Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Etude des kératinocytes en SIPS-UVB et de l'effet de leur sécrétome sur la migration des cellules cancéreuses

Parée, Thomas

Award date:
2019

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.

Download date: 02. May. 2026



Faculté des Sciences

ETUDE DES KERATINOCYTES EN SIPS-UVB ET DE L'EFFET DE LEUR SECRETOME SUR LA MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Tom PAREE

Janvier 2019

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - http://www.unamur.be

Etude des kératinocytes en SIPS-UVB et de l'effet de leur sécrétome sur la migration des cellules cancéreuses

PAREE Tom

Résumé

La sénescence cellulaire, définie par un arrêt permanent du cycle cellulaire, a d'abord été décrite comme une barrière anti-tumorale. La sénescence est hétérogène, et en fonction des stimuli l'induisant ou du type cellulaire, elle peut présenter des caractéristiques différentes. Elle est également dynamique et évolue avec le temps. Les cellules sénescentes sont impliquées dans des processus aussi variés que la morphogénèse de certains tissus, la cicatrisation ou la diminution de la fibrose pathologique. Néanmoins, quand elles ne sont pas éliminées par le système immunitaire et s'accumulent, elles peuvent causer la perte de structure des tissus, une inflammation chronique et le vieillissement ainsi qu'augmenter la migration, l'invasion et la tumorigénèse des cellules cancéreuses. Les effets (bénéfiques ou délétères) des cellules sénescentes sont principalement attribués à leur profil sécrétoire singulier, appelé SASP (Senescence associated secretory phenotype). Ce dernier est composé de cytokines, de facteurs de croissance, de protéinases, ainsi que d'autres composant protéiques et non protéiques. Il est bien connu que le SASP met plusieurs jours à se développer mais plus récemment des études indiquent que la régulation et la composition du SASP sont également modulées avec le temps.

Dans ce travail, nous avons investigué la sénescence et le SASP des kératinocytes, encore peu étudiés. Plus précisément, nous avons étudié la sénescence induite prématurément par les UVB (SIPS-UVB) dans des kératinocytes humains normaux (NHKs). Ce modèle avait préalablement été caractérisé jusqu'à 3 jours après le dernier stress. Néanmoins, au vu de la vision actuelle d'un SASP dynamique et dans le but de pouvoir étudier le SASP une fois la sénescence bien établie, nous avons prolongé le modèle jusque 7 jours après le dernier stress. Dans la première partie, les biomarqueurs de la sénescence ont été caractérisés jusqu'à 7 jours après le dernier stress. Nous avons montré que la SIPS-UVB étaient maintenue jusque ce temps. Nous avons également mis en évidence que les acteurs de l'arrêt du cycle cellulaire évoluent entre l'induction et le maintien de la sénescence. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons investigué plusieurs facteurs potentiels du SASP des NHKs en SIPS-UVB. Nous n'avons pas réussi à identifier de facteurs du SASP au delà de 4 jours après le dernier stress. Néanmoins, nos résultats préliminaires ont mis en lumière divers facteurs qui pourraient être importants pour l'induction et le renforcement de la SIPS-UVB des NHKs. Enfin, nous avons investigué l'effet du sécrétome des NHKs exposés aux UVB sur la migration de cellules provenant de carcinomes spinocellulaires (SCC). L'impact des sécrétomes récoltés à différents temps a été testé. A 3 jours post-stress, le sécrétome semble associé à la réponse au stress et à l'entrée en sénescence des NHKs. A 7 jours post-stress, nous avons montré un effet pro-migratoire sur un certain type de cellules de SCC. Ces résultats renforcent l'idée que le sécrétome est également dynamique lors de la sénescence des kératinocytes.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2019

Promoteur: Florence Debacq-Chainiaux

Remerciements

Tout d'abord, un grand merci à Maude, Martine, Noelle, Catherine, Guy et Antoine pour le travail qu'ils font pour le labo, leur patience et l'aide qu'ils apportent aux mémorants (et à tout l'URBC).
Je tiens également à remercier Florence Chainiaux et les SAGE pour m'avoir accueilli dans leur équipe. Merci Florence pour vos conseils, votre gentillesse, toutes les corrections et les bons articles que vous recommandiez au cours de notre parcours dans votre équipe.
Plus particulièrement, un grand merci à toi Emi, pour m'avoir appris les techniques, la vie de labo, comment bien faire un tampon (oups) ainsi que les bonnes adresses pour manger à Namur. Merci également d'avoir subit mes horribles tournures de phrases, mes fautes d'orthographes et, plus généralement, mes fautes de forme. T'avoir comme tutrice est une des raisons pour laquelle j'ai choisis ce mémoire et je n'ai pas été déçu (pour l'instant, il reste 2 jours avant la fin, à l'heure où j'écris ces lignes). Courage pour la fin de ta thèse, t'as plein de bonnes idées et tu vas faire un papier d'enfer !
Merci également à Morgane pour la dernière relecture !
Merci aux collègues, à savoir Rachid et Docteur la Sciences pour la bonne ambiance du bureau. Merci à Loïc pour être venu se pavaner cette dernière semaine pendant ses pauses et renverser du café sur mon bureau quand on bossait.
Un grand merci à Patricia également ! Je pourrais revenir en URBC rien que pour toi.

Je remercie également les membres du jury de ce mémoire et j'espère qu'ils apprécieront la lecture.

Liste d'abréviations

(6-4)PP	(6-4) photoproducts
53BP1	p53 binding protein 1
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
9-1-1	RAD9–RAD1–HUS1
AMPK	AMP activated protein kinase
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia Rad3 related
BCC	Basal cell carcinoma
BPE	Bovine pituitary extract (extrait pituitaire bovin)
BSA	Bovine serum albumin
C/EBPβ	CCAAT/enhancer binding protein β
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor
cGAMP	GMP-AMP cyclique
cGAS	cGAMP synthase
CHK	Checkpoint kinase
CPD	Cumulative populations doubling
CPDs	Cyclobutane pyrimidine dimers
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
DDR	DNA damage response
DHG	DMEM high glucose
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epidermal to mesenchymal transition
FISH	Fluorescence in situ hybridation
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
H_2O_2	Hydrogen peroxyde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hTERT	Human telomerase catalytic subunit
IFN	Interféron
IGFBP	Insulin growth factor binding protein
IKK	IκB kinase
IL	Interleukin
ImK	Immortal keratinocytes
IR	Ionizing Radiation
IRF-3	IFN Regulatory Factor 3
IκB	Inhibiteur de κB
K-SFM	Keratinocyte-serum free medium
MC	Milieu conditionné
MEC	Matrice extracellulaire

MiDAS	Mitochondrial dysfunction associated senescence
MMP	Matrix metalloproteinase
MRN	MRE11/RAD50/NBS1
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
NB-UVB	Narrow-band UVB
NER	Nucleotide excision repair
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells
NHEJ	Non-homologous end joining
NHK	Normal human keratinocytes
NICD	NOTCH Intracellular Domain
NLR	Nod-like receptor
OIS	Oncogen induced senescence
$p38^{MAPK}$	p38 mitogen-activated protein kinase
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF-AA	Platelet-derived growth factor-AA
PFA	Paraformaldéhyde
PSNE	Post senescence neoplasic emergence
PVDF	Polyvinilidene fluoride
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RB	Retinoblastoma
rEGF	Recombinant EGF
ROS	Reactive oxygen species
SA-βGal	Senescence-associated β-galactosidase
SAHF	Senescence associated heterochromatin foci
SASP	Senescence associated secretory phenotype
SCC	Squamous cell carcinoma
SDF	Senescence associated DNA damage foci
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	Short hairpin RNA
SIPS	Stress induced premature senescence
SR	Sénescence réplicative
SSC	Saline sodium citrate
STING	Stimulator of interferon genes
t-BHP	Tert-butyl-hydroperoxyde
TBK-1	TANK binding kinase
TBS	Tris buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TIF	Telomere dysfunction induced foci
TIS	Telomere induced senescence
TNF	Tumor necrosis factor

UPR	Unfolded protein response
UV	Ultraviolet
UVA	Ultraviolet A
UVB	Ultraviolet B
UVC	Ultraviolet C
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XRCC1	X-Ray repair cross complementing 1

TABLE DES MATIERE

INTRODUTION **1**
I) Les différents types de sénescence **1**
1) Sénescence réplicative 1
2) Sénescence induite prématurément par les stress 2
3) Sénescence induite par les oncogènes 3
4) Sénescence des cellules post-mitotiques 4
II) Les biomarqueurs associés à la sénescence **4**
1) Changement de morphologie cellulaire et activité β-galactosidase associée à la sénescence 4
2) Arrêt du cycle cellulaire 5
3) Activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) 5
4) Dysfonctions mitochondriales 6
5) SASP 7
III) Sénescence des cellules épithéliales et cellules émergentes **10**
1) Entrée en sénescence des cellules épithéliales en culture 10
2) Cellules émergentes post-sénescence 11
IV) Accumulation des cellules sénescentes dans les tissus **11**
1) Sénescence aigue ou chronique 11
2) Apparition des cellules sénescentes *in vivo* 12
3) Impact de la sénescence sur le vieillissement 13
4) Relation entre cancer et sénescence *in vivo* 13
V) Vieillissement de la peau **14**
1) L'histologie de la peau 14
2) Vieillissement intrinsèque et extrinsèque 15
3) Rayonnement UV et stress oxydatifs 15
VI) Cancer de la peau **16**
1) Types de cancers cutanés 16
2) Impact des rayons UV sur les cancers cutanés 17
3) Communication entre cellules sénescentes et cellules cancéreuses dans la peau 17
VII) Objectif et modèle **17**

MATERIEL ET METHODES **19**
I. Culture cellulaire **19**
1) Kératinocytes humains normaux (NHKs) 19
2) Lignées cancéreuses 19
II) Exposition des NHKs aux UVB **20**
III) Détection de l'activité β-galactosidase associée à la sénescence (SA-βgal) **20**
IV) Analyse de l'expression génique **21**
1) Extraction d'ARN total 21
2) Transcription inverse des ARNm en ADNc 21
3) Real time quantitative PCR 22
V) Extraction protéique et Western Blot **22**
1) Extraction protéique 22
2) Dosage protéique 23
3) Western Blot 23
3.1) Gel 10 ou 12% Acrylamide 23
3.2) Gel 3-8% d'acrylamide 24
VI) Immunofluorescence **24**
VII) Hybridation *in situ* en fluorescence combinée à une immunofluorescence **25**
VIII) Etude de l'impact des milieux conditionnés des kératinocytes sur la migration de cellules cancéreuses **26**
Test scratch 26

RESULTATS **27**
I) Etude des biomarqueurs de la sénescence chez les NHKs en SIPS-UVB **28**
1) Morphologie cellulaire et activité SA-βgal 28
2) Etude de l'arrêt du cycle cellulaire 28
3) Dommages à l'ADN et activation de la DDR 30
II) Etude du sécrétome des NHKS en SIPS-UVB **32**
1) Etude de facteurs pro-inflammatoire du SASP dans les NHKs en SIPS-UVB 32
2) Etude de l'expression d'autres facteurs non inflammatoires associés au SASP 33
3) Etude de l'expression de STING 34
III) Etude de l'impact du sécrétome des NHKs sur la migration de SCCs **34**
1) Mise au point des condition de changement de milieu 34
2) Etude de l'effet du milieu conditionné sur la migration et l'EMT de cellules cancéreuses 35
3) Etude de la migration des cellules A431 avec les chambres de Boyden 36
DISCUSSION ET PERSPECTIVES **37**
I) Etude des biomarqueurs de la sénescence jusqu'au jour 7 ..... **37**
1) Morphologie et activité SA-βgal 37
2) Arrêt du cycle cellulaire 37
3) Dommages à l'ADN et activation de la DDR 39
II) Etude du SASP et de sa régulation dans les NHKs en SIPS-UVB **41**
1) Etudes de facteurs du SASP dans les NHKs en SIPS-UVB et discussion de leur implication dans la sénescence 41
2) Etude de la régulation du SASP 43
III) Etude de l'impact des milieux conditionnés sur les SCC **45**
1) Discussion et perspectives sur la différence de réponse observée entre les milieux conditionnés des NHKs en SIPS-UVB récoltés à 3 et 7 jours. 45
2) Discussion et perspectives sur la différence de réponse observée entre les A431 et les MET1 46
REFERENCES **48**

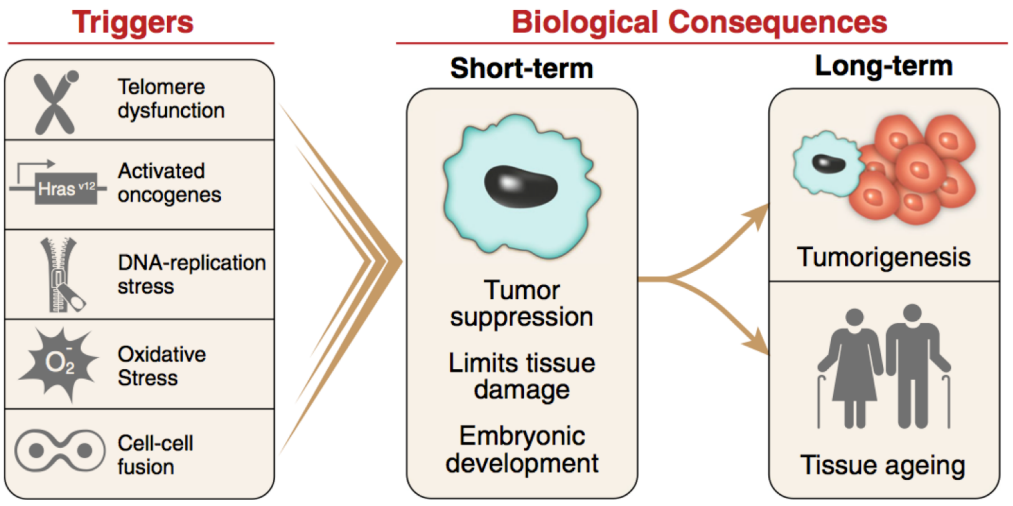


Fig 1 : Causes et conséquences de la sénescence [Burton et Krizhanovsky, 2014]

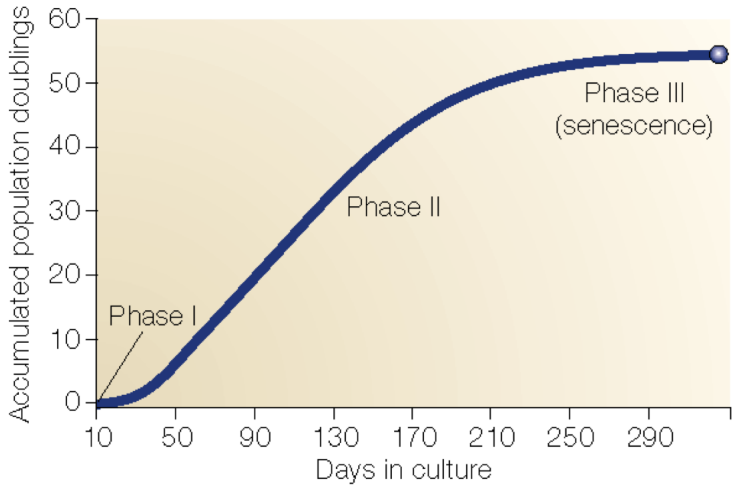


Fig 2 : Courbe de croissance d'une culture de fibroblastes [Shay et Wright, 2000]

INTRODUTION

Le cancer est une prolifération incontrôlée des cellules suite à un dérèglement du cycle cellulaire [Sperka, 2012]. Des régulateurs négatifs du cycle cellulaire, tels que p53, sont impliqués dans les points de contrôles durant la prolifération normale. Ces régulateurs sont également des barrières anti-tumorales et peuvent être maintenus suite à un stress potentiellement oncogénique. Ce maintien peut mener à des réponses telles que l'apoptose ou la sénescence [Sperka, 2012 ; Campisi, 2007]. Cette dernière a été définie comme un arrêt de prolifération irréversible des cellules restant néanmoins métaboliquement actives [Hayflick et Moorhead, 1961]. Cet arrêt du cycle cellulaire permanent survient suite à une activation de la voie p53/p21 et/ou de la voie p16/RB (Retinablastoma protein) [Campisi, 2007].

La sénescence est hétérogène et complexe. En plus de son rôle de barrière anti-cancéreuse, elle présente divers effets positifs dans des processus tels que la cicatrisation, ou encore le développement embryonnaire [Demaria, 2015 ; Munoz Espin, 2013]. D'un autre coté, elle est associée au vieillissement et peut, de façon surprenante, également avoir un impact protumoral (Figure 1) [Campisi, 2013].

I) Les différents types de sénescence

1) Sénescence réplicative

La sénescence a été observée pour la première fois par Leonard Hayflick et Paul Moorhead dans des cultures de fibroblastes humains dérivés de tissus embryonnaires. Ceux-ci arrêtaient de proliférer après approximativement 50 doublements de population cumulés (cumulative population doublings ou CPD) [Hayflick et Moorhead, 1961]. Cet arrêt de prolifération à la suite d'une culture prolongée est appelé sénescence réplicative (SR) [Jeyalapan, 2007].
La culture des fibroblastes peut être divisée en 3 phases (Figure 2). La phase I correspond à l'adaptation des cellules issues de biopsies à la culture *in vitro*. La phase II correspond à la période de prolifération rapide et exponentielle des cellules. Enfin, la phase III correspond au plateau de sénescence où la réplication des cellules ralentit avant de s'arrêter [Shay et Wright, 2000].
De façon similaire aux fibroblastes, la majorité des cellules somatiques ont une capacité limitée de division. Le plateau de sénescence a en effet été observé dans les cellules endothéliales [Kurz, 2000], les hépatocytes [Ogrodnik, 2017], les kératinocytes [Gosselin, 2009], les mélanocytes [Bandyopadhyay, 2001] ou encore les cellules épithéliales mammaires [Romanov, 2005].

La sénescence réplicative a par la suite été associée au raccourcissement critique des télomères [Harley, 1998]. Les télomères sont des séquences répétées (5'-TTAGGG-3') d'environ 10-15kb chez l'humain, à l'extrémité des chromosomes. L'extrémité des télomères est sous forme d'un simple brin dépassant (overhang), se repliant pour former la boucle T (qui est coiffée de protéines). Celle-ci a pour fonction de protéger l'ADN [Griffith et al, 1999 ; Blackburn, 2001].
Le raccourcissement des télomères a d'abord été attribué au fait qu'à chaque division l'ADN polymérase réplique de façon incomplète l'extrémité des chromosomes [Levy, 1992 ; Alsopp,

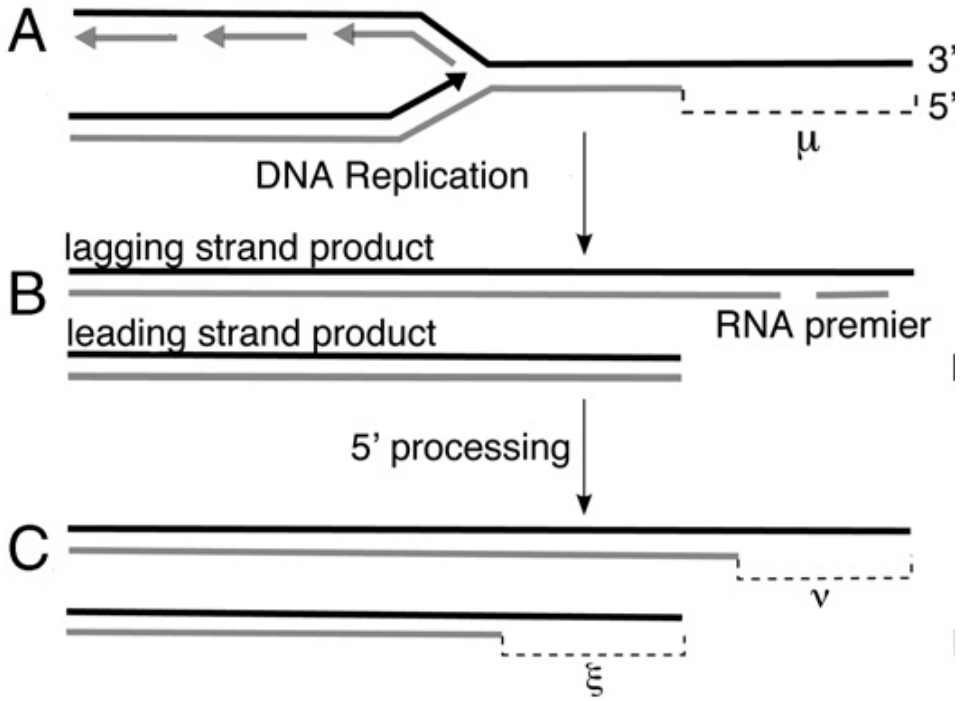


Fig 3 : Raccourcissement des télomères suite à la formation des brins dépassant [Rodriguez-Brenes et Peskin, 2010]. A : Le brin inférieur est plus court à l'extrémité. Cela permet la formation de la t-loop. B : Le brin retardé n'est pas entièrement répliqué à cause des fragments d'Okazaki, n'est pas entièrement formé. C : Pour la formation des boucles t, des brins dépassant sont formés, ce qui cause le raccourcissement des télomères.

1995]. Néanmoins, le raccourcissement des télomères serait principalement du à la formation du simple brin pour la t-loop via des exonucléases [Arnoult, 2015] (Fig 3).

En plus de l'érosion des télomères décrite ci-dessus, d'autres évènements stochastiques peuvent provoquer un raccourcissement brutal de ceux-ci [Arnoult, 2015]. Par exemple, le raccourcissement des télomères peut être accéléré par des dommages simples brins suite à un stress oxydatif [Von Zglinicki, 2000]. Ceci entraîne donc une hétérogénéité dans la taille des télomères des cellules pré-sénescentes [Arnoult, 2015].
Quand les télomères sont trop courts, la stabilité du génome peut être menacée et la cellule entre en sénescence [Jeyalapan, 2007]. En effet, normalement, des protéines télomériques appelées shelterines, empêchent les senseurs de dommages à l'ADN de reconnaître la fin des chromosomes comme une cassure doubles brins. L'érosion des télomères entraîne une exposition des extrémités et active une réponse aux dommages à l'ADN (DNA damage response ou DDR) menant à la sénescence notamment via l'activation du facteur de transcription p53 [Arnoult, 2015]. Le raccourcissement des télomères peut également mener à la fusion des télomères et donc des chromosomes [Arnoult, 2015]. Il y a en effet une augmentation du nombre de chromosomes dicentriques chez les fibroblastes en sénescence réplicative [Counter, 1995 ; Serrano et Blasco, 2001].

La télomérase est composée de deux sous-unités. Une sous unité protéique (TERT) qui est une reverse transcriptase rallongeant les télomères, et une sous unité ARN (TERC) qui sert de matrice à la première. L'expression de la sous-unité TERT permet d'immortaliser des fibroblastes, des cellules pigmentaires de la rétine et des cellules endothéliales [Serrano, 2001]. La majorité des cellules cancéreuses expriment la télomérase et n'entrent pas en sénescence, ce qui les rend immortelles [Bodnar, 1998].

2) Sénescence induite prématurément par les stress

Il a été mis en évidence que différents types cellulaires (fibroblastes de derme et de poumon, cellules endothéliales, mélanocytes, kératinocytes) peuvent présenter un phénotype similaire à la sénescence réplicative alors que la cellule n'a pas encore atteint sa limite de division [Debacq-Chainiaux, 2005, Toussaint, 2000 ; Toussaint, 2002]. En effet, elles peuvent entrer dans un arrêt de prolifération irréversible suite à l'exposition à des stress de nature chimique ou physique, induisant des dommages à l'ADN directement ou indirectement via un stress oxydatif [Toussaint et al, 2002].

Ce phénomène est appelé sénescence prématurément induite par les stress (SIPS pour Stress Induced Premature Senescence). De nombreux modèles de SIPS ont été mis au point. Par exemple, il est possible d'induire la sénescence suite à une exposition prolongée à une hyperoxie [Von Zglinicki, 2005], à une exposition à des rayons ultraviolets (UVs) [Bertrand-Vallery, 2010, Debacq-Chainiaux, 2005, Lewis, 2008], à des radiations ionisantes (IR) [Coppé, 2008], un choc thermique [Alekseenko, 2014], une exposition à l'éthanol [Dierick, 2002], au *tert*-butyhydroperoxide (t-BHP) ou encore au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [Frippiat, 2000].

Dans ces modèles, l'intensité du stress est importante. En effet, si le stress est trop faible et que les dommages qu'il induit sont réparables, l'arrêt du cycle sera transitoire [Coppé, 2008]. Par contre, si le stress est trop intense, il induira l'apoptose. Une exposition répétée permet de diminuer la dose du stress [Toussaint, 2002].

Il est intéressant de souligner que dans certains cas, une exposition prolongée à un stress oxydatif tel que l'hyperoxie (40% O_2) pendant plusieurs semaines induit la sénescence après un nombre précoce de CPD par un raccourcissement accéléré des télomères. Les cellules stressées atteignent donc prématurément la taille critique des télomères. La limite entre les modèles de SIPS et la SR est alors floue. En effet, la culture cellulaire est actuellement réalisée à 21% d'O_2 (concentration en oxygène atmosphérique), une concentration au-dessus de celle à laquelle la plupart des cellules sont confrontées *in vivo* (concentration en oxygène physiologique), et peut donc représenter un stress oxydatif. Par exemple, les fibroblastes entrent en sénescence après un nombre de CPD plus élevé quand ils sont cultivés à 4% d'O_2 qu'à 20% [Toussaint, 2002].
D'un autre coté, un stress aigu à l'H_2O_2 ou à des IR, ou des stress répétés au *t*-BHP induisent une SIPS indépendamment du raccourcissement des télomères [Dumont, 2001; Suzuki et Boothman, 2008].

Lors d'une exposition à des IR, des UV ou à un choc thermique, l'arrêt du cycle cellulaire est généralement observé dés les premières heures après le stress [Bertrand-Vallery, 2010 ; Lewis et al, 2008, Rodier, 2009, Alekseenko et al, 2014]. Les autres biomarqueurs de la sénescence sont généralement observables dans les 2 à 3 jours après le dernier stress [Dierick, 2002 ; Bertrand-Vallery, 2009 ; Lewis, 2008, Suzuki et Boothman, 2008, Alekseenko, 2014].

Si les cellules en SIPS présentent un phénotype sénescent, des études comparant l'expression génique et protéique des fibroblastes en sénescence réplicative et en SIPS (par exposition à l'éthanol, au *t*-BHP ou à l'H_2O_2) ont montré que malgré des phénotypes similaires, les différents types de sénescence présentaient des marqueurs spécifiques [Dierick, 2002 ; Pascal, 2005].

3) Sénescence induite par les oncogènes

De façon surprenante, l'expression d'oncogènes dans des cellules normales peut induire un arrêt de prolifération et un phénotype sénescent. Par exemple, certains oncogènes tels que c-Myc activent l'apoptose alors que d'autres tels que Ras induisent plutôt la sénescence [Serrano, 1997 ; Bringold et serrano, 2000]. Dans ce deuxième cas, on parle de sénescence induite par les oncogènes ou OIS (oncogene induced senescence) [Campisi, 2007]. Pour rappel, les membres de la famille Ras sont impliqués dans la transmission de signaux mitogéniques et sont donc des proto-oncogènes. Quand ils sont amplifiés ou lorsqu'une mutation les active constitutivement, ils deviennent des oncogènes [Serrano, 1997].

