGF- β 1 et en SIPS-UVB (**Figure III.5**). Nous avons pris un cut off



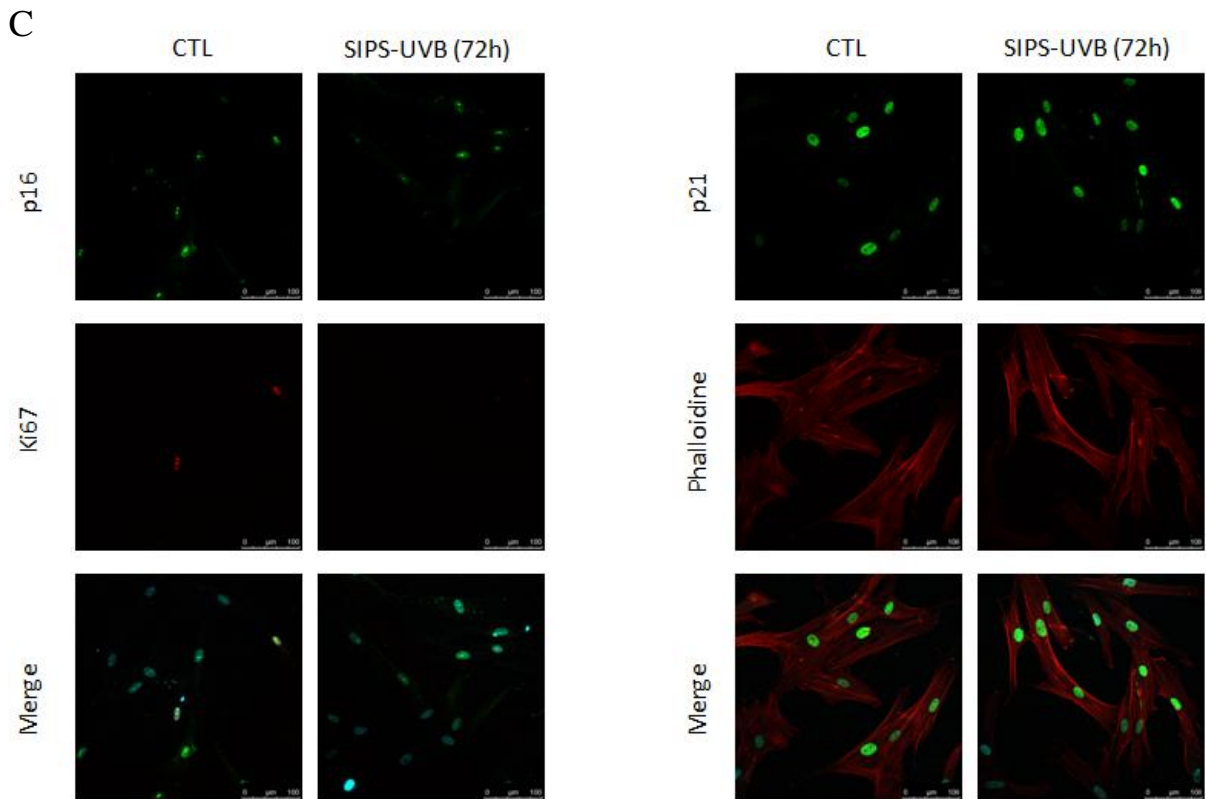


Figure III.6 : Visualisation de différents biomarqueurs de sénescence dans des HDFs en condition de RS, de SIPS-TGF- β 1 (72h) et de SIPS-UVB (72h)

A) Images représentatives montrant les comarquages obtenus pour p16/Ki67 (n=1) et p21/phalloïdine (n=2), dans des HDFs jeunes ou en sénescence réplivative. Les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² et fixées 24 heures plus tard. **B)** Images représentatives montrant les comarquages obtenus pour p16/Ki67 (n=3) et p21/phalloïdine (n=3), dans des HDFs soumis (ou non) à une stimulation chronique au TGF- β 1 durant 72 heures, à une concentration de 5 ng/mL. Les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² après 72 heures de stimulation et fixées le lendemain. **C)** Images représentatives montrant les comarquages obtenus pour p16/Ki67 (n=1) et p21/phalloïdine (n=1), dans des HDFs soumis (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². Les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² 72 heures après la dernière exposition et fixées le lendemain.

Les marquages ont été visualisés par microscopie confocale à fluorescence (échelle = 100 μ m). Les noyaux ont été colorés en bleu par du TO-PRO-3 ou du Hoechst.

- RESULTATS -

arbitraire de 30% pour déterminer si l'expression génique était modifiée (surexprimée ou réprimée). Le gène *GAPDH* a été utilisé comme gène de référence.

Les résultats présentés correspondent à 3 ou 4 expériences indépendantes. Nous avons observé une variabilité entre les résultats obtenus dans ces réplicats biologiques, rendant la plupart des données statistiques non significatives. Des tendances peuvent toutefois se dégager des résultats obtenus.

Parmi les gènes dont l'expression varie lors de la sénescence, une surexpression de l'*apolipoprotéine J*, de la *fibronectine*, de l'*ostéonectine* et du *CTGF* est souvent observée [Gonos *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2004]. Lors de ce mémoire, nous avons pu confirmer une surexpression du *CTGF* et de la *fibronectine*, et une tendance vers la surexpression de l'*ostéonectine* (1,27) et de l'*apolipoprotéine J* (1,22) en sénescence réplivative. La surexpression de ces quatre gènes a été confirmée dans nos modèles de SIPS-TGF- β 1 et SIPS-UVB.

Dans le modèle de SIPS-TGF- β 1, nous avons montré que le gène codant pour le TGF- β 1 est aussi surexprimé, ce qui suggère l'existence d'une boucle d'amplification positive du TGF- β 1 dans ce modèle.

L'expression des régulateurs négatifs du cycle cellulaire p16 et p21 (codés respectivement par les gènes *CDKN2A* et *CDKN1A*) est aussi modifiée dans nos trois modèles. En effet, nous avons montré une surexpression hautement significative du gène *CDKN2A* en sénescence réplivative. Une surexpression de *CDKN2A* et *CDKN1A* est aussi observée en SIPS-TGF- β 1 et en SIPS-UVB.

Les métalloprotéinases matricielles présentent également des changements d'expression dans nos modèles. Ainsi, une répression de *MMP2* et de *MMP1* est observée en sénescence réplivative et en SIPS-TGF- β 1, respectivement. Les fibroblastes en SIPS-TGF- β 1 présentent une surexpression de *MMP2* et *MMP14* et ceux en SIPS-UVB une surexpression de *MMP1*, *MMP2* et *MMP14*.

Enfin, nous avons également observé des changements d'expression au niveau des interleukines *IL8* et *IL1 β* . En particulier, l'expression de ces gènes est augmentée de façon significative (pour l'*IL8*) et très hautement significative (pour l'*IL1 β*) en SIPS-UVB.

Ces résultats montrent des similitudes d'expression génique entre les 3 modèles mais également des modifications spécifiques. Afin d'augmenter la puissance statistique de nos données, il semble nécessaire de répéter ces analyses dans de nouveaux réplicats biologiques.

Protéines impliquées dans la prolifération cellulaire

Etant donné que la sénescence est avant tout définie par un arrêt irréversible du cycle cellulaire, nous avons marqué par immunofluorescence différentes protéines liées à la prolifération dans des fibroblastes en sénescence réplivative (**Figure III.6A**), en SIPS-TGF- β 1 (**Figure III.6B**) et en SIPS-UVB (**Figure III.6C**).

De cette manière, nous avons pu montrer que la présence de l'inhibiteur de CDK (CDKI) p16 semble augmenter dans les fibroblastes en RS et en SIPS-TGF- β 1, mais pas en SIPS-UVB. A l'inverse, la présence de Ki67, un marqueur de prolifération, est réduite dans le noyau des cellules en SIPS-TGF- β 1 et en SIPS-UVB, mais ne semble pas modifiée en RS. Le marquage

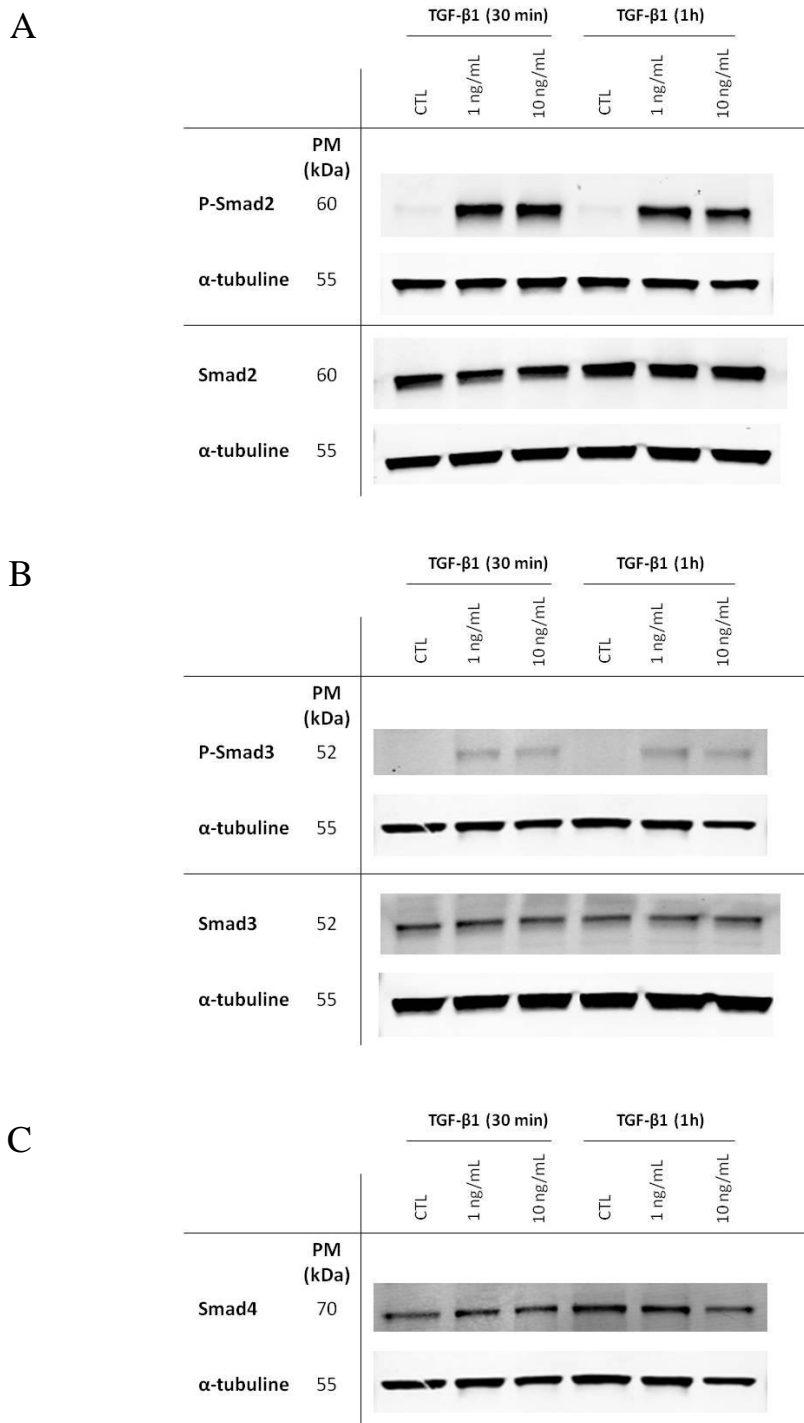


Figure III.7 : Activation de la voie TGF- β 1/Smads après une stimulation unique au TGF- β 1 (extraits protéiques totaux)

Analyse de l'abondance protéique de **A) P-Smad2 et Smad2, B) P-Smad3 et Smad3 et C) Smad4** par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à une stimulation unique au TGF- β 1. Les cellules ont été déprivées en sérum pendant 1 heure puis stimulées (ou non) au TGF- β 1 durant 30 minutes ou 1 heure, à une concentration de 1 ng/mL ou 10 ng/mL, dans du BME + 1% FBS. L'extraction des protéines totales a été réalisée dès la fin de la stimulation et un Western Blot a été réalisé. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

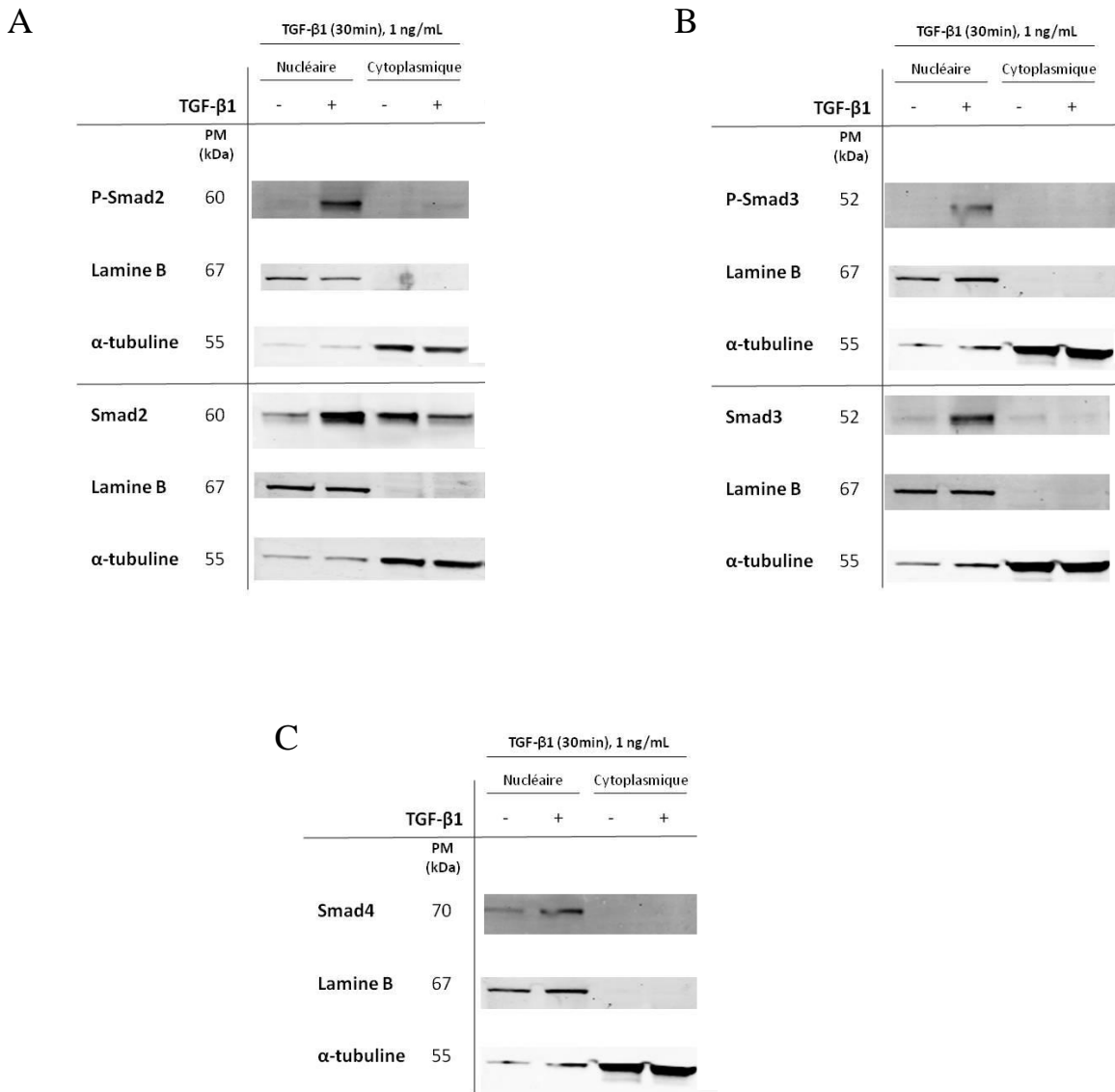


Figure III.8 : Activation de la voie TGF-β1/Smads après une stimulation unique au TGF-β1 (extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques)

Analyse de l'abondance protéique de **A**) P-Smad2 et Smad2, **B**) P-Smad3 et Smad3 et **C**) Smad4 par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à une stimulation unique au TGF-β1. Les cellules ont été déprivées en sérum pendant 1 heure puis stimulées (ou non) au TGF-β1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée dès la fin de la stimulation et un Western Blot a été réalisé. La lamine B a été utilisée comme contrôle de charge nucléaire et l'α-tubuline comme contrôle de charge cytoplasmique.

pour p21, un autre inhibiteur de CDK, semble aussi augmenter légèrement en RS et en SIPS-TGF- β 1, mais pas en SIPS-UVB.

Nous avons également utilisé la phalloïdine, qui marque l'actine, pour visualiser la morphologie cellulaire. Nous avons ainsi observé une morphologie étalée des fibroblastes en RS tandis qu'aucune différence morphologique n'a été mise en évidence entre les fibroblastes en SIPS-TGF- β 1 ou en SIPS-UVB par rapport aux fibroblastes contrôles.

L'ensemble des résultats obtenus pour l'étude de ces biomarqueurs confirme l'augmentation de la proportion de cellules sénescentes en conditions de RS, de SIPS-TGF- β 1 et de SIPS-UVB, à des degrés divers.