Un modèle classique d'OIS est la transfection de cellules normales avec la forme oncogénique de Ras, H-RasV12. La prévention de la transformation des cellules suite à l'expression de H-RasV12 se fait par l'arrêt du cycle et l'entrée en sénescence [Serrano, 1997 ; Jones, 2000 ; Di Micco, 2006, Kim, 2015 ; Gluck, 2017]. L'entrée en OIS serait causée par l'hyperprolifération des cellules suite à l'expression de l'oncogène. En effet, en absence de réplication, la surexpression d'une oncogène ne mène pas à la sénescence [Di Micco, 2006].
L'entrée en sénescence suite à l'expression de H-RasV12 peut prendre des temps variables en fonction du type cellulaire. En effet, cela prend 2 à 4 jours chez les fibroblastes [Serrano,

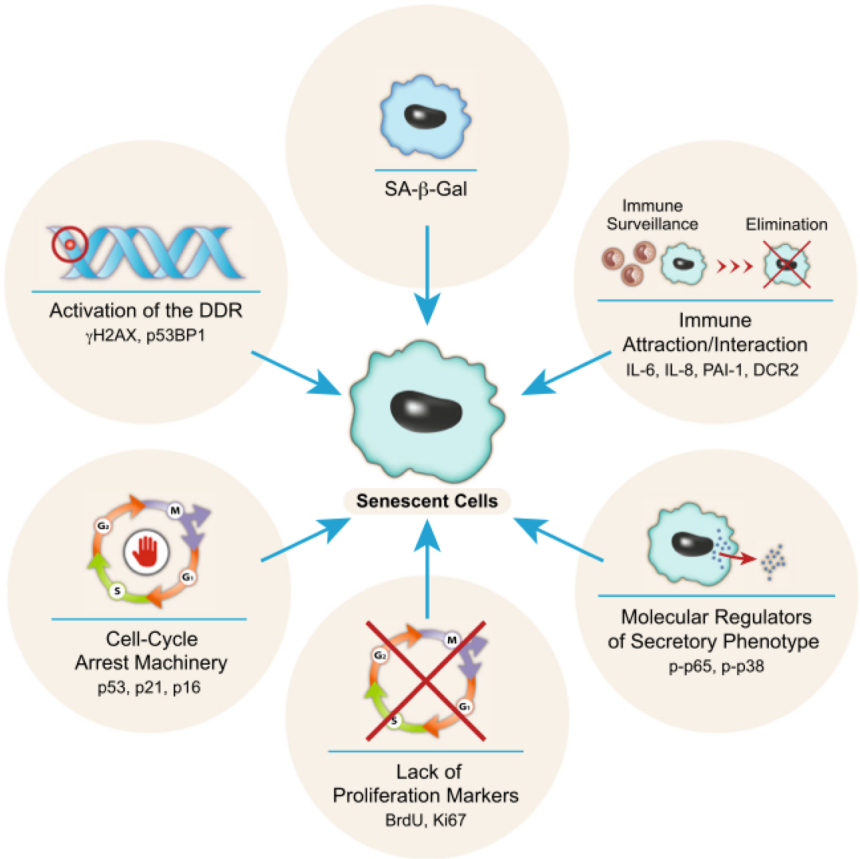


Fig 4 : Biomarqueurs associés à la sénescence *[Burton et Krizhanovsky, 2014]*

1997], 6 jours chez les kératinocytes [Kim, 2015], mais cela peut mettre 20 passages dans des cellules épithéliales de thyroïde [Jones, 2000].

4) Sénescence des cellules post-mitotiques

Un phénotype sénescent a également été observé dans des cellules non prolifératives. En effet, des neurones matures post-mitotiques présentent un phénotype sénescent induit par une activation de la DDR et de p21. Bien que les cellules soient déjà en arrêt de prolifération, cette sénescence est similaire à la sénescence des fibroblastes prolifératifs [Jurk, 2012].

II) Les biomarqueurs associés à la sénescence

Les cellules sénescentes présentent un phénotype particulier (Figure 4). Elles présentent une morphologie élargie, une activité β-galactosidase particulière, un arrêt du cycle cellulaire, des dommages à l'ADN persistants et une activation de la DDR, une délétion de l'ADN mitochondrial, un profil sécrétoire particulier et une résistance à l'apoptose [Campisi et d'Adda Di Fagagna, 2007]. Plusieurs marqueurs sont nécessaires pour définir la sénescence. Il faut noter que ces biomarqueurs ont principalement été mis en évidence chez le fibroblaste [Campisi, 2007].

1) Changement de morphologie cellulaire et activité β-galactosidase associée à la sénescence

Les cellules sénescentes ont une morphologie élargie (et aplatie si elles sont adhérentes). Le changement de morphologie est associé à un remodelage du cytosquelette [Nishio, 2001]. Une expansion du réticulum endoplasmique est également observée, associée à l'activation d'ATF6α, un partenaire de la voie UPR (Unfolded Protein Response) liée à la détection de protéines mal repliées [Druelle, 2016].
Ce changement de morphologie est aussi associé à une accumulation de vacuoles autophagiques, entrainant notamment une augmentation de la biogénèse des lysosomes [Kurz, 2000].
Cette biogénèse accrue explique en partie la surexpression d'enzymes lysosomiales, telles que la β-galactosidase (gène GLB1). Cette enzyme, est surabondante chez les cellules sénescentes et son activité, normalement optimale à pH 4,0 est alors également détectable à pH 6,0. Ce biomarqueur est donc appelé β-galactosidase associée à la sénescence (SA-βgal pour Senescence Associated β-galactosidase) [Dimri, 1995 ; Debacq-Chainiaux, 2009 ; Cho et Hwang, 2012].

Il faut noter que les cellules quiescentes (par privation de sérum) ont également une activité lysosomale élevée et une activité β-galactosidase détectable à pH 6,0. Par contre, contrairement aux cellules sénescentes, les cellules quiescentes possèdent une activité autophagique élevée et ne présentent pas d'augmentation de la biogénèse des lysosomes [Cho et Hwang, 2012].

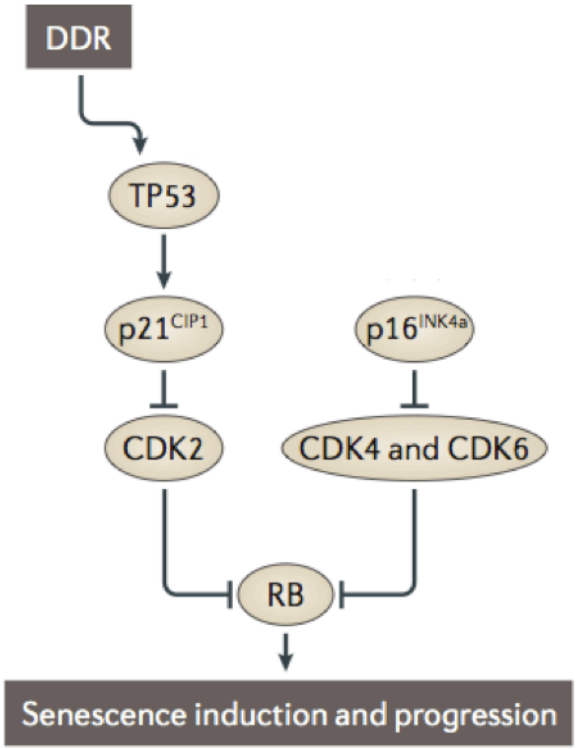


Fig 5 : Acteurs principaux de l'arrêt du cycle cellulaire [Adapté de Sturmlechner et al, 2016]

2) Arrêt du cycle cellulaire

L'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence a souvent été observé lors de la transition G1/S, la cellule étant alors en arrêt G1 [Kuilman, 2010 ; Suzuki et Boothman, 2008]. Néanmoins, de plus en plus d'études rapportent que l'arrêt du cycle en sénescence peut également se réaliser en phase G2 [Gire et Dulic, 2015].
Deux voies principales sont responsables de cet arrêt de cycle : la voie p53/p21 et la voie p16/RB. Il est important de préciser que ces voies ont principalement été mises en évidence chez le fibroblaste [Campisi, 2007] où une augmentation de l'expression de p21 est observée 2 à 3 passages avant la sénescence, pour ensuite diminuer au profit d'une augmentation d'expression de p16 [Alcorta, 1996]. Ces voies sont communes aux autres types de sénescence. En effet, elles ont été rapportées comme étant toutes les deux activées en OIS [Serrano, 1997 ; Di Micco, 2006] et en SIPS [Toussaint, 2002a,b ; Suzuki et Boothman, 2008].

La figure 5 résume l'activation de ces 2 voies. Lors d'un stress génotoxique important, le facteur de transcription p53 est activé et va induire la transcription de p21, un inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines (CDKI). P21, ainsi que p16, une autre CDKI, sont surexprimées dans les cellules sénescentes. Elles inhibent les kinases dépendantes des cyclines (CDKs) qui sont des régulateurs positifs du cycle cellulaire. Dans, l'arrêt de cycle en phase G1, p16 et p21 inhibent respectivement la CDK4/6 et la CDK2 [Gire et Dulic, 2015], responsables de la phosphorylation de RB [Campisi et d'Adda di Fagagna, 2007]. Ce dernier est donc hypophosphorylé et séquestre le facteur de transcription E2F, impliqué dans l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire [Johnson, 2016].
La voie p53/p21 et la voie p16/RB sont donc interconnectées mais peuvent être activées indépendamment [Campisi et d'Adda di Fagagna, 2007].

Dans l'arrêt en phase G2, p21 induit également la déphosphorylation de RB en inhibant les CDKs. Par contre, RB réprime directement la transcription des gènes de la transition G2/M [Gire et Dulic, 2015].

Soulignons de plus qu'il a été mis en évidence que la voie p16/RB était liée a la formation de foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) [Kosar, 2011 ; Aird et Zhang, 2013]. Les SAHF sont des domaines d'hétérochromatine qui se forment sur des promoteurs de gènes impliqués dans la prolifération, tels que les gènes cibles du facteur de transcription E2F, induisant ainsi leur inhibition [Aird et Zhang, 2013]. De plus, les SAHF bloquent la fourche de réplication induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase S, menant à la sénescence [Prieur, 2011].

3) Activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR)

La DDR est une voie impliquée dans la réparation de l'ADN. Comme indiqué ci-dessus, la DDR est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire, afin de permettre la réparation des dommages et d'empêcher la croissance des cellules dont l'ADN est endommagé [Campisi, 2007 ; Campisi, 2013]. Cependant, lorsque les dommages sont trop importants et que la cellule n'est pas capable de les réparer, cette dernière entre en apoptose ou en sénescence [Campisi, 2007 ; Campisi, 2013 ; Fumagalli, 2014].

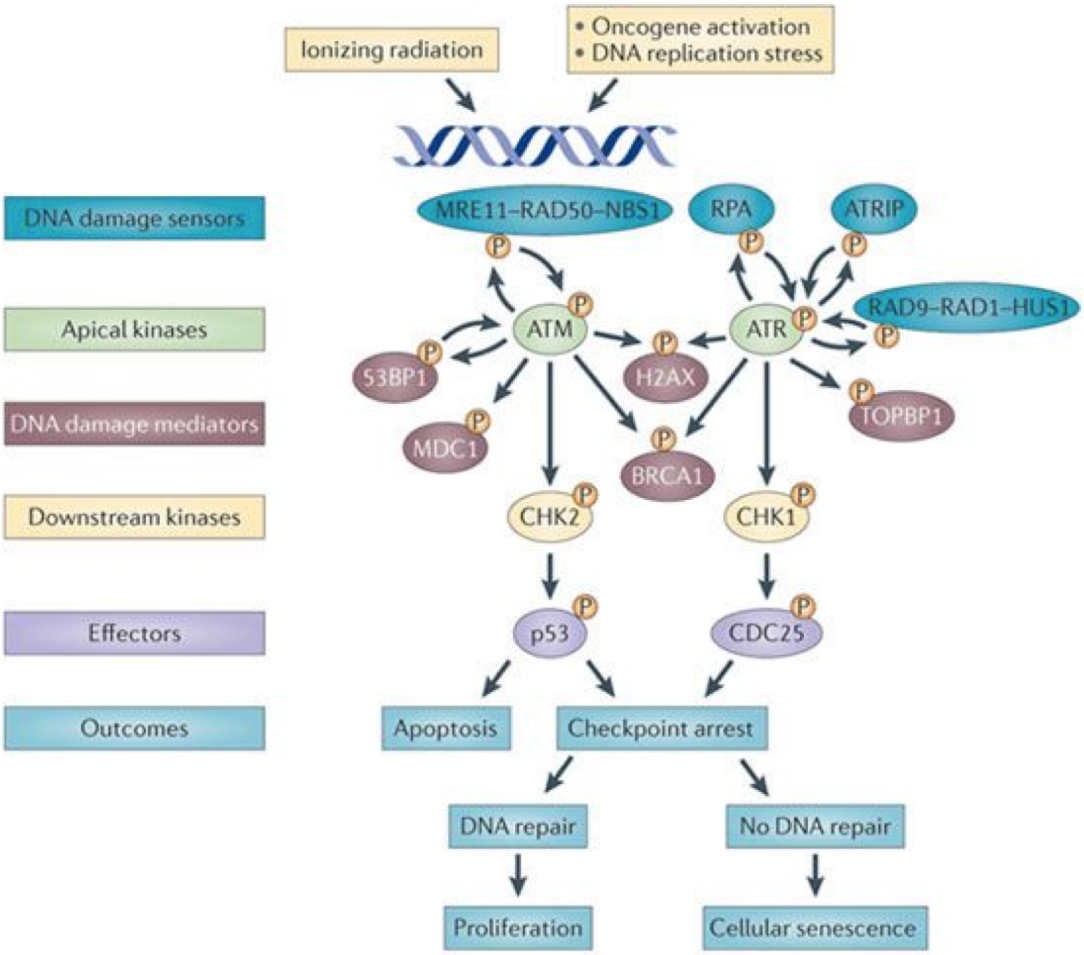


Fig 6 : Voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) [Sulli et al, 2012]

La DDR détecte des dommages via des complexes protéiques qui diffèrent suivant le type de dommage (Figure 6). Le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) détecte les cassures doubles brins, alors que les cassures simples brins sont détectées par le complexe 9-1-1 (RAD9–RAD1–HUS1). Ces complexes permettront la phosphorylation activatrice des kinases apicales ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related protein) respectivement [Sulli, 2012].

ATM et ATR activent par phosphorylation les kinases en aval CHK2 (checkpoint kinase 2) et CHK1, respectivement. CHK1 et CHK2 stabilisent à leur tour p53 par phosphorylation [Campisi et d'Adda di Fagnagna, 2007]. Elles peuvent également inhiber par phosphorylation CDC25 (cell division cycle 25), une protéine pro-prolifération activant des CDKs [Sulli et al, 2012].
De nombreuses protéines médiatrices participent à la transduction, l'entretien et l'amplification du signal. Ces médiateurs tels que 53BP1 (p53 binding protein 1) ou γH2AX entretiennent l'activation de la DDR. On retrouve la présence de ces médiateurs dans des foci de dommages à l'ADN, appelés SDFs (senescence associated DNA damage foci) [d'Adda di Fagagna, 2003]. Quand les SDFs sont détectés au niveau des télomères, ils sont appelés TIF pour Telomere Dysfunction Induced Foci [Takai, 2003].

La DDR peut également activer la voie p16/RB mais cela se fait de manière indirecte via l'activation de p53 (ces voies étant interconnectées) [Jacobs et De Lange, 2004]. L'activation de p16 a souvent lieu après celle de p53 [Takeuchi, 2010].

4) Dysfonctions mitochondriales

Des dysfonctionnements de la mitochondrie sont associés à la sénescence. En effet, les cellules sénescentes accumulent des mutations et des délétions dans leur ADN mitochondrial, dont une délétion dite « commune » de 4977 pb [Liu, 2015 ; Lee, 1994]. De plus, il y a une augmentation de la masse mitochondriale et de la production de ROS en SR [Passos, 2007], en SIPS induite par H_2O_2 [Lee, 2002] et en OIS [Moiseeva, 2009].

Des données indiquent que les dysfonctions mitochondriales sont une conséquence de la sénescence [Ziegler, 2014]. Par exemple, en OIS-Ras, c'est une conséquence des signaux aberrant de réplication qui activent p53 et RB. Néanmoins, les dysfonctions mitochondriales pourraient renforcer la sénescence en induisant la production de ROS endommageant l'ADN [Moiseeva, 2009]. Par ailleurs, retarder les dysfonctions mitochondriales ralentit le raccourcissement des télomères et retarde la SR [Passos, 2007].

A l'inverse, induire des dysfonctions mitochondriales peut entraîner prématurément un arrêt du cycle cellulaire irréversible et un phénotype sénescent. Cet arrêt, qui a été nommé MiDAS (mitochondrial dysfonction associated senescence), semble indépendant des dommages à l'ADN ou de la production de ROS [Wiley, 2016]. La DDR n'est pas activée et l'activation de p53 se fait via l'AMPK (AMP activated protein kinase) qui détecte le faible ratio NAD+/NADH de la cellule (lié au dysfonctionnement des mitochondries). Il faut préciser que quand ce ratio est raugmenté, les cellules en MiDAS peuvent à nouveau proliférer, en gardant néanmoins certains traits du phénotype sénescent [Wiley, 2016].

5) SASP

Une caractéristique importante des cellules sénescentes est qu'elles possèdent un profil sécrétoire modifié par rapport aux cellules non sénescentes. Ce dernier est appelé phénotype sécrétoire associé à la sénescence ou SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) [Coppé, 2008].
Le SASP a d'abord été mis en évidence dans des fibroblastes en SR ou en SIPS-IR et dans des cellules épithéliales de prostate en SIPS-IR. Des différences dans le SASP sont observées en fonction du type cellulaire et du type de sénescence [Coppé, 2008 ; Salminen, 2012 ; Toutfaire, 2018]. De plus, ce SASP est dynamique et donc modulé au cours du temps [Hoare, 2016].

Le SASP est composé de cytokines, dont trois majeures sont les interkeukines IL-1 α, IL-6 et IL-8, ainsi que de chémokines. Il est également composé de protéinases telles que les MMPs (métalloprotéinases) et de facteurs de croissance tels que VEGF [Coppé, 2008 ; Orjalo, 2009 ; Van Deursen, 2014]. Des composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine 1 ainsi que des microvésicules sont également rapportées comme faisant partie du SASP [Van Deursen, 2014 ; Weilner, 2013].

a) Induction et développement du SASP

Il a été démontré que le SASP était principalement modulé au niveau de l'expression génique [Coppé, 2008]. Un des régulateurs principals du SASP est le facteur de transcription NF-κB (Nuclear factor kappa B). Il a ainsi été montré que NF-κB impacte l'expression d'un nombre plus important de gènes dans les cellules sénescentes en comparaison avec des cellules non sénescentes [Chien, 2011 ; Salminen, 2012]. NF-κB est connu pour activer la transcription de gènes inflammatoires. Il n'est donc pas surprenant qu'il intervienne dans l'expression de nombreux facteurs pro-inflammatoires du SASP [Salminen, 2012].
NF-κB est un dimère composé à partir des sous unités RelB, c-Rel, p50, p52 et p65. Quand NF-kB est séquestré par son inhibiteur IκBα, il est inactif. Suite à divers stimuli (cytokines, stress, etc.), IκBα est phosphorylé par l'IκB kinase (IKK), causant la libération de NF-κB qui va alors transloquer dans le noyau et induire l'expression des gènes inflammatoires et/ou de la réponse immune. Il peut également induire la production de ROS [Wan et Leonardo, 2009].
Les gènes du SASP régulés par NF-κB comprennent les facteurs inflammatoires tels que IL-6, IL-8, ICAM-1 ou CXCL1, et d'autres facteurs tels que les MMPs [Chien, 2011].
NF-κB peut coopérer avec C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein β) pour réguler le SASP. L'activation de NF-κB et C/EBPβ et l'induction du SASP sont modulées par de nombreuses voies [Ito, 2017].

NF-κB est activé suite aux dommages à l'ADN et à l'activation de la DDR [Rodier, 2009]. En effet, phospho-ATM induit un SASP en activant NEMO (NF-κB Essential Modulator), une sous unité régulatrice de IKK [Salminen, 2012]. Cette activation de NEMO par ATM est indépendante de p53. Notons que la perte de ce dernier induit une augmentation du SASP, indiquant qu'il présente plutôt une action restrictive sur la production du SASP [Coppé, 2008].

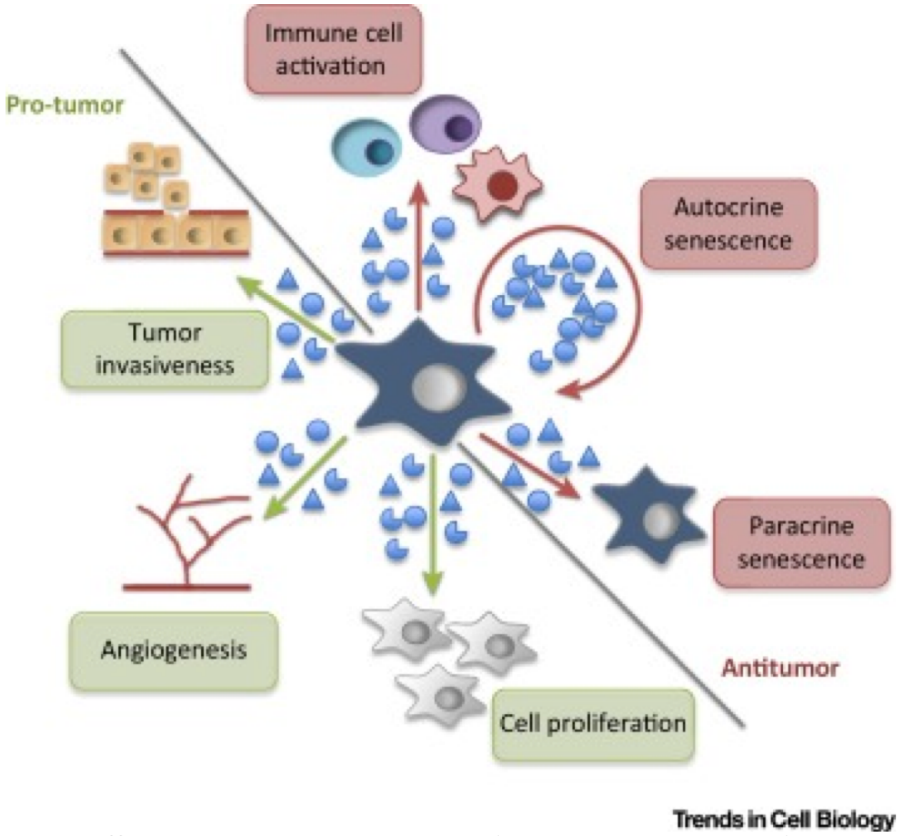


Fig 7 : Les effets autocrines et paracrines du SASP [Di Mitri et Alimonti, 2016]

Les dommages à l'ADN peuvent également activer NF-κB via $p38^{MAPK}$ (p38 mitogen-activated protein kinase). Cette dernière peut également être activée par des stress oxydatifs, mécaniques ou métaboliques [Salminen, 2012].

Les dommages à l'ADN peuvent également causer une augmentation de petits fragments d'ADN cytoplasmiques [Li et Chen, 2018]. Une accumulation de ces derniers est observée en sénescence (SR et OIS) [Ivanov, 2013]. Dans les cellules non sénescentes, ces ADN cytoplasmiques sont dégradés par des DNAses. Par contre, celles-ci sont sous-exprimées dans les cellules sénescentes. Cela est notamment dû au fait qu'elles sont sous la dépendance du facteur E2F, inhibé par RB [Takahashi, 2018].

L'accumulation de ces ADN cytoplasmiques peut activer NF-κB par l'intermédiaire de la voie cGAS/STING (Cyclic guanosine monophosphate (GMP)-adenosine monophosphate (AMP) synthase / Stimulator IFN gene). Cette voie intervient normalement dans l'inflammation en induisant la sécrétion de cytokines, telles que les IFN (interféron) de type 1, suite à la détection de DAMPs (Damage associated molecular patterns). Néanmoins, cGAS reconnaît les ADN cytosoliques comme des DAMPs [Li et Chen, 2018]. Une fois activé, cGAS produit du GMP-AMP cyclique (cGAMP) qui se lie à STING, qui ensuite induit l'activation de NF-κB. Il peut également induire l'activation de IRF-3 (IFN Regulatory Factor 3) par l'intermédiaire de TBK-1 (TANK binding kinase). Comme NF-κB, IRF-3 induit l'expression de cytokines [Li et Chen, 2018].

Comme mentionné précédemment, le SASP est dynamique. Il se développe en plusieurs jours [Coppé, 2008] et sa composition peut en effet changer avec le temps [Hoare, 2016 ; Ito, 2017]. Lors de l'OIS-Ras dans des fibroblastes, deux vagues de SASP ont été identifiées. Une première vague induite par NOTCH1 présentant une augmentation de TGF-β1 et TGF-β3, suivie d'une seconde vague pro-inflammatoire (IL-6, IL-8) associée à l'activation de C/EBPβ [Ito, 2017]. La première vague de sécrétion observée ne présente donc pas un profil inflammatoire. Plusieurs données indiquent que des acteurs de la famille NOTCH sont importants pour l'entrée en sénescence. En effet, ces derniers ont été rapportés comme étant surexprimés dans de nombreux modèles de SIPS [Liu, 2012 ; Kagawa, 2015 ; Ito, 2017]. Et l'expression ectopique des domaines intracellulaires des récepteurs NOTCH induit la sénescence [Kagawa, 2015 ; Ito, 2017]. Quand un récepteur NOTCH est activé par son ligand, son domaine intracellulaire appelé NICD (NOTCH Intracellular Domain) est clivé et va activer l'expression des gènes cibles de NOTCH [Ito, 2017].

b) Effets du SASP

Le SASP présente plusieurs facettes. En effet, il peut avoir des effets autocrines et paracrines, ces derniers pouvant alors être bénéfiques ou non suivant le contexte (Figure 7). Premièrement, il est décrit que le SASP a un effet pro-sénescent. Il peut en effet d'une part renforcer la sénescence de la cellule qui le sécrète (sénescence autocrine) mais il peut également induire la sénescence des cellules voisines (sénescence paracrine). Les cytokines tel que IL-6 et IL-8 peuvent induire l'activation des voies p53/p21 et p16/RB [Acosta, 2008 ; Kuilman, 2009].

De plus, il a été montré que l'IL-6 augmente le niveau de ROS dans la cellule, ce qui pourrait entretenir l'arrêt du cycle via la DDR, suite à des dommages à l'ADN [Wassmann, 2004 ; Takahashi, 2018]. La sécrétion de chémokines (tel que IL-8 ou GRO-α) participe également à l'immunosurveillance des cellules sénescentes, permettant leur élimination par les cellules du système immunitaire [Sagiv et krizhanovsky, 2013].

Le SASP est également associé à d'autres processus bénéfiques. Par exemple il permet la limitation de la fibrose via la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMPs) [Demaria, 2014] [Krizhanovsky, 2008]. Il impacte également la cicatrisation [Li et LF, 2010 ; Demaria, 2014]. En effet, lors d'une blessure, des cellules sénescentes sont observées en périphérie, où elles sécrètent du PDGF-AA (Platelet-derived growth factor-AA) qui induit la différentiation des myofibroblastes et permet la réparation tissulaire. Par la suite, ces cellules vont présenter un SASP qui va induire leur élimination par les cellules immunitaires [Demaria, 2014]. Les cellules sénescentes interviennent aussi dans la morphogénèse de certaines structures lors du développement embryonnaire [Munoz Espin, 2013 ; Lecot, 2016] et dans le remodelage vasculaire [Rajagopalan, 2012].

Comme indiqué précédemment, en plus de ces effets bénéfiques, le SASP présente des aspects négatifs. Ceci découle principalement du fait qu'il comporte de nombreux facteurs pro-inflammatoires. Un microenvironnement inflammatoire chronique peut causer l'accumulation de dommages tissulaires et le déclin du système immunitaire [Salminen, 2012 ; Pawelec, 2017]. De plus, le SASP contient des MMPs pouvant dégrader la matrice extracellulaire et donc la structure des tissus environnants. Le SASP a également un effet antiprolifératif sur les cellules souches [Lopez Otin, 2013]. La diminution de la prolifération des cellules souches et la dégradation de la structure des tissus sont deux caractéristiques du vieillissement [Lopez Otin, 2013 ; Demaria, 2015].

Un autre effet délétère du SASP est qu'il peut être protumoral. En effet, il a été décrit que le SASP des fibroblastes stimule la prolifération de cellules épithéliales précancéreuses (kératinocytes, cellules épithéliales mammaires et de prostate), de sarcomes, [Krtolica, 2001 ; Bavik, 2006 ; Larsy, 2015] ainsi que de mélanomes [Kim, 2013].
Deuxièmement il augmente la migration des cellules de carcinomes de l'épiderme [Farsam et al, 2016]. Troisièmement, il augmente l'invasion de cellules du cancer du sein [Rodier, 2009] et de mélanomes [Kim et al, 2013]. Malaquin et al [2013] ont également montré que le SASP des fibroblastes a un impact pro-migratoire sur des cellules en stade précoce de tumorigénèse (kératinocytes PSNE, voir sénescence des cellules épithéliales).

L'impact protumoral du SASP s'explique également par la création d'un microenvironnement inflammatoire, qui est favorable à la tumorigénèse. Par exemple, IL-6 et IL-8 augmentent l'invasion des cellules cancéreuses [Yuan et al, 2005 ; Hsu et Chung, 2006]. Il a été montré que le SASP des fibroblastes induit également la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) dans des lignées de cellules de cancer du sein, et que cet effet était principalement du à IL-6 et IL-8 [Laberge et al, 2012 ; Coppé, 2008]. Durant l'EMT, les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques, telles que leur adhésion à la matrice et à d'autres cellules, pour acquérir des propriétés mésenchymateuses. Les cellules mésenchymateuses sont très motiles et l'EMT favorise la migration et l'invasion des cellules cancéreuses [Murtas, 2017].
De plus, des facteurs non inflammatoires du SASP peuvent également être protumoraux. En effet, les MMPs, en dégradant la matrice extracellulaire favorisent l'invasion des cellules

cancéreuses. Un autre exemple est la sécrétion de VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) qui favorise l'angiogenèse [Coppé, 2006].

III) Sénescence des cellules épithéliales et cellules émergentes

1) Entrée en sénescence des cellules épithéliales en culture

Tous comme chez les fibroblastes, un plateau de sénescence est observé dans des cultures de cellules épithéliales (kératinocytes et cellules épithéliales mammaires). Par exemple, les kératinocytes atteignent ce plateau en seulement 10 à 15 CPD. Néanmoins, contrairement aux cellules mésenchymateuses, le plateau de sénescence observé ne serait pas dû à un raccourcissement critique des télomères [Nassour, 2016]. En effet, les télomères marqués par hybridation in situ (FISH) montrent un signal beaucoup plus intense chez les kératinocytes ayant atteint le plateau de sénescence que les fibroblastes en SR [Nassour, 2016]. De plus, les cellules épithéliales ne peuvent pas être immortalisées en induisant l'expression de la télomérase contrairement aux fibroblastes [Kiyono, 1998 ; Dickson, 2000 ; Rheinwald, 2018]. Pour immortaliser les kératinocytes et les cellules épithéliales mammaires, l'inactivation de p16 est également nécessaire, indiquant que p16 est important pour leur sénescence [Kiyono, 1998 ; Brenner, 1998, Dickson, 2000 ; Nassour 2016]. Ces cellules entrent donc probablement en sénescence avant d'avoir atteint la limite de leur potentiel réplicatif [Gosselin, 2009b].

Alors qu'ils surexpriment p16 [Ramirez, 2001], les kératinocytes en SR sous-expriment p53 (à l'inverse des fibroblastes) et p21 [Kim, 2015 ; Nassour, 2016]. Notons qu'à la base, les kératinocytes non sénescents ont une abondance protéique de p53 beaucoup plus élevée que les fibroblastes [Kim, 2015].

Alors que les fibroblastes en SR sont dans un arrêt du cycle en phase G1, les kératinocytes sont dans un arrêt du cycle cellulaire en phase G2. Cela est cohérent avec le fait que p53 soit plus souvent à l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et S [Kim, 2015].

L'équipe du professeur C. Abbadie a récemment montré que contrairement aux fibroblastes, les cellules épithéliales n'accumulent pas de cassures doubles brins et n'activent pas la DDR. Par contre, elles ont une accumulation de cassures simple brins et sous expriment la poly(ADP)ribose polymérase (PARP1). Cette dernière fait partie de la machinerie de réparation des cassures simples brins. Ce défaut de réparation induit une activation de p16 [Nassour 2016]. A l'origine, les cassures simples brins et la sous-expression de PARP1 sont causées par une accumulation de ROS [Nassour 2016]. Cela est cohérent avec une étude rapportant que les ROS induisent la sénescence des kératinocytes via p16 [Sasaki, 2014]. De plus, NF-κB, qui est capable d'induire des ROS, est impliqué dans la sénescence du kératinocyte [Bernard et al, 2004].

Cependant, il faut noter que l'arrêt de prolifération précoce des cellules épithéliales en culture pourrait être dû aux conditions de culture utilisées. En effet, il a été montré que les cellules épithéliales cultivées sur couche nourricière (couche de fibroblastes 3T3) atteignent un nombre de CPD cumulé plus élevé et peuvent être immortalisée par l'expression de la télomérase [Ramirez et al, 2001]. Dès lors, le plateau de sénescence observé chez les cellules

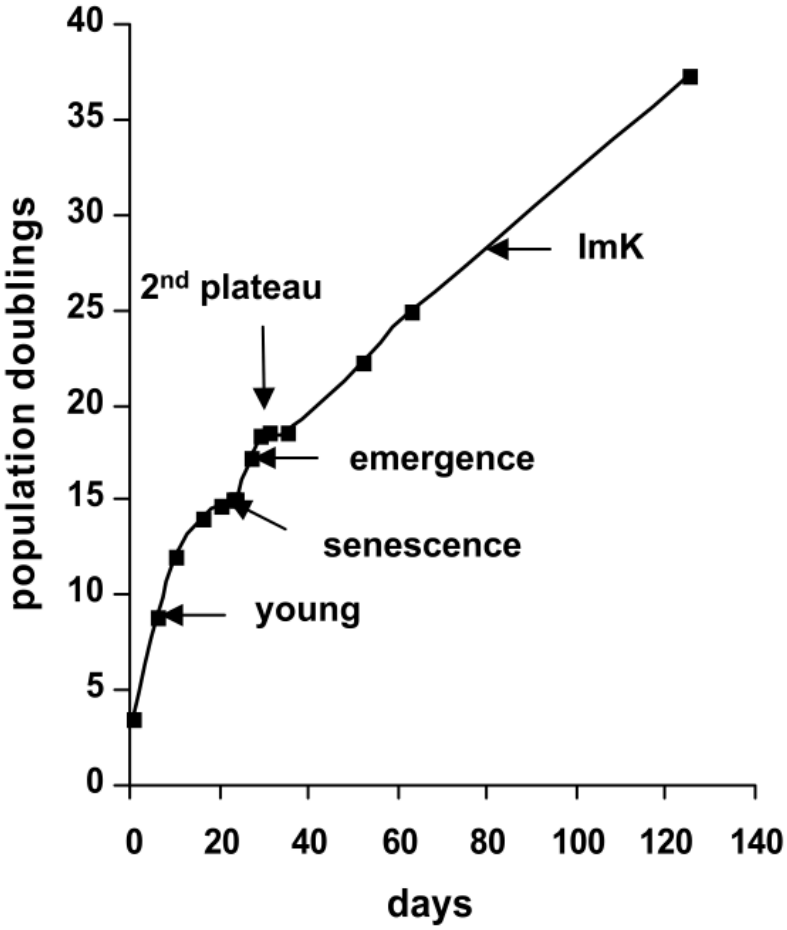


Fig 8 : Entrée en sénéscence de kératinocytes en culture et émergence [Gosselin et al, 2009b]

épithéliales en culture simple (dans un milieu propice), est peut être plus proche d'une SIPS que d'une SR comme elle est observée chez les fibroblastes.

Néanmoins, des marquages réalisés sur coupes de peau provenant de donneurs d'âge différent coïncident avec les observations *in vitro* en culture classique, et montrent une augmentation de p16 et une diminution de PARP1 avec l'âge [Nassour, 2016]. Une diminution de p53 avec l'âge est également observée dans des coupes d'épithéliums oraux [Kim, 2015]. Les observations faites *in vivo* semblent donc cohérentes avec celles faites *in vitro.*

2) Cellules émergentes post-sénescence

Bien que la sénescence ait été définie comme un arrêt irréversible de prolifération, une reprise de la prolifération appelée émergence a été observée chez les cellules épithéliales, et a été plus particulièrement étudiée chez les kératinocytes (Figure 8) [Gosselin et al, 2009a]. En effet, alors que la majorité des kératinocytes sénescents finissent par mourir par autophagie programmée [Gosselin et al, 2009a], une petite proportion des kératinocytes sénescents (de l'ordre de 1/40 000 cellules) recommence à se diviser par mitose bourgeonnante [Gosselin et al, 2009b ; Nassour, 2016]. Il s'agit d'une division asymétrique inhabituelle ou une cellule-mère sénescente donne des cellules filles émergentes [Gosselin et al, 2009b].
Ces cellules émergentes sont mutées, probablement suite à l'accumulation de cassures simples brins du aux stress oxydatifs [Gosselin et al, 2009b ; Nassour, 2016]. De plus, une accumulation de mutations dans les kératinocytes sénescents est rapportée et est liée à la diminution de p53 dans ceux-ci [Kim et al, 2015].

Les cellules émergentes ont perdu les caractéristiques de la sénescence et recommencent à proliférer rapidement. Ce phénomène est également observé dans des cultures de cellules épithéliales mammaires [Romanov et al, 2001]. Ces cellules sont qualifiées de néoplasiques émergentes post-sénescence (PSNE). En effet, elles possèdent des caractéristiques précancéreuses [Nassour, 2016]. De plus, sous certaines conditions, ces cellules peuvent avoir un profil migratoire [Malaquin et al, 2013]
Après 5 à 15 PDs, les kératinocytes PSNE atteignent un second plateau de sénescence suivi d'une seconde émergence. Ces cellules émergeant une seconde fois sont appelées ImKs pour Immortal keratinocytes (bien qu'elles meurent après 60 PDs). Les ImKs sont transformés avec des caryotypes perturbés [Gosselin, 2009b].
Les kératinocytes PSNE et les ImKs peuvent former des carcinomes quand ils sont xénogreffés dans des souris nude [Gosselin, 2009b].

IV) Accumulation des cellules sénescentes dans les tissus

1) Sénescence aigue ou chronique

Via le SASP, les cellules sénescentes peuvent avoir des effets positifs dans les tissus, comme détaillé précédemment. Dans ce cas-ci on parle de sénescence aigüe, car les cellules sénescentes apparaissent rapidement via des signaux spécifiques et sont éliminées efficacement par le système immunitaire. La sénescence aigüe passe par p21 mais est indépendante de la DDR et de p53 [Van Deursen, 2014].

Par contre, l'accumulation des cellules sénescentes liée à l'âge n'est pas induite par des stimuli précis mais par divers stress non spécifiques, tel que les stress oxydatifs. Elles sont alors moins efficacement éliminées par le système immunitaire (qui décline avec l'âge) et s'accumulent. On parle alors de sénescence chronique. Les cellules sénescentes chroniques présenteraient alors les effets négatifs du SASP [Van Deursen, 2014].

Certains auteurs ont fait un parallèle entre la sénescence et la théorie de la pléiotropie antagoniste. Cette théorie propose que le vieillissement soit une conséquence de phénotypes qui sont d'abord avantageux chez l'individu jeune mais qui deviennent délétères avec le temps [Williams, 1957]. Donc, ces phénotypes pourraient avoir été sélectionnés parce qu'ils augmentent la survie (barrière anticancéreuse et sénescence aigüe), et leurs effets délétères (sénescence chronique) ne se manifestent que quand la pression de sélection est moins forte (la mort survient souvent avant dans la nature, et le taux de reproduction diminue) [Ungewitter et Scrable, 2009].

2) Apparition des cellules sénescentes *in vivo*

La mise en évidence de marqueurs de sénescence a permis d'identifier les cellules sénescentes *ex vivo*. Ainsi, sur des coupes de tissus, les cellules sénescentes peuvent être détectées par différents marquages: p16, p21, p53, γH2AX, 53BP1 et l'activité SA-βGal [Dimri et al, 1995 ; Herbig, 2006 ; Wang et al, 2009 ; Baler, 2013 ; Nassour, 2016]. Ces biomarqueurs indiquent une augmentation de cellules sénescentes avec l'âge dans certains tissus (dont la peau, les poumons, le foie, la rate, les reins, le pancréas et les tissus adipeux) [Baker, 2016 ; Lopez-Otin, 2013, Zhao, 2017]. Cela pourrait être dû à une augmentation de l'entrée en sénescence et/ou d'une diminution de l'élimination des cellules sénescentes [Rodier, 2011]. Ce biais d'élimination est en lien avec la détérioration du système immunitaire liée à l'âge [Wang et al, 2011 ; Shaw et al, 2010 ; Weiskopf, 2009].

Les stress semblent être une cause importante de la sénescence *in vivo*. En effet, une augmentation de cellules sénescentes est observée dans des microenvironnements stressants. Par exemple, une augmentation des cellules présentant les marqueurs de sénescence dans les lésions cancéreuses est observée [Chen et al, 2005 ; Barkova, 2006]. Il y a également une augmentation de cellules sénescentes dans des sites inflammatoires tels que les ulcères gastriques [Toussaint et al, 2002] ou les emphysèmes pulmonaires [Tsuji et al, 2006]. Les cellules sénescentes sont également observées *in vivo* dans les blessures en cours de cicatrisation [Jun et Lau, 2010].
Il a également été montré chez la souris que certains stress *in vivo* (inflammation chronique) peuvent amener à une dysfonction des télomères [Tsuji et al, 2006 ; Jurk et al, 2014], ce qui accélère le vieillissement [Jurk et al, 2014].

A notre connaissance, aucune étude n'a mis en évidence la sénescence réplicative suite à un raccourcissement critique des télomères *in vivo*. Des études rapportent qu'il existe un raccourcissement des télomères *in vivo* mais pas forcément que ceux ci atteignent une taille critique [Campisi, 1996 ; Notaro, 1997 ; Kajstura, 2000]. De plus, il a été observé que le marqueur de dommages à l'ADN, γH2AX ne colocalise pas avec les télomères dans des entérocytes de souris âgées [Wang et al, 2011].

3) Impact de la sénescence sur le vieillissement

Les cellules sénescentes sont depuis longtemps soupçonnées d'avoir un impact sur le vieillissement et les maladies liées à l'âge. Néanmoins, cet impact n'a été montré que récemment, notamment en éliminant les cellules sénescentes via des sénolytiques [Schafer et al, 2017, Zhu et al, 2015] ou des constructions transgéniques induisant la mort programmée des cellules exprimant p16 [Baker et al, 2011 ; Baker, 2016]. Les sénolytiques sont des molécules chimiques qui éliminent sélectivement les cellules sénescentes en interférant avec les voies anti-apoptotiques et pro-survie qui sont activées dans celles-ci [Zhu et al, 2015]. Ces approches ont permis de montrer que l'élimination des cellules sénescentes chez des souris progéroïdes ou normales augmente la durée de vie moyenne en bonne santé avec un retard de l'apparition de pathologies associées à l'âge (telles que la sarcopénie ou la cataracte) [Baker et al, 2011 ; Baker, 2016, Zhu et al, 2015]. L'élimination des cellules sénescentes diminue également l'athérosclérose et l'arthrose [Childs et al, 2018].

La sénescence est donc associée à une dégénération graduelle et une perte de fonction des tissus, ce qui caractérise le vieillissement [Demeria et al, 2015]. Cela est probablement dû à l'incapacité des cellules sénescentes à proliférer, réduisant la capacité du tissus à se renouveler, ainsi que à la sécrétion de facteurs inflammatoires via le SASP.

4) Relation entre cancer et sénescence *in vivo*

La relation entre sénescence et cancer est complexe.
D'un coté, l'arrêt du cycle cellulaire est une barrière anti-cancéreuse et l'induction de la sénescence est une voie possible de thérapie anti-cancéreuse. En effet, Xue et al [2009] ont suivi, dans un modèle murin, des carcinomes hépatiques où p53 était désactivé (shRNA) de façon réversible. En réactivant p53, les carcinomes régressent suite à l'apparition de cellules sénescentes et le recrutement des cellules immunitaires [Xue et al, 2009]. Il a également été montré que des cellules sénescentes étaient présentes dans des tumeurs prémalignes mais pas dans des tumeurs malignes. Cela pourrait indiquer que la sénescence empêche l'évolution maligne de la tumeur [Collado et al, 2005].

De plus, certaines cellules cancéreuses gardent la capacité de rentrer en sénescence, notamment suite à une chimiothérapie. Dans ce cas, cette sénescence induite par la thérapie (TIS) est associée à une régression de la tumeur [Coppé et al, 2010]. Néanmoins, une étude sur une TIS induite par étoposide (un agent chimiothérapeutique) suggère qu'une sous-population de cellules cancéreuses sénescentes peut ré-entrer en prolifération [Saleh et al, 2018].

De façon opposée, la sénescence pourrait aussi avoir un effet protumoral. En effet, il y a une augmentation de l'incidence de plusieurs cancers avec l'âge. Plusieurs hypothèses ont été émises : des cellules sénescentes pourraient devenir cancéreuses suite à des mutations, ou, des cellules cancéreuses pourraient échapper à l'entrée en sénescence [Rodier et al, 2011].

Cela pourrait également être associé au fait que de nombreux facteurs du SASP ont un impact protumoral. En effet, plusieurs données supportent cela *in vivo*. Par exemple, lorsque des cellules cancéreuses ou précancéreuses sont injectées avec des fibroblastes sénescents dans des souris nude, une proportion plus importante de souris développent des tumeurs, en comparaison avec les souris dans lesquelles sont injectées les cellules (pré)cancéreuses avec

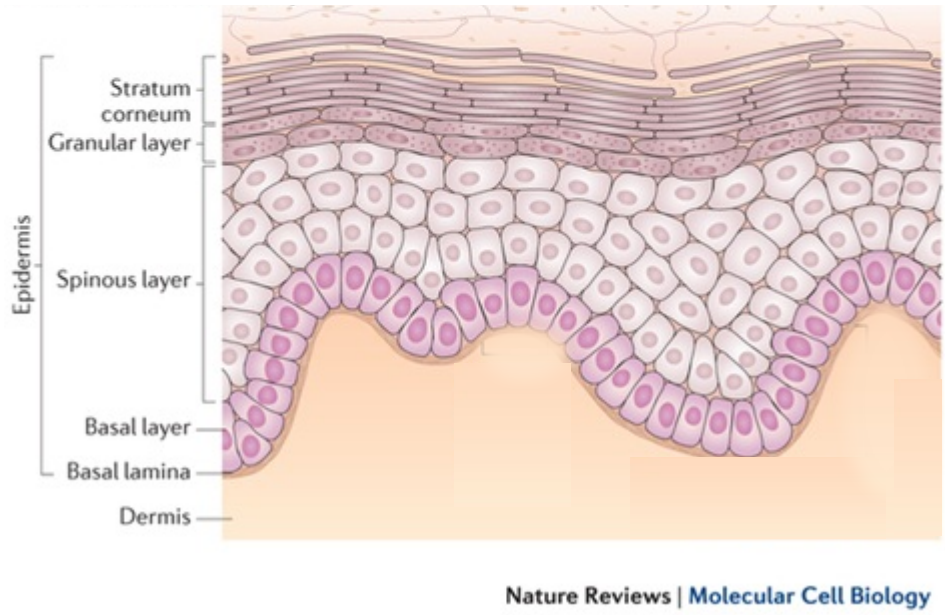


Fig9: Représentation schématique des couches de l'épiderme [adapté de Solanas, 2013]

des fibroblastes jeunes [Krtolica, 2001]. En deuxième exemple, Kaur et al [2016], ont montré que des mélanomes injectés dans des souris âgées sont plus agressifs et forment plus de métastases que dans des souris jeunes. Ils ont montré que cela pourrait être en partie dû à la présence de cellules sénescentes. En effet, ils ont observé que dans des peaux reconstruites avec des mélanomes et des fibroblastes de patients jeunes ou âgés, les mélanomes étaient plus agressifs dans un environnement âgé.

V) Vieillissement de la peau

Avec l'âge, une accumulation de cellules sénescentes est observée dans la peau. En effet, des cellules positives à la SA-βgal et à p16 ont été détectées dans des coupes de peaux et d'épidermes provenant de donneurs âgés [Dimri, 1995; Nassour, 2016]. La proportion de cellules p16 positives augmente avec l'âge, atteignant 8,5% pour les donneurs les plus âgés [Nassour, 2016]. Une augmentation avec l'âge de cellules avec un marquage γH2AX [Herbig, 2006 ; Wang et al, 2009] ou 53BP1 [Herbig, 2006] à également été observée dans le derme.

1) L'histologie de la peau

La peau est composée de 3 couches : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. L'hypoderme est la couche la plus profonde, et est composée d'adipocytes, de vaisseaux sanguins et de nerfs. Cette couche permet l'attachement de la peau aux autres tissus [Chu, 2011 ; Kolarsick et al, 2011].
La couche intermédiaire, le derme, donne notamment son élasticité à la peau. En effet, les fibroblastes que contient le derme produisent une matrice extracellulaire riche en collagène et en élastine. Cette couche contient également des récepteurs sensoriels, des vaisseaux sanguins et des glandes sudoripares [Losquadro, 2017].
L'épiderme constitue la couche externe. Celui-ci est composé principalement de cellules épithéliales, les kératinocytes (90%) ainsi que de mélanocytes, de cellules de Merckel et de cellules de Langerhans. En fonction du stade de différentiation des kératinocytes, l'épiderme peut être divisé en 4 couches (Figure 9) [Chu et al, 2011]. La couche basale (*stratum germinativum*) contient les kératinocytes non différenciés à haut pouvoir prolifératif. En arrivant dans les couches supérieures, les kératinocytes vont progressivement se différencier [Chu et al, 2011 ; Losquadro, 2017].
La couche épineuse (*stratum spinosum*) contient des kératinocytes en début de différentiation attachés entre eux par des desmosomes et contenant des granules lamellaires composées de lipides, de glycoprotéines et d'hydrolases [Chu, 2011].
La couche suivante, la couche granuleuse (*stratum granulosum*) est composée de kératinocytes contenant des grains de kératohyaline (composée de filaments de kératine, de profilaggrine et de loricrine).
Enfin, la couche cornée (*stratum corneum*), qui est la plus superficielle, est composée des kératinocytes en fin de différenciation appelés alors cornéocytes. Ces derniers sont des cellules mortes et ont perdu leur noyau et leurs organites [Chu, 2011 ; Losqudro, 2017]. Les cornéocytes sont totalement kératinisés et ont un épaississement interne de la membrane cytoplasmique formé à partir des composants des grains de kératohyaline [Chu, 2011]. L'espace intercellulaire est riche en lipides suite à la libération des granules lamellaires. La

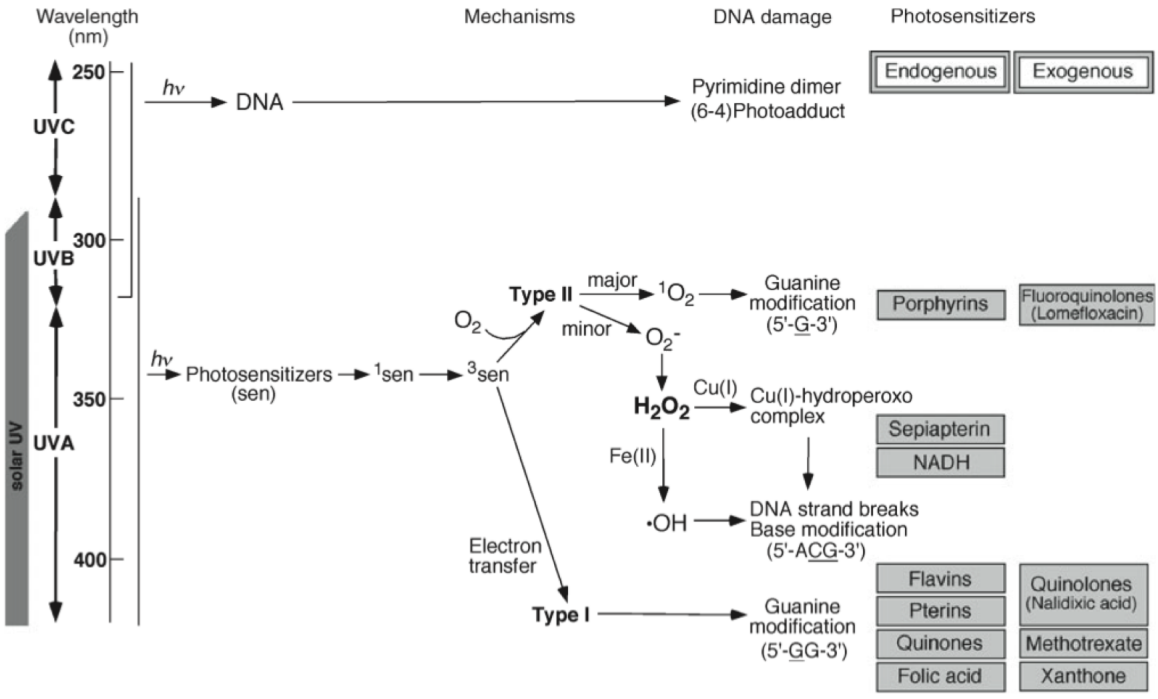


Fig 10 : Dommages directs et indirects à l'ADN suite à l'exposition aux rayons UV [Hiraku, 2007]

couche cornée sert de barrière aux agents externes et maintient l'hydratation de la peau [Chu, 2008].

2) Vieillissement intrinsèque et extrinsèque

La peau est un organe dont le vieillissement peut être modulé par des facteurs externes. En effet, la peau est soumise à un vieillissement intrinsèque chronologique mais aussi à un vieillissement extrinsèque important, dû aux nombreux stress exogènes auxquels elle est exposée. L'ensemble des ces stress est appelé l'exposome de la peau [Krutmann et al, 2017].
Le vieillissement intrinsèque est déterminé génétiquement, et peut s'observer sur des zones cutanées photo-protégées [Baumann, 2007]. L'épaisseur de l'épiderme et du derme est réduite comparativement aux peaux jeunes et perdent leur fonction, et il y a également apparition de fines rides. Le nombre de fibroblastes diminue et on observe une dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Cette dernière est due à une dérégulation de la synthèse de collagène et d'élastine ainsi qu'à une augmentation d'expression de MMPs [Wlaschek et al, 2001; Baumann, 2007].
L'exposome de la peau, amenant au vieillissement extrinsèque, regroupe notamment le tabagisme, la pollution et l'exposition aux rayonnements solaires [Krutmann et al, 2017]. Parmi ceux-ci, l'exposition aux rayons ultraviolets (UV) constitue le stress majeur auquel la peau fait face. Le vieillissement extrinsèque suite à l'exposition aux rayons UV est appelé photo-vieillissement. Le vieillissement extrinsèque présente des caractéristiques différentes du vieillissement intrinsèque. En effet, il est associé à un épaississement du derme et de l'épiderme. La distribution de mélanocytes devient irrégulière causant l'apparition de taches pigmentées. Il y a également une dégradation de la MEC notamment suite à la synthèse de collagénase de type 1 (MMP-1). Il y a apparition de rides profondes suite à la perte d'élasticité de la peau [Wlaschek et al, 2001].

3) Rayonnement UV et stress oxydatifs

a) Les types de rayons ultraviolets

Les rayons ultraviolets (Figure 10) sont divisés en 3 catégories en fonction de leur longueur d'onde: les UVC (100-280 nm), les UVB (280-315 nm) et les UVA (315-400 nm) [Krutmann et al, 2017]. Les UVC sont normalement absorbés par la couche d'ozone. Les UVB sont moins énergétiques que les UVC et atteignent l'épiderme et le derme supérieur. Les UVA sont encore moins énergétiques mais atteignent le derme profond [Dupont et al, 2013].
Les rayons UV les plus énergétiques (et donc les plus dangereux) auxquels la peau doit faire face sont donc les UVB [Dupont et al, 2013].

b) Dommages à l'ADN causés par les UV

Les UV sont connus pour entraîner des dommages à l'ADN de façon directe ou indirecte, suivant leur longueur d'onde (figure 10).
Les UV aux longueurs d'onde plus petites, et donc plus énergétiques, UVC et UVB, peuvent directement causer la formation de dimères de pyrimidine tels que les CPDs (cyclobutane

pyrimidine dimers) et les photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone ((6-4)PPs), via leur absorption directe par l'ADN [Pattison and Davies, 2006].
Les UVB peuvent également donner des dommages de type indirect, tout comme les UVA. Dans ce cas, les UVA/B vont exciter des molécules photosensibles (telles que les quinones ou les flavines) dans la cellule. Ces molécules peuvent ensuite transmettre leur énergie de deux façons [Hiraku, 2007].
Dans le cas de dommages indirects de type I, la molécule photosensible excitée transfère un électron à d'autres molécules dont l'ADN. La guanine présentant le potentiel d'oxydation le plus bas parmi les bases nucléiques, est plus sujette à cette oxydation. Cela cause la formation d'une base modifiée 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8oxoDG). Celle-ci s'apparie alors avec une adénine et non une cytosine et cause une conversion G-C => T-A lors de la réplication [Hiraku, 2007].
Les dommages indirects sont dits de type II quand la molécule photosensible transfère son électron à une molécule d'oxygène menant à la formation de ROS. Parmi ceux-ci, les radicaux hydroxyls, les anions superoxydes, ou les oxygènes singulets sont capables d'interagir avec l'ADN et de l'endommager. Les radicaux hydroxyls induisent notamment des cassures à l'ADN [Hiraku, 2007].