II. Etude de l'activation de la voie canonique du TGF- β 1

La voie des Smads est considérée comme la voie canonique du TGF- β 1. Elle débute par la liaison du TGF- β 1 à ses récepteurs membranaires T β RII et T β RI qui s'activent alors et phosphorylent les R-Smads Smad2 et Smad3. Cette phosphorylation permet aux R-Smads de se lier à Smad4 pour former un complexe trimérique. Ce complexe transloque alors dans le noyau où les R-Smads se lient à l'ADN et permettent de moduler l'expression génique (**Figure I.9**).

Dans ce mémoire, nous avons étudié l'activation de cette voie dans les modèles de SIPS-TGF- β 1 et SIPS-UVB. Pour ce faire, nous avons investigué à la fois l'abondance, la phosphorylation et la localisation subcellulaire de ces protéines par analyse en Western Blot d'extraits protéiques totaux, nucléaires et cytoplasmiques, et par imagerie en immunofluorescence. Nous avons réalisé l'étude de cette voie de signalisation à différents temps après la première stimulation au TGF- β 1 (pour la SIPS-TGF- β 1) ou après la dernière exposition aux UVB (pour la SIPS-UVB).

1) *Etude de la voie des Smads après une stimulation unique au TGF- β 1*

Avant d'étudier l'activation de la voie des Smads dans les modèles de SIPS, nous avons mis au point un contrôle positif pour l'activation de cette voie.

Nous avons soumis les HDFs à une heure de déprivation en sérum suivie par une stimulation unique au TGF- β 1 à une concentration de 1 ng/mL ou 10 ng/mL, durant 30 minutes ou 1 heure, avant de procéder à une extraction des protéines totales (**Figure III.7**). L'analyse de ces extraits par Western Blot révèle la présence de P-Smad2 et P-Smad3 uniquement dans les cellules stimulées au TGF- β 1, sans différence d'abondance notable entre les différentes concentrations et les différents temps d'incubation testés. L'abondance des formes totales Smad2 et Smad3 semble constante dans toutes les conditions, tout comme l'abondance de Smad4 qui ne semble pas varier (**Figure III.7C**). Dès lors, nous avons choisi d'utiliser par la suite une stimulation unique des cellules avec 1 ng/mL de TGF- β 1 durant 30 minutes comme contrôle positif d'activation de la voie des Smads.

Etant donné que les Smads transloquent dans le noyau une fois activées, nous avons voulu vérifier cette translocation en réalisant des extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques (**Figure III.8**). Nous avons ainsi pu confirmer la présence de P-Smad2 et P-Smad3 uniquement après stimulation au TGF- β 1 et ce, exclusivement dans les extraits nucléaires. La protéine Smad2 totale a été détectée dans tous les extraits (**Figure III.8A**). Cependant, son

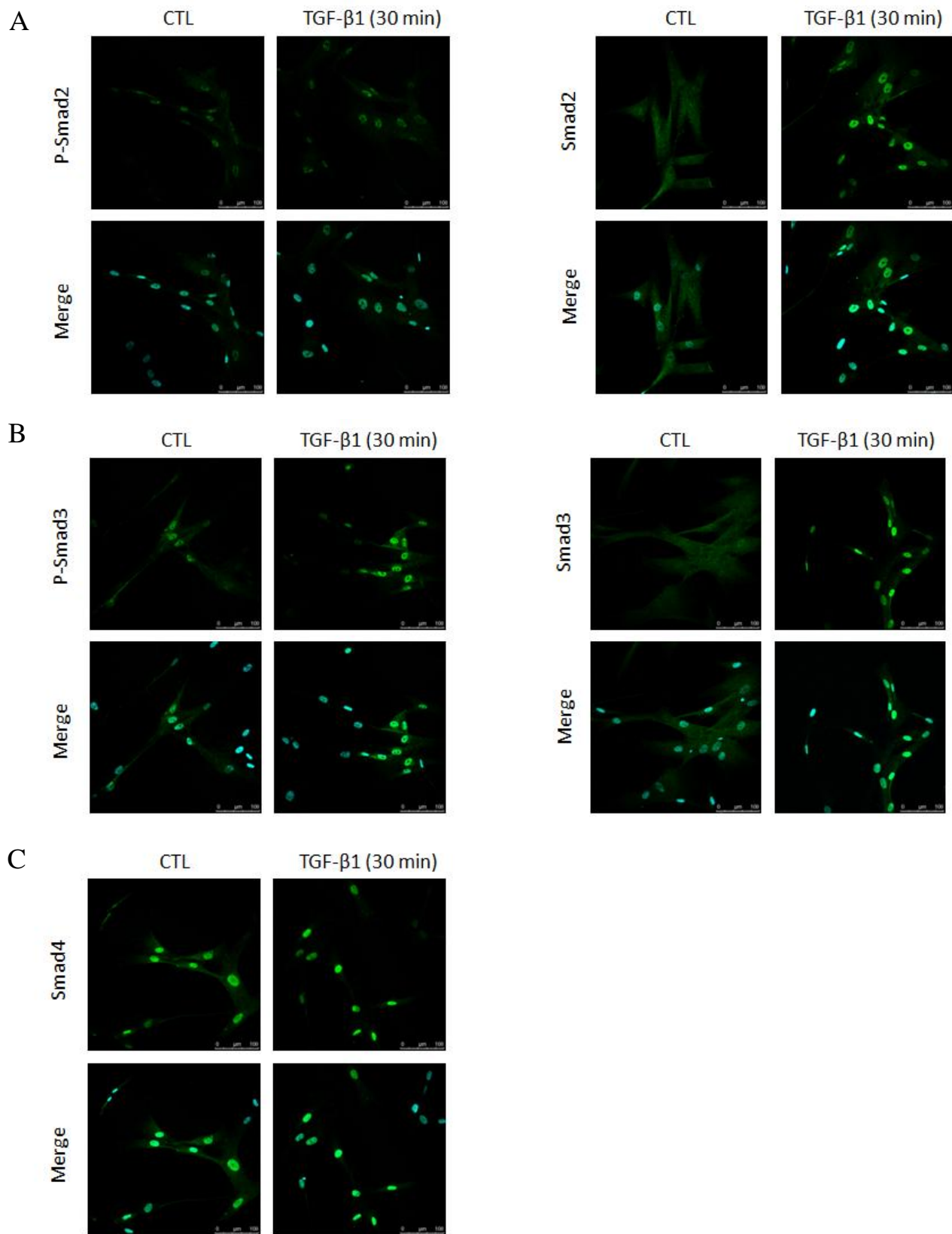
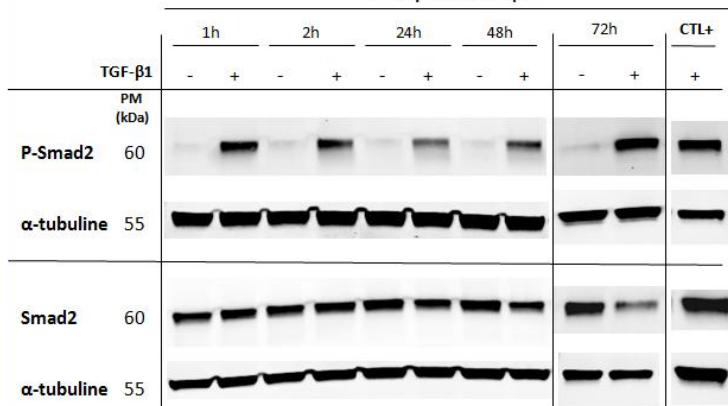


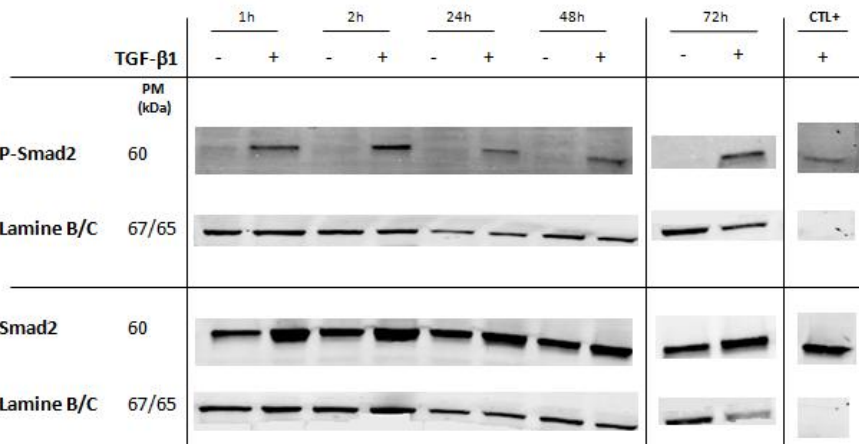
Figure III.9 : Activation de la voie TGF- β 1/Smads après une stimulation unique au TGF- β 1 (visualisation en immunofluorescence)

Images représentatives montrant les marquages obtenus pour **A)** P-Smad2 et Smad2, **B)** P-Smad3 et Smad3 et **C)** Smad4 dans des HDFs soumis (ou non) à une stimulation unique au TGF- β 1. Les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm², déprivées en sérum pendant 1 heure puis stimulées (ou non) au TGF- β 1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS, avant d'être fixées. Les marquages ont été visualisés par microscopie confocale à fluorescence (échelle = 100 μ m). Les noyaux ont été colorés en bleu par du Hoechst.

EXTRAITS TOTAUX



EXTRAITS NUCLEAIRES



EXTRAITS CYTOPLASMIQUES

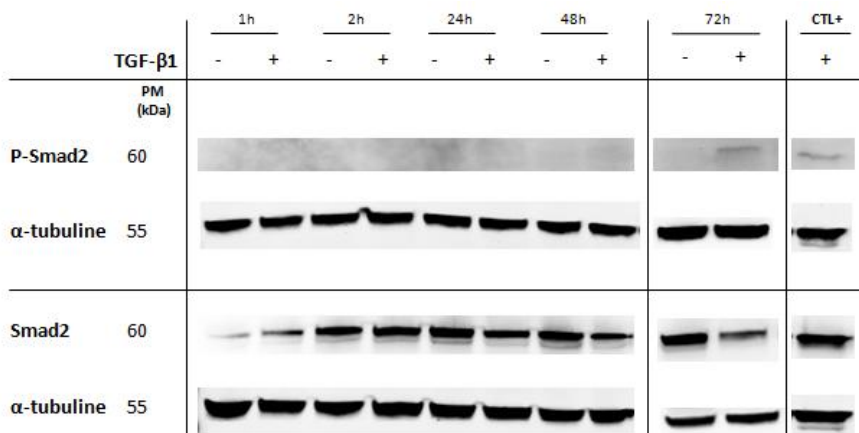


Figure III.10 : Cinétique d'activation de Smad2 en condition de SIPS-TGF- β 1 (extraits protéiques totaux, nucléaires et cytoplasmiques)

Analyse de l'abondance protéique de P-Smad2 et Smad2 par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-TGF- β 1. Les cellules ont été stimulées (ou non) au TGF- β 1 durant 72 heures (avec renouvellement du TGF- β 1 toutes les 24 heures), à une concentration de 5 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'extraction des protéines totales, nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée à 1h, 2h, 24h, 48h et 72h après la 1ère stimulation et des Western Blots ont été réalisés. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge totale et cytoplasmique et les lamines B (1h-48h et CTL+) ou C (72h) comme contrôles de charge nucléaire. Le contrôle positif (CTL+) correspond à des extraits protéiques totaux de HDFs soumis à une déprivation en sérum d'1 heure suivie d'une stimulation unique au TGF- β 1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'expérience avec les extraits nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée 1 fois (n=1). L'expérience avec les extraits totaux aux temps 1h, 2h, 24h, 48h a été réalisée 2 fois (n=2) et au temps 72h, 4 fois (n=4).

abondance est plus élevée dans le noyau des cellules stimulées au TGF- β 1. A l'inverse, elle est plus faible dans le compartiment cytoplasmique de ces cellules. La forme totale Smad3 a été détectée de façon prédominante dans le compartiment nucléaire après stimulation au TGF- β 1 (**Figure III.8B**). Enfin, la présence de Smad4 n'a été décelée que dans les extraits nucléaires avec une abondance accrue après stimulation au TGF- β 1 (**Figure III.8C**).

Cette activation de la voie des Smads a été confirmée par visualisation en immunofluorescence. En effet, nous avons observé une nette translocation nucléaire des protéines Smad2 (**Figure III.9A**) et Smad3 (**Figure III.9B**) dans la condition traitée au TGF- β 1. La visualisation de Smad4 n'a pas révélé de différence par rapport aux cellules non-exposées au TGF- β 1 (**Figure III.9C**).

En conclusion, nous avons pu montrer que la voie des Smads était activée après seulement 30 minutes de stimulation au TGF- β 1, à une concentration de 1 ng/mL. Cette activation a été démontrée d'une part par la détection en Western Blot des formes phosphorylées de Smad2 et Smad3 uniquement dans les extraits protéiques totaux et nucléaires des fibroblastes stimulés. D'autre part, nous avons confirmé cette activation par visualisation en immunofluorescence de la translocation nucléaire de Smad2 et Smad3 dans les cellules traitées. Par la suite, nous avons donc utilisé ce modèle de stimulation unique au TGF- β 1 (30 minutes, 1 ng/mL) comme contrôle positif d'activation de la voie des Smads.

2) *Etude de la voie des Smads en SIPS-TGF- β 1*

Après avoir validé notre contrôle positif, nous avons étudié le profil d'activation de la voie des Smads dans le modèle de SIPS-TGF- β 1, à différents temps au cours des 3 jours de stimulation. Pour cela, les cellules ont été stimulées (ou non) au TGF- β 1 durant 72 heures (avec renouvellement du TGF- β 1 toutes les 24 heures), à une concentration de 5 ng/mL dans du BME + 1% FBS, et l'extraction de protéines totales a été réalisée à 1h, 2h, 24h, 48h et 72h après le début de la stimulation. Afin de déterminer la localisation subcellulaire des différentes Smads, nous avons procédé à la même expérience mais cette fois en réalisant des extraits de protéines nucléaires et cytoplasmiques suivant la même cinétique.

○ Cinétique d'activation de Smad2 (**Figure III.10**)

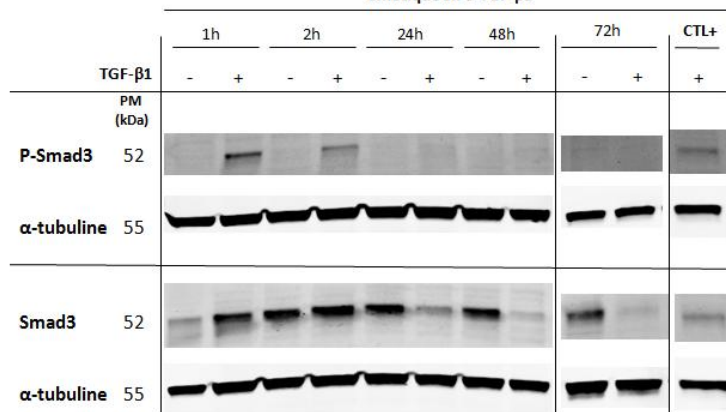
Dans les extraits totaux, nous avons pu mettre en évidence que P-Smad2 était présente du début à la fin de la stimulation exclusivement dans les fibroblastes traités vu sa détection par Western Blot à tous les temps testés. Nous avons observé le même profil d'abondance dans les extraits nucléaires que dans les totaux. Par ailleurs, P-Smad2 n'est quasiment pas détecté dans les extraits cytoplasmiques, ce qui est indiquer que P-Smad2 est principalement localisée dans le noyau.

La forme totale Smad2 est détectée dans les extraits totaux à la fois dans les cellules contrôles et traitées mais son abondance semble diminuer dans les fibroblastes exposés au TGF- β 1 à partir de 24h de stimulation, pour finalement devenir évidente à 72h. Smad2 est également détecté dans les extraits nucléaires avec une abondance plus élevée dans les cellules stimulées au TGF- β 1 et ce, à tous les temps testés. Enfin, Smad2 présente le même profil d'abondance dans les extraits cytoplasmiques que dans les extraits totaux, à savoir une diminution d'abondance à partir de 24h de stimulation dans les fibroblastes traités.

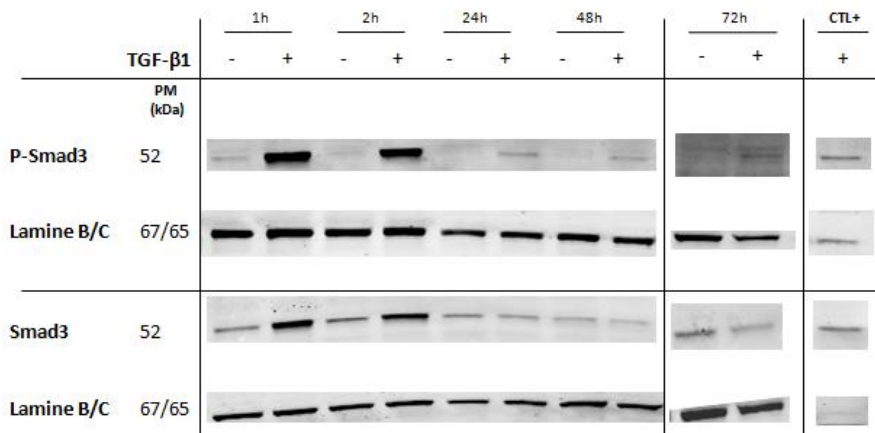
Ceci démontre l'activation et la translocation nucléaire de Smad2 à court et à long terme au cours de la SIPS-TGF- β 1.