VI) Cancer de la peau

Les cancers des cellules mésenchymateuses sont appelés sarcomes en opposition aux cancers des cellules épithéliales qui sont appelés carcinomes. Dans la peau, ils émergent respectivement des fibroblastes et des kératinocytes. Au niveau de la peau, un troisième type de cancer, le mélanome, est issu des mélanocytes [Gordon, 2013].
La fréquence des cancers de la peau augmente avec l'âge [International Agency for Research on Cancer, 2002]. Les cancers les plus communs sont presque toujours des carcinomes (cancers du sein, des poumons, du colon, etc.). Les sarcomes, eux, sont plus rares [International Agency for Research on Cancer, 2002]. Certains auteurs proposent que la différence entre l'incidence des sarcomes et des carcinomes pourraient être en partie expliquée par les différences entre la sénescence des cellules mésenchymateuses et épithéliales, tels que l'apparition de cellules PSNE [Nassour, 2016].

1) Types de cancers cutanés

La grande majorité des cancers cutanés sont des carcinomes, apparaissant donc au niveau de l'épiderme. On trouve les carcinomes basocellulaires (BCC) et les carcinomes de cellules squameuses (SCC) ou spinocellulaires [Gordon, 2013].
Les BCCs apparaissent au niveau des cellules basales de l'épiderme et représentent 80% des carcinomes cutanés. Ce type de cancer croit lentement et métastase rarement [Madam, 2010].
Les SCCs sont la seconde forme de cancer cutané la plus fréquente. Ce type de cancer croit plus rapidement que les BCCs et est plus agressif, formant presque toujours des métastases en l'absence de traitement [Ratushny, 2012].

Les mélanomes sont plus rares que les carcinomes. Ils représentent en effet 132 000 cas par an contre 2 à 3 millions de cas pour les BCCS et les SCCs. Par contre ils sont très agressifs et métastasent souvent [Gordon, 2013].

2) Impact des rayons UV sur les cancers cutanés

A cause de sa haute capacité proliférative et de son exposome, la peau est un des organes avec un risque de tumorigenèse le plus élevé. L'exposition aux UV est le facteur de risque principal des cancers de la peau.
Les UV induisent notamment des mutations au niveau de la séquence de p53 (BCC et SCC) et p16 (mélanome) [Hussein, 2005].
La majorité des lésions précancéreuses cutanées apparait suite à l'exposition aux UV. La principale est la kératose actinique qui peut donner naissance à un SCC [Moy, 2000].
Les cancers de la peau apparaissent d'ailleurs principalement dans les zones exposées au soleil telles que le visage ou les avant-bras [World Health Organization, 2018]

3) Communication entre cellules sénescentes et cellules cancéreuses dans la peau

L'effet protumoral du SASP des fibroblastes, détaillé précédemment, a principalement été montré sur des cellules cancéreuses non cutanées [Coppé, 2008 ; Rodier, 2009, Krtolica, 2001 ; Bavik, 2006].
Plus récemment, certaines études se sont donc intéressées à l'effet du SASP de fibroblastes dermiques sur des lignées de SCC [Farsam, 2016 ; Toutfaire, 2018]. Farsam et al [2016] ont montré une augmentation de la migration de cellules issues de SCCs induite par le SASP de fibroblastes en SR. Cet effet était observé sur plusieurs lignées cancéreuses différentes, incubées avec du milieu conditionné provenant de plusieurs souches différentes de fibroblastes.
Cependant, Toutfaire et al [2018] ont montré des effets plutôt limité du SASP des fibroblastes (en SR et en SIPS-UVB) sur la prolifération, la migration et l'invasion de différentes lignées de SCC (à différents stades de tumorigenèse).
On peut noter des différences dans les deux études. Premièrement, les lignées de fibroblastes utilisés dans les deux études étaient différentes. Une seconde différence majeure entre les deux études est que dans la première les milieux conditionnés des fibroblastes étaient récoltés après 7 jours alors que les fibroblastes étaient confluents [Farsam et al, 2016], alors que dans la deuxième, les milieux conditionnés étaient récoltés après 48h [Toutfaire et al, 2018].

L'effet du SASP des fibroblastes sénescents a également été testé sur des cellules de mélanome, et a montré un effet pro-prolifératif et pro-invasif de celui-ci [Kim et al, 2013].
Notons que la communication entre cellules cancéreuses et sénescentes semble être bidirectionnelle. Effectivement, un effet pro-sénescent du sécrétome de SCCs a été observé sur les fibroblastes [Toutfaire, 2018].

VII) Objectif et modèle

Alors que l'épiderme est la première barrière contre les stress environnementaux et qu'il est à l'origine de la grande majorité des cancers cutanés, [Gordon, 2013 ; Krutmann, 2017], peu d'informations sont disponibles sur la composition et l'impact du SASP des kératinocytes sénescents.
L'objectif de ce travail est d'étudier la sénescence réplicative et la SIPS-UVB des kératinocytes humains normaux, et d'investiguer l'impact de leur sécrétome sur des cellules cancéreuses cutanées issues de SCCs, la forme agressive la plus fréquente de cancer de la peau.

Tableau 1 : Matériel pour l'extraction et la culture cellulaire des kératinocytes

Nom	Firme	Référence
Milieu Lebowitz L15 Mix antibiotiques / antimycotiques Gentamycine	Gibco, USA Gibco, USA Gibco, USA	11415 15240 15750
Tamis cellulaire 70 µm	Greiner BioOne	
PBS (Phosphate Buffer Saline): • NaCl 150mM • Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 H_2O		
Dispase II Pénicilline / streptomycine	Roche Applied, Biosciences, Suisse Gibco, USA	 15140
Trypsine + 0,05% EDTA Sérum bovin fœtal	Gibco, USA Gibco, USA	25300
Keratinocytes Serum Free Medium (KSFM) Suppléments : • Facteur de croissance épidermique humain recombinant (rEGF) (2,5mg /500 mL) • Extrait pituitaire bovin (BPE) (25mg/500mL)	Gibco, USA	17005-042

MATERIEL ET METHODES

I. Culture cellulaire

1) Kératinocytes humains normaux (NHKs)

Les NHKs sont isolés à partir de biopsies de peaux (prépuces) venant de jeunes donneurs. Les biopsies viennent de l'hôpital St Luc à Bouge, Belgique. La procédure a été approuvée par le comité éthique de l'hôpital St Luc.

a) Matériel

Voir Tableau 1.

b) Méthode

Les biopsies sont conservées dans du milieu L15 auquel est ajouté un mix antibiotiques/antimicotiques. Premièrement, le tissu adipeux est retiré. Ensuite, la peau est coupée en bandes de 1mm de large qui sont successivement rincées dans du PBS, de l'éthanol 70% et une nouvelle fois dans du PBS.
Les bandes de peau sont incubées dans de la dispase II + 1% pénicilline/streptomycine à 4°C pour la nuit. La dispase II est une protéase bactérienne qui clive la fibronectine et le collagène IV. Ce dernier est spécifique des lames basales et la dispase II permet donc de faciliter la séparation du derme de l'épiderme.
Les épidermes sont séparés des dermes et sont ensuite incubés dans de la trypsine + 0,05% EDTA pendant 20 min à 37°C. C'est une peptidase pancréatique utilisée en culture cellulaire pour cliver les protéines membranaires d'adhésion et détacher les cellules. La trypsine est neutralisée avec l'ajout de PBS + 10% de sérum fœtal de bovin et la suspension cellulaire est filtrée dans un tamis cellulaire de 70 µm. Le filtrat est ensuite centrifugé à 1200 rpm pendant 8 min et le culot est resuspendu dans du milieu K-SFM enrichi avec de l'extrait pituitaire bovin et du facteur de croissance epidermal humain.

Les cellules sont cultivées dans des boites T75 à 37°C, 5% CO_2 et 95% d'humidité et sont repiquées quand elles atteignent ± 80% de confluence. Pour le repiquage, 2 mL de trypsine + 0,05% EDTA sont ajoutés et les cellules sont incubées quelques min à 37°C. Lorsque les cellules sont détachées, la trypsine est inhibée avec 10 mL de PBS + 10% FBS. La solution est centrifugée 8 min à 1200 rpm et le culot est ensuite resuspendu dans 30mL de milieu K-SFM complet et divisé dans deux nouvelles T75.

2) Lignées cancéreuses

Les cellules A431 sont dérivées d'un carcinome épidermoïde humain (ATCC, USA).
Les lignées PM1, MET1 et MET4 proviennent du laboratoire du Pr. C. Proby (Université de Dundee) et ont toutes été isolées d'un même patient immunodéprimé. Elles sont dérivées respectivement d'une dysplasie du front, d'un carcinome primaire de cellules squameuses et d'une métastase des ganglions axillaires [Proby, 2000].

Tableau 2 : Matériel pour la culture cellulaire des lignées cancéreuses

Nom	Firme	Référence
Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose	Thermo Fisher Scientific	119065092
Ham's nutrient mix F12	Gibco	11765054
PBS (Phosphate Buffer Saline): • Voir Table 1		
Trypsine + 0,05% EDTA	Gibco, USA	25300
Sérum bovin fœtal	Gibco, USA	10270106
Hydrocortisone	Sigma Aldrich	
EGF de souris	AbD Serotec	

Tableau 3 : Matériel pour l'UVB-SIPS

Nom	Firme	Référence
PBS (Phosphate Buffer Saline): • Voir Tableau 1		
Narrowband Philips lamps TL20W/01 RS	Philips	
Détecteur d'UVB	Viber Lourmat	
Keratinocytes Serum Free Medium (KSFM) + Suppléments : Voir Tableau 1	Gibco, USA	17005-042

Tableau 4 : Matériel pour la détection de l'activité SA-βgal

Nom	Firme	Référence
PBS (Phosphate Buffer Saline): • Voir Tableau 1		
Solution de Fixation : • 2% formaldéhyde • 0,2% glutaraldéhyde • PBS	 Merck Merck, Millipore	 104002 354400
Solution de coloration : • Tampon phosphate pH 6,0 o NaH_2PO_4 o $NaHPO_4$ • Ferrocyanure de potassium 0,1M • Ferricynaure de potassium 0,1M • NaCl 2,5M • $MgCl_2$ 1M • 20 mg/mL de X-gal dilué dans du N,N-diméthylformaldéhyde • H_20	 Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Carl Roth Merck, Allemagne Amresco, USA Janssen Chimica	 7558-80-7 7558-79-4 P029.2 OP-0020-02

a) Matériel

Voir Tableau 2.

b) Méthode

Les A431 sont cultivées dans des T75 avec du Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DHG) + 10% FBS à 37°C et 5% de CO_2.
Les lignées PM1, MET1 et MET4 sont cultivées dans des T75 avec un mix 2/3 de DHG, 1/3 de Ham's nutrient Mix F12 auquel on ajoute 10% de FBS 400 ng/ml d'hydrocortisone et 10 ng/ml d'EGF de souris.
Quand les cellules atteignent ± 80% de confluence, elles sont repiquées. Elles sont rincées avec du PBS stérile avant d'être détachées grâce à l'action de la trypsine-EDTA quelques min à 37°C. Pour inhiber cette dernière, 10 mL de PBS + 10% FBS sont ensuite ajoutés. La suspension cellulaire est centrifugée 5 min à 1000 rpm pour les A431 et 7 min à 1200 rpm pour les cellules PM1, MET1 et MET4. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans du milieu frais. Les A431 sont repiquée à 1/20 ou 1/30 de leur confluence, les PM1 à 1 400 000 cellules par T75 et les MET1 et MET4 à 700 000 cellules par T75.

II) Exposition des NHKs aux UVB

a) Matériel

Voir Tableau 3.

b) Méthode

Les cellules en passage 5 ou 6 sont repiquées 72 h avant le premier stress UVB à la densité de 12 000 cellules/cm^2 pour les conditions UVB et 8000 cellules/cm^2 pour les conditions contrôles.
Les cellules sont exposées à une dose de 675 mJ/cm^2 (narrow band UVB) 3 fois dans une même journée à 3 heures d'intervalle. Avant le stress, les cellules sont rincées une fois au PBS, puis placées dans 1 mL/T25 ou 3 mL/T75 durant le stress UVB. Les cellules sont remises dans du milieu KSFM entre chaque stress.

III) Détection de l'activité β-galactosidase associée à la sénescence (SA-βgal)

a) Matériel

Voir Tableau 4.

b) Méthode

L'activité SA-βgal est détectée suite à l'incubation des cellules, préalablement fixées, dans une solution de coloration à pH 6,0 contenant du X-gal. Ce composé est reconnu par la

Tableau 5 : Matériel pour l'extraction ARN

Nom	Firme	Référence
RLT	Qiagen, Allemagne	79216
Qiacube	Qiagen, Allemagne	
RNeasy minikit DNAse	Qiagen, Allemagne	74104

Tableau 6 : Matériel pour la transcription inverse

Nom	Firme	Référence
Nanodrop	Isogen Life Science	
Nanophotomètre	Implen	
Kit GoScript™ Reverse Transcriptase o Eau RNAse free o Enzyme mix o OligoDT buffer o Random primers buffer	Promega	 A2791 A2801

galactosidase et clivé. Cela donne un composé bleu. Les cellules présentant une activité SA-βgal à pH 6,0 sont ainsi colorées en bleue. Pour chaque condition, le comptage de la proportion de cellules SA-βgal positives se fait en triplicat (300 cellules par réplicat).

Le jour précédant la mesure de l'activité SA-βgal, les kératinocytes sont repiqués à faible densité (1200 cellules/cm^2) dans une plaque 6 puits. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du PBS et incubées 5 min dans la solution de fixation à température ambiante. Ensuite, les cellules sont rincées deux fois dans du PBS et incubée 16h à 37°C dans la solution de coloration contenant le X-gal. Les cellules sont enfin rincées deux fois au PBS et deux fois au méthanol.

IV) Analyse de l'expression génique

1) Extraction d'ARN total

a) Matériel

Voir Tableau 5.

b) Méthode

Les cellules sont lysées (tampon RLT) dans 350 µL pour les boites de pétri et 600 µL pour les T25 et les T75, et les lysats sont conservées à -80°C ou utilisés directement. L'ARN total est extrait au moyen du Qiacube avec le RNeasy minikit DNAse digest et en suivant la procédure recommandée par la firme.

2) Transcription inverse des ARNm en ADNc

a) Matériel

Voir Tableau 6.

b) Méthode

Les ARN totaux sont rétrotranscrits en ADNc par une reverse transcriptase, et à l'aide d'amorces OligodT et random. Au mix réactionnel sont ajoutés également des désoxyribonucléotides (dNTP) nécessaires à la rétrotranscription.

2 µg d'ARN total sont utilisés pour la transcription inverse. L'ARN est dosé en mesurant l'absorbance à 260 nm avec un spectrophotomètre (nanodrop ou implen).
Le volume d'échantillon est porté à 12 µL dans de l'eau RNAse free et incubé 5 min à 70°C pour dénaturer l'ADN. Ensuite 8 µL d'un mélange contenant 1/4 mix d'enzyme, 1/4 de tampon amorces oligodT + dNTP, 1/4 de tampon amorces random + dNTPs et 1/4 d'eau RNAse free, est ajouté, sur glace. Le mélange est ensuite chauffé 5 min à 25°C pour permettre l'hybridation des amorces. Ensuite il est incubé 60 min à 60°C (température

Tableau 7 : Matériel pour la qPCR

Nom	Firme	Référence
Plaque 96 puits	Greiner Bio-One	
H_2O		
SYBR Green Master mix	Promega	A6002
Step One plus		

Tableau 8 : Amorces utilisée pour la qPCR

Gène	**Forward primers**	**Reverse primers**
GAPDH	ACC CAC TCC ACC TTT GAC	GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA
Ki67	CGT AGC AGC ACA GAA AT	TGA TGG TTG AGG TCG TTC CTT GAT G
$p16^{INK4a}$	CCC AAC GCA CCG AAT AGT TAC G	GCT GCC CAT CAT CAT GAC CT
$p21^{WAF1}$	ACC CTT GTG CCT CGC TCA GG	GCG TTT GGA GTG GTA GAA ATC TGT
IL-6	CCA GGA GCC AGC TAT GAA CTC	AAG GCA GCA GGC AAC ACC AG
IL-8	GGC ACA AAC TTT CAG AGA CAG CA	GGC AAA ACT GCA CCT TCA CAC A
MMP9	TCG AAG GCG ACC TCA AGT G	TTC GGT GTA GCT TTG GAT CCA
IGFBP3	TGG AAG ACA CAC TGA ATC ACC T	GGC TGC CCA TAC TTA TCC ACA
IGFBP5	TGT GTA CCT GCC CAA TTG TGA	CAA CGT TGC TGC TGT CGA AG
CCL2	AGC AGC AAG TGT CCC AAA GA	GGA GTT TGG GTT TGC TTG TCC
STING	CCC TTC ACT TCG ATT CTT GC	AGC CGC AGA TAT CCG ATG TAA
Vimentin	GAG GCT GCC AAC CGG AAC AATG	TCC ATT TCA CGC ATC TGG CGT TC
E-cadherin	TGA AGG TGA GAG AGC CTC TGG	TGG GTG AAT TCG GGC TTG TT

Tableau 9 : Matériel pour l'extraction protéique

Nom	Firme	Référence
Tampon de lyse DLA		
o Thiourée 2M	Amersham	RPN6301
o Urée 7M	Merck Millipore, USA	8488
o Chaps 2%	Sigma Aldrich, USA	22694-7
o ABS 14 2%	Sigma Aldrich, USA	A1346
o Tris 30nM	Carl Roth	A411.1
Sonicateur	Hielscher, Allemagne	
Thermomixeur	Eppendorf, Allemagne	
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne	

optimale de la reverse transcriptase) pour permettre l'extension. Enfin, il est incubé 15 min à 70°C pour inactiver la reverse transcriptase. L'ADNc obtenu est conservé à -20°C.

3) Real time quantitative PCR

a) Matériel

Voir Tableau 7 et 8.

b) Méthode

Pour mesurer l'expression de gènes d'intérêt, l'ADNc est engagé dans une qPCR. La cible est amplifiée au moyen d'amorces spécifiques à sa séquence et par de nombreux cycles de PCR (polymerase chain reaction). Le SYBRgreen, un agent fluorescent qui se lie à l'ADN double brin, permet à chaque cycle de mesurer la quantité d'amplicons. Le Ct (cycle threshold) est le cycle de PCR où la fluorescence dépasse un seuil fixé. Plus l'ADNc correspondant au gène cible est abondant, plus le Ct est petit.

Dans une plaque 96 puits, 16 µL d'un mélange de SYBRgreen Master mix avec 300 nM d'amorces forward et reverse sont ajoutés à 4 µL d'ADNc dilué 100x. Les échantillons sont réalisés en duplicat technique. La plaque est centrifugée 1 min à 1200 rpm. La PCR est effectuée à l'aide de la StepOne plus. Le run PCR se compose d'abord d'une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 30 secondes et 65°C pendant une minute.

La GAPDH est utilisée comme gène de référence et les résultats sont calculés en taux d'expression relatif à la condition contrôle par le calcul du ΔΔCt [Schmittgen, 2008].

V) Extraction protéique et Western Blot

1) Extraction protéique

a) Matériel

Voir Tableau 9.

b) Méthode

Les cellules sont lysées dans 75 µL de tampon DLA par T25 ou 200 µL/T75. Les lysats sont soniqués trois fois pendant 10 sec à faible amplitude. Le lysat est ensuite agité à 1200 rpm et 12°C pendant 15 min. Il est ensuite centrifugé 10 min à 13 000 rpm pour culoté les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -80°C.

Tableau 10 : Matériel pour le dosage protéique

Nom	Firme	Référence
Plaque 96 puits	Greiner Bio-One	655101
H_2O		
Albumine serique bovine (BSA)	VWR life science	422361V
Pierce 660 Protein Assay Reagent	Thermo Scientific	22660
Ionic Detergent Compatibility reagent	Thermo Scientific	22663
Spectrophotomètre	Biorad, USA	
Logiciel Microplate Manager 6	Biorad, USA	

Tableau 11 : Matériel utilisé pour le western blot avec des gels 10 ou 12%

Nom	Firme	Référence
Bleu de charge • SDS (dodécylsulfate de sodium) 20% • Glycérol 85% • Bleu de bromophénol • β-mercaptoéthanol • Tris-HCl 0,5M pH 6,8	 Carl Roth Merck Millipore GE Healthcare Fluka Carl Roth	 A3942 104092 17-1329-01 A411.1
H_2O		
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne	
Gel : • Gel de concentration o Tris 0,5M 0,4% SDS à pH 6,8 o 3,75% acrylamide o TEMED o APS 10% • Gel de séparation o Tris 1,5M 0,4% SDS à pH8,8 o 10 ou 12% acrylamide o TEMED o APS 10%	 Carl Roth Carl Roth Biorad Biorad Biorad	 A411.1 A3942 1610158 1610800 1610700
Tampon de migration o Tris 25mM o Glycine 0,192M o SDS 1% o H_2O	 Carl Roth Carl Roth Carl Roth	 A411.1 3908.2 A3942
Membrane nitrocellulose	Thermofisher Scientific	
Marqueur de poids moléculaire o Blue prestained protein standard o Precision plus kaleidoscop standard	 Biorad, USA Biorad, USA	 P7712
Tampon de transfert pH 8,3 • Tris 25 nM • Glycine 150 mM • Méthanol 20%	 Carl Roth Carl Roth VWR life chemicals	 A411.1 3908.2 20847.307

• H_2O		
TBS (Tris buffered Saline) pH 7,4 • 0,2 M Tris • 1,5 M NaCl • H_2O	Carl Roth Carl Roth	A411.1 P029.2
Odyssey Blocking buffer	LI-COR	927-50 000
Tween 20	Biorad, USA	170-6531
Scanner Odyssey	LI-COR	
Logiciel Odyssey V3 .0	LI-COR	

Tableau 12 : Matériel pour le western blot avec des gels 3-8% précoulés

Nom	Firme	Référence
Bleu de charge 4x	Nupage	NP0007
Tampon de migration • Tris acétate SDS running buffer 10x • H_2O	Nupage	LA0041
Antioxydant	Nupage	NP0005
DTT		
Gel 3-8% acrylamide	Nupage	
Etalon Himark	Novex	LC5699
Tampon de transfert : • Tampon de transfert stock 10x • 10% méthanol • 0,01% antioxydant	Nupage VWR chemicals	NP0006 20847.307

Tableau 13 : Anticorps utilisés en western blot

Primary antibody	**Firm**	**Clonality**	**Source**	**Dilution**	**Reference**
GAPDH	Abcam	Monoclonal	Rabbit	1/10 000	#ab12895
alpha-Tubuline	Sigma	Monoclonal	Mouse	1/20 000	T5168
phospho-RB	Cell signaling technology	Monoclonal	Rabbit	1/1000	#9307S
RB	Cell signaling technology	Monoclonal	Mouse	1/1000	#9309S
phospho-p53 (ser 15)	Cell signaling technology	Monoclonal	Mouse	1/1000	#9286
p53	Millipore	Monoclonal	Mouse	1/1000	05 224
$p16^{INK4a}$	Abcam	Monoclonal	Rabbit	1/1000	#108349

$p21^{WAF1}$	Cell signaling technology	Monoclonal	Rabbit	1/1000	#2946S
Vimentin	Cell signaling technology	Monoclonal	Mouse	1/1000	#5741S
E-cadherin	Cell signaling technology	Monoclonal	Mouse	1/1000	#3195S
Phospho ATM	Cell signaling technology	Monoclonal	Rabbit	1/1000	5883
ATM	GeneTex	Monoclonal	Mouse	1/1000	GTX70103
Phospho CHK2	Cell signaling technology	Monoclonal	Rabbit	1/1000	2197
CHK2	Cell signaling technology	Polyclonal	Rabbit	1/1000	2662
Secondary antibody	**Firm**	**Clonality**	**Source**	**Dilution**	**Reference**
IRDye800CW Goat anti-Rabbit IgG	LI-COR	Polyclonal	Goat	1/10 000	#926-32211
IRDye680RD Goat anti-Mouse IgG	LI-COR	Polyclonal	Goat	1/10 000	#926-68070

2) Dosage protéique

a) Matériel

Voir Tableau 10.

b) Méthode

L'abondance protéique est quantifiée par la méthode de Pierce 660. Le pierce est un composé se liant au niveau des acides aminés basiques. Une fois lié ce composé a une absorbance mesurable à 660 nm. Les mesures se font en duplicat dans des plaques 96 puits où 150 µL de Pierce (dans lequel de la poudre Ionic Detergent compatibility Reagent a préalablement été ajoutée) sont ajoutés à 10 µL d'échantillon dilué 10x. Après 5 min, l'absorbance à 660nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

Un blanc (DLA dilué 10x) est soustrait à l'absorbance des échantillons. L'abondance protéique est calculée à partir d'une droite d'étalonnage de BSA.

3) Western Blot

3.1) Gel 10 ou 12% Acrylamide

a) Matériel

Voir Tableau 11 et 13.

b) Méthode

Les échantillons sont préparés afin d'obtenir 20 ou 25 µg de protéines dans un volume de 16 µL. 4 µL de bleu de charge concentré 5x sont ajoutés et le mélange est chauffé 5 min à 100°C pour dénaturer les protéines à l'aide du β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont centrifugés brièvement avant d'être chargés dans les puits du gel. La migration des protéines dans le gel se fait grâce à l'application d'un courant dans une cuve remplie de tampon de transfert.

Les protéines sont transférées sur des membranes de nitrocellulose par transfert liquide. Pour cela, le gel est déposé sur la membrane, et ils sont placés entre, de chaque coté, deux papiers whatman et une éponge imbibés de tampon de transfert. Le « sandwich » est placé dans une cuve remplie de tampon de transfert. Le transfert se fait sous une tension de 70 Volts pendant 2h, sur glace.

La membrane est bloquée dans un mélange 50%TBS/50% de tampon Licor pendant 1h à température ambiante. L'anticorps primaire est dilué de façon appropriée dans le tampon Licor agrémenté de 0,1% Tween 20, et est mis en contact avec la membrane une nuit à 4°C sous agitation. La membrane est ensuite rincée trois fois 5 min avec du TBS 0,1% tween 20, et incubée 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué 10 000 x dans du tampon Licor 0,1% Tween 20. La membrane est de nouveau rincée trois fois 5 min avec du TBS 0,1% tween 20 et deux fois avec du TBS. La membrane est séchée puis scannée avec l'Odyssey V3.0.

Tableau 14 : Matériel utilisé pour le marquage par immunofluorescence

Nom	Firme	Référence
PBS (Phosphate Buffer Saline): • Voir Tableau 1		
PFA (paraformaldéhyde)	Merck Millipore, USA	
BSA	VWR life sciences	
Triton-X100	Carl Roth	3051
DAPI	Sigma	10236 276 001
Mowiol	Sigma Aldrich, USA	
HCl	Merck	
DAPI	Sigma	10236 276 001

Tableau 15 : Anticorps utilisés en immunofluorescence

Primary antibody	**Firm**	**Clonality**	**Source**	**Dilution**	**Reference**
53BP1	Novus	Polyclonal	Rabbit	1/300	N100-305
CPD	Cosmo Bio Co	Monoclonal	Mouse	1/300	NMDN001
Ki67	Cell signaling technology	Polyclonal	Mouse	1/800	#9449
Secondary antibody	**Firm**	**Clonality**	**Source**	**Dilution**	**Reference**
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa fluor 488 conjugate	Molecular Probe	Polyclonal	Goat	1/1000	#A11008
Goat anti-Rabbit IgG, Alexa fluor 488 conjugate	Molecular Probe	Polyclonal	Goat	1/1000	#A11001
Goat anti-Mouse IgG, Alexa fluor 568 conjugate	Molecular Probe	Polyclonal	Goat	1/1000	#A11004

3.2) Gel 3-8% d'acrylamide

a) Matériel

Voir Tableau 12 et 13.

b) Méthode

Les gels 3-8% d'acrylamide sont prêts à l'emploi. Les échantillons protéiques sont préparés à l'aide d'un bleu de charge Nupage 5x auquel est ajouté 0,05M de DTT, qui permet de réduire les ponts disulfures des protéines. Le mélange bleu de charge-protéines est chauffé à 70°C pendant 10 min pour la dénaturation. La migration se fait à 200V avec du tampon de migration tris acétate + 0,25% d'antioxydant dans la partie centrale de la cuve et sans antioxydant autour. Le transfert est réalisé en semi-sec à 1 mA/cm^2 pendant 2h dans le tampon Nupage.