Cinétique SIPS-TGF- β 1

EXTRAITS TOTAUX



EXTRAITS NUCLEAIRES



EXTRAITS CYTOPLASMIQUES

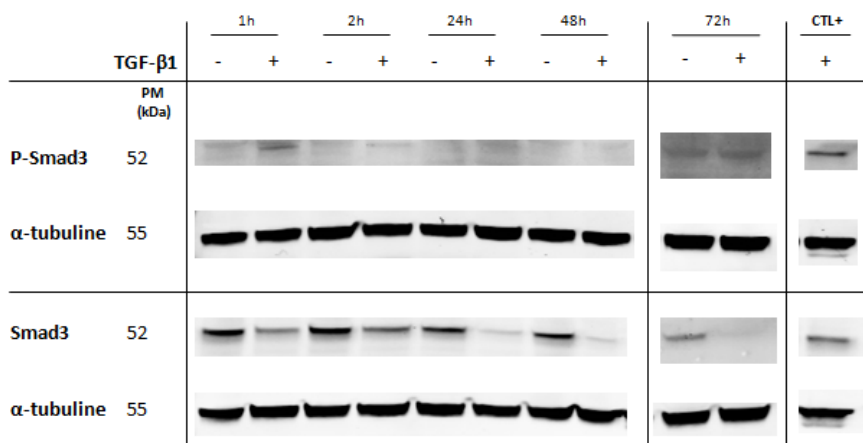
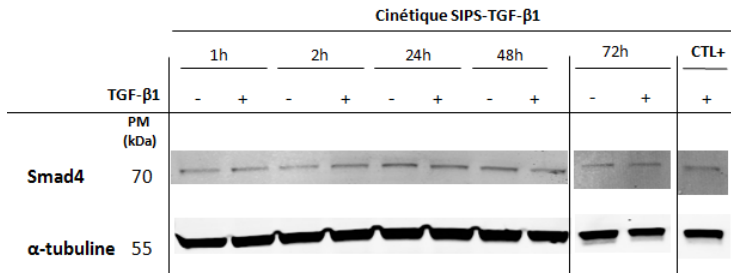


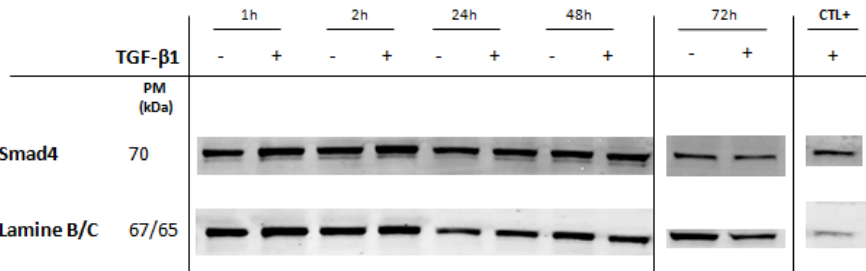
Figure III.11 : Cinétique d'activation de Smad3 en condition de SIPS-TGF- β 1 (extraits protéiques totaux, nucléaires et cytoplasmiques)

Analyse de l'abondance protéique de P-Smad3 et Smad3 par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-TGF- β 1. Les cellules ont été stimulées (ou non) au TGF- β 1 durant 72 heures (avec renouvellement du TGF- β 1 toutes les 24 heures), à une concentration de 5 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'extraction des protéines totales, nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée à 1h, 2h, 24h, 48h et 72h après la 1ère stimulation et des Western Blots ont été réalisés. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge totale et cytoplasmique et les lamines B (1h-48h et CTL+) ou C (72h) comme contrôles de charge nucléaire. Le contrôle positif (CTL+) correspond à des extraits protéiques totaux de HDFs soumis à une déprivation en sérum d'1 heure suivie d'une stimulation unique au TGF- β 1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'expérience avec les extraits nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée 1 fois (n=1). L'expérience avec les extraits totaux aux temps 1h, 2h, 24h, 48h a été réalisée 2 fois (n=2) et au temps 72h, 4 fois (n=4).

EXTRAITS TOTAUX



EXTRAITS NUCLEAIRES



EXTRAITS CYTOPLASMIQUES

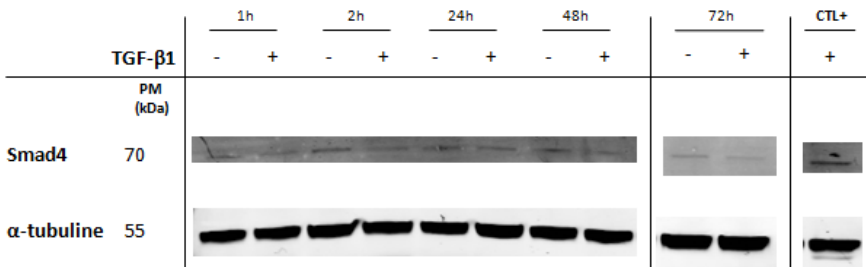


Figure III.12 : Cinétique d'activation de Smad4 en condition de SIPS-TGF- β 1 (extraits protéiques totaux, nucléaires et cytoplasmiques)

Analyse de l'abondance protéique de Smad4 par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-TGF- β 1. Les cellules ont été stimulées (ou non) au TGF- β 1 durant 72 heures (avec renouvellement du TGF- β 1 toutes les 24 heures), à une concentration de 5 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'extraction des protéines totales, nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée à 1h, 2h, 24h, 48h et 72h après la 1ère stimulation et des Western Blots ont été réalisés. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge totale et cytoplasmique et les lamines B (1h-48h et CTL+) ou C (72h) comme contrôles de charge nucléaire. Le contrôle positif (CTL+) correspond à des extraits protéiques totaux de HDFs soumis à une déprivation en sérum d'1 heure suivie d'une stimulation unique au TGF- β 1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'expérience avec les extraits nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée 1 fois (n=1). L'expérience avec les extraits totaux aux temps 1h, 2h, 24h, 48h a été réalisée 2 fois (n=2) et au temps 72h, 4 fois (n=4).

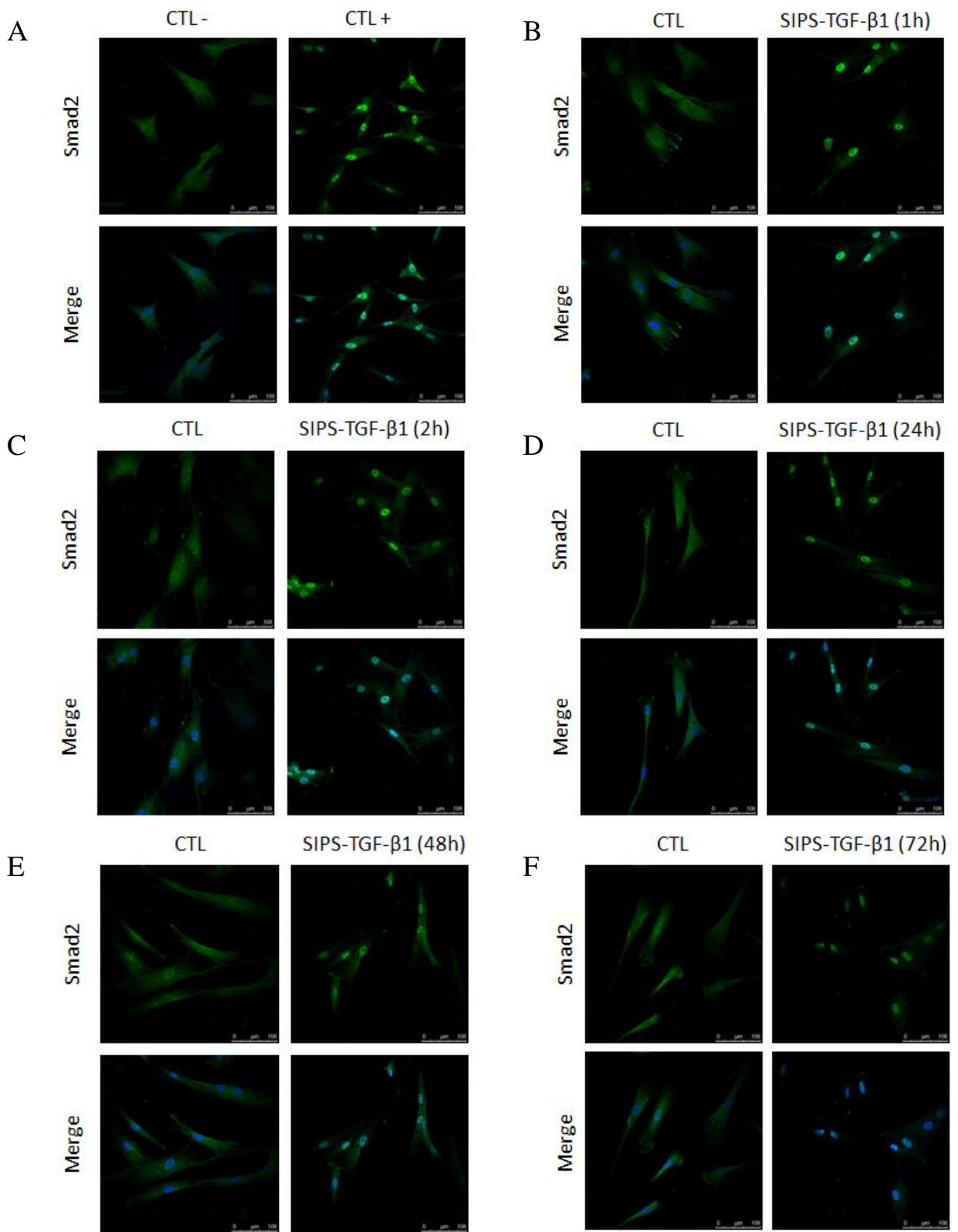


Figure III.13 : Cinétique d'activation de Smad2 en condition de SIPS-TGF- β 1 (visualisation en immunofluorescence)

Images représentatives montrant les marquages obtenus pour Smad2 dans des HDFs soumis (ou non) à 1h (B), 2h (C), 24h (D), 48h (E) ou 72h (F) de stimulation au TGF- β 1. Les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm², puis stimulées au TGF- β 1, à une concentration de 5 ng/mL, dans du BME + 1% FBS, avec renouvellement du TGF- β 1 toutes les 24 heures. Elles ont ensuite été fixées 1h, 2h, 24h, 48h ou 72h après la 1ère stimulation. Pour les CTL+ et CTL- (A), les cellules ont été soumises à une déprivation en sérum d'1 heure suivie (ou non) d'une stimulation unique au TGF- β 1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. Les marquages ont été visualisés par microscopie confocale à fluorescence (échelle = 100 μm). Les noyaux ont été colorés en bleu par du TO-PRO-3. Les marquages à 1h, 2h et 24h ont été réalisés 2 fois (n=2), le marquage à 48h a été réalisé 1 fois (n=1) et le marquage à 72h a été réalisé 3 fois (n=3). Les images présentées ici proviennent de la même expérience.

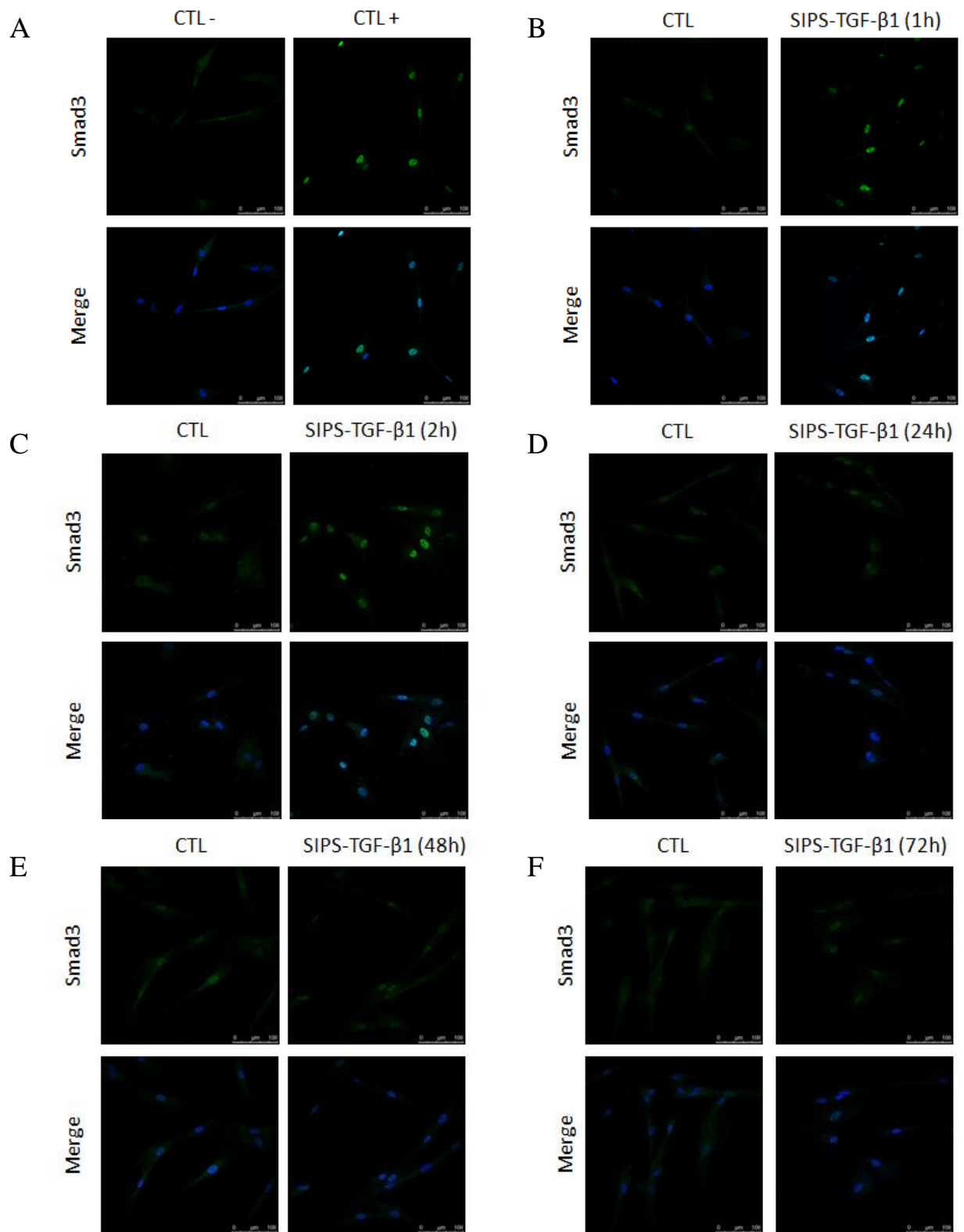


Figure III.14 : Cinétique d'activation de Smad3 en condition de SIPS-TGF-β1 (visualisation en immunofluorescence)

Images représentatives montrant les marquages obtenus pour Smad3 dans des HDFs soumis (ou non) à 1h (B), 2h (C), 24h (D), 48h (E) ou 72h (F) de stimulation au TGF-β1. Les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm², puis stimulées au TGF-β1, à une concentration de 5 ng/mL, dans du BME + 1% FBS, avec renouvellement du TGF-β1 toutes les 24 heures. Elles ont ensuite été fixées 1h, 2h, 24h, 48h ou 72h après la 1^{ère} stimulation. Pour les CTL+ et CTL- (A), les cellules ont été soumises à une déprivation en sérum d'1 heure suivie (ou non) d'une stimulation unique au TGF-β1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. Les marquages ont été visualisés par microscopie confocale à fluorescence (échelle = 100 μm). Les noyaux ont été colorés en bleu par du TO-PRO-3. Les marquages à 1h, 2h et 24h ont été réalisés 2 fois (n=2), le marquage à 48h a été réalisé 1 fois (n=1) et le marquage à 72h a été réalisé 3 fois (n=3). Les images présentées ici proviennent de la même expérience.

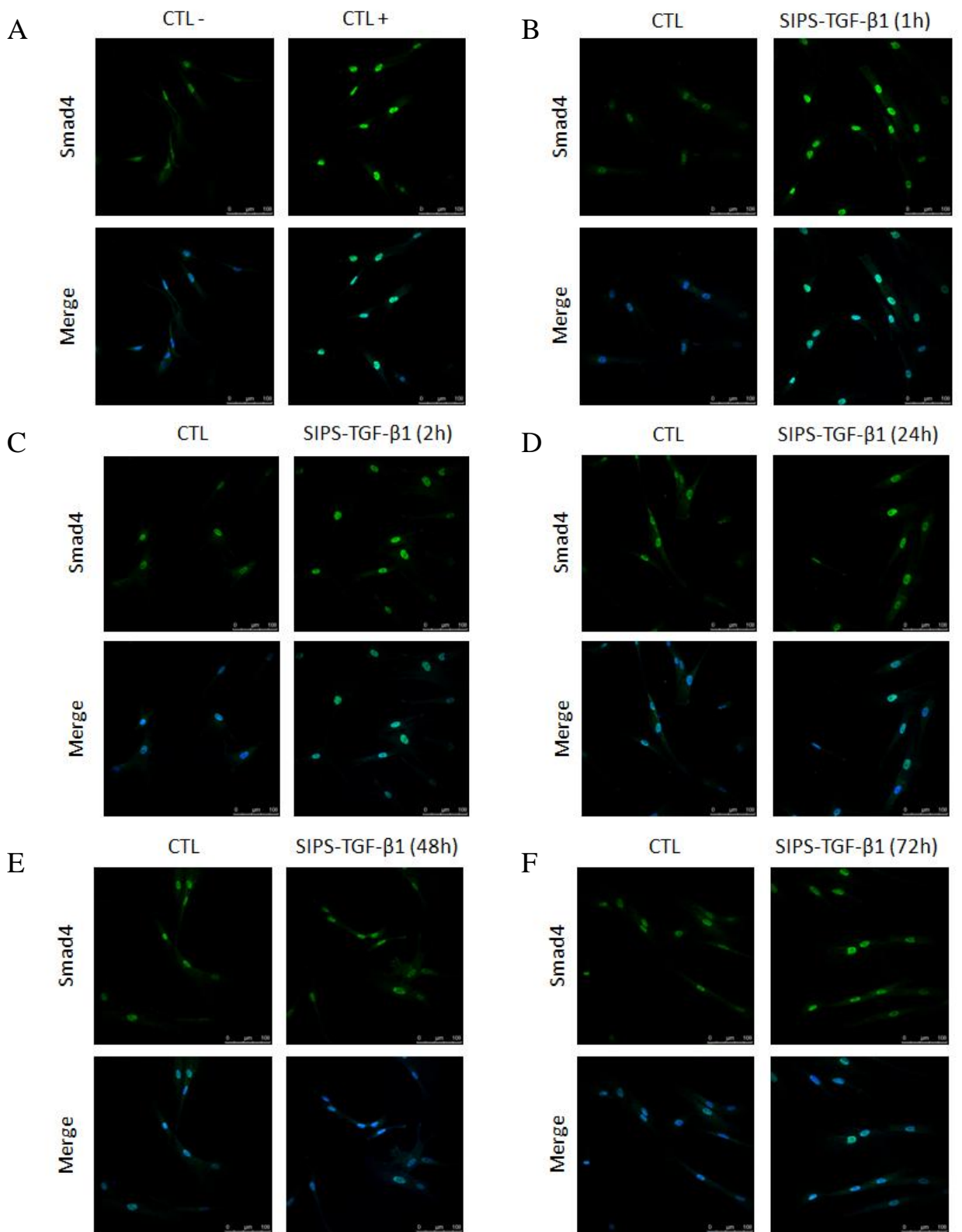


Figure III.15 : Cinétique d'activation de Smad4 en condition de SIPS-TGF- β 1 (visualisation en immunofluorescence)

Images représentatives montrant les marquages obtenus pour Smad4 dans des HDFs soumis (ou non) à 1h (B), 2h (C), 24h (D), 48h (E) ou 72h (F) de stimulation au TGF- β 1. Les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm², puis stimulées au TGF- β 1, à une concentration de 5 ng/mL, dans du BME + 1% FBS, avec renouvellement du TGF- β 1 toutes les 24 heures. Elles ont ensuite été fixées 1h, 2h, 24h, 48h ou 72h après la 1ère stimulation. Pour les CTL+ et CTL- (A), les cellules ont été soumises à une déprivation en sérum d'1 heure suivie (ou non) d'une stimulation unique au TGF- β 1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. Les marquages ont été visualisés par microscopie confocale à fluorescence (échelle = 100 μ m). Les noyaux ont été colorés en bleu par du TO-PRO-3. Les marquages à 1h, 2h et 24h ont été réalisés 2 fois (n=2), le marquage à 48h a été réalisé 1 fois (n=1) et le marquage à 72h a été réalisé 3 fois (n=3). Les images présentées ici proviennent de la même expérience.

○ Cinétique d'activation de Smad3 (**Figure III.11**)

Dans les extraits totaux, P-Smad3 n'est activé qu'à court terme dans les cellules traitées puisqu'il n'est détecté qu'à 1h et 2h après le début de la stimulation au TGF- β 1. Le profil d'abondance de P-Smad3 dans les extraits nucléaires a révélé sa présence dans les fibroblastes traités à 1h et 2h, comme le montraient les extraits totaux, mais également à 24h, 48h et 72h, dans une moindre mesure. Par ailleurs, tout comme P-Smad2, P-Smad3 n'est quasiment pas détecté dans les extraits cytoplasmiques.

Smad3 est détecté dans les conditions contrôle et traitée. Cependant, son abondance, tout comme celle de Smad2, diminue à partir de 24h de stimulation dans les fibroblastes soumis au TGF- β 1. Smad3 présente deux profils très différents entre les extraits nucléaires et cytoplasmiques. En effet, dans les extraits nucléaires, son abondance est plus élevée dans les cellules stimulées à 1h et à 2h puis commence à diminuer à partir de 48h pour devenir inférieure à celle observée dans les cellules contrôles à 48h et 72h. Dans les extraits cytoplasmiques, l'abondance de Smad3 diminue lorsque les cellules sont exposées au TGF- β 1 dès 1h et cette diminution s'amplifie au fil du temps pour aboutir à la disparition de Smad3 dans la condition traitée.

Ceci démontre l'activation et la translocation nucléaire de Smad3 essentiellement à court terme au cours de la SIPS-TGF- β 1.

○ Cinétique d'activation de Smad4 (**Figure III.12**)

Dans les extraits totaux, la protéine Smad4 est détectée dans toutes les conditions et son abondance ne semble pas varier au fil du temps ni en fonction des conditions. Elle n'est pas ou peu détectée dans le compartiment cytoplasmique et son abondance semble globalement stable au fil du temps dans le compartiment nucléaire pour les deux conditions contrôle et traitée, avec toutefois une légère augmentation à 1h, 2h et 24h dans les fibroblastes stimulés.

Ceci démontre la présence essentiellement nucléaire de Smad4, sans modification d'abondance notable suite à la SIPS-TGF- β 1.

Nous avons également étudié l'activation de la voie des Smads au cours de la SIPS-TGF- β 1 en visualisant par immunofluorescence les formes totales Smad2 et Smad3 ainsi que Smad4 à 1h, 2h, 24h, 48h et 72h après le début de la stimulation au TGF- β 1. Pour cela, les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8 000 cellules/cm², puis stimulées au TGF- β 1, à une concentration de 5 ng/mL dans du BME + 1% FBS. Elles ont ensuite été fixées 1h, 2h, 24h, 48h ou 72h après la première stimulation.

L'activation de Smad2 à long terme a ainsi été confirmée par la visualisation de sa translocation nucléaire à tous les temps testés (**Figure III.13**). Une translocation de Smad3 a aussi été montrée mais seulement à 1h et 2h (**Figure III.14B et 14C**), il n'y a en effet plus de différence notable entre les conditions contrôle et traitée à partir de 24h (**Figure III.14D-F**). Enfin, le marquage pour Smad4 semble plus intense dans les cellules stimulées au TGF- β 1 par rapport aux cellules contrôles à 1h et 2h (**Figure III.15B et 15C**), cette différence commence à s'estomper à partir de 24h (**Figure III.15D-F**).

En conclusion, le marquage en immunofluorescence des Smads a permis de confirmer l'activation à court et à long terme de Smad2 et à court terme de Smad3 dans le modèle de SIPS-TGF- β 1 par la visualisation de leur translocation nucléaire.

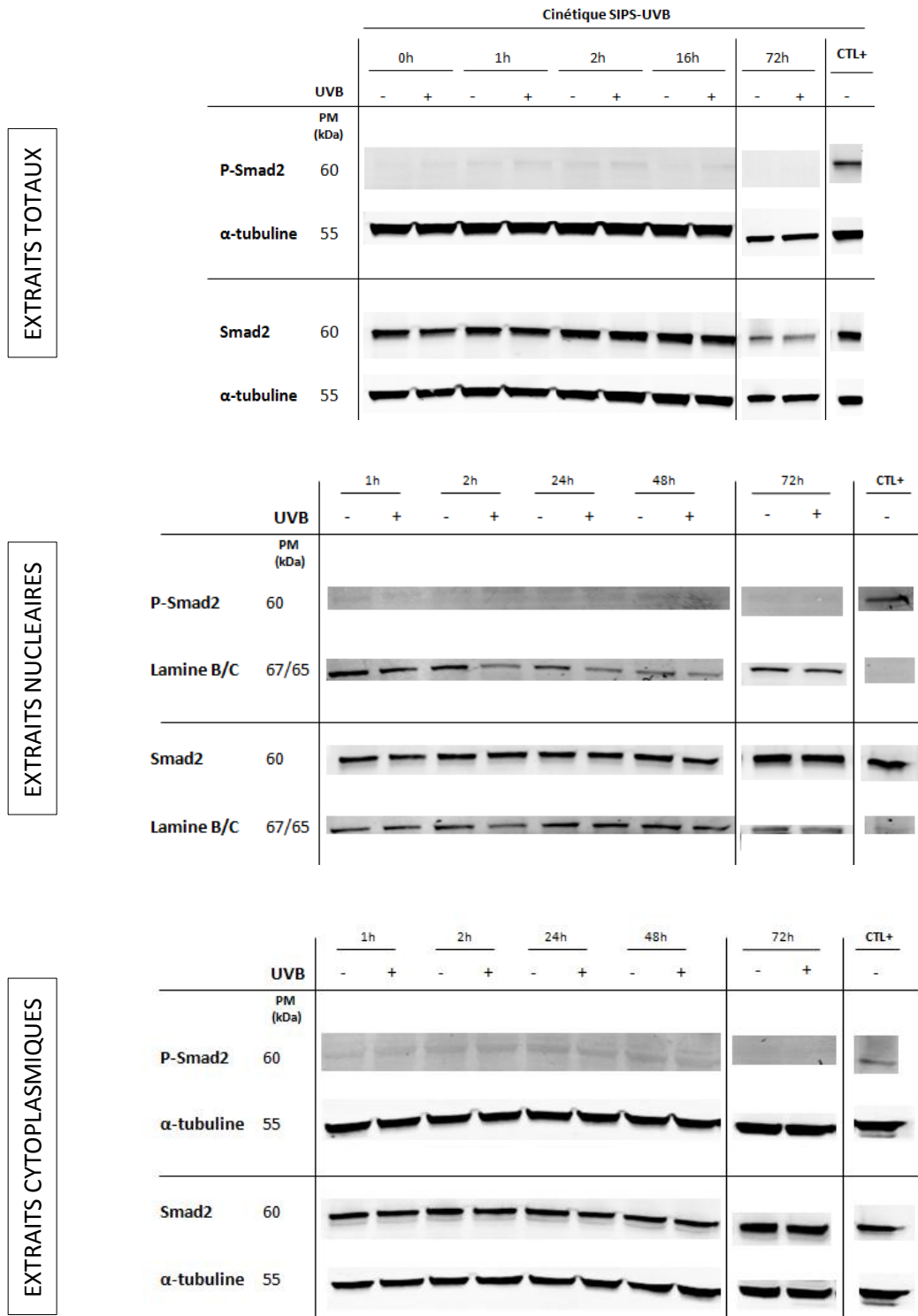


Figure III.16 : Cinétique d'activation de Smad2 en condition de SIPS-UVB (extraits protéiques totaux, nucléaires et cytoplasmiques)

Analyse de l'abondance protéique de P-Smad2 et Smad2 par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-UVB. Les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². L'extraction des protéines a été réalisée à 0h, 1h, 2h, 16h et 72h (extraits totaux) ou à 1h, 2h, 24h, 48h et 72h (extraits nucléaires et cytoplasmiques) après la dernière exposition et des Western Blots ont été réalisés. L'α-tubuline a été utilisée comme contrôle de charge totale et cytoplasmique et les lamines B (1h-48h et CTL+) ou C (72h) comme contrôles de charge nucléaire. Le contrôle positif (CTL+) correspond à des extraits protéiques totaux de HDFs soumis à une déprivation en sérum d'1 heure suivie d'une stimulation unique au TGF-β1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'expérience avec les extraits nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée 1 fois (n=1). L'expérience avec les extraits totaux aux temps 0h, 1h, 2h, 16h a été réalisée 1 fois (n=1) et au temps 72h, 2 fois (n=2).

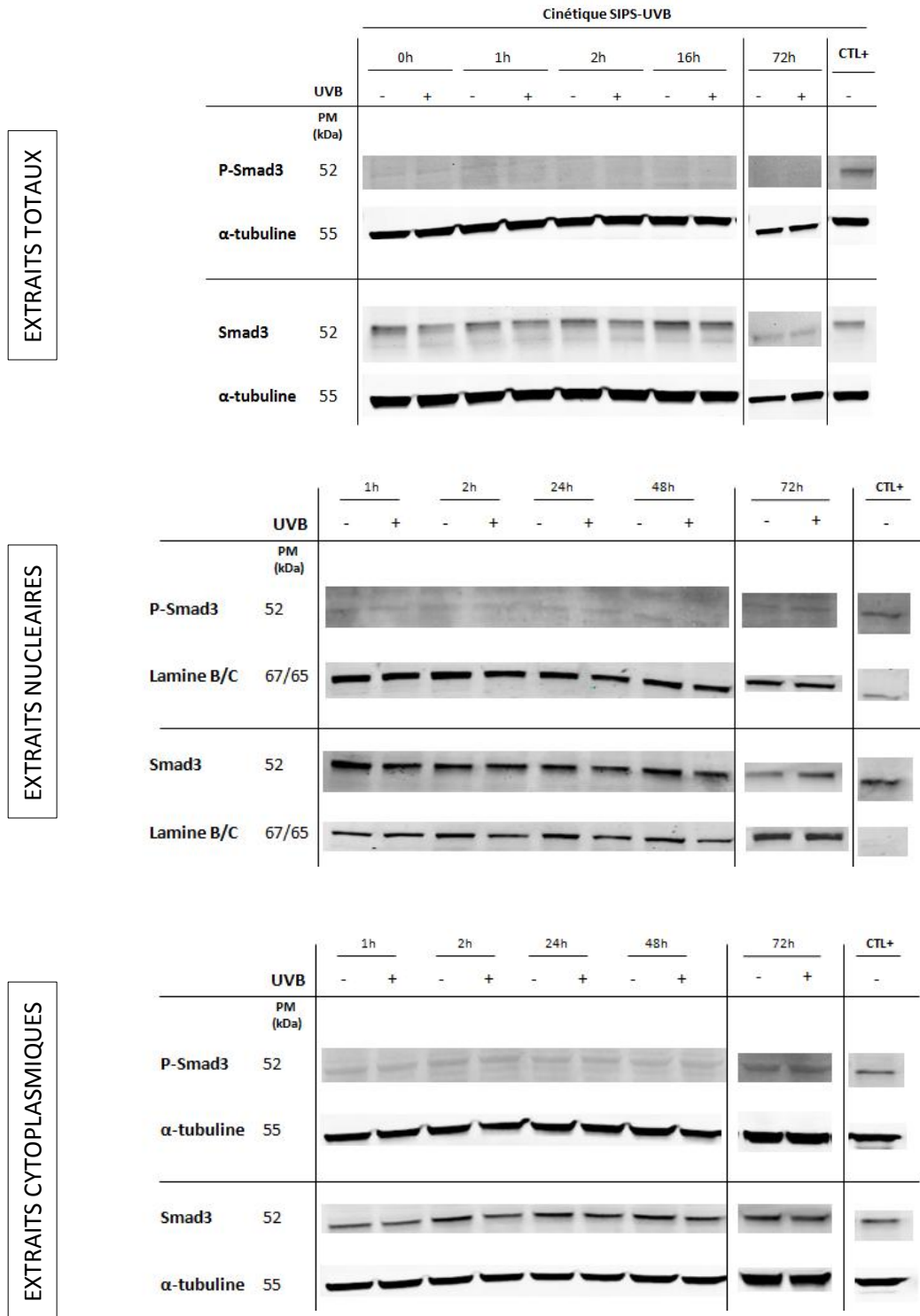
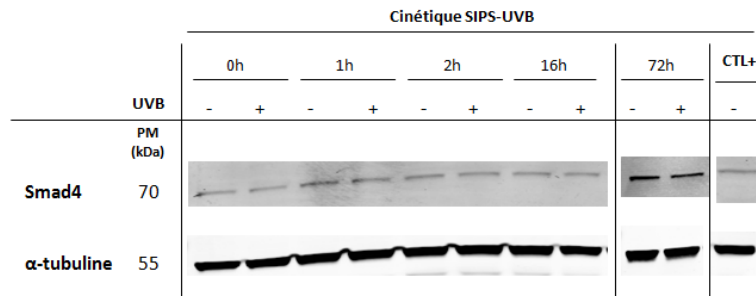


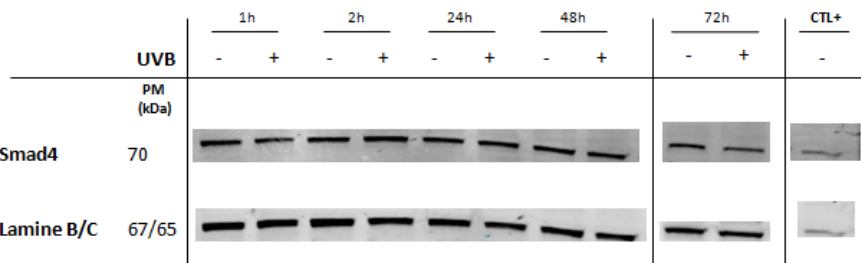
Figure III.17 : Cinétique d'activation de Smad3 en condition de SIPS-UVB (extraits protéiques totaux, nucléaires et cytoplasmiques)

Analyse de l'abondance protéique de P-Smad3 et Smad3 par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-UVB. Les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². L'extraction des protéines a été réalisée à 0h, 1h, 2h, 16h et 72h (extraits totaux) ou à 1h, 2h, 24h, 48h et 72h (extraits nucléaires et cytoplasmiques) après la dernière exposition et des Western Blots ont été réalisés. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge totale et cytoplasmique et les lamines B (1h-48h et CTL+) ou C (72h) comme contrôles de charge nucléaire. Le contrôle positif (CTL+) correspond à des extraits protéiques totaux de HDFs soumis à une déprivation en sérum d'1 heure suivie d'une stimulation unique au TGF- β 1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'expérience avec les extraits nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée 1 fois (n=1). L'expérience avec les extraits totaux aux temps 0h, 1h, 2h, 16h a été réalisée 1 fois (n=1) et au temps 72h, 2 fois (n=2).