Le blocage de la membrane et le marquage se font comme précédemment. Notons que des membranes ont été strippées, sans succès, suivant le protocole d'Abcam (Western blot membrane stripping for restaining protocol, Mild stripping).

VI) Immunofluorescence

a) Matériel

Voir Tableau 14 et 15.

b) Méthode

Les cellules sont repiquées à une densité de 40 000 cellules/couvre-objet. Le lendemain, les cellules sont fixées pendant 10 min dans du PBS + 4% PFA. Les cellules sont ensuite rincées deux fois dans du PBS non stérile et une fois dans du PBS stérile. Elles sont conservées à 4°C.
Le jour du marquage, les cellules sont perméabilisées avec du PBS 1% Triton-X100 pendant 5 min à température ambiante.

Les cellules sont bloquées 3 fois 10 min dans du PBS + 2% BSA. Les cellules sont ensuite incubées en chambre humide avec l'anticorps primaire dilué de façon appropriée dans du PBS + 2% BSA pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules sont rincées 3 fois dans du PBS + 2% BSA. Les cellules sont incubées en chambre humide pendant 1h à température ambiante dans l'obscurité avec l'anticorps secondaire dilué 1000x dans du PBS + 2% BSA. Les cellules sont de nouveau rincées trois fois dans du PBS + 2% BSA puis une fois avec du PBS. Les noyaux sont marqués avec du DAPI dilué dans du PBS pendant 10 min et les cellules sont rincées 3 fois dans du PBS avant que les couvre- objets ne soient montés sur lame avec du Mowiol préchauffé à 56°C.

Tableau 16 : Matériel pour le FISH combiné à une immunofluorescence

Nom	Firme	Référence
PBS (Phosphate Buffer Saline): • Voir Tableau 1		
Solution de perméabilisation • 20 mM de Tris-HCL • 50 mM NaCl • 3 mM $MgCl_2$ • 300 mM sucrose • 0,5% Triton X-100 • H_2O	 Caril Roth Carl Roth Sigma Carl Roth	 9090 P029.2 S7903-250G 3051
Solution de fixation • PBS • 3% formaldehyde • 2% sucrose	 Merck Sigma	 104002 S7903-250G
Solution de Blocking : • PBS • 10% Normal Goat Serum 10x • 1% BSA 0,1% Triton-X100	 VWR life science Carl Roth	 422361V 3051
Anticorps 53BP1	Novus antibody	NB100-304
Tween 20	Biorad	170-6531
Alexa 488 anti-rabbit	Invitrogen	A11008
Formaldéhyde	Merck	104002
RNAse	Sigma, USA	
saline sodium citrate (SSC) • 3 M NaCl 300 mM $Na_3C_6H_5O_7$	 Carl Roth Merck	 P029.2 6448
Ethanol		
Solution de préperméabilisation • 20 mM de Tris-HCL • 50 mM NaCl • 3 mM $MgCl_2$ • 300 mM sucrose • 0,5% Triton X-100 H_2O	 Carl Roth Carl Roth Merck Sigma Carl Roth	 9090 3957 A914133 908 S7903-250G 3051
Tris	Carl Roth	A411.1
Formamide		
Agent bloquant	Boehringer	
Tween 20	Biorad	170-6531
DAPI	Sigma	10236 276 001

Pour le marquage des CPDs il y a des différences dans le protocole après la fixation. Le blocking est précédé d'un étape de dénaturation de l'ADN dans de l'HCl 2N pendant 30 min à température ambiante. Le blocking se fait dans une solution de PBS + 20% FBS pendant 30 min à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS et incubées en chambre humide avec l'anticorps dilué dans du PBS + 5% sérum une nuit à 37°C. Le lendemain les cellules sont rincées trois fois dans du PBS avant d'être incubées 1h à température ambiante en chambre humide avec l'anticorps secondaire dilué 1000x dans du PBS 5%. Le marquage et le montage se fait comme précédemment.

VII) Hybridation *in situ* en fluorescence combinée à une immunofluorescence

Cette technique est utilisée afin d'observer les régions télomériques (teloFISH) et le marqueur de dommages à l'ADN 53BP1 (par immunofluorescence). Les télomères sont marqués au moyen d'une sonde LNA (locked nucleic acid) spécifique. Les LNA sont des ARN modifiés possédant un pont méthylène entre l'hydroxyl en position 2 et l'atome de carbone 4 du sucre. Cela permet de bloquer la conformation du ribose et d'augmenter l'hybridation de la sonde.

a) Matériel

Voir Tableau 16.

b) Méthode

Les kératinocytes sont repiqués à une densité de 40 000 cellules par couvre-objet. Le lendemain, les cellules sont incubées 5 min à température ambiante dans le tampon de perméabilisation. Ensuite elles sont incubées 15 min à température ambiante dans la solution de fixation. Les cellules sont rincées 3 fois au PBS et incubées de nouveau 10 min à température ambiante dans le tampon de perméabilisation. Les cellules sont rincées 3 fois au PBS (elles peuvent alors être conservées plusieurs jours dans du PBS stérile à 4°C).
Les cellules sont incubées 1h à 37°C dans la solution de blocking. Ensuite les couvre-objets sont incubés une nuit à 4°C en chambre humide avec l'anticorps 53BP1 dilué 600 fois dans la solution de blocking. Après incubation, les cellules sont rincées trois fois au PBS + 0,1% Tween 20 à 45°C, et incubées 1h à 37°C en chambre humide avec l'anticorps secondaire. Les cellules sont de nouveau rincées 3 fois au PBS + 0,1% Tween 20 à 45°C et trois fois au PBS.
Les cellules sont fixées pendant 2 min avec du PBS + 3,7% formaldéhyde et rincées 3 fois au PBS. Les cellules sont ensuite incubées 1h à 37°C avec de la RNAse 0,1mg/mL et rincées trois fois dans du tampon SSC (saline sodium citrate). Les cellules sont ensuite incubées 10 min dans le tampon de perméabilisation à RT, rincées au PBS et refixées dans du PBS + 3,7% formaldéhyde pendant 2 min. Après des bains successifs de 2 min dans du PBS puis dans de l'éthanol à concentration croissante (70%-80%-90%-100%), les cellules sont ensuite séchées avant l'étape du FISH.

La solution-mère contenant la sonde LNA télomérique est chauffée à 75°C et centrifugée à 13 000 g pendant 5 min. La sonde est diluée à 160 nM dans un mix 50% formamide déionisé, 2x SCC et 1x agent bloquant. Les cellules sont incubées avec cette solution d'hybridation en chambre humide à 83°C pendant 3 min suivi de 2h à température ambiante.

Tableau 17 : Matériel pour le Scratch assay

Nom	Firme	Référence
Milieu de culture • Voir Tableau 2.		
PBS (Phosphate Buffer Saline): • Voir Tableau 1		
Mitomycine C	Sigma	M4287
Cytonote 1W	Iprasense	
Logiciel Horus	Iprasense	

Après l'incubation avec la sonde, les cellules sont rincées deux fois pendant 15 min dans un mélange 50% formamide, 2x SSC et 20 mM Tris à pH 7,4. Ensuite, elles sont rincées deux fois pendant 5 min avec dans une solution 50 mM Tris à pH 7,4 + 150 nM NaCl et 0,05% Tween 20.
Les noyaux sont finalement marqués avec du DAPI dilué dans du PBS pendant 10 min à RT. Les cellules sont à nouveau rincées deux fois 5 min dans le mélange 50 mM Tris à pH 7,4 + 150 nM NaCl et 0,05% Tween 20, puis au PBS. Les couvre-objets sont ensuite montés sur lame avec du mowiol chauffé à 56°C et conservées à 4°C.

VIII) Etude de l'impact des milieux conditionnés des kératinocytes sur la migration de cellules cancéreuses

Pour mesurer l'impact du sécrétome des kératinocytes sénescents sur des cellules cancéreuses, on récupère les milieux de culture de kératinocytes conditionnés pendant 72 h. Pour retirer les cellules mortes, les milieux conditionnés sont centrifugés 8 min à 1200 rpm. Ils sont ensuite stockés à -80°C.
L'impact de ces milieux conditionnés est ensuite testé sur la migration des cellules cancéreuses.

Test scratch

a) Matériel

Voir Tableau 17.

b) Méthode

Le scratch assay ou test scratch consiste à mesurer la fermeture d'une « cicatrice » réalisée sur un tapis cellulaire confluent. La veille du test, les cellules sont repiquées à confluence, soit à 90 000 cellules/cm^2 pour les A431 et 50 000 cellules /cm^2 pour les MET1. Le lendemain, les cellules sont rincées deux fois dans du PBS stérile et incubées pendant 3h à 37°C à l'abri de la lumière dans leur milieu de culture dans lequel 10 µg/mL de mytomycine C ont été ajoutés afin de stopper la prolifération. Les cellules sont ensuite rincées une fois dans du PBS et du milieu sans mitomycine est rajouté. Une cicatrice (« scratch ») est faite sur le tapis cellulaire au moyen d'un tip ou d'un râteau cellulaire. Les cellules sont rincées quelques fois avec du milieu de culture afin de retirer les débris cellulaires et les cellules arrachées, et incubées avec un mélange 50% milieu conditionné + 50% milieu 20% FBS (10% de sérum au final), à 37°C 5% CO_2 sous microscope cytonote. Le scratch est photographié toutes les demi-heures par le cytonote.

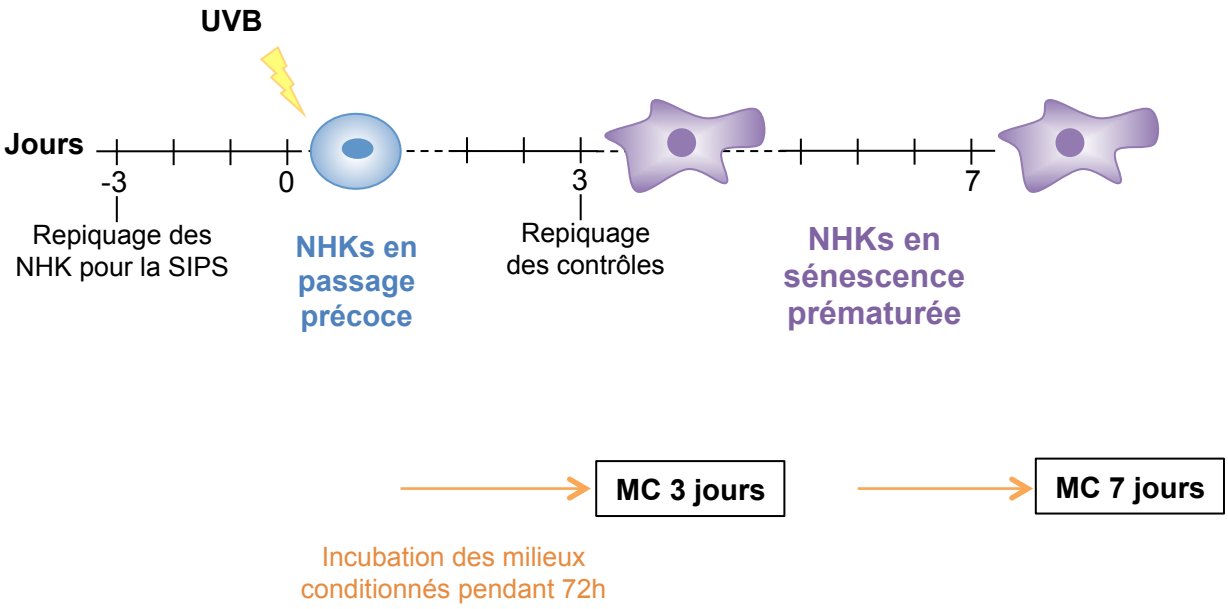


Figure 1: Modèle de sénescence prématurée induite par les stress UVB (SIPS-UVB). Les kératinocytes humains normaux (NHKs pour Normal Human Keratinocytes) sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. Au 3ème jour après le dernier stress, les NHKs contrôles, atteignant la confluence, sont repiqués. Les milieux conditionnés des NHKs sont récoltés aux jours 3 et 7 après 72h d'incubation.

RESULTATS

Le but de ce mémoire est d'investiguer la sénescence des kératinocytes suite à des stress UVB et l'effet de leur sécrétome sur les cellules cancéreuses. Les rayons UVB sont en effet connus pour induire la sénescence prématurée et représentent un stress physiologique important des kératinocytes [Ahmad, 2017].

Pour répondre à cet objectif, nous utilisons un modèle de sénescence induite prématurément pas des stress UVB développé en l'URBC (Unité de recherche en biologie cellulaire), UNamur. Des kératinocytes humains normaux (NHKs pour Normal Human Keratinocytes) sont extraits de biopsies de peaux jeunes et peu exposées au soleil. Ces NHKs sont exposés à trois expositions UVB à une dose de 675 mJ/cm^2 réparties sur une journée, avec un intervalle de 3 heures entre les expositions. Cette dose représente une dose physiologique sublétale n'amenant pas d'apoptose (données non publiées E. Bauwens). Les cellules contrôles suivent le même traitement (sortie de l'incubateur, rinçages au PBS, etc.) mais sans l'exposition aux UVB. Les marqueurs classiques de sénescence étaient observés trois jours après le dernier stress.

Des résultats obtenus précédemment au laboratoire ont montré que le milieu conditionné issu de NHKs en sénescence réplicative entrainait une migration plus importante de cellules A431 issues d'un carcinome épidermoïde (scratch assay, données non publiées d'Emilie Bauwens - mémoire Clotilde Hannart, 2018). Par contre, aucun effet sur la migration n'a pu être montré à partir de milieu conditionné issu de NHKs en SIPS-UVB, récolté à 3 jours après le stress. Etant donné que la composition du SASP est dynamique [Coppé, 2008 ; Hoare, 2016], nous avons donc investigué lors de ce mémoire la sénescence des NHKs en SIPS-UVB à plus long terme après les stress (Fig. 1).

Dans une première partie de ce travail, les biomarqueurs de sénescence de ce modèle de SIPS-UVB prolongé sont caractérisés jusqu'à 7 jours après le dernier stress. Au-delà de ce temps, les NHKs contrôles montrent des signes de sénescence et ne sont plus jugés comme étant un contrôle adéquat (données non montrées).

Dans une seconde partie, le sécrétome des NHKs exposés aux UVB a été étudié. Les milieux conditionnés pendant 72 h des NHKs ont également été récoltés à 3 et 7 jours après le dernier stress et utilisés pour investiguer l'impact du sécrétome sur des lignées cancéreuses. Les lignées cancéreuses sélectionnées sont des carcinomes cutanés des cellules squameuses.

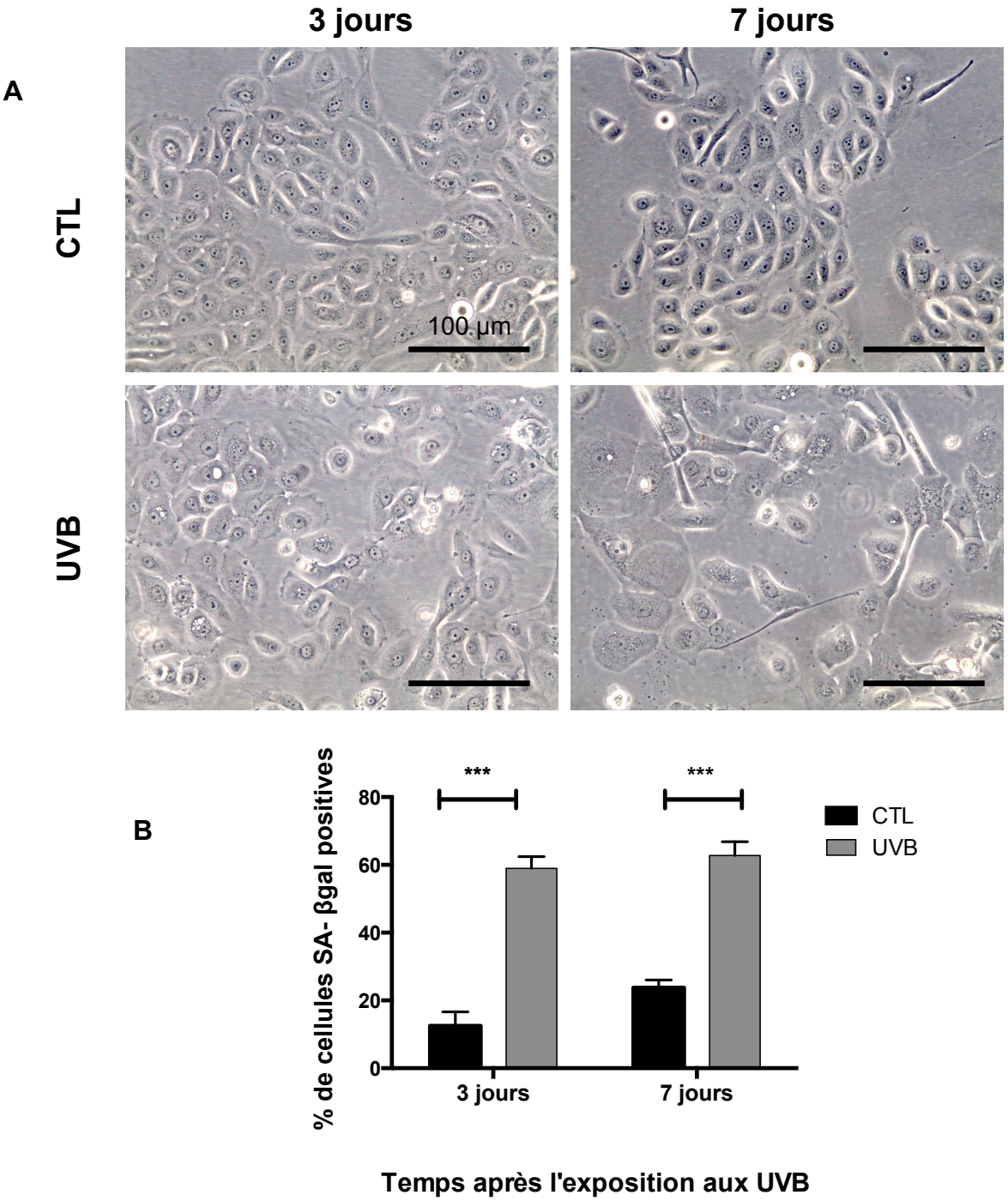


Figure 2 Etude des changements morphologiques et de l'activité SA-βgal à 3 jours et 7 jours après l'exposition aux UVB. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. **A**: La morphologie cellulaire est observée par microscope à contraste de phase (Grossissement 100X – échelle = 100 µm). **B**: La proportion de cellules SA-βgal positives est calculée en comptant 300 cellules/ puits, dans 3 puits (n=3). Analyse statistique: test de student pairé (***: p< 0,001).

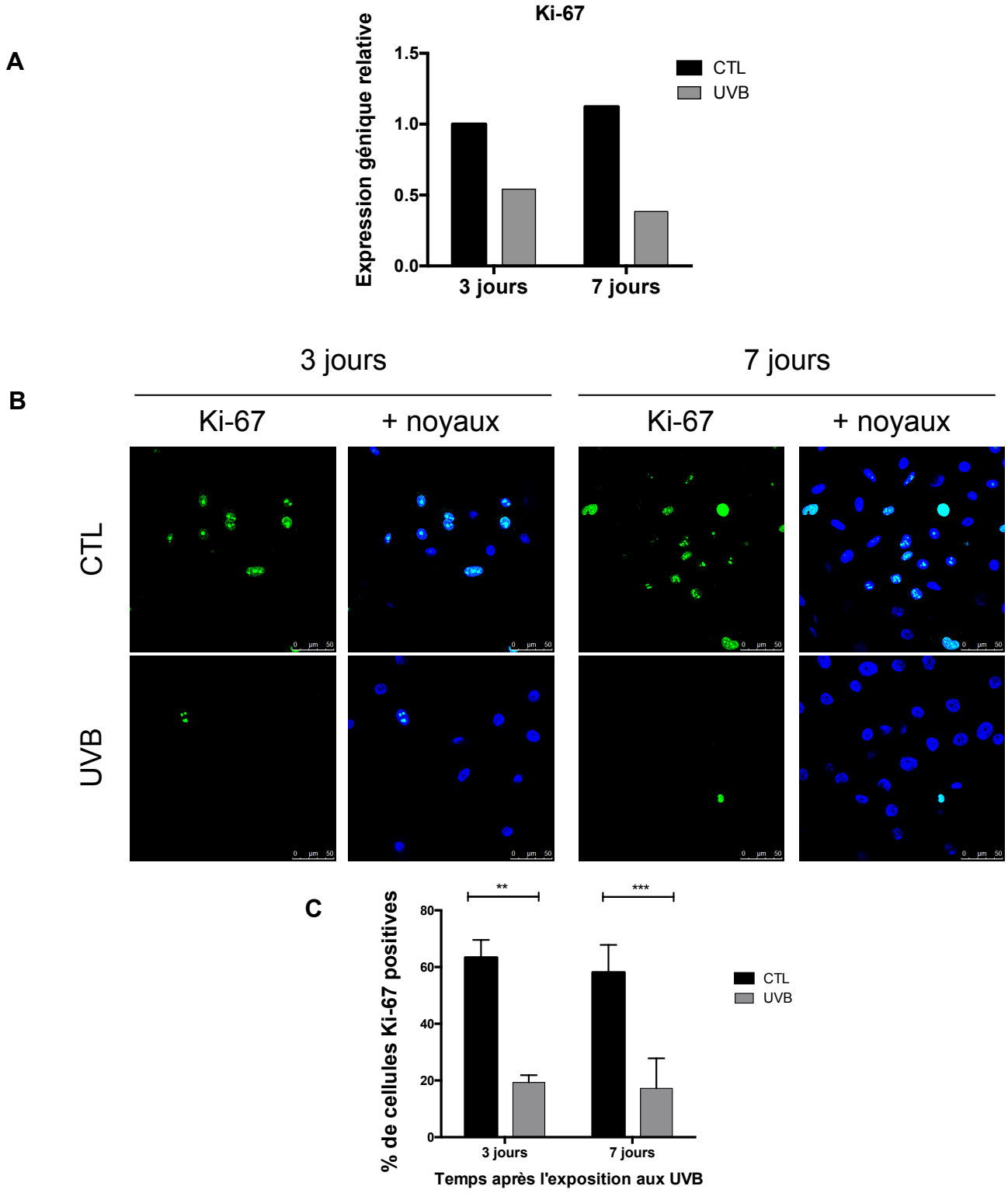


Figure 3: Etude de la prolifération des NHKs, à 3 et 7 jours après l'exposition aux UVB, par l'étude du marqueur Ki-67. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. **A:** Expression génique de Ki-67 (n=2). L'ARN total à été extrait à 3 et 7 jours après le dernier stress puis rétrotranscrit en ADNc. Les résultats sont exprimés en taux d'expression par rapport au contrôle à 3 jour. **B**: Niveau de Ki-67 étudié par immunofluorescence. K-67 est marqué par un fluorochrome Alexa 488 (vert)**.** Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu). Les micrographies ont été réalisées au microscope confocal (barre d'échelle = 50 µm). **C**: La quantification des noyaux marqués à été réalisée sur 250 cellules par conditions (n=3) Analyse statistique: test de student pairé (***: p< 0,001; **: p < 0,01).

I) Etude des biomarqueurs de la sénescence chez les NHKs en SIPS-UVB

1) Morphologie cellulaire et activité SA-βgal

Les NHKs utilisés pour la SIPS sont en passages précoces (P5 ou P6). Les cellules contrôles (CTL) présentent une morphologie typique polygonale, et ont tendance à pousser en grappe (Fig. 2A). Aucune différence dans la morphologie des NHKs contrôles n'est observée au jour 3 et 7.

Les NHKs exposées aux UVB présentent par contre une morphologie modifiée avec des bords irréguliers aux jours 3 et 7 après le dernier stress UVB, par rapport aux contrôles.
Au jour 3, quelques cellules présentent également une morphologie plus large. Néanmoins, pour la plupart des cellules, leur taille est similaire aux contrôles. Par contre, au jour 7 après la dernière exposition au UVB, la majorité des cellules présentent une morphologie plus large.

En second biomarqueur de la sénescence, des tests SA-βgal ont été réalisés (Fig. 2B), afin de déterminer la proportion de cellules sénescentes dans la population. La proportion de NHKs présentant une activité SA-βgal atteint déjà 59% après 3 jours contre 12% dans les contrôles. Au jour 7, elle est de 63% contre 24%.

La morphologie et l'activité SA-βgal suggèrent que suite à l'exposition aux UVB, il y a une augmentation de la proportion de cellules sénescentes, qui reste constante entre les deux timings testés (3 et 7 jours post-stress UVB). Il faut cependant souligner qu'il y a une augmentation de NHKs positifs à la SA-βgal dans les contrôles au jour 7 comparé au jour 3.
Ces deux biomarqueurs ne sont pas suffisants pour établir que les cellules sont sénescentes et d'autres biomarqueurs ont donc été étudiés.

2) Etude de l'arrêt du cycle cellulaire

La sénescence est caractérisée par un arrêt permanent du cycle cellulaire. Afin de déterminer si les cellules en SIPS-UVB étaient bien en arrêt de prolifération, nous avons étudié l'expression de Ki-67, un marqueur de prolifération.
L'expression génique de Ki-67 diminue de moitié dans les cellules exposées aux UVB au jour 3, et de presque 3x au jour 7 après le stress, par rapport à leurs contrôles respectifs (Fig. 3A).
L'abondance protéique de Ki-67 a également été étudiée en immunofluorescence. La proportion des noyaux présentant un marquage Ki-67 passe de 63% dans les contrôles à 19% dans les NHKs exposées aux UVB après 3 jours, et de 48% à 17% après 7 jours (Fig. 3B).
Ces résultats confirment que la proportion des NHKs en prolifération diminue de façon importante suite à la SIPS-UVB et que la diminution d'expression de Ki-67 est maintenue jusque 7 jours post-stress UVB.

L'arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence est associé dans la littérature aux voies p16/RB et/ou p53/p21 [Campisi, 2007]. Dans le cas des kératinocytes, le plateau de sénescence est associé à une augmentation de l'abondance protéique de $p16^{INK-4A}$ (Nassour, 2016). Nous avons donc étudié ces différents marqueurs dans le modèle de SIPS-UVB.