EXTRAITS TOTAUX



EXTRAITS NUCLEAIRES



EXTRAITS CYTOPLASMIQUES

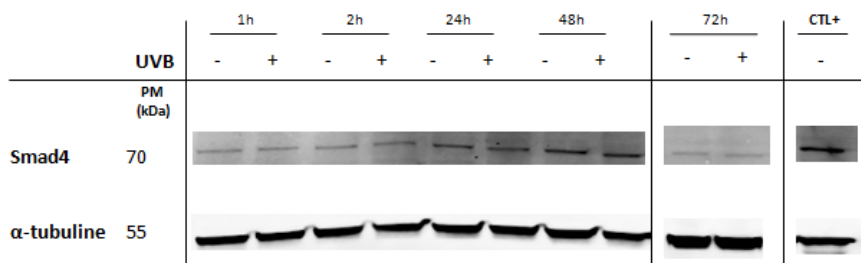


Figure III.18 : Cinétique d'activation de Smad4 en condition de SIPS-UVB (extraits protéiques totaux, nucléaires et cytoplasmiques)

Analyse de l'abondance protéique de Smad4 par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-UVB. Les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². L'extraction des protéines a été réalisée à 0h, 1h, 2h, 16h et 72h (extraits totaux) ou à 1h, 2h, 24h, 48h et 72h (extraits nucléaires et cytoplasmiques) après la dernière exposition et des Western Blots ont été réalisés. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge totale et cytoplasmique et les lamines B (1h-48h et CTL+) ou C (72h) comme contrôles de charge nucléaire. Le contrôle positif (CTL+) correspond à des extraits protéiques totaux de HDFs soumis à une déprivation en sérum d'1 heure suivie d'une stimulation unique au TGF- β 1 durant 30 minutes, à une concentration de 1 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'expérience avec les extraits nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée 1 fois (n=1). L'expérience avec les extraits totaux aux temps 0h, 1h, 2h, 16h a été réalisée 1 fois (n=1) et au temps 72h, 2 fois (n=2).

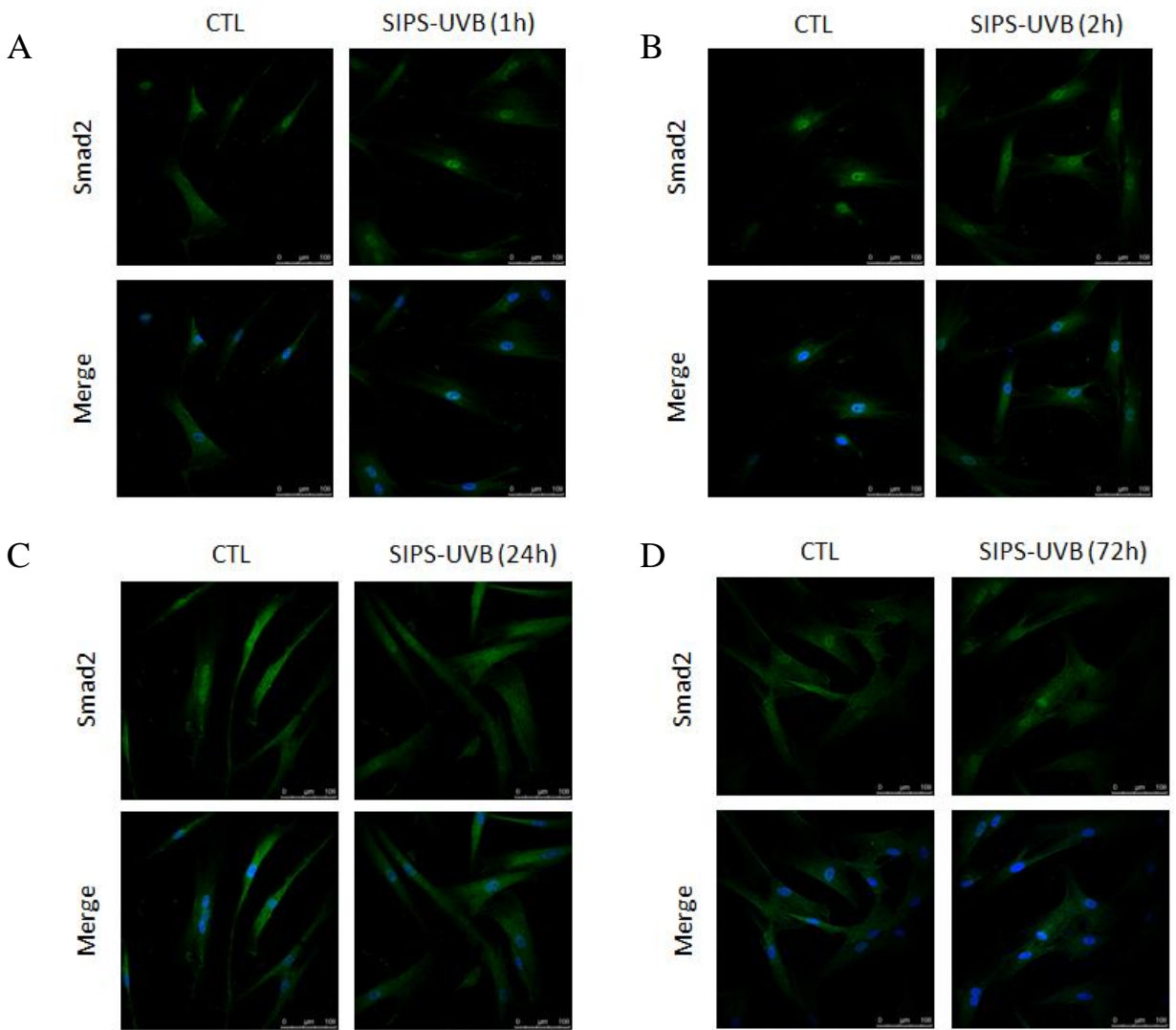


Figure III.19 : Cinétique d’activation de Smad2 en condition de SIPS-UVB (visualisation en immunofluorescence)

Images représentatives montrant les marquages obtenus pour Smad2 dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-UVB, aux temps 1h (A), 2h (B), 24h (C) et 72h (D) après la dernière exposition. Les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². Pour les temps 1h, 2h et 24h, elles ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² entre le 8^e et le 9^e stress et fixées 1h, 2h et 24h après le 10^e stress. Pour le temps 72h, les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² 72h après le 10^e stress et fixées le lendemain. Les marquages ont été visualisés par microscopie confocale à fluorescence (échelle = 100 µm). Les noyaux ont été colorés en bleu par du TO-PRO-3. Les marquages à 1h, 2h et 24h ont été réalisés lors de la même expérience, les marquages à 72h proviennent d’une expérience différente.

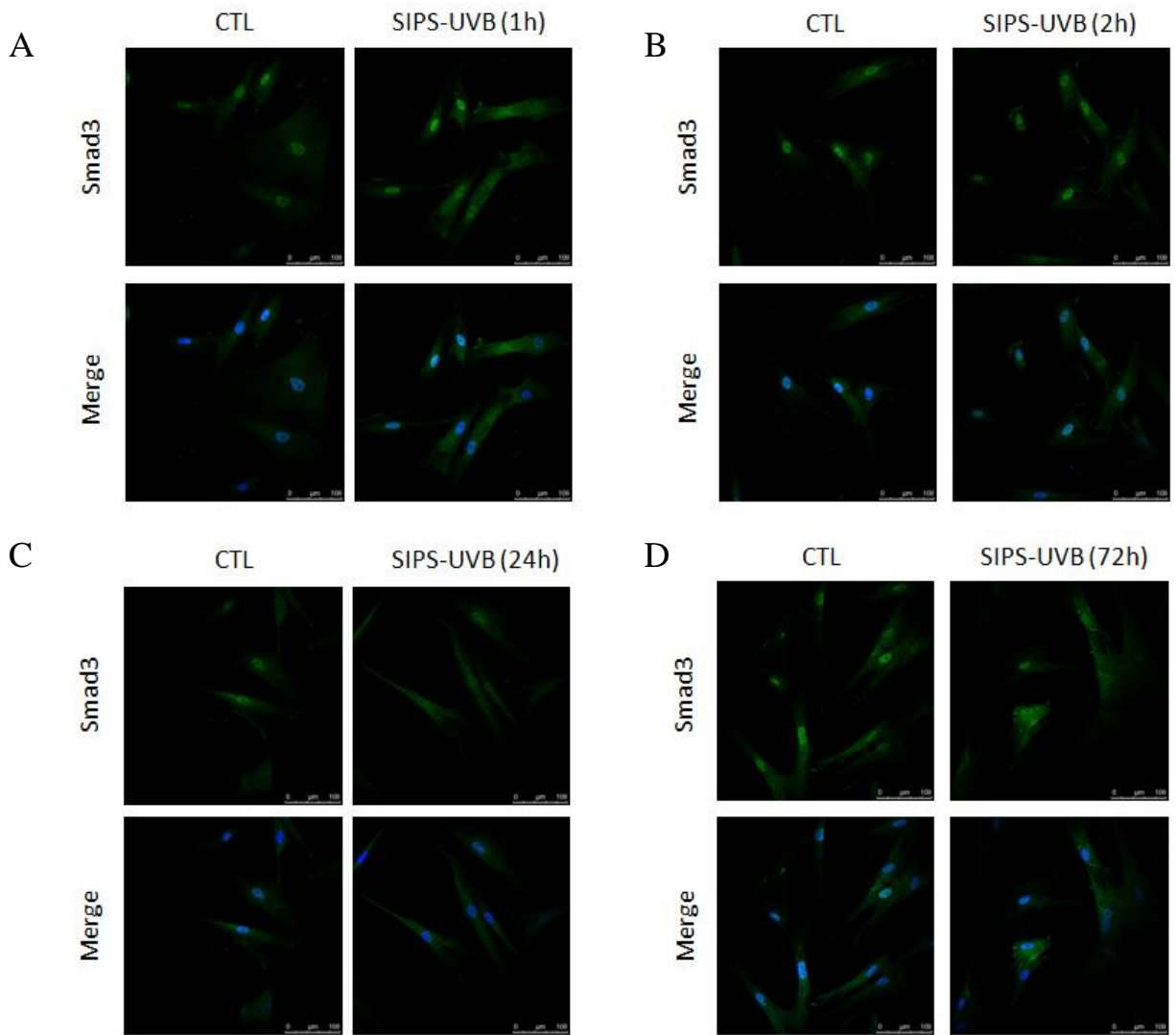


Figure III.20 : Cinétique d'activation de Smad3 en condition de SIPS-UVB (visualisation en immunofluorescence)

Images représentatives montrant les marquages obtenus pour Smad3 dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-UVB, aux temps 1h (**A**), 2h (**B**), 24h (**C**) et 72h (**D**) après la dernière exposition. Les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². Pour les temps 1h, 2h et 24h, elles ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² entre le 8^e et le 9^e stress et fixées 1h, 2h et 24h après le 10^e stress. Pour le temps 72h, les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² 72h après le 10^e stress et fixées le lendemain. Les marquages ont été visualisés par microscopie confocale à fluorescence (échelle = 100 µm). Les noyaux ont été colorés en bleu par du TO-PRO-3. Les marquages à 1h, 2h et 24h ont été réalisés lors de la même expérience, les marquages à 72h proviennent d'une expérience différente.

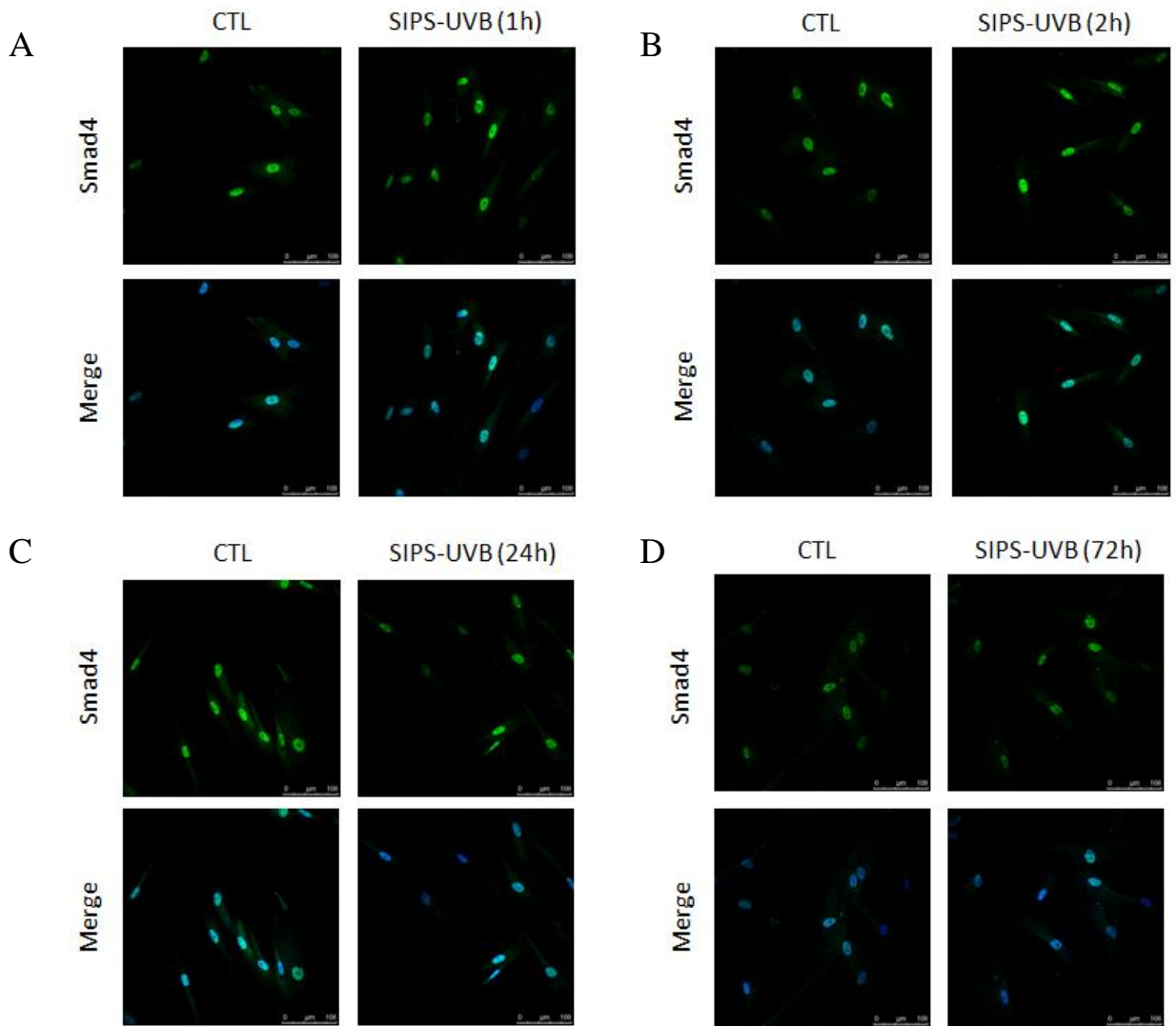


Figure III.21 : Cinétique d'activation de Smad4 en condition de SIPS-UVB (visualisation en immunofluorescence)

Images représentatives montrant les marquages obtenus pour Smad4 dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-UVB, aux temps 1h (A), 2h (B), 24h (C) et 72h (D) après la dernière exposition. Les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². Pour les temps 1h, 2h et 24h, elles ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² entre le 8^e et le 9^e stress et fixées 1h, 2h et 24h après le 10^e stress. Pour le temps 72h, les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² 72h après le 10^e stress et fixées le lendemain. Les marquages ont été visualisés par microscopie confocale à fluorescence (échelle = 100 μm). Les noyaux ont été colorés en bleu par du TO-PRO-3. Les marquages à 1h, 2h et 24h ont été réalisés lors de la même expérience, les marquages à 72h proviennent d'une expérience différente.

3) *Etude de la voie des Smads en SIPS-UVB*

Nous avons également étudié le profil d'activation de la voie des Smads dans le modèle de SIPS-UVB, à différents temps après le dernier stress. Pour cela, les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm² et l'extraction des protéines totales a été réalisée directement, et à 1h, 2h, 16h et 72h après la dernière exposition. Afin de déterminer la localisation subcellulaire des différentes Smads, nous avons procédé à la même expérience mais cette fois en réalisant des extraits de protéines nucléaires et cytoplasmiques 1h, 2h, 24h, 48h et 72h après la dernière exposition.

De cette façon, nous avons pu mettre en évidence l'absence d'activation de la voie des Smads dans notre modèle de SIPS-UVB.

En effet, aucune présence de P-Smad2 et P-Smad3 n'a été détectée et ce, à tous les temps testés et dans tous les extraits (**Figures III.16 et III.17**). Par ailleurs, dans tous les extraits, les formes totales Smad2 et Smad3 sont détectées à la fois dans les cellules contrôles et exposées aux UVB mais leurs abondances respectives ne semblent pas varier entre les conditions, ni au fil du temps (**Figures III.16 et III.17**).

Le même constat est dressé pour Smad4 dont l'abondance semble stable dans toutes les conditions (**Figures III.18**). Notons cependant que Smad4 est plus abondant dans le compartiment nucléaire que cytoplasmique.

Nous avons ensuite étudié l'activation de la voie des Smads au cours de la SIPS-UVB en visualisant par immunofluorescence les formes totales Smad2 et Smad3 ainsi que Smad4 à 1h, 2h, 24h et 72h après la dernière exposition aux UVB. Pour cela, les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². Pour les temps 1h, 2h et 24h, elles ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8 000 cellules/cm² entre le 8^e et le 9^e stress et fixées 1h, 2h et 24h après le 10^e stress. Pour le temps 72h, les cellules ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8 000 cellules/cm² 72 heures après le 10^e stress et fixées le lendemain.

De cette manière, nous avons de nouveau confirmé l'absence d'activation de la voie des Smads en SIPS-UVB étant donné l'absence de translocation nucléaire pour Smad2 (**Figure III.19**), Smad3 (**Figure III.20**) et Smad4 (**Figure III.21**) et ce, à tous les temps testés.

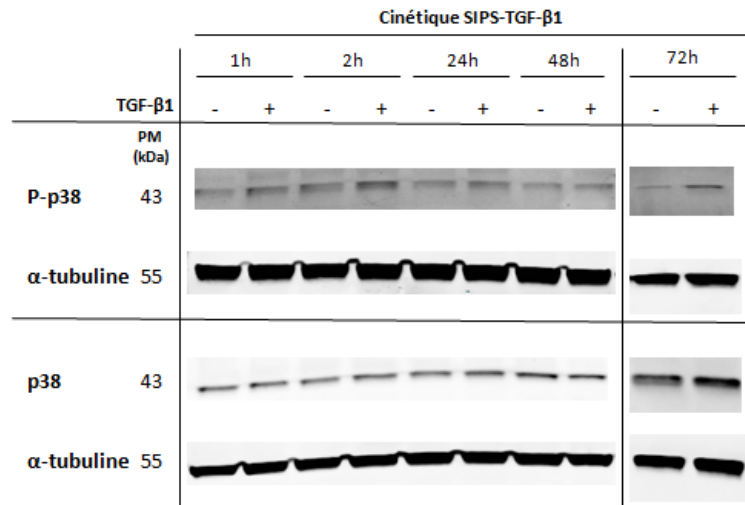
4) *Conclusion*

Au cours de ce mémoire, nous avons voulu identifier les voies de signalisation activées en aval des récepteurs au TGF- β 1 dans les modèles de SIPS-TGF- β 1 et SIPS-UVB.

La première voie que nous avons étudiée est la voie des Smads, considérée comme la voie canonique de réponse au TGF- β 1. Pour ce faire, nous avons commencé par réaliser des extraits protéiques à différents temps après la première stimulation au TGF- β 1 et après la dernière exposition aux UVB. Nous avons ensuite confirmé nos résultats en visualisant par marquage en immunofluorescence les protéines Smads.

Pour la SIPS-TGF- β 1, l'analyse des extraits protéiques totaux a démontré que les formes phosphorylées de Smad2 et Smad3 n'étaient détectées que dans les cellules stimulées au TGF- β 1. P-Smad2 est détectée à tous les temps examinés tandis que P-Smad3 n'est présent qu'aux temps 1h et 2h. Afin de déterminer la localisation subcellulaire de ces protéines, nous avons ensuite réalisé des extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques. L'analyse de ces extraits nous a permis d'observer la localisation nucléaire de P-Smad2 et P-Smad3. De plus,

A



B

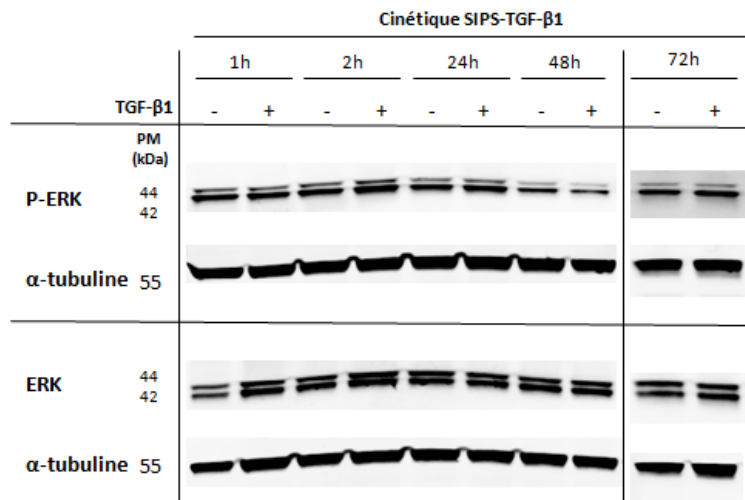


Figure III.22 : Cinétique d'activation de p38 et ERK en condition de SIPS-TGF- β 1 (extraits protéiques totaux)

Analyse de l'abondance protéique de **A)** P-p38 et p38, et **B)** P-ERK et ERK par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-TGF- β 1. Les cellules ont été stimulées (ou non) au TGF- β 1 durant 72 heures (avec renouvellement du TGF- β 1 toutes les 24 heures), à une concentration de 5 ng/mL dans du BME + 1% FBS. L'extraction des protéines totales a été réalisée 1h, 2h, 24h, 48h et 72h après la 1ère stimulation et des Western Blots ont été réalisés. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. L'expérience avec les temps 1h, 2h, 24h et 48h a été réalisée deux fois (n=2) et le temps 72h quatre fois (n=4).

ceci a confirmé l'activation à court et à long terme de Smad2 (présence de P-Smad2 à tous les temps examinés) et a montré que l'activation de Smad3 se poursuivait au-delà du temps 2h mais dans une moindre mesure. Enfin, nous avons pu une nouvelle fois confirmer l'activation de la voie des Smads dans notre modèle de SIPS-TGF- β 1 par visualisation en immunofluorescence de la translocation nucléaire de Smad2 et Smad3 dans les fibroblastes stimulés.

Pour la SIPS-UVB, l'analyse des extraits protéiques totaux n'a révélé aucune activation de la voie des Smads dans les fibroblastes exposés aux UVB étant donné l'absence de détection des formes phosphorylées de Smad2 et Smad3 et l'abondance inchangée des formes totales. L'analyse d'extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques et le marquage en immunofluorescence des Smads ont confirmé cette absence d'activation de la voie TGF- β 1/Smads dans notre modèle de SIPS-UVB.

III. Etude de l'activation des voies non-canoniques du TGF- β 1

Après avoir étudié la voie du TGF- β 1/Smads dans les modèles de SIPS-TGF- β 1 et SIPS-UVB nous avons voulu investiguer d'autres voies non-canoniques dépendantes du TGF- β 1 pour comprendre comment les biomarqueurs de sénescence apparaissaient dans nos modèles. Durant ce mémoire, nous nous sommes particulièrement intéressés à deux MAPK, p38 et ERK, ainsi qu'à la PI3K et à Rac1.

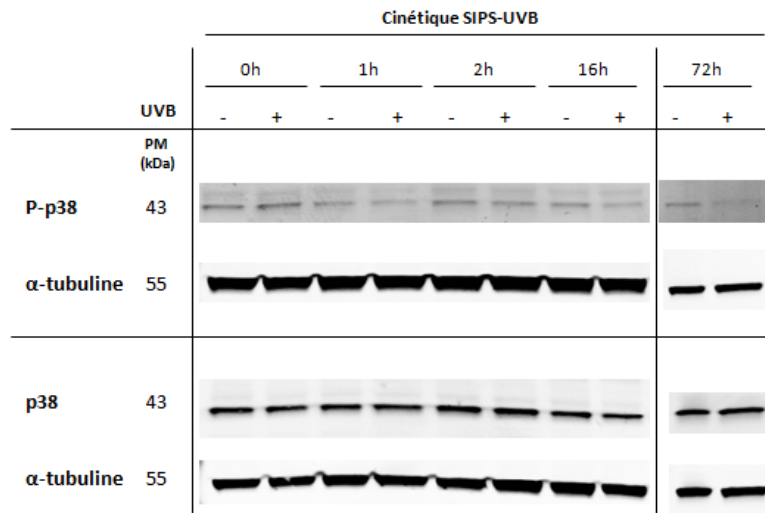
En effet, il a été montré que le TGF- β 1 est capable de mener à l'activation de ERK et de p38 [Zhang, 2009]. Dans certains cas, cette activation se produit dans les minutes suivant la stimulation par le TGF- β 1, dans d'autres quelques heures après. Ces cinétiques différentes suggèrent que le TGF- β 1 peut agir en activant directement les MAPKKK (activation rapide des MAPK) ou *via* la modulation de la transcription génique médiée par les Smads (activation lente des MAPK) [Javelaud and Mauviel, 2005]. Dès lors, il est intéressant d'étudier la phosphorylation de ERK et p38 en cinétique, comme nous l'avons fait pour la voie des Smads. Nous avons également étudié l'abondance de la PI3K et de Rac1 en cinétique. Ces deux protéines semblent en effet être activées par le TGF- β 1 de façon rapide, c'est-à-dire sans passer par la régulation transcriptionnelle induite par les Smads [Zhang, 2009].

1) Etude de l'activation de p38 et ERK en SIPS-TGF- β 1

Nous avons étudié le profil d'activation des MAPK p38 et ERK dans le modèle de SIPS-TGF- β 1, à différents temps au cours des 3 jours de stimulation. Pour cela, les cellules ont été stimulées (ou non) au TGF- β 1 durant 72 heures (avec renouvellement du TGF- β 1 toutes les 24 heures), à une concentration de 5 ng/mL dans du BME + 1% FBS, et l'extraction des protéines totales a été réalisée 1h, 2h, 24h, 48h et 72h après la première stimulation. Ces extraits ont été analysés par Western Blot (**Figure III.22**).

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une légère activation de p38 dans le modèle de SIPS-TGF- β 1. En effet, l'abondance de P-p38 semble augmenter légèrement dans les fibroblastes stimulés au TGF- β 1 par rapport aux fibroblastes contrôles aux temps 1h, 2h, 24h et 72h. Notons que cet effet n'est pas observé au temps 48h, ce qui suggère une activation biphasique de p38 dans ce modèle. Par ailleurs, l'abondance de p38 total ne semble pas varier en fonction du temps ni de la condition. De même, nous n'avons pas observé d'effet de la stimulation au TGF- β 1 sur l'abondance de P-ERK et de ERK aux différents temps. Cette MAPK ne semble donc pas activée dans le modèle de SIPS-TGF- β 1.

A



B

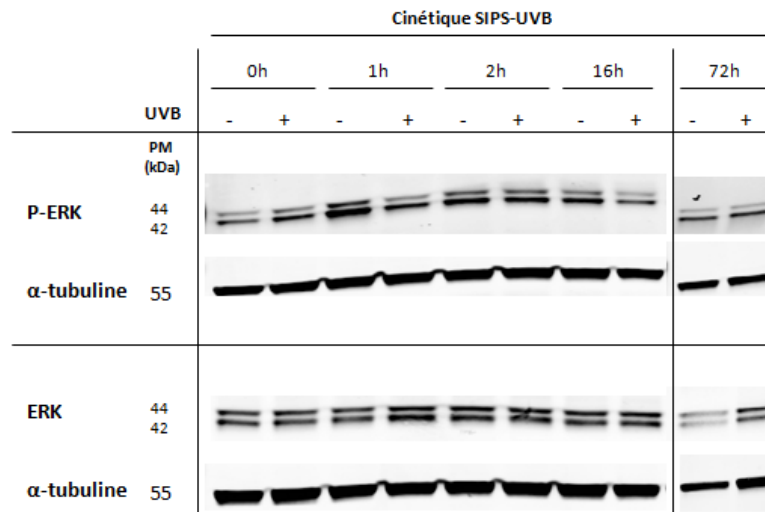


Figure III.23 : Cinétique d'activation de p38 et ERK en condition de SIPS-UVB (extraits protéiques totaux)

Analyse de l'abondance protéique de **A)** P-p38 et p38, et **B)** P-ERK et ERK par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-UVB. Les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². L'extraction des protéines totales a été réalisée 0h, 1h, 2h, 16h et 72h après la dernière exposition et des Western Blots ont été réalisés. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. L'expérience avec les temps 0h, 1h, 2h et 16h a été réalisée une fois (n=1) et le temps 72h deux fois (n=2).

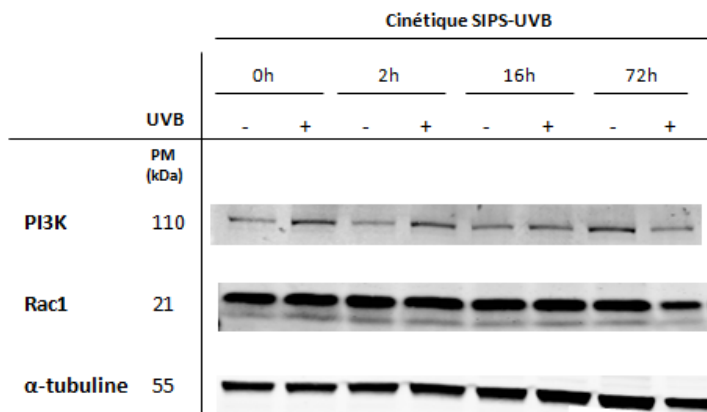


Figure III.24 : Cinétique d'activation de PI3K et Rac1 en condition de SIPS-UVB (extraits protéiques totaux)

Analyse de l'abondance protéique de PI3K et Rac1 par Western Blot, dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-UVB. Les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². L'extraction des protéines totales a été réalisée 0h, 2h, 16h et 72h après la dernière exposition et un Western Blot a été réalisé. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

2) *Etude de l'activation de p38 et ERK en SIPS-UVB*

Nous avons étudié le profil d'activation des MAPK p38 et ERK dans le modèle de SIPS-UVB, à différents temps après le dixième stress. Pour cela, les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm² et l'extraction des protéines totales a été réalisée directement, et à 1h, 2h, 16h et 72h après la dernière exposition. Ces extraits ont été analysés par Western Blot (**Figure III.23**).

De cette façon, nous avons montré que les formes phosphorylées P-p38 et P-ERK ainsi que les formes totales p38 et ERK sont détectées dans les fibroblastes contrôles et dans les fibroblastes en SIPS-UVB, mais leur abondance ne semble pas varier entre les conditions, ni au fil du temps. Dès lors, il ne semble pas y avoir d'activation de ces MAPK lors de la SIPS-UVB.

3) *Etude de l'activation de la PI3K et de Rac1 en SIPS-UVB*

Après avoir déterminé que la voie du TGF- β 1/Smads et les MAPK p38 et ERK n'étaient pas activées dans le modèle de SIPS-UVB, nous nous sommes intéressés à PI3K et Rac1, deux protéines impliquées dans les voies non-canoniques dépendantes du TGF- β 1. Nous avons étudié leur profil d'activation dans le modèle de SIPS-UVB, à différents temps après le dernier stress. Pour cela, les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm² et l'extraction des protéines totales a été réalisée directement, et à 2h, 16h et 72h après la dernière exposition. Ces extraits ont été analysés par Western Blot (**Figure III.24**).

La PI3K semble surexprimée à court terme lors de la SIPS-UVB étant donné son abondance accrue directement et 2h après le dernier stress dans les fibroblastes exposés aux UVB. Par la suite, cette différence entre la condition contrôle et la condition traitée semble s'estomper. A l'inverse, l'abondance de Rac1 ne varie pas entre les conditions et ce, à tous les temps étudiés.

Il semble donc que la voie de la PI3K soit activée à court terme après le dixième stress dans notre modèle de SIPS-UVB.

4) *Conclusion*

Au cours de ce mémoire, nous avons voulu identifier les voies de signalisation activées en aval des récepteurs au TGF- β 1 dans les modèles de SIPS-TGF- β 1 et SIPS-UVB.

Après avoir étudié l'activation de la voie des Smads, nous nous sommes intéressés aux MAPK p38 et ERK, ainsi qu'à la PI3K et à Rac1, toutes ces protéines faisant partie des voies non-canoniques de réponse au TGF- β 1.

Pour la SIPS-TGF- β 1, il semblerait que p38 soit activé à court terme puis à long terme, comme le suggère l'abondance accrue de sa forme phosphorylée à 1h, 2h, 24h et 72h après la première stimulation dans les fibroblastes traités. A l'inverse, aucune activation de ERK n'a été mise en évidence dans ce modèle.

Pour la SIPS-UVB, à l'instar de la voie des Smads, l'analyse des extraits protéiques a révélé que les MAPK p38 et ERK ainsi que la GTPase Rac1 ne semblaient pas non plus activées. Néanmoins, nous avons pu montrer une augmentation de l'abondance de la PI3K à court terme, étant donné son abondance accrue dans les fibroblastes en SIPS-UVB au cours des 2 premières heures suivant le dernier stress UVB.