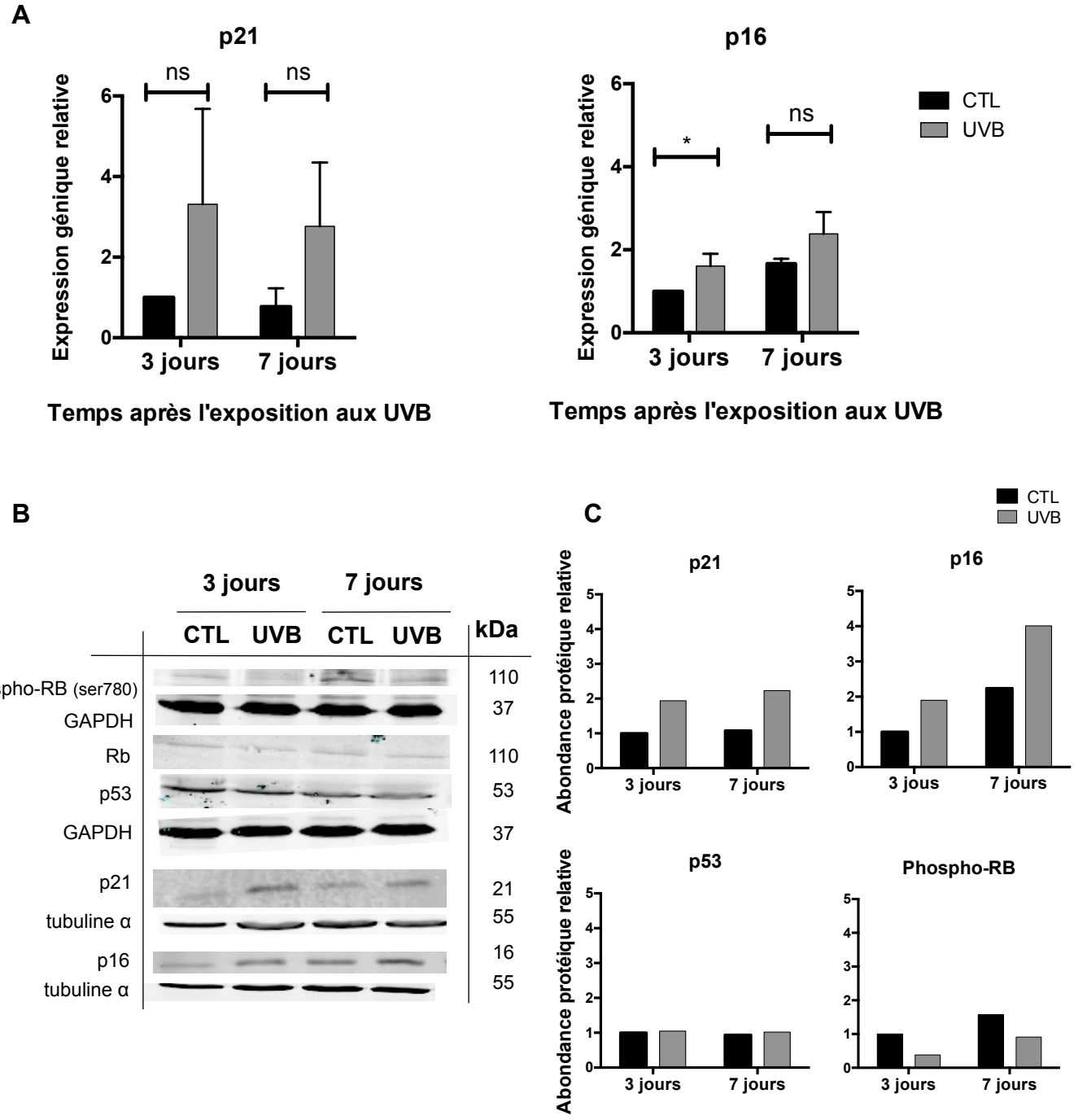
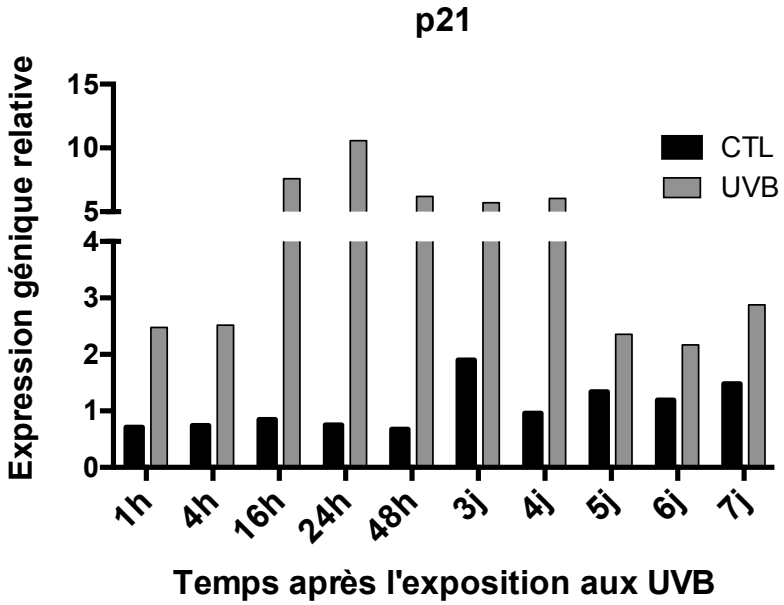


Figure 4: Etude des marqueurs de l'arrêt du cycle cellulaire des NHKs à 3 et 7 jours après l'exposition aux UVB. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. **A:** Expression génique de p21 et p16. . L'ARN total à été extrait à 3 et 7 jours après le dernier stress puis rétrotranscrit en ADNc. Les résultats sont exprimés en taux d'expression par rapport au contrôle 3 jours (n=4). Analyse statistique: test de student pairé (ns: $p>0,05$; *: $p< 0,05$). **B:** Abondance protéique de phospho-RB (n=2), p53 (n=1), p16, (n=2) et p21 (n=2) par western blot. La tubuline α et la GAPDH sont utilisés comme contrôles de charge. **C:** Quantification des western blot réalisée via le logiciel Odyssey. Les résultats sont rapportés à leur contrôle de charge respectif et normalisé par rapport au contrôle 3 jours. Phospho-RB est rapporté à sa forme totale.

A



B

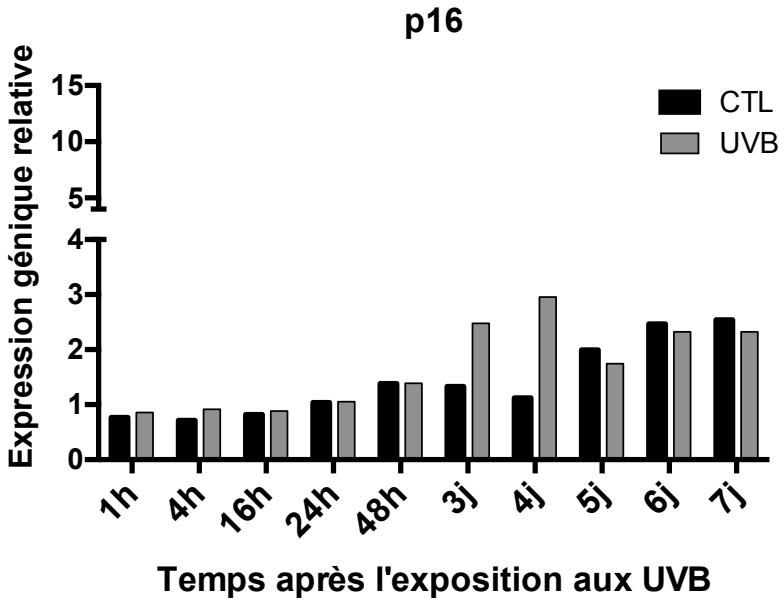


Figure 5: Cinétique de l'expression génique de p16 et p21 dans les NHKs après l'exposition aux UVB. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. L'ARN total à été extrait à 1h, 4h, 16h, 24h, 48h, et à 3, 4, 5, 6 et 7 jours après le dernier stress puis rétrotranscrit en ADNc. Les résultats sont exprimés en taux d'expression par rapport au contrôle t0. A: Expression génique de p21 (n=1). B: Expression génique de p16 n=2).

Au niveau de l'expression génique, *p21* a été étudié sur 4 donneurs différents à 3 et 7 jours après le dernier stress UVB (Fig. 4A). Il y a une augmentation d'expression de 3,3x et 3,6x dans les NHKs exposés aux UVB comparés à leurs contrôles respectifs, à 3 et 7 jours, respectivement.
P21 a également été étudiée au niveau de son abondance protéique en western blot (Fig. 4B, C). Comme pour l'expression génique, une augmentation de l'abondance protéique de p21 est observée dans les conditions UVB à 3 et 7 jours après le dernier stress par rapport aux contrôles.

L'expression de p21 est connue comme étant généralement induite par le facteur de transcription p53. Néanmoins, au niveau de l'abondance protéique de celui-ci, aucune augmentation n'est observée dans les NHKs exposés aux UVB par rapport aux contrôles (Fig. 4B, C). Cela est cohérent avec des données précédentes (données non publiées E. Bauwens), montrant une augmentation de l'expression protéique de p53 de 1h à 48h après l'exposition aux UVB par rapport aux contrôles, mais plus observable à 3 jours.

Deuxièmement, l'expression génique de la CDKI $p16^{INK4A}$ a été étudiée à 3 et 7 jours après le stress UVB sur 4 donneurs différents (Fig. 4A). Une surexpression de l'ordre de 1,5x est observée dans les NHKs exposés aux UVB à 3 et 7 jours après le stress, par rapport à leurs contrôles respectifs. Celle-ci est significative au jour 3 mais plus au jour 7, où la variabilité dans le taux d'expression suivant le donneur est plus importante. De plus, une augmentation de l'expression de $p16^{INK4A}$ dans les contrôles 7 jour est observée, par rapport au jour 3.
Au niveau de l'abondance protéique de p16, il y a une augmentation de l'ordre de 2x dans les conditions UVB à 3 et 7 jours par rapport à leurs contrôles respectifs (Fig. 4B, C). Il est à noter que le contrôle 7 jours présente également une augmentation dans l'abondance protéique de $p16^{INK4A}$ par rapport au contrôle 3 jours. Cela est cohérent avec les observations en expression génique.

Les CDKI $p16^{INK4A}$ et p21 inhibent la phosphorylation de RB, qui peut alors s'associer et séquestrer le facteur de transcription E2F impliqué dans l'expression de gènes pro-prolifératifs. Une hypophosphorylation de RB sur la sérine 780 est observée à 3 et 7 jours après l'exposition aux UVB par rapport aux contrôles. La forme totale de RB ne montre par contre pas de variation d'abondance entre les conditions.

L'expression génique de p21 et de $p16^{INK4A}$ a également été suivie de 1h à 7 jours après le stress UVB (Fig. 5). L'expression a été normalisée par rapport à un contrôle t0 représentant les NHKs au jour 0, avant d'être exposés au UVB, et donc n'ayant ni subis les passages hors de l'incubateur, ni le contact avec le PBS, comme c'est le cas pour les contrôles habituels de SIPS-UVB. La cinétique montre une surexpression de p21 dans les NHKs exposés aux UVB, par rapport aux contrôles respectifs, à tous les temps étudiés. Le niveau d'expression de p21 dans les contrôles reste stable (moins de 0,5x de variation par rapport au t0), à part au jour 3 où il y a une surexpression de 1,9x par rapport au t0. La surexpression de p21 dans les conditions UVB est la plus importante entre 16h et 4 jours après le dernier stress, avec un maximum de 10,6 x à 24h par rapport au t0.

L'expression génique de $p16^{INK4A}$ a également été étudiée en cinétique, sur deux donneurs (Fig. 5). L'expression de p16 reste à un niveau d'expression basal (+/- 0,3x de variation par rapport au contrôle t0) jusque 48h après le dernier stress et ce dans les deux conditions, contrôle et UVB. A 3 jours et à 4 jours après le stress UVB, il y a une surexpression de $p16^{INK4A}$ dans les conditions exposées au UVB par rapport aux contrôles. A partir de 5 jours,

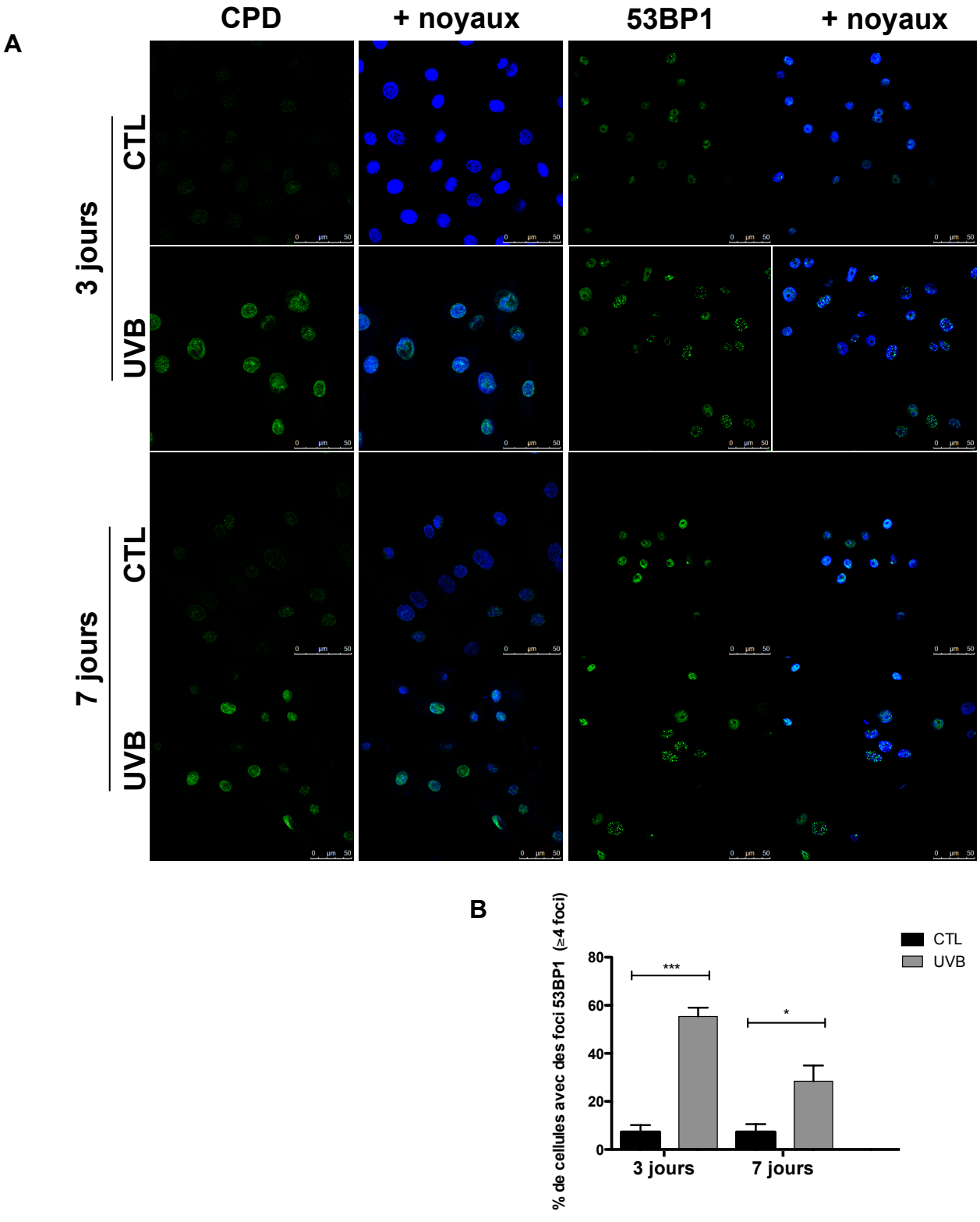


Figure 6: Présence de dommages à l'ADN chez les NHKs à 3 et 7 jours après l'exposition aux UVB. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. **A:** Abondance de CPDs et de foci 53BP1 étudiés par immunofluorescence. Les CPDs et 53BP1 sont marqués par un fluorochrome Alexa 488 (vert). Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu). Les micrographies ont été réalisées au microscope confocal (barre d'échelle = 50 µm) (CPDs en n=3 et 53BP1 en n=3).
B: La quantification des noyaux présentant plus de 4 foci 53BP1 à été réalisée sur 250 cellules par conditions (n=3). Analyse statistique: test de student pairé (*: p< 0,05;***: p< 0,001).

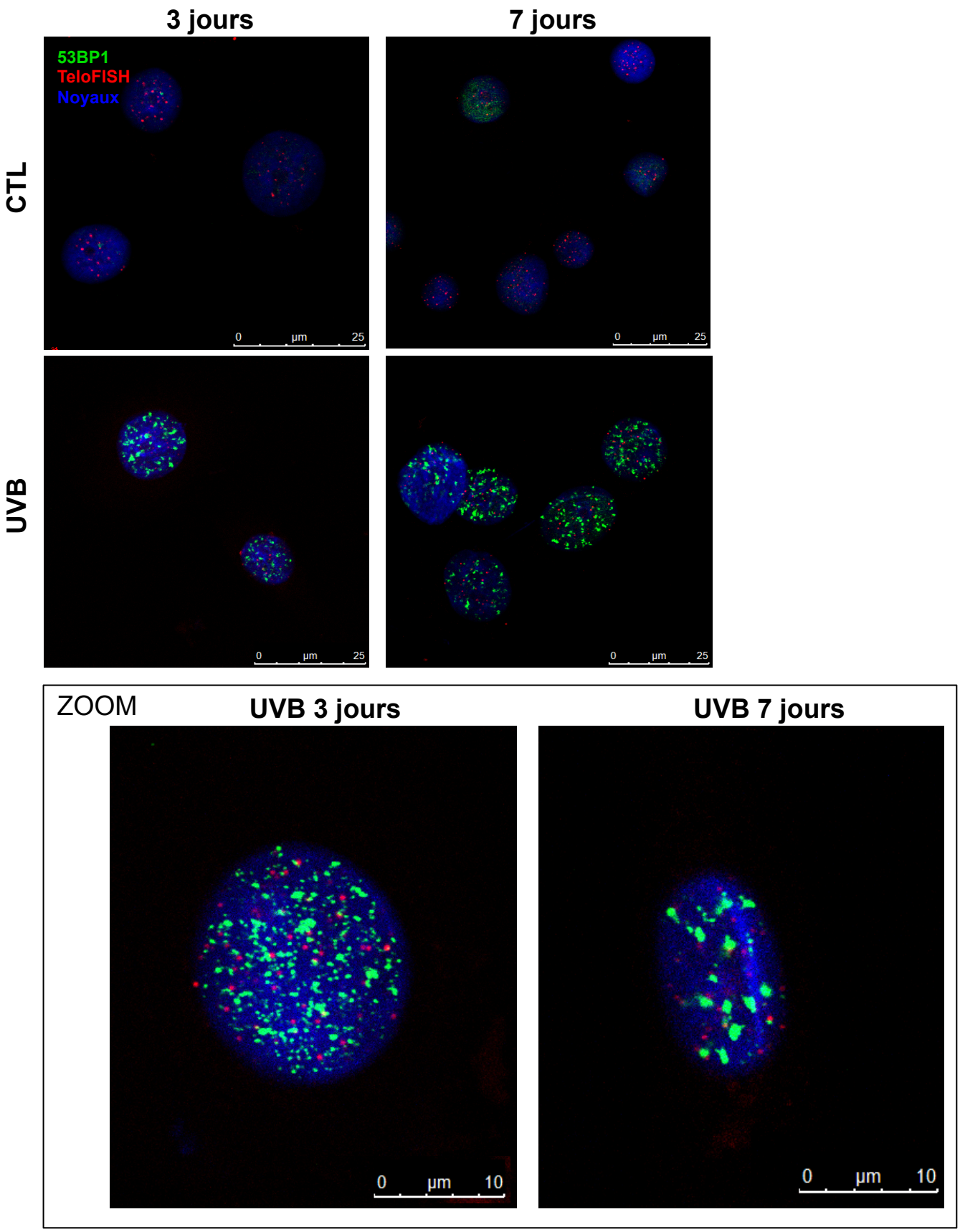


Figure 7: Etude de la colocalision de 53BP1 et des télomères dans les NHKs à 3 et 7 jours après l'exposition aux UVB. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. Le marquage de 53BP1 est réalisée par immunofluorescence et révélé par un fluorochrome Alexa 488 (vert). Les télomères sont localisé via une sonde LNA-FISH (révélés en rouge). Les noyaux sont marqués avec du DAPI (bleu). Les micrographies ont été réalisées au microscope confocal (barre d'échelle = 25 µm et 10µm dans le zoom) (n=3).

il y a également une surexpression dans les conditions contrôles par rapport au contrôle t0, et la différence entre l'expression de $p16^{INK4A}$ dans les cellules contrôles et dans les cellules exposées aux UVB semble négligeable.

L'étude de Ki-67 et des acteurs de l'arrêt du cycle cellulaire suggère que l'arrêt du cycle cellulaire est maintenu jusqu'au moins 7 jours après le stress. Les résultats semblent indiquer que l'arrêt du cycle est induit par p21 de façon plus ou moins dépendante de p53. En effet, nous observons une augmentation de p53 jusque 24h suite à l'exposition aux UVB et un pic d'expression de p21 à 24h. Ensuite, à des temps plus longs, une augmentation de p21 est toujours observée mais plus celle de p53.
Aux plus longs temps après le dernier stress UVB, l'augmentation de $p16^{INK4A}$ dans les NHKs exposés au UVB suggère une activation de la voie p16/RB.

3) Dommages à l'ADN et activation de la DDR

L'arrêt du cycle cellulaire en sénescence est associé à la présence de dommages à l'ADN persistants [Von Zglinicki, 2005]. L'exposition aux UVB est associée à une forte augmentation de dommages à l'ADN [Ahmad, 2017]. Nous avons donc étudié si ces dommages étaient observés et s'ils étaient réparés ou persistants dans le modèle de SIPS-UVB.

Premièrement, nous avons étudié la présence de CPDs (cyclobutane pyrimidine dimers), des dommages à l'ADN typiques des UV (Fig. 6A). Le marquage par immunofluorescence des CPDs montre une nette augmentation du nombre de cellules marquées dans les conditions exposées au UVB à 3 et à 7 jours après le stress par rapport aux contrôles. Ces dommages spécifiques des UVB semblent donc persister, indiquant que la cellule ne parvient probablement pas à les réparer.

Les rayons UVB peuvent également provoquer des cassures doubles brins [Ahmad, 2017]. Un moyen d'observer ces dommages est d'étudier la présence de protéines recrutant les la machinerie de réparation. Aux sites de cassures doubles brins, la protéine 53BP1, un médiateur de la DDR, est recrutée [Campisi, 2007]. Sa détection en foyers spécifiques, ou foci, permet de mettre en évidence la présence de foci de dommages à l'ADN associés à la sénescence (SDFs pour Senescence associated DNA damage Foci) observables en immunofluorescence [Panier et Boulton, 2013].

La détection de 53BP1 en immunofluorescence montre un marquage nucléaire principalement diffus dans les conditions contrôles alors que dans les conditions UVB, le marquage est concentré en foci (Fig. 6A, 7). La proportion de noyaux comportant 4 foci ou plus passe de 7% dans les contrôles à 55% dans les cellules exposées aux UVB à 3 jours, et de 7% à 28% respectivement à 7 jours (Fig. 6B). Le nombre de noyaux présentant 4 foci ou plus diminue donc à 7 jours après les UVB.

Les télomères sont particulièrement sensibles à l'accumulation de dommages car ils sont moins efficacement réparés [Petersen, 1998]. La question qui s'est donc ensuite posée était de savoir si 53BP1 était recrutée de manière préférentielle au niveau des télomères, indiquant une présence plus importante de dommages sur ces sites. Pour y répondre, la co-localisation de 53BP1 avec les régions télomériques a donc été étudiée en couplant une

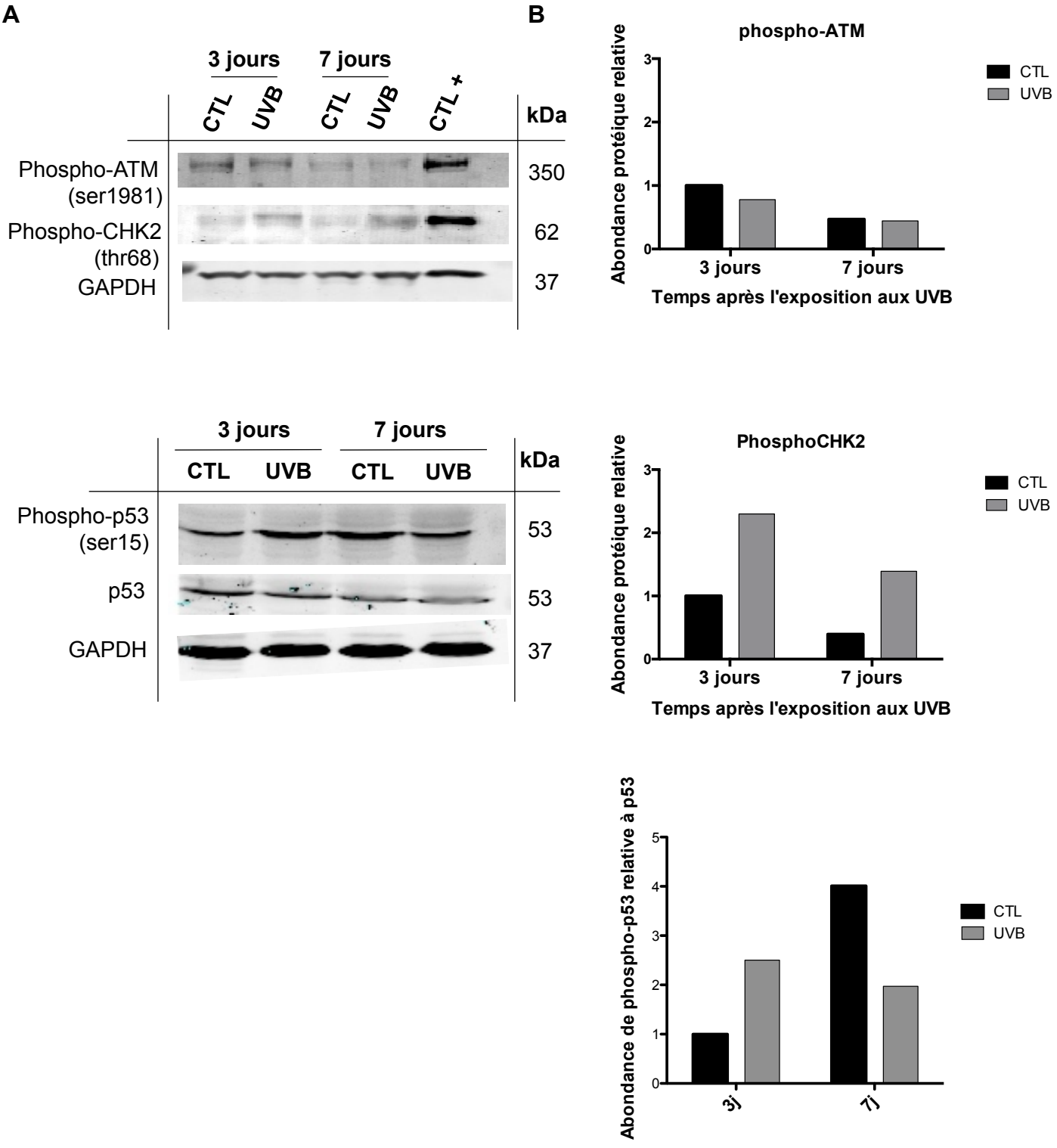


Figure 8: Etude de la DDR chez les NHKs à 3 et 7 jours après l'exposition aux UVB. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. A: Abondance protéique des formes phosphorylées actives phospho-ATM, phospho-CHK2, phospho-p53 ainsi que la forme totale de p53, analysées par western blot (werstern blots représentatifs, n=2). Le contrôle positif consiste en un extrait protéique des NHKs obtenu 1h après l'exposition aux UVB. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge. **B**: quantification de l'abondance relative de phospho-ATM et phospho-CHK2 est calculée par rapport à celle de la GAPDH. L'abondance relative de la forme phospho-p53 est calculée par rapport à la forme totale.

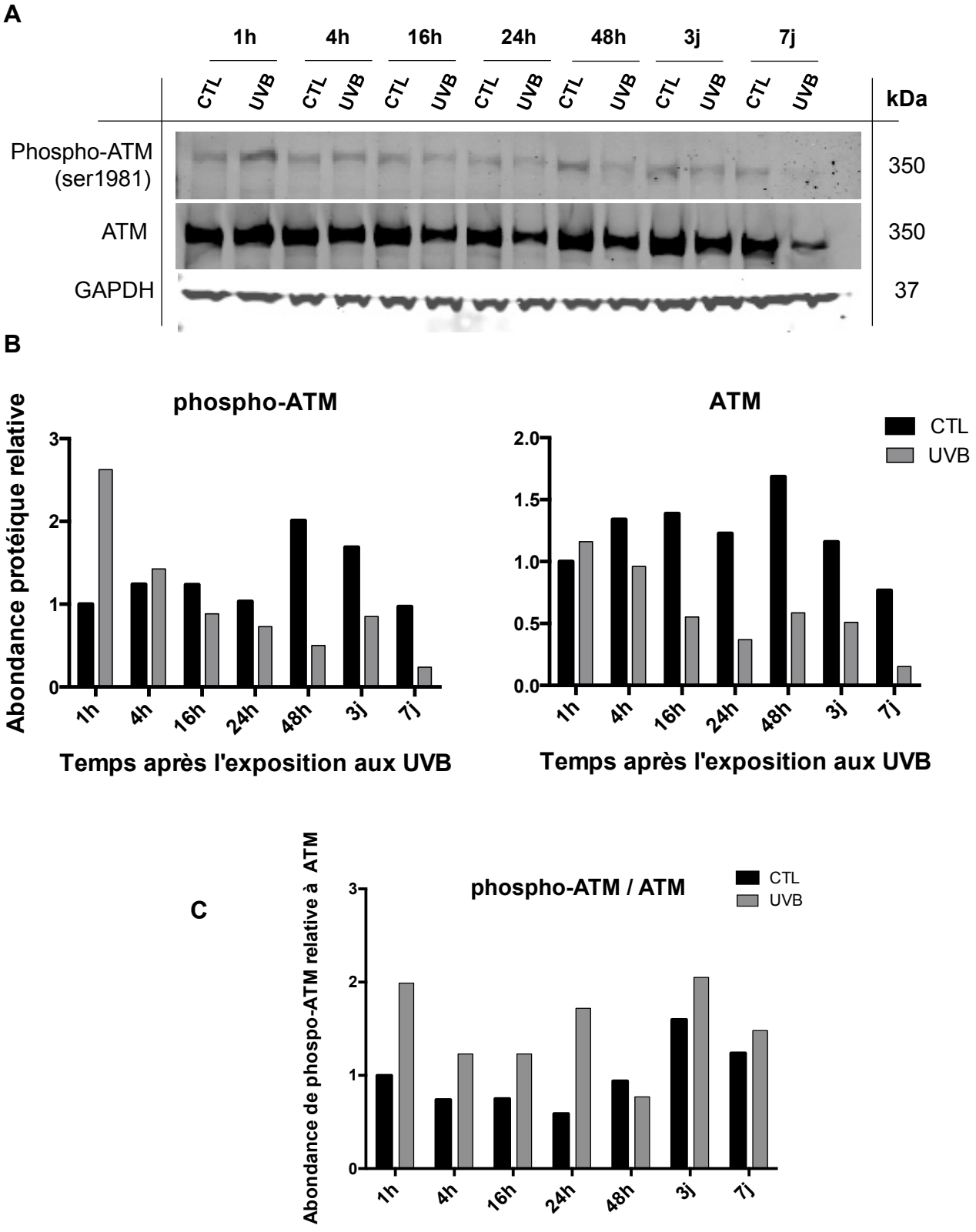


Figure 9: Etude de la forme phosphorylée et de la forme totale d' ATM en cinétique dans les NHKs en SIPS-UVB. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. L'abondance protéique est étudiée par western blot. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge. **B**: L'abondance relative d'ATM et de phospho-ATM est calculée par rapport à l'abondance de la GAPDH. **C:** L'abondance relative de la forme phosphorylée est également calculée par rapport à la forme totale (western blot représentatif n=2).

immunofluorescence avec un marquage des télomères par FISH (Fig. 7). Le résultat indique que les foci 53BP1 dans les conditions UVB à 3 jours et 7 jours après stress ne co-localisent pas avec les télomères. Les régions télomériques n'ont donc pas plus de cassures doubles brins que le reste de l'ADN à la suite des expositions répétées aux UVB.

Ces résultats indiquent que les dommages à l'ADN causés par les UVB sont persistants et il est donc probable que les cellules n'arrivent pas à les réparer complètement. Dans la littérature, la présence de dommages à l'ADN persistants est associée à l'activation de la voie de réparation DDR [Rodier, 2009]. Afin de déterminer si la DDR est activée dans le modèle de SIPS-UVB, nous avons analysé l'abondance des formes actives de trois de ces acteurs: ATM, CHK2 et p53 (Fig. 8). L'activation d'ATM se fait par phosphorylation (Ser1981). ATM actif phosphoryle, à son tour, CHK2 (Thr68) une kinase en aval qui peut alors phosphoryler et activer p53 (ser15) [Sulli, 2012 ; Tibbets, 1999].

Premièrement, l'abondance des formes phosphorylées d'ATM et de CHK2, a été étudiée par western blot à 3 et 7 jours après le dernier stress UVB (n=3) (Fig. 8A). A ces deux temps, l'abondance de la forme phosphorylée de ATM est semblable entre les NHKs exposés aux UVB et leurs contrôles respectifs. Par contre, il semble y avoir une augmentation de la forme phosphorylée de CHK2 aux jours 3 et 7 après le dernier stress, par rapport aux contrôles respectifs. Soulignons que des difficultés techniques ont été rencontrées pour observer les formes totales.

L'abondance de la forme phosphorylée de p53 a également été étudiée à ces temps, et rapportée à sa forme totale (Fig. 8B). Une augmentation de la forme phosphorylée (Ser15) de p53 est observée dans les NHKs exposés au UVB à 3 jours après le stress, par rapport au contrôle (Fig. 8B). Par contre, à 7 jours, il y a une diminution de l'abondance de la forme phosphorylée par rapport au contrôle. Il faut noter que le contrôle 7 jours présente une abondance importante de phospho-p53 par rapport au contrôle 3 jours.

L'abondance de phospho-ATM et d'ATM total a également été étudiée sur une cinétique à 1h, 4h, 16h, 24h, 48h, 3 jours et 7 jours après le stress (Fig. 9). Une augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée d'ATM est observée dans les conditions UVB à 1h et 4h après le stress, comparé au contrôle. De 48h à 7 jours, une augmentation de la forme phosphorylée est par contre observée dans les contrôles.

La forme totale d'ATM a également été étudiée. On observe une diminution de la forme totale d'ATM dès 4h dans les NHKS exposés aux UVB, par rapport aux contrôles respectifs. Dans les contrôles, l'abondance d'ATM reste assez stable. Il y a même une légère augmentation de l'abondance d'ATM au temps 48h comparé aux contrôles aux autres temps.

Si on compare maintenant l'abondance de la forme phosphorylée d'ATM sur l'abondance de sa forme totale, on détecte une augmentation de la forme phosphorylée dans les cellules exposées aux UVB de 1h à 24h après le dernier stress UVB. A 3 et 7 jours une augmentation de la proportion d'ATM phosphorylé est également observée, néanmoins la différence entre la condition contrôle et UVB est moins importante.

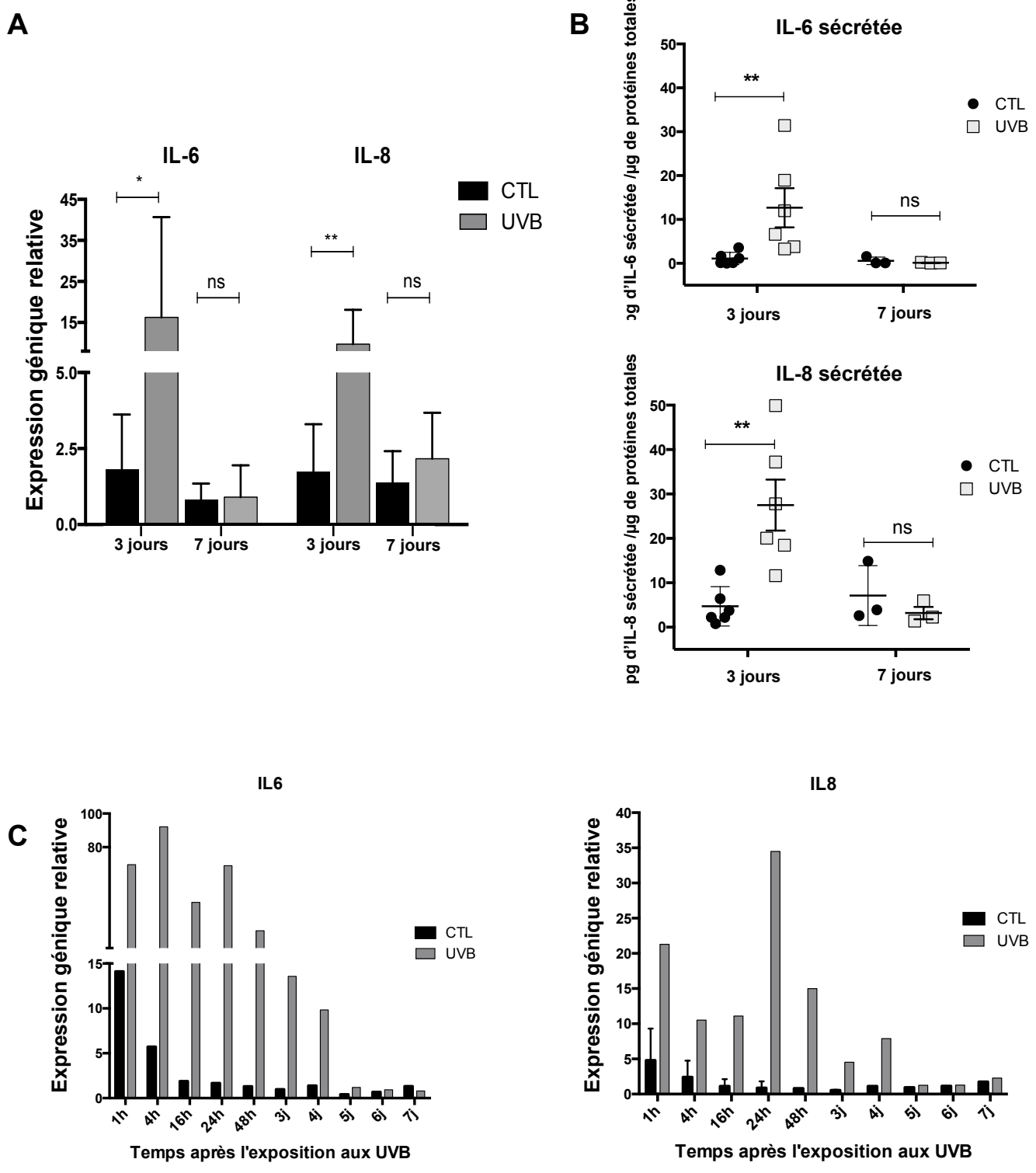


Figure 10: Etude d'IL-6 et IL-8 dans les NHKs en SIPS-UVB. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. **A**: Expression génique d'IL-6 et IL-8 à 3 et 7 jours après l'exposition aux UVB. L'ARN total à été extrait à 3 et 7 jours après le dernier stress puis rétrotranscrit en ADNc. Les résultats sont exprimés en taux d'expression par rapport au contrôle 3 jours (n=6). **B**: Abondance d'IL-6 et 8 sécrétées par les NHKs dans les milieux conditionnés récoltés à 3 et 7 jours (incubation de 72h) [Données d'Emilie Bauwens] . Analyse statistique: test de Student pairé (ns: p>0,05, *: p<0,05 **: p< 0,01). **C:** Cinétique de l'expression génique d'IL-6 et IL-8. L'ARN total à été extrait à 1h, 4h, 16h, 24h, 48h, et à 3, 4, 5, 6 et 7 jours après le dernier stress puis rétrotranscrit en ADNc. Les résultats sont exprimés en taux d'expression par rapport au contrôle t0 (moyenne, n=2).

II) Etude du sécrétome des NHKS en SIPS-UVB

Le SASP est une caractéristique majeure des cellules en sénescence. Bien que sa composition complète ne soit pas encore connue, il a été investigué dans de nombreuses études dans les fibroblastes. Par contre, le sécrétome des NHKs sénescents est nettement moins étudié. Dans notre étude, nous avons donc étudié l'expression de divers facteurs sécrétés identifiés comme facteurs du SASP des fibroblastes.

1) Etude de facteurs pro-inflammatoire du SASP dans les NHKs en SIPS-UVB

Premièrement, IL-6 et IL-8, deux cytokines inflammatoires majeures du SASP ont été étudiées.

L'expression génique a d'abord été étudiée à 3 et 7 jours après le dernier stress UVB (Fig. 10A). Les valeurs sont rapportées au contrôle à 3 jours. Les données viennent de 6 donneurs différents. Pour les deux cytokines, il y a une surexpression importante à 3 jours dans les NHKs exposés aux UVB par rapport aux contrôles. Cette surexpression est 15x plus importante pour *IL-6* et 10x plus importante pour *IL-8*. A 7 jours, il y a toujours une légère surexpression dans les NHKs exposés au UVB par rapport aux contrôles. Néanmoins, elle est non significative et cette expression est beaucoup moins importante que dans les NHKs exposés aux UVB à 3 jours après le stress.

Nous avons ensuite étudié l'expression protéique d'IL-6 et IL-8 dans les milieux conditionnés provenant de NHKs contrôles et exposés aux UVB à 3 et 7 jours après le dernier stress [Données d'Emilie Bauwens] (Fig. 10B). La quantité de protéines sécrétées est normalisée par rapport à la quantité de protéines totales récoltées au niveau du tapis cellulaire.
Dans le milieu conditionné provenant de cellules exposées aux UVB après 3 jours, il y a une augmentation significative d'IL-6 et d'IL-8, par rapport aux contrôles.
Par contre, dans le milieu conditionné récolté au jour 7, il n'y a plus de différence entre la condition UVB et la condition contrôle. De plus, le niveau de sécrétion revient au niveau basal du contrôle au jour 3. L'abondance d'IL-6 et d'IL-8 secrétées suit donc bien les résultats observés en expression génique, où on observe également cette diminution au jour 7.

Pour étudier plus précisément la dynamique dans l'expression de ces deux cytokines, leur expression génique a été étudiée à 1h, 4h, 16h et tous les jours jusqu'au jour 7 sur deux donneurs (Fig. 10C). Les résultats sont rapportés au contrôle t0, correspondant à l'état des cellules avant le premier stress UVB.

L'*IL-6* et *IL-8* sont surexprimées dans les conditions UVB jusque 4 jours après le dernier stress.
Au temps 1h, une surexpression de 69,6 x pour *IL-6* et de 21,2x pour *IL-8* est observée dans les NHKs exposés aux UVB comparés au t0. A 4h, l'expression dans les NHKs exposés aux UVB continue à augmenter pour *IL-6*, alors qu'elle diminue pour *IL-8*, comparés aux NHKs exposés aux UVB à 1h. A 1h et 4h, une surexpression par rapport au t0 est également observée dans les contrôles, pour *IL-6*, et *IL-8*. Elle est néanmoins beaucoup moins importante que dans les cellules exposées aux UVB et provient probablement des manipulations communes avec les NHKs exposés aux UVB. Elle revient toutefois à un niveau basal à partir de 16h.

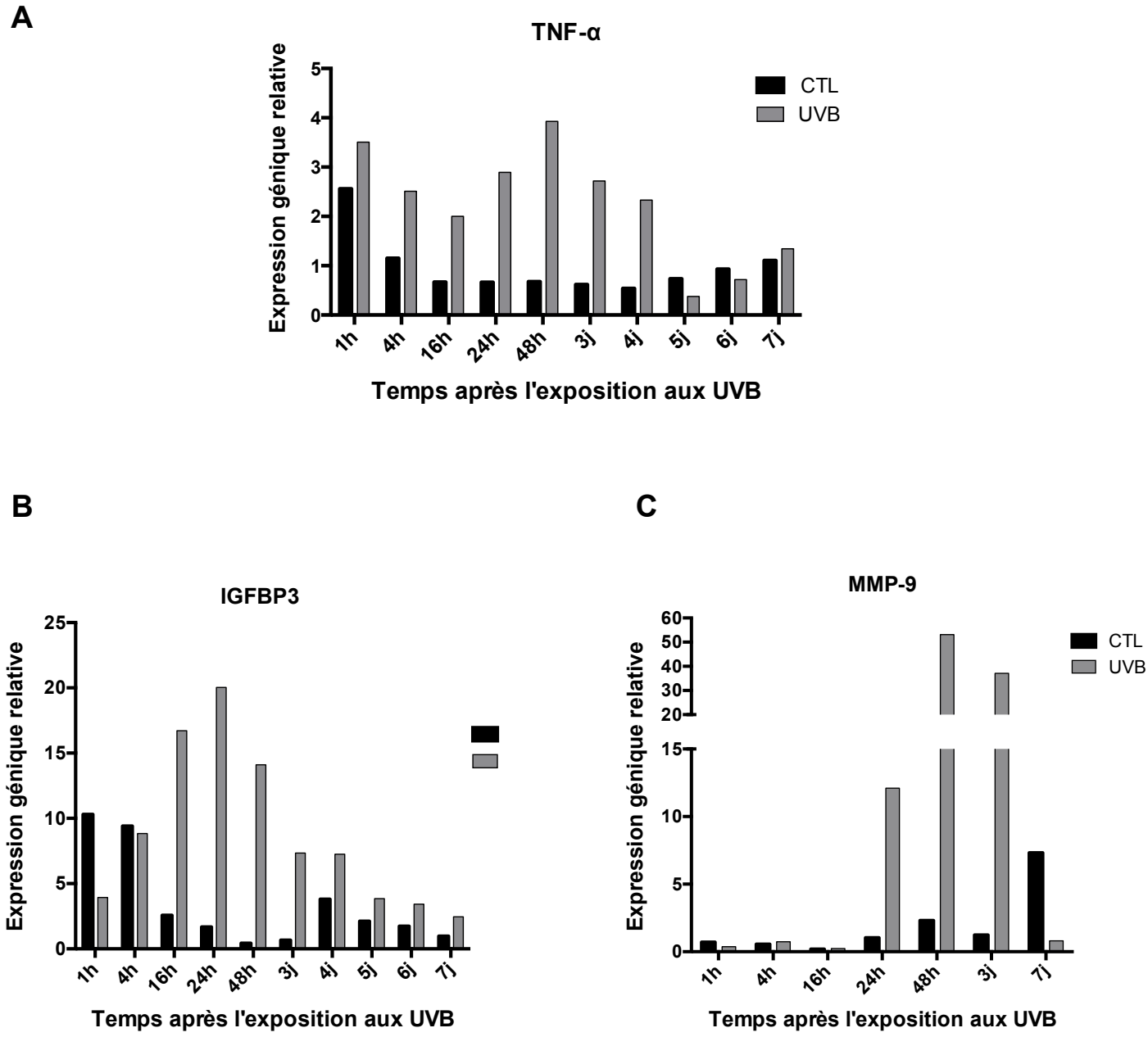


Figure 11: Etude de facteur du SASP des NHKs en SIPS-UVB. les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. Cinétique de l'expression génique de TNF-α, IGFBP3 et MMP-9. L'ARNtotal à été extrait à 1h, 4h, 16h, 24h, 48h, et à 3, (4, 5, 6) et 7 jours après le dernier stress puis retrotranscript en ADNc. Les résultats sont exprimés en taux d'expression par rapport au contrôle t0. **A**: Expression génique de TNF-α (n=1). **B**: Expression génique de IGFBP3 (n=1) et C: MMP-9 (n=1 pour 1h, 4h, 16h, 24h, 48h et n=2 pour 3j et 7j).

Il y a une diminution dans l'expression d'IL-6 dans les NHKs exposés aux UVB par rapport au temps 16h par rapport au temps 4h. Pour IL-8, l'expression dans ces deux conditions est similaire.
A 24h après le dernier stress, on observe une augmentation de l'expression des deux cytokines dans les NHKs exposés aux UVB, par rapport aux contrôles. Il semble donc y avoir un second pic d'expression atteignant 69x et 34x pour *IL-6* et *IL-8* respectivement, par rapport au contrôle t0. A partir de 5 jours, le niveau d'expression des deux cytokines diminue et est semblable au niveau observé dans les contrôles.

Nous nous sommes ensuite demandés si ce profil de sécrétion était propre à ces deux cytokines ou commun à d'autres facteurs sécrétés inflammatoires ou non.

La cinétique de l'expression d'un troisième facteur pro-inflammatoire, *TNF-α* (*Tumor Necrosis Factor*), a donc été étudiée (n=1) (Fig. 11A). Comme pour *IL-6* et *IL-8*, deux pics d'expression sont observés dans la cinétique UVB. Un premier à 1h dans les NHKs en SIPS-UVB, par rapport au t0, mais il est également observé dans les NHKs contrôles (2,5x et 3,5x respectivement par rapport au contrôle t0). Le second pic d'expression est observé dans les NHKs exposés aux UVB à partir de 24h après le dernier stress, mais pas dans les contrôles. Ce pic est plus tardif que celui d'*IL-6* et *IL-8*. Soulignons cependant que, comme observé pour les deux interleukines, les taux de surexpression restent élevés entre ces deux pics. A partir du jour 5, l'expression de *TNF-α* diminue drastiquement et revient au niveau basal du contrôle t0.

2) Etude de l'expression d'autres facteurs non inflammatoires associés au SASP

La cinétique de l'expression génique de deux autres facteurs non inflammatoires du SASP, *IGFBP-3* et *MMP-9,* a également été étudiée (Fig. 11B, 11C). IGFBP-3 (Insulin-like growth factor 3) est un facteur de croissance qui joue un rôle important dans la régulation de la prolifération des cellules normales et malignes. MMP-9 est une métalloprotéinase matricielle impliquée dans divers processus cellulaires tels que la cicatrisation, mais elle présente aussi des effets protumoraux.

L'expression de *IGFBP-3* augmente dans les NHKS exposés aux UVB jusque 7 jours après le dernier stress par rapport au t0. Au temps 1h dans les cellules exposées aux UVB, il y a une surexpression de 3,9x par rapport à l'expression du contrôle t0. Toutefois, nous observons également une augmentation de l'expression de *l'IGFBP-3* dans les contrôles à 1h et 4h, par rapport au contrôle t0. A partir de 16h, le niveau d'expression d'*IGFBP-3* diminue dans les contrôles, et on observe un pic d'expression à 24h dans les cellules exposées aux UVB de 20x. A partir de 48h, le niveau d'expression d'IGFBP-3 diminue dans les cellules exposées aux UVB, mais reste plus élevé que les contrôles respectifs jusque 7 jours.

L'expression de *MMP-9* augmente également dans les cellules exposées au UVB, mais cette fois plus tardivement, puisqu'une augmentation de l'expression est détectable de 24h à 3 jours, avec un pic à 48h (53,1x), par rapport aux contrôles respectifs.

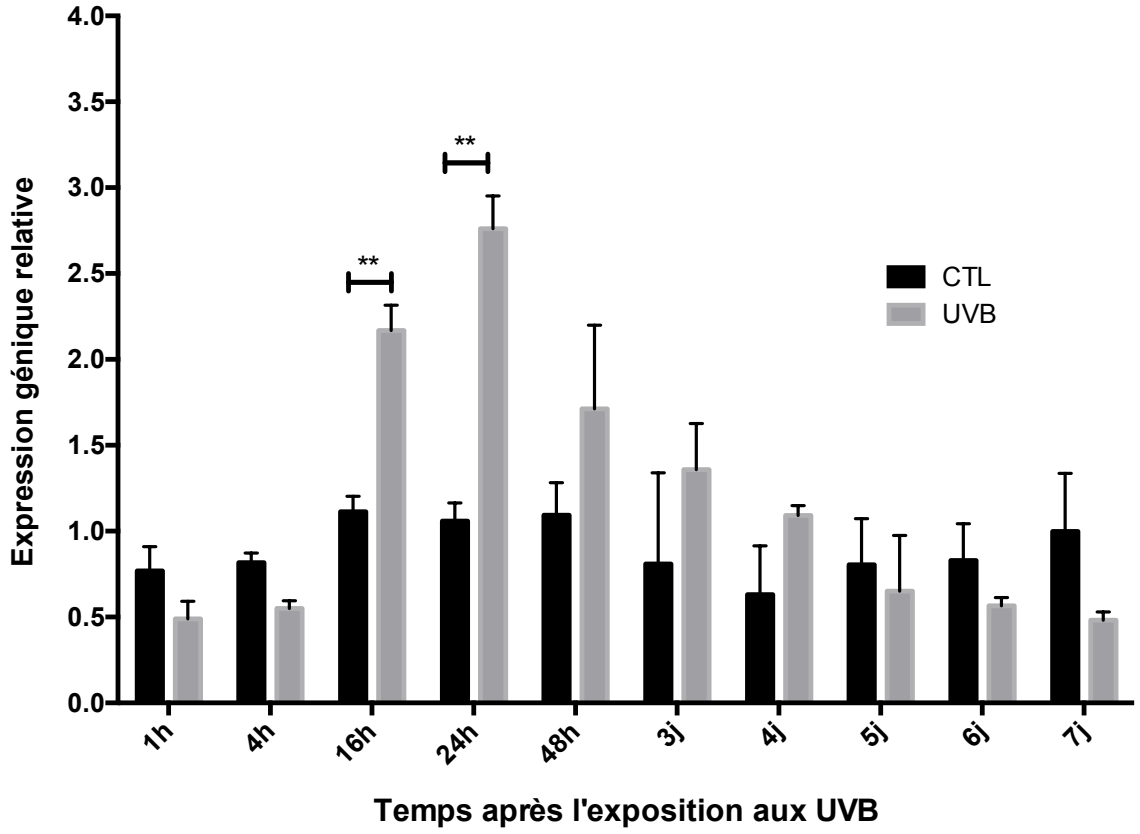


Figure 12: Etude de l'expression génique de STING dans les NHKs en SIPS-UVB. Les NHKs sont exposés (UVB) ou non (CTL) à 3 doses (675 mJ/cm^2) d'UVB à 3h d'intervalle. L'ARN total à été extrait à 1h, 4h, 16h, 24h, 48h, et à 3, 4, 5, 6 et 7 jours après le dernier stress puis rétrotranscrit en ADNc. Les résultats sont exprimés en taux d'expression par rapport au contrôle t0 (n=3). Analyse statistique: test de student pairé (**: $p< 0,01$).

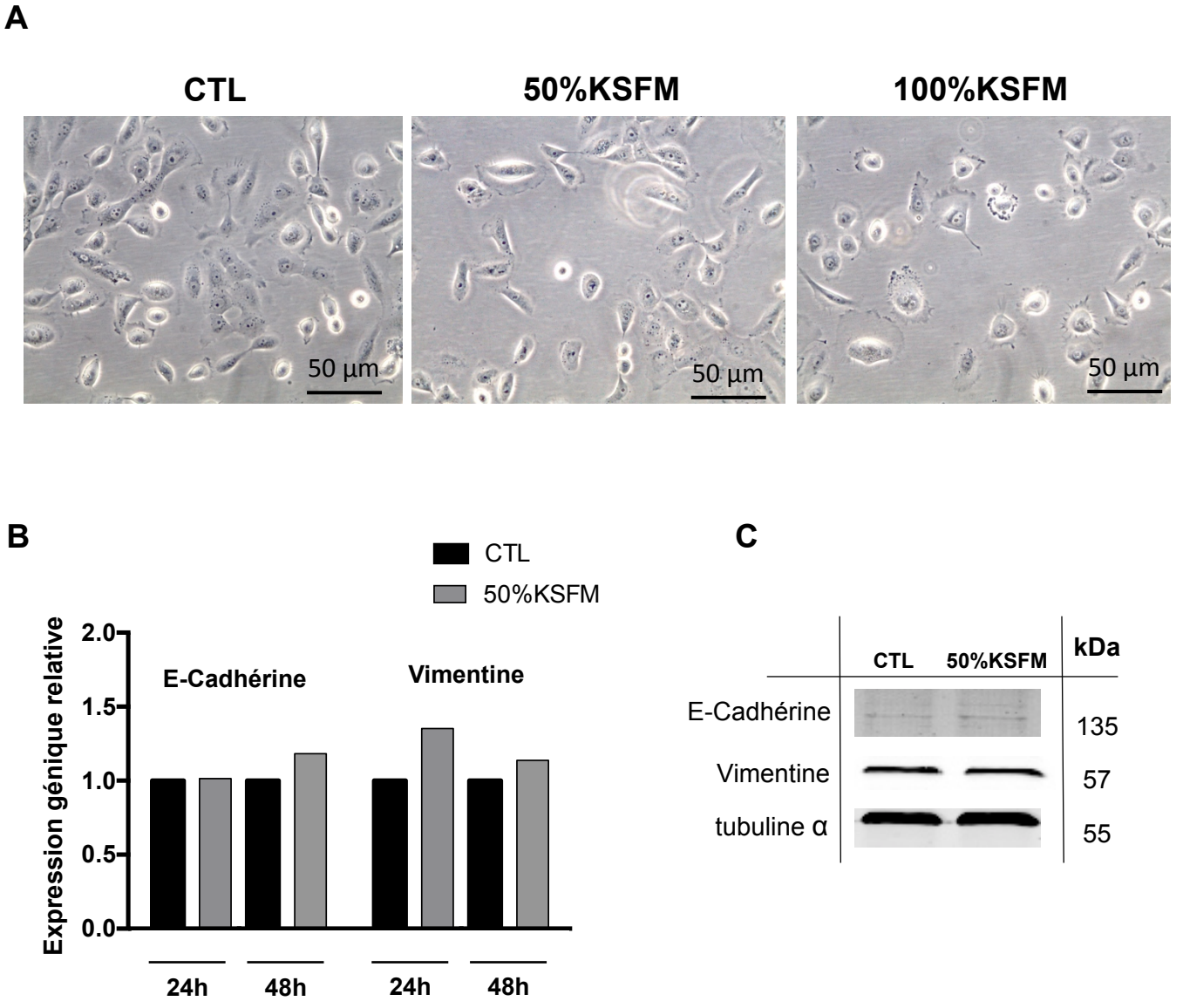


Figure 13: Etude de l'impact du KSFM sur la morphologie et l'EMT des MET1. Les MET1 sont incubées pendant 24h et 48h avec leur milieu de culture (milieu complet) (CTL), du KSFM (100%KSFM) ou un mélange 50/50 des deux (50%KSFM). **A**: La morphologie cellulaire est observée par microscope à contraste de phase après 24h d'incubation (Grossissement 200X – échelle = 50 µm). **B**: Expression génique de deux marqueurs pour l'étude de l'EMT, l'E-cadhérine et la vimentine. L'ARN total à été extrait après 24h et 48h d'incubation puis rétrotranscrit en ADNc. Les résultats sont exprimés en taux d'expression par rapport aux contrôles. **C**: Abondance protéique de l'E-cadhérine et la vimentine par western blot. Les extrait protéiques sont obtenus après 48h d'incubation. La tubuline α est utilisé comme contrôle de charge.

3) Etude de l'expression de STING

Les résultats précédant indiquent que le sécrétome des NHKs exposées aux UVB est dynamique. Nous nous sommes donc intéressés à la régulation de ce sécrétome.

La voie de signalisation cGas/STING a été rapportée comme étant activée en sénescence et impliquée dans la formation du SASP [Takahashi, 2018]. Nous avons donc étudié l'expression génique de *STING* à 1h, 4h, 16h, 24h et tous les jours jusque 7 jours après le dernier stress UVB (Fig. 12).
Les résultats montrent une légère sous expression de *STING* dans les cellules exposées aux UVB à 1h et 4h après le stress, par rapport aux contrôles respectifs. A partir de 16h après le dernier stress, on observe une surexpression de *STING*, par rapport aux contrôles respectifs, atteignant un maximum à 24h (2,8x par rapport au contrôle). Ensuite l'expression de *STING* diminue jusqu'à atteindre un niveau basal au jour 5 après le stress, par rapport au contrôle t0. Aux jours 6 et 7, il y a une sous-expression de *STING* par rapport au contrôle t0 et aux contrôles respectifs.

III) Etude de l'impact du sécrétome des NHKs sur la migration de SCCs

1) Mise au point des conditions de changement de milieu

Dans le but d'étudier l'impact du sécrétome des NHKs en SIPS-UVB sur la migration des cellules cancéreuses, l'effet des milieux conditionnés (MC) est testé sur deux lignées cancéreuses isolées de SCCs (squamous cell carcinoma) agressifs, les A431 et les MET1 (voir matériel et méthode). Les milieux de culture des NHKs incubés pendant 72h seront récoltés à 3 et 7 jours.

Or, les NHKs et les lignées cancéreuses étudiées ont un milieu de culture différent. L'impact du milieu des NHKs doit donc d'abord être testé sur les cellules cancéreuses, dans le but de déterminer si celui-ci n'a pas à lui seul un impact sur les lignées étudiées, principalement au niveau de la morphologie et de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

Les tests de milieux sur les cellules A431 ont déjà été réalisés, et un mélange 50% MC – 50% DMEM high glucose (milieu de culture des A431) a été choisi [données de Emilie Bauwens].

Les MET1 sont cultivées dans un milieu particulier, que nous appellerons milieu complet (voir matériel et méthode). Les kératinocytes étant cultivés dans du milieu KSFM, nous allons étudier l'impact de celui-ci sur les MET1. Les cellules MET1 ont donc été incubées pendant 24h avec 100% KSFM, un mélange 50/50 de KSFM et de milieu complet (50% KSFM) ou 100% de milieu complet comme contrôle (CTL).

Après 24h, la morphologie cellulaire est analysée (Fig. 13A). Les cellules incubées avec le mélange 50% KSFM ne présentent pas de différence de morphologie notable par rapport aux contrôles. Par contre, les cellules incubées dans 100%KSFM présentaient des bords irréguliers.

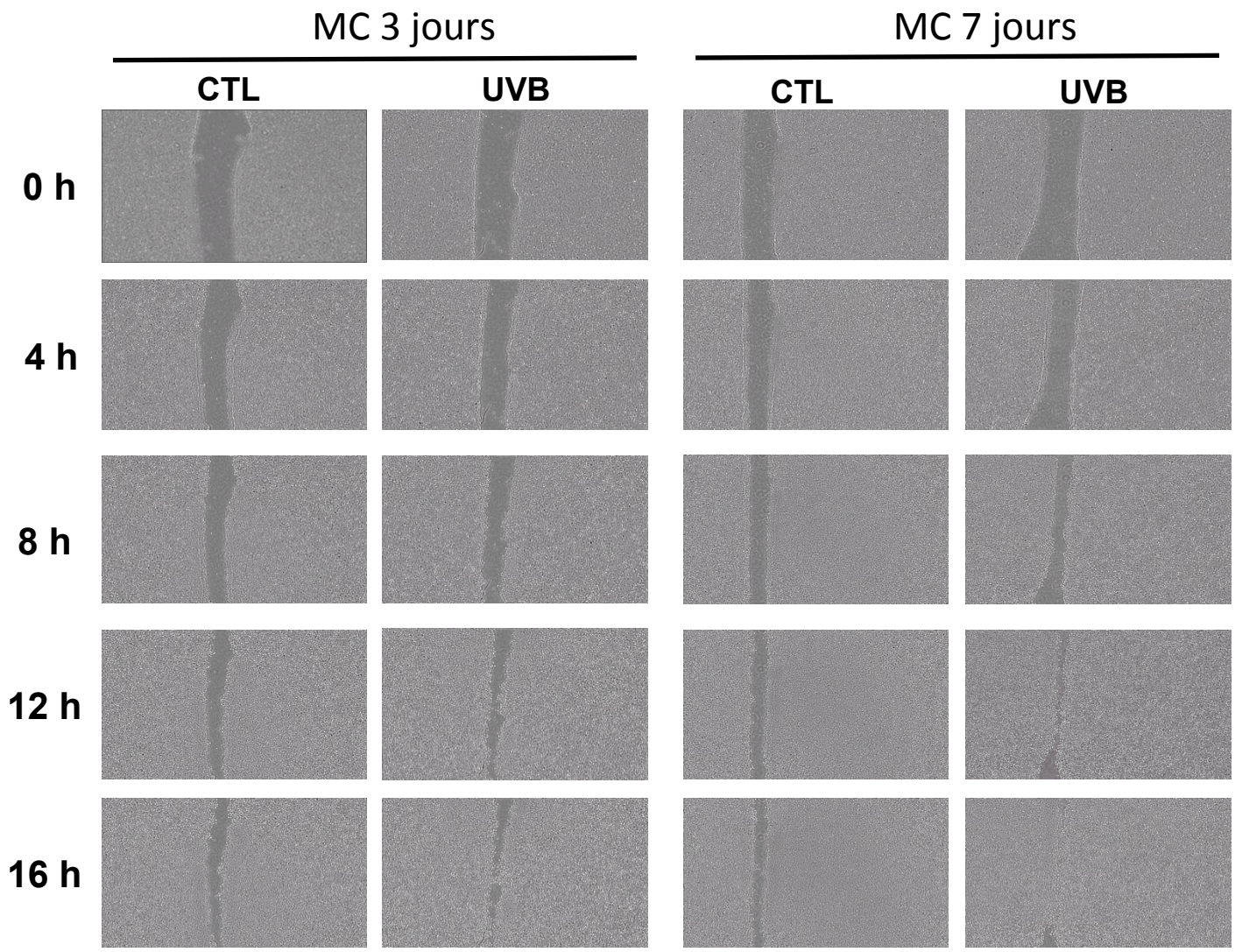


Figure 14: Etude de l'impact du milieu conditionné des NHKs en SIPS-UVB sur les A431 par scratch assay. Les cellules sont repiquées la veille du scratch assay pour atteindre une confluence de 100%. La prolifération est arrêtée par une incubation de 3h avec de la mitomycine C. Une cicatrice est ensuite réalisée au centre du tapis cellulaire. Les cellules sont incubées avec un mélange 50/50 de DHG/ MC UVB 3 ou 7 jours, ou de DHG/ MC CTL 3 ou 7 jours. (n=3).

L'impact du mélange 50% KSFM a ensuite été testé sur deux marqueurs de l'EMT, la vimentine et l'E-cadhérine (Fig. 13B). Le premier est un marqueur mésenchymal et le second est un marqueur épithélial. Après 24h et 48h d'incubation, nous n'observons pas de changement de l'expression génique de *l'E-cadherin* entre les 2 milieux, aussi bien après 24h que 48h d'incubation, ceci est confirmé au niveau protéique (Fig. 13C). En ce qui concerne la vimentine, nous observons une légère augmentation de son expression génique dans les cellules exposées aux UVB à 24h et à 48h (Fig. 13B), mais nous n'observons aucune modification de son expression protéique (Fig. 13C).

Le mélange 50% KSFM n'ayant qu'un effet limité sur l'EMT des MET1 (et des A431), cette proportion a été sélectionnée et utilisée pour l'étude de l'impact des MC sur ces lignées cancéreuses.

2) Etude de l'effet du milieu conditionné sur la migration et l'EMT de cellules cancéreuses

L'effet des MC sur la migration des A431 et des MET1 a été étudié par scratch assay. Dans cette technique, les cellules cancéreuses sont repiquées pour être à 100 % de confluence et leur prolifération est arrêtée par la mitomycine C. Une «cicatrice » ou « scratch » est faite au milieu du tapis confluant et les cellules sont ensuite incubées avec les milieux conditionnés. La fermeture du scratch, ne dépendant alors que de la migration est suivie au cours du temps à l'aide de microscopes de type cytonote.

a) Effet sur les A431

Les cellules A431 sont incubées avec du milieu conditionné de NHKs en SIPS-UVB récolté à 3 et 7 jours (MC UVB 3 ou 7 jours). L'effet de ces milieux est comparé celui des NHKs contrôles (MC CTL 3 ou 7 jours) (n=3).

Aucun effet du MC UVB 3 jours n'a pu être mis en évidence sur la migration des A431, en comparaison au MC CTL 3 jours (Fig. 14). Par contre, les cellules incubées avec le MC UVB 7 jours montrent une migration plus importante que les cellules incubées avec le milieu conditionné CTL 7 jours. En effet, le scratch se referme plus rapidement dans les cellules mises en contact de ce MC, avec fermeture presque complète du scratch à 16h. Ces résultats ont été répétés sur des NHKs isolés de 3 donneurs différents et ont donné des résultats comparables.

Ces résultats indiquent que le sécrétome des NHKs en SIPS-UVB à un timing plus long (7 jours) a un effet pro-migratoire sur les cellules A431. Il semble de plus que cet effet n'est pas en lien avec la sécrétion des IL-6 et -8, souvent indiquées comme potentiellement responsables de tels effets [Coppé, 2008].

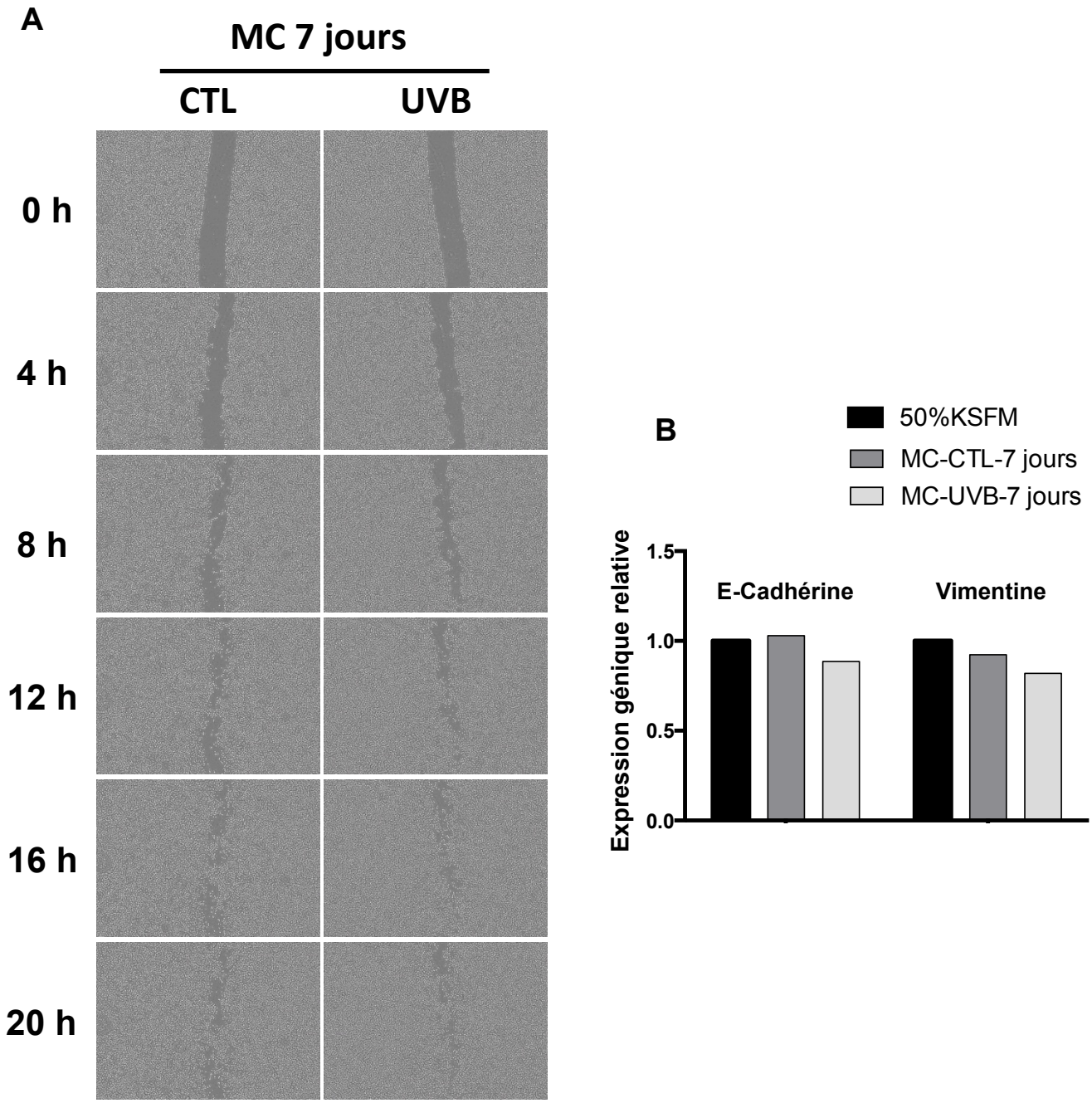


Figure 15: Etude de l'impact du milieu conditionné des NHKs en SIPSUVB- 7 jours sur les MET1. Les cellules sont incubées avec un mélange 50/50 de milieu complet/ MC UVB 7 jours, ou MC CTL 7 jours. **A.** Les cellules sont repiquées la veille du scratch assay pour atteindre une confluence de 100%. La prolifération est arrêtée par une incubation de 3h avec de la mitomycine C. Une cicatrice est ensuite réalisée au centre du tapis cellulaire. Les cellules sont incubées avec un mélange 50/50 de milieu complet/MC (n=4).

B: : Expression génique de deux marqueurs de l'EMT, l'E-cadhérine et la vimentine. L'ARN total à été extrait après 24h d'incubation puis retrotranscript en ADNc. Les résultats sont exprimés en taux d'expression par rapport au cellules incubées avec le mélange 50/50 milieu complet/KSFM.

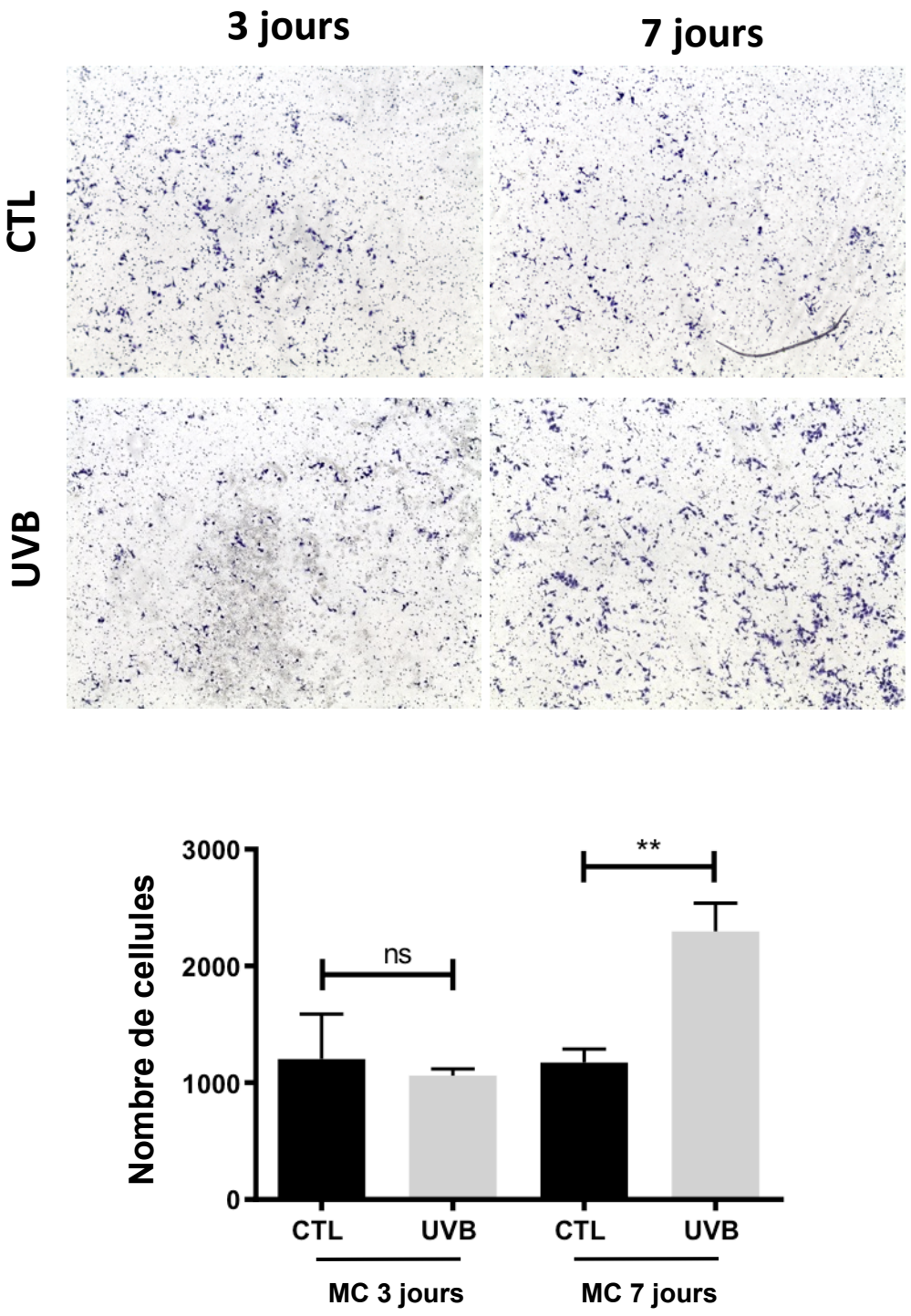


Figure 16: Etude de l'impact du milieu conditionné des NHKs en SIPS-UVB sur les A431 par chambre de Boyden. Les cellules sont incubées avec un mélange 50/50 de DHG/ MC UVB 3 ou 7 jours, ou de DHG/ MC CTL 3 ou 7 jours. Le nombre de cellules ayant migré dans la partie inférieure de l'insert sont comptées (n=3). test de Student pairé (ns: $p>0,05$, ;**: $p< 0,01$)(Manipulations réalisées par Emilie Bauwens).

b) Effet sur les MET1

L'effet des MC UVB 7 jours de NHKs provenant de 4 donneurs différents sur la migration des MET1 a également été étudié par scratch assay.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence de migration entre les MET1 incubées avec le MC CTL et UVB à 7 jours (Fig. 15A). De plus, aucune modification significative de l'expression génique de l'E-cadherine et de la vimentine dans les cellules MET1 n'a été mise en évidence dans ces conditions (Fig. 15B).

Ces résultats suggèrent que le sécrétome des NHKs en SIPS-UVB à 7 jours post-stress UVB n'a pas d'effet sur le comportement migratoire des MET1, ni sur les marqueurs de l'EMT.

3) Etude de la migration des cellules A431 avec les chambres de Boyden

Pour confirmer l'effet des MC UVB 7 jours sur les cellules A431, la migration de celles-ci a été étudiée en utilisant des chambres de Boyden (Fig. 16) [Données d'Emilie Bauwens]. Les chambres de Boyden sont également utilisées ici pour mesurer la migration des cellules. Ce sont des inserts contenant une membrane perforée de pores et placés dans un puits.
Les cellules dont on veut observer la migration sont ensemencées sur le dessus de l'insert, dans leur milieu. Le milieu dont on veut étudier l'effet chémoattractant est placé dans le puits. Les cellules attirées par des facteurs du milieu traversent alors les pores de la membrane et se retrouvent dans la partie inférieure de l'insert, où un marquage et un comptage cellulaire peuvent ensuite être effectués.

Le résultat obtenu confirme les résultats de scratch assay. En effet, il n'y a pas de différence observée dans le nombre de cellules A431 qui migrent à travers la membrane dans les conditions d'incubation avec le MC des NHKs contrôles ou exposés aux UVB à 3 jours. Par contre, il y a une augmentation de la migration des cellules incubées avec le MC UVB 7 jours, par rapport à leurs contrôles respectifs (n=3).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La sénescence est un état dynamique dont les caractéristiques varient en fonction du type cellulaire, du stimulus pro-sénescent [Coppé, 2008 ; Kim, 2015], mais aussi du temps. En effet, des données montrent que le SASP est modulé au court du temps [Demaria, 2014; Hoare, 2016].

Dans ce travail, nous avons étudié la sénescence prématurée et le SASP des kératinocytes (NHKs). Un modèle de SIPS-UVB sur NHKs a été établi dans notre équipe (données non publiées E. Bauwens). Les NHKs sont exposés à 3 doses subcytotoxiques d'UVB et les biomarqueurs de la sénescence sont étudiés 72h après la dernière exposition aux UVB.

Le SASP pouvant mettre plusieurs jours à se développer [Coppé, 2008] et au vu des études récentes montrant cette modulation du SASP au court du temps, nous avons décidé d'étudier si les biomarqueurs de sénescence dont le SASP étaient maintenus à plus long terme, jusque 7 jours après le dernier stress. Nous discuterons donc dans un premier temps de la présence des biomarqueurs à long terme, puis, des modifications observées au niveau du SASP et de l'impact de ce dernier sur les lignées cancéreuses.

I) Etude des biomarqueurs de la sénescence jusqu'au jour 7

1) Morphologie et activité SA-βgal

Les changements de morphologie associés à la sénescence sont observés jusqu'à au moins 7 jours après le dernier stress. Au jour 7, les cellules sénescentes sont même plus larges qu'au jour 3 de la SIPS-UVB, et donc plus proches de ce qui est observé en senescence réplicative.
De plus, la proportion de cellules positives à la SA-βgal reste toujours plus élevée dans les cellules exposées aux UVB que dans les contrôles. Le pourcentage de cellules SA-βgal positives reste constant entre les deux timings, ce qui indique que, de façon surprenante, les cellules sénescentes ne sont pas diluées dans les cellules qui présentent toujours un potentiel prolifératif.
Il faut cependant noter qu'il y a également une petite augmentation des cellules positives à la SA-βgal dans les contrôles avec le temps. Cela est certainement dû à une proportion des NHKs entrant en sénescence réplicative. En effet, la sénescence réplicative des kératinocytes arrive souvent rapidement avec un plateau de sénescence vers les 10-15 passages, suivant le donneur [Nassour, 2016]. De plus, contrairement à ce qui est observé lors de la culture des fibroblastes, ou la proportion de cellules SA-βgal positives augmente tardivement mais exponentiellement, les cultures de NHKs accumulent progressivement ces cellules au fur et à mesure des passages, jusqu'à atteindre un plateau avec plus de 90 % de cellules positives (données non publiée E. Bauwens).

2) Arrêt du cycle cellulaire

Un autre biomarqueur de la sénescence qui a été investigué est l'arrêt du cycle cellulaire. Premièrement, le marqueur de prolifération Ki-67 a donc été étudié. Ce marqueur indique que, dans les NHKs exposés aux UVB, la proportion de cellules en prolifération est réduite à

3 jours par rapport aux contrôles, et cette différence est maintenue au moins jusqu'au jour 7 après le dernier stress. De plus, le nombre de cellules négatives pour le marquage de Ki-67 reste constant, renforçant l'hypothèse que la population sénescente n'est pas diluée dans la population cellulaire jusqu'à 7 jours.

Nous avons également étudié des acteurs de l'arrêt du cycle cellulaire, à savoir, la voie p53/p21 et la voie p16/RB au niveau de l'expression génique et de l'abondance protéique.
Premièrement, *p21* est surexprimé dans les cellules exposées aux UVB de 1h jusqu'au jour 7, par rapport aux contrôles respectifs. Son abondance protéique semble également plus élevée dans les conditions exposées au UVB, au jour 3 et 7 après le dernier stress, par rapport aux contrôles respectifs. Ceci doit être confirmé par des réplicats biologiques supplémentaires.
Au niveau des conditions contrôles, l'expression de *p21* reste relativement stable, au moins jusqu'au jour 7. Une surexpression de *p21* au jour 3 par rapport au t0 est néanmoins parfois observée. Cela pourrait être du au fait qu'au jour 3, les NHKs contrôles peuvent présenter une confluence proche de 90-100% et pourraient donc entrer en phase de quiescence associée avec une augmentation de p21 [Kolly, 2005].

Deuxièmement, le facteur de transcription p53 est connu pour induire l'expression de p21. Comme le montre des données précédentes (données non publiée d'Emilie Bauwens-mémoire de Sébastien Hellin), dans le modèle de SIPS-UVB, l'abondance protéique de p53 est plus élevée dans les premières heures jusqu'à 24h/48h mais plus ou très peu à 72h après le dernier stress, par rapport aux contrôles respectifs. Dans ce mémoire, nous n'avons pas non plus observé d'augmentation de l'abondance de p53 au jour 3 et 7 de la SIPS-UVB. Néanmoins, il est également rapporté que p53 est nécessaire pour la SIPS-UVB de kératinocytes immortalisés [Lewis et al, 2008].

L'expression de *p21* pourrait donc être induite par p53 dans un premier temps. Par contre, le maintien de l'expression de *p21* à partir de 3 jours et à des temps plus élevé semble indépendant de p53. Des études rapportent que *p21* peut être surexprimé indépendamment de p53 dans des kératinocytes en OIS-Ras [Takaoka, 2004 ; Kim, 2015]. De plus, Cipriano et al [2011] ont montré dans des cellules épithéliales mammaires en OIS-Ras, un arrêt du cycle cellulaire p21-dépendant induit par la voie de signalisation du TGF-β et non de p53. L'importance de la voie TGF-β est également rapportée comme étant importante en SIPS-UVB des fibroblastes [Debacq-Chainiaux, 2005]
Il serait donc intéressant d'investiguer la voie de signalisation TGF-β dans notre modèle de kératinocytes en SIPS-UVB. L'expression du TGB-β1 a été regardée de manière préliminaire [données non présentées] mais aucune différence n'a été observée entre les contrôles et les NHKs exposés aux UVB. Néanmoins, d'autres ligands que TGB-β1 peuvent induire la voie