DISCUSSION
&
PERSPECTIVES

Le vieillissement de la population constitue un des défis majeurs de notre société. En effet, l'incidence de nombreux désordres et pathologies augmente avec l'âge, ce qui met en péril la santé mais aussi l'intégration sociale des seniors. Dès lors, il est plus que jamais important de comprendre les fondements biologiques du vieillissement afin de mettre en place des solutions pour améliorer le bien-être des personnes âgées.

Dans notre mémoire, nous nous sommes intéressés à la sénescence cellulaire, une des neuf caractéristiques du vieillissement proposées récemment [López-Otin *et al.*, 2013]. En particulier, nous avons centré notre étude sur la sénescence de fibroblastes de derme (HDFs) dans trois modèles *in vitro* : la sénescence répliquative (RS), la sénescence induite prématurément par le TGF- β 1 (SIPS-TGF- β 1) et la sénescence induite prématurément par les rayons UVB (SIPS-UVB). La sénescence répliquative a été obtenue en maintenant les fibroblastes en culture jusqu'à ce qu'ils cessent de proliférer. Les deux modèles de SIPS que nous avons utilisés ont été mis au point au laboratoire [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005]. Pour la SIPS-TGF- β 1, les fibroblastes sont stimulés au TGF- β 1 à une concentration de 5 ng/mL dans du milieu BME + 1% FBS durant 72 heures, avec renouvellement du milieu toutes les 24 heures. De cette façon, au terme de 3 jours de stimulation, les HDFs entrent en sénescence prématurée. Pour la SIPS-UVB, nous avons soumis les cellules à 2 expositions aux UVB par jour, à une dose de 250 mJ/cm², durant 5 jours consécutifs. La sénescence prématurée est ainsi obtenue 72 heures après le dernier stress.

Pour chaque modèle, nous avons vérifié l'induction de la sénescence par l'analyse de différents biomarqueurs : changements morphologiques [Bayreuther *et al.*, 1988], augmentation de l'activité SA- β gal [Dimri *et al.*, 1995], surexpression de gènes associés à la sénescence [Gonos *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2004], absence de marqueurs prolifératifs et présence de marqueurs d'arrêt du cycle cellulaire [Lawless *et al.*, 2010].

Une modification de la morphologie des cellules a pu être observée dans les trois modèles, mais de façon moins marquée en SIPS-UVB.

L'augmentation de l'activité SA- β gal a été démontrée dans les trois modèles. Notons cependant que la proportion de cellules positives pour cette activité en SIPS-UVB n'augmente ici que d'un facteur 1,6 contre un facteur 2,5 dans la littérature [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005]. La différence entre les cellules contrôles et les cellules exposées aux UVB dans ce mémoire est néanmoins significative.

La surexpression des gènes pour la *fibronectine*, l'*ostéonectine*, l'*apolipoprotéine J* et le *CTGF* a été observée plus ou moins fortement dans les trois modèles. Ces 4 gènes sont en effet communément associés à la sénescence [Gonos *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2004]. Une augmentation de l'expression du *TGF- β 1* a aussi été montrée en SIPS-TGF- β 1, conformément à la littérature [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005] et indique que le TGF- β 1 induit sa propre expression. Le gène *CDKN2A*, codant pour la CDKI p16, est surexprimé dans les trois modèles. A l'heure actuelle, p16 est un des biomarqueurs de sénescence les plus utilisés [Campisi, 2013]. Un deuxième inhibiteur de CDK, p21, codé par le gène *CDKN1A*, est aussi surexprimé en SIPS-TGF- β 1 et en SIPS-UVB. L'expression accrue de ces gènes dans les différents modèles de sénescence est cohérente avec leur rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire. Une surexpression des gènes *IGFBP3* et *IGFBP5* en SIPS-UVB et une répression du gène *IGFBP5* en RS ont été observées, conformément à la littérature [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005 ; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2008]. Une implication de l'*IGFBP3* dans l'apparition des biomarqueurs de sénescence a d'ailleurs été suggérée dans des modèles de SIPS utilisant le *t*-BHP et l'éthanol [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2008]. Enfin, nous avons également évalué l'expression de différentes protéines impliquées dans le SASP dans les trois modèles. Nous avons ainsi pu remarquer que l'expression des métalloprotéinases matricielles *MMP1*, *MMP2*

et *MMP14* est assez hétérogène entre les modèles mais qu'elles sont toutes surexprimées en SIPS-UVB. La même constatation est faite pour les interleukines *IL8* et *IL1 β* . La chémokine *MCP1* est également surexprimée de façon hautement significative en SIPS-UVB. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que le SASP ne se développe qu'en présence d'une DDR persistante [Campisi, 2013], ce qui pourrait être le cas dans le modèle de SIPS-UVB.

Pour terminer, nous avons visualisé en immunofluorescence le marqueur prolifératif Ki67 et les régulateurs négatifs du cycle cellulaire p16 et p21 dans les trois modèles de sénescence. La présence de Ki67 diminue dans les deux modèles de SIPS mais, de façon étonnante, semble inchangée en RS. À l'inverse, un accroissement de la présence de p16 et p21 a été montré dans les cellules en RS et en SIPS-TGF- β 1, mais n'a pas pu être mis en évidence en SIPS-UVB alors qu'une analyse en Western Blot révèle une augmentation de l'abondance de ces protéines dans ce modèle [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005].

De manière générale, nous avons pu confirmer l'induction de la sénescence dans les trois modèles utilisés lors de ce mémoire. Notons toutefois que malgré la présence de biomarqueurs communs, la sénescence répllicative et la SIPS ne correspondent pas exactement à la même réalité biologique. En effet, la sénescence répllicative est causée par l'attrition des télomères, alors que la SIPS est obtenue bien plus rapidement grâce à l'utilisation d'agents stressants. L'apparition des biomarqueurs de sénescence en SIPS n'est donc pas dépendante du raccourcissement télomérique, comme cela a été prouvé en SIPS-UVB [de Magalhães *et al.*, 2002]. Des différences transcriptomiques et protéomiques ont également été montrées entre la RS et des modèles de SIPS utilisant le *t*-BHP et l'éthanol comme agents stressants [Dierick *et al.*, 2002 ; Pascal *et al.*, 2005].

Depuis sa découverte il y a plus de 50 ans [Hayflick and Moorhead, 1961], d'importants progrès ont été réalisés dans la compréhension de la sénescence. Cependant, de nombreuses questions persistent. En effet, à l'heure actuelle, les voies de transduction du signal qui aboutissent à l'établissement de la sénescence sont encore mal connues et doivent être investiguées. Dans la littérature, une des pistes proposées concerne le TGF- β 1. Au laboratoire, une implication du TGF- β 1 dans l'apparition des biomarqueurs de sénescence dans les fibroblastes de derme a été suggérée dans différents modèles de SIPS [Frippiat *et al.*, 2001 ; Chainiaux *et al.*, 2002 ; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005 ; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2008]. En particulier, une surexpression du TGF- β 1 ainsi qu'une augmentation protéique de sa forme latente et active sont observées dans le modèle de SIPS-UVB utilisé dans ce mémoire [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005]. De plus, l'inhibition des voies dépendantes du TGF- β 1 par l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre le TGF- β 1 ou T β RII empêche l'apparition des biomarqueurs de sénescence dans ce modèle. Par ailleurs, la stimulation chronique des fibroblastes au TGF- β 1 permet d'observer certains biomarqueurs de sénescence au bout de 3 jours [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005], comme montré dans ce mémoire. Ces données suggèrent que le TGF- β 1 est impliqué causalement dans l'induction de la sénescence. Toutefois, il reste à déterminer quelles sont les voies activées en aval du TGF- β 1 responsables de ce phénomène.

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons étudié l'activation de différentes voies dépendantes du TGF- β 1 dans les deux modèles de SIPS. Dans ce mémoire, nous nous sommes d'abord intéressés à la voie des Smads, considérée comme la voie canonique du TGF- β 1. Nous avons ensuite étudié les MAPK p38 et ERK ainsi que la PI3K et Rac1, toutes ces protéines étant impliquées dans les voies non-canoniques de réponse au TGF- β 1.

Sans surprise, nous avons observé une activation immédiate de la voie des Smads dans le modèle de SIPS-TGF- β 1. Nos analyses en cinétique par Western Blot ont permis de déterminer que Smad2 était activée à court et à long terme dans ce modèle, étant donné la présence de sa forme phosphorylée tout au long des 72 heures de stimulation et ce, uniquement dans les extraits nucléaires des cellules traitées, prouvant sa translocation dans le noyau. L'activation de Smad3 a été détectée essentiellement à court terme (dans les 2 heures suivant le début de la stimulation) dans les noyaux des fibroblastes stimulés, mais semble se poursuivre dans une moindre mesure jusqu'au temps 72h. La diminution progressive de l'abondance des formes totales observée en parallèle conforte nos résultats. De plus, nous avons pu confirmer ces observations par visualisation en immunofluorescence de la translocation nucléaire de Smad2 (de 1h à 72h) et Smad3 (aux temps 1h et 2h). Enfin, l'abondance protéique de Smad4 semble stable au cours du temps mais a été plus fortement détectée dans les extraits nucléaires que cytoplasmiques, ce qui est cohérent avec une activation des Smads. De plus, le signal obtenu pour Smad4 en immunofluorescence semble plus lumineux dans la condition stimulée au TGF- β 1 à 1h et 2h. Tous ces résultats semblent donc démontrer une activation de la voie des Smads dans le modèle de SIPS-TGF- β 1.

A l'inverse, nous n'avons détecté aucune activation de la voie des Smads dans le modèle de SIPS-UVB. En effet, les formes phosphorylées P-Smad2 et P-Smad3 n'ont jamais été détectées, les formes totales ne présentent pas de modification d'abondance et l'analyse en immunofluorescence n'a pas révélé de translocation nucléaire des protéines. Cette absence d'activation de la voie des Smads après stimulation aux UVB a déjà été observée dans la littérature. Ainsi, *Quan et al.* ont montré que l'exposition de cellules épithéliales de poumon à 20 mJ/cm² de rayons UVB induisait une diminution des récepteurs T β RII et une augmentation de Smad7, tous deux au niveau transcriptionnel et protéique, empêchant ainsi la phosphorylation de Smad2 [*Quan et al.*, 2001]. L'hypothèse avancée propose que la stimulation de récepteurs de surface par les UVB conduirait à l'activation de différentes voies de transduction du signal aboutissant à la transcription du complexe AP-1 (formé de c-Jun et c-Fos). AP-1 induirait alors l'expression de Smad7 et diminuerait celle de T β RII, résultant en l'inhibition de la voie des Smads [*Quan et al.*, 2005 ; *Yaar and Gilchrest*, 2007]. Cet effet des UVB sur les récepteurs T β RII et sur Smad7 a été confirmé *in vivo* au niveau du derme et de l'épiderme dans différents modèles [*Quan et al.*, 2002 ; *Han et al.*, 2005 ; *Dai et al.*, 2007]. Notons que les résultats obtenus dans le cadre de ce travail ne sont pas identiques à ceux montrés dans un précédent mémoire réalisé au laboratoire (Hélène Riquier, 2007) où une activation de la voie des Smads avait été mise en évidence à court terme (1h et 2h) dans le même modèle de SIPS-UVB.

Après avoir étudié la voie des Smads, nous avons analysé le profil d'abondance protéique des MAPK p38 et ERK et de leurs formes phosphorylées à différents temps dans les modèles de SIPS-TGF- β 1 et SIPS-UVB.

Nous avons mis en évidence une légère activation de p38 en SIPS-TGF- β 1. En effet, l'abondance de P-p38 semble légèrement augmenter dans les fibroblastes traités, aux temps 1h, 2h, 24h et 72h après le début de la stimulation mais pas à 48h, ce qui semble indiquer une activation biphasique de la protéine. Ceci ne serait pas étonnant car un profil d'activation de p38 en deux phases a déjà été démontré au laboratoire dans un modèle de SIPS utilisant l'H₂O₂ comme agent stressant dans des fibroblastes humains [*Frippiat et al.*, 2002]. Dans ce modèle, le peroxyde d'hydrogène induit la phosphorylation de p38 qui active alors le facteur de transcription ATF-2. Ce dernier augmente l'expression du TGF- β 1 qui, une fois sécrété, se lie à ses récepteurs et active à nouveau p38, mettant en place une boucle de rétroaction

positive. Par la suite, ATF-2 interagit avec la forme hypophosphorylée de pRb, ce qui conduit à l'apparition des biomarqueurs de sénescence dans ce modèle. D'un autre côté, nous n'avons pas observé d'activation de ERK dans notre modèle, ce qui est surprenant car l'activation des différentes MAPK par le TGF- β 1 est bien connue [Zhang, 2009 ; Kubiczkova *et al.*, 2012 ; Massagué, 2012].

L'analyse de p38 et ERK dans le modèle de SIPS-UVB n'a pas révélé d'activation de ces MAPK. Ces résultats sont intrigants car ils sont en contradiction avec ce qui est d'habitude observé. En effet, l'activation de p38 et ERK par les UV est décrite dans la littérature. Elle résulte d'ailleurs en la formation préférentielle de complexes AP-1 de type c-Jun/c-Fos responsables de l'augmentation de l'expression de différentes MMPs et de la diminution de la production du collagène de type I, ce qui concourt à modifier profondément la structure histologique de la peau [Rittié and Fisher, 2002]. Une surexpression des gènes *c-Jun* et *c-Fos* a d'ailleurs été observée dans le modèle de SIPS-UVB [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005]. De plus, il a clairement été démontré que l'utilisation du SB203580, un inhibiteur chimique de p38, dans ce modèle engendre la perte de certains biomarqueurs de sénescence [Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005], ce qui indique que p38 est impliqué dans l'établissement de la sénescence après exposition chronique aux UVB. Enfin, une rapide phosphorylation de p38 et ERK a également été détectée *in vivo* dans des biopsies de peau exposées de façon répétée aux UV [Bermudez *et al.*, 2015].

Après n'avoir détecté aucune activation de la voie des Smads ni de la voie des MAPK dans notre modèle de SIPS-UVB, nous avons décidé d'étudier deux autres protéines impliquées dans les voies non-canoniques du TGF- β 1, Rac1 et la PI3K.

Dans ce mémoire, nous n'avons pas montré de modification du profil d'abondance de Rac1 dans le modèle de SIPS-UVB. Ceci est étonnant car cette GTPase est normalement activée par les rayons UV [Rittié and Fisher, 2002]. A l'inverse, l'étude de la PI3K a révélé sa surexpression à court terme dans les fibroblastes en SIPS-UVB. En effet, une augmentation de son abondance a été observée au cours des 2 premières heures suivant la dernière exposition. Une activation de la voie PI3K/Akt est également référencée dans la littérature. Ainsi, il a été démontré que le niveau de PIP₃ augmente très rapidement dans les fibroblastes soumis à une stimulation unique aux UVB et que cet effet disparaît lorsque la PI3K est inhibée [Kabuyama *et al.*, 1998]. Une activation de la PI3K a aussi été montrée dans un modèle de SIPS utilisant l'H₂O₂ comme agent stressant dans des fibroblastes humains [Wang *et al.*, 2004]. Dans cette étude, l'utilisation d'un inhibiteur chimique de la PI3K, le LY294002, a permis de mettre en évidence que l'inhibition de la PI3K résultait en la perte de certains biomarqueurs de sénescence mais n'avait pas d'effet sur l'arrêt du cycle cellulaire. Enfin, une activation de la voie PI3K/Akt a aussi été montrée *in vivo* par la détection de l'activation de Akt et mTOR dans des biopsies de peau soumises de façon répétée aux UV [Bermudez *et al.*, 2015]. Notons que de nombreuses conséquences ont été décrites concernant l'activation de cette voie de signalisation dans un contexte de sénescence et d'exposition aux rayons UV. Ainsi, elle serait responsable de la sécrétion des MMP1 et MMP3 par l'intermédiaire du complexe AP-1, ce qui induit la dégradation de la MEC et modifie donc la structure du tissu cutané [Oh *et al.*, 2006]. De plus, l'activation de cette voie en réponse aux UVB et aux radiations ionisantes n'est pas anodine puisqu'elle pourrait induire une insensibilité des cellules tumorales à la radiothérapie [Zhan and Han, 2004]. Enfin, l'inhibition de cette voie semble avoir un impact positif sur la longévité [Sikora, 2013].

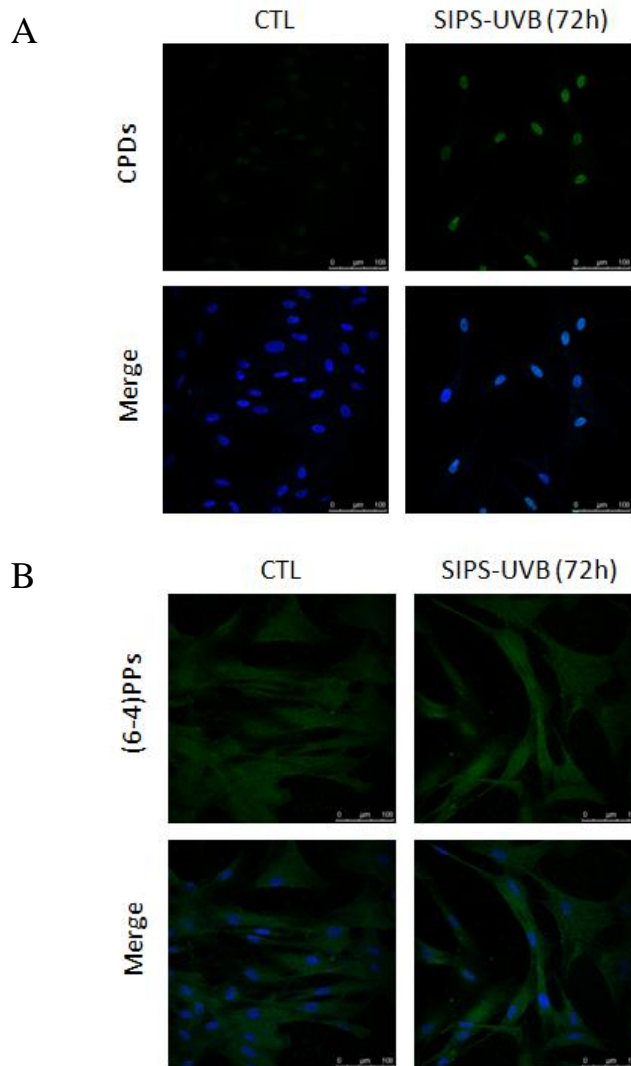


Figure IV.1 : Visualisation des dommages à l'ADN dans des HDFs en condition de SIPS-UVB (72h)
 Images représentatives montrant les marquages obtenus pour CPDs (A) et (6-4)PPs (B) dans des HDFs soumis (ou non) à la SIPS-UVB. Les cellules ont été soumises (ou non) à 2 expositions aux UVB par jour, durant 5 jours, à une dose de 250 mJ/cm². Elles ont été repiquées sur couvre-objets à une densité de 8000 cellules/cm² 72 heures après la dernière exposition et fixées le lendemain. Les marquages ont été visualisés par microscopie confocale à fluorescence (échelle = 100 μm). Les noyaux ont été colorés en bleu par du TO-PRO-3.

La sénescence cellulaire étant un domaine d'étude très vaste et présentant encore beaucoup d'énigmes, de nombreuses perspectives s'offrent à nous.

Tout d'abord, il serait utile de terminer l'analyse des différentes voies dépendantes du TGF- β 1 dans les deux modèles de SIPS. En effet, nous avons étudié la voie des Smads, les MAPK p38 et ERK ainsi que la PI3K et Rac1 mais d'autres voies non-canoniques de réponse au TGF- β 1 restent à investiguer (JNK, Ras, NF- κ B, Wnt/ β -caténine, etc).

Ensuite, si nous avons décrit une activation de la voie des Smads et de p38 en SIPS-TGF- β 1 et une activation de la voie PI3K/Akt en SIPS-UVB, nous n'avons en aucun cas prouvé que ces voies étaient responsables de l'apparition des biomarqueurs de sénescence dans nos modèles. L'étape suivante est donc de bloquer ces voies de manière spécifique et d'observer si les biomarqueurs sont maintenus ou non. Pour ce faire, nous pouvons utiliser des siRNA (par exemple contre Smad4), des inhibiteurs chimiques (par exemple le SB203580, un inhibiteur de p38), réaliser des inactivations géniques, etc.

Une fois l'implication causale de la voie prouvée, il serait intéressant de déterminer précisément par quels mécanismes elle aboutit à l'expression des biomarqueurs (Quels facteurs de transcription sont concernés ? Quels gènes sont régulés ? etc).

Par ailleurs, si une implication du TGF- β 1 est soupçonnée dans l'établissement de la sénescence, d'autres voies indépendantes du TGF- β 1 semblent aussi jouer un rôle dans ce phénomène et méritent donc d'être investiguées dans notre modèle de SIPS-UVB. En effet, les rayons UVB activent différents récepteurs en surface de la cellule, engendrent des lésions à l'ADN qui activent la voie DDR (DNA damage repair), augmentent le niveau intracellulaire des ROS, etc. Il serait donc intéressant d'étudier ces différents effets des UVB et leurs conséquences sur la cellule. En particulier, l'investigation de la voie DDR semble prometteuse étant donné que nous avons pu observer la persistance de lésions de type CPDs dans les fibroblastes exposés jusqu'à 72 heures après la SIPS-UVB (**Figure IV.1**). Ces résultats ont également été obtenus dans un précédent mémoire (Alix Verbeke, 2013) dans lequel un début d'activation de la DDR a été mis en évidence.

D'autre part, dans ce mémoire nous nous sommes particulièrement intéressés aux voies activées dans des modèles de sénescence prématurée induite par les stress. Il serait enrichissant d'investiguer également ces voies en sénescence répliquative, en suivant l'expression des différents partenaires au cours de passages en culture menant à la sénescence répliquative.

Un autre aspect prometteur à étudier est le SASP. Nous avons en effet montré une surexpression de différents gènes liés à ce phénomène (*MMPs*, *IL8*, *MCPI*, etc) dans le modèle de SIPS-UVB. Un premier pas vers une meilleure compréhension de ce biomarqueur serait de comparer les voies de signalisation activées lorsque les fibroblastes sont cultivés seuls ou maintenus en coculture avec des cellules cancéreuses, ceci afin de déterminer les changements induits dans les fibroblastes sénescents par cette proximité. Réciproquement, ces cocultures permettraient de déterminer l'impact des cellules sénescents et du SASP sur le développement des cellules tumorales (croissance, transition épithélio-mésenchymateuse, capacités de migration et d'invasion, etc). L'étude du SASP permettrait également de mieux comprendre comment les cellules sénescents modulent leur microenvironnement [Rodier and Campisi, 2011] et communiquent avec les cellules voisines [Malaquin *et al.*, 2015].

Enfin, de nombreuses variantes de notre sujet d'étude peuvent être imaginées. Par exemple, les fibroblastes pourraient être remplacés par des kératinocytes afin d'étudier l'épiderme plutôt que le derme, les UVB pourraient être remplacés par les UVA ou encore par une combinaison d'UVA et d'UVB afin de se rapprocher davantage du rayonnement solaire, etc.

- DISCUSSION & PERSPECTIVES -

Pour conclure, en plus d'augmenter nos connaissances sur la biologie fondamentale de la cellule, l'étude de la sénescence permet également d'envisager des solutions concrètes pour l'avenir en matière de soins de santé. Ainsi, la mise au point de thérapies « pro-sénescences » permettrait de lutter contre le cancer grâce aux puissantes propriétés anti-tumorales des cellules sénescents et des thérapies « anti-sénescents » pourraient être utiles dans le cas où l'accumulation de cellules sénescents conduit à une dysfonction tissulaire [Muñoz-Espín and Serrano, 2014]. Un « rajeunissement » des cellules sénescents, même s'il semble difficile à accomplir, pourrait également être imaginé pour prolonger l'espérance de vie et surtout pour améliorer la qualité de vie des seniors [Sikora, 2013].

BIBLIOGRAPHIE

- BIBLIOGRAPHIE -

- ANNES, J. P., MUNGER, J. S. & RIFKIN, D. B. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*, 116, 217-24.
- BAKER, D. J., WIJSHAKE, T., TCHKONIA, T., LEBRASSEUR, N. K., CHILDS, B. G., VAN DE SLUIS, B., KIRKLAND, J. L. & VAN DEURSEN, J. M. 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479, 232-6.
- BAYREUTHER, K., RODEMANN, H. P., HOMMEL, R., DITTMANN, K., ALBIEZ, M. & FRAN CZ, P. I. 1988. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5112-6.
- BERMUDEZ, Y., STRATTON, S. P., CURIEL-LEWANDROWSKI, C., WARNEKE, J., HU, C., BOWDEN, G. T., DICKINSON, S. E., DONG, Z., BODE, A. M., SABODA, K., BROOKS, C. A., PETRICOIN, E. F., 3RD, HURST, C. A., ALBERTS, D. S. & EINSPAHR, J. G. 2015. Activation of the PI3K/Akt/mTOR and MAPK Signaling Pathways in Response to Acute Solar-Simulated Light Exposure of Human Skin. *Cancer Prev Res (Phila)*, 8, 720-8.
- CAMPISI, J. 2005. Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science*, 309, 886-7.
- CAMPISI, J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, 75, 685-705.
- CAMPISI, J., ANDERSEN, J. K., KAPAHI, P. & MELOV, S. 2011. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*, 21, 354-9.
- CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.
- CHAINIAUX, F., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2002. Exposure of human skin diploid fibroblasts to repeated subcytotoxic doses of ultraviolet-B induces the overexpression of transforming growth factor-beta1 mRNA. *Ann N Y Acad Sci*, 973, 44-8.
- CHEN, Z., TROTMAN, L. C., SHAFFER, D., LIN, H. K., DOTAN, Z. A., NIKI, M., KOUTCHER, J. A., SCHER, H. I., LUDWIG, T., GERALD, W., CORDON-CARDO, C. & PANDOLFI, P. P. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436, 725-30.
- COLLADO, M., GIL, J., EFEYAN, A., GUERRA, C., SCHUHMACHER, A. J., BARRADAS, M., BENGURIA, A., ZABALLOS, A., FLORES, J. M., BARBACID, M., BEACH, D. & SERRANO, M. 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436, 642.
- DAI, G., FREUDENBERGER, T., ZIPPER, P., MELCHIOR, A., GREYER-BECK, S., RABAUSCH, B., DE GROOT, J., TWAROCK, S., HANENBERG, H., HOMEY, B., KRUTMANN, J., REIFENBERGER, J. & FISCHER, J. W. 2007. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am J Pathol*, 171, 1451-61.
- DE MAGALHAES, J. P., CHAINIAUX, F., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2002. Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett*, 523, 157-62.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., BORLON, C., PASCAL, T., ROYER, V., ELIAERS, F., NINANE, N., CARRARD, G., FRIGUET, B., DE LONGUEVILLE, F., BOFFE, S., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2005. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic

- BIBLIOGRAPHIE -

- level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*, 118, 743-58.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., LEDUC, C., VERBEKE, A. & TOUSSAINT, O. 2012. UV, stress and aging. *Dermatoendocrinol*, 4, 236-40.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., PASCAL, T., BOILAN, E., BASTIN, C., BAUWENS, E. & TOUSSAINT, O. 2008. Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, 44, 1817-32.
- DIERICK, J. F., ELIAERS, F., REMACLE, J., RAES, M., FEY, S. J., LARSEN, P. M. & TOUSSAINT, O. 2002. Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol*, 64, 1011-7.
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. & ET AL. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.
- FRIPPIAT, C., CHEN, Q. M., ZDANOV, S., MAGALHAES, J. P., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2001. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, 276, 2531-7.
- FRIPPIAT, C., DEWELLE, J., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2002. Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, 33, 1334-46.
- GEMS, D. 2015. The aging-disease false dichotomy: understanding senescence as pathology. *Front Genet*, 6, 212.
- GONOS, E. S., DERVENTZI, A., KVEIBORG, M., AGIOSTRATIDOU, G., KASSEM, M., CLARK, B. F., JAT, P. S. & RATTAN, S. I. 1998. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res*, 240, 66-74.
- GUO, X. & WANG, X. F. 2009. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res*, 19, 71-88.
- HAN, K. H., CHOI, H. R., WON, C. H., CHUNG, J. H., CHO, K. H., EUN, H. C. & KIM, K. H. 2005. Alteration of the TGF-beta/SMAD pathway in intrinsically and UV-induced skin aging. *Mech Ageing Dev*, 126, 560-7.
- HAYFLICK, L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 37, 614-36.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 25, 585-621.
- HWANG, E. S., YOON, G. & KANG, H. T. 2009. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell Mol Life Sci*, 66, 2503-24.
- IKUSHIMA, H. & MIYAZONO, K. 2012. TGF-beta signal transduction spreading to a wider field: a broad variety of mechanisms for context-dependent effects of TGF-beta. *Cell Tissue Res*, 347, 37-49.

- BIBLIOGRAPHIE -

- JAVELAUD, D. & MAUVIEL, A. 2005. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene*, 24, 5742-50.
- KABUYAMA, Y., HAMAYA, M. & HOMMA, Y. 1998. Wavelength specific activation of PI 3-kinase by UVB irradiation. *FEBS Lett*, 441, 297-301.
- KAMMEYER, A. & LUITEN, R. M. 2015. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*, 21, 16-29.
- KANG, J. S., LIU, C. & DERYNCK, R. 2009. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol*, 19, 385-94.
- KIM, K. H., PARK, G. T., LIM, Y. B., RUE, S. W., JUNG, J. C., SONN, J. K., BAE, Y. S., PARK, J. W. & LEE, Y. S. 2004. Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 819-25.
- KUBICZKOVA, L., SEDLARIKOVA, L., HAJEK, R. & SEVCIKOVA, S. 2012. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *J Transl Med*, 10, 183.
- LACKNER, D. H., HAYASHI, M. T., CESARE, A. J. & KARLSEDER, J. 2014. A genomics approach identifies senescence-specific gene expression regulation. *Ageing Cell*, 13, 946-50.
- LAWLESS, C., WANG, C., JURK, D., MERZ, A., ZGLINICKI, T. & PASSOS, J. F. 2010. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol*, 45, 772-8.
- LEE, B. Y., HAN, J. A., IM, J. S., MORRONE, A., JOHUNG, K., GOODWIN, E. C., KLEIJER, W. J., DIMAIO, D. & HWANG, E. S. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Ageing Cell*, 5, 187-95.
- LOPEZ-OTIN, C., BLASCO, M. A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M. & KROEMER, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153, 1194-217.
- MALAQUIN, N., CARRIER-LECLERC, A., DESSUREAULT, M. & RODIER, F. 2015. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front Genet*, 6, 94.
- MASSAGUE, J. 2012. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 616-30.
- MATSUZAKI, K. 2013. Smad phospho-isoforms direct context-dependent TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 24, 385-99.
- MUNOZ-ESPIN, D. & SERRANO, M. 2014. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 482-96.
- OH, J. H., KIM, A., PARK, J. M., KIM, S. H. & CHUNG, A. S. 2006. Ultraviolet B-induced matrix metalloproteinase-1 and -3 secretions are mediated via PTEN/Akt pathway in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol*, 209, 775-85.
- PASCAL, T., DEBACQ-CHAINIAUX, F., CHRETIEN, A., BASTIN, C., DABEE, A. F., BERTHOLET, V., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2005. Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett*, 579, 3651-9.

- BIBLIOGRAPHIE -

- PROST-SQUARCIONI, C. 2006. [Histology of skin and hair follicle]. *Med Sci (Paris)*, 22, 131-7.
- QUAN, T., HE, T., KANG, S., VOORHEES, J. J. & FISHER, G. J. 2002. Ultraviolet irradiation alters transforming growth factor beta/smard pathway in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*, 119, 499-506.
- QUAN, T., HE, T., VOORHEES, J. J. & FISHER, G. J. 2001. Ultraviolet irradiation blocks cellular responses to transforming growth factor-beta by down-regulating its type-II receptor and inducing Smad7. *J Biol Chem*, 276, 26349-56.
- QUAN, T., HE, T., VOORHEES, J. J. & FISHER, G. J. 2005. Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts. *J Biol Chem*, 280, 8079-85.
- RAVANAT, J. L., DOUKI, T. & CADET, J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*, 63, 88-102.
- RITTIE, L. & FISHER, G. J. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev*, 1, 705-20.
- RODIER, F. & CAMPISI, J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, 192, 547-56.
- ROSS, S. & HILL, C. S. 2008. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 383-408.
- SALAMA, R., SADAIE, M., HOARE, M. & NARITA, M. 2014. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev*, 28, 99-114.
- SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K., BRENNEISEN, P., WENK, J., HERRMANN, G., MA, W., KUHR, L., MEEWES, C. & WLASCHEK, M. 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol*, 35, 307-16.
- SCHEFE, J. H., LEHMANN, K. E., BUSCHMANN, I. R., UNGER, T. & FUNKE-KAISER, H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)*, 84, 901-10.
- SIKORA, E. 2013. Rejuvenation of senescent cells-the road to postponing human aging and age-related disease? *Exp Gerontol*, 48, 661-6.
- SIKORA, E., ARENDT, T., BENNETT, M. & NARITA, M. 2011. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev*, 10, 146-52.
- TIGGES, J., KRUTMANN, J., FRITSCHKE, E., HAENDELER, J., SCHAAL, H., FISCHER, J. W., KALFALAH, F., REINKE, H., REIFENBERGER, G., STUHLER, K., VENTURA, N., GUNDERMANN, S., BOUKAMP, P. & BOEGE, F. 2014. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech Ageing Dev*, 138, 26-44.
- TOUSSAINT, O., MEDRANO, E. E. & VON ZGLINICKI, T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, 35, 927-45.
- WANG, Y., MENG, A. & ZHOU, D. 2004. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase uncouples H2O2-induced senescent phenotype and cell cycle arrest in normal human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res*, 298, 188-96.

- BIBLIOGRAPHIE -

- XU, P., LIU, J. & DERYNCK, R. 2012. Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling. *FEBS Lett*, 586, 1871-84.
- YAAR, M. & GILCHREST, B. A. 2007. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br J Dermatol*, 157, 874-87.
- ZHAN, M. & HAN, Z. C. 2004. Phosphatidylinositide 3-kinase/AKT in radiation responses. *Histol Histopathol*, 19, 915-23.
- ZHANG, Y. E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*, 19, 128-39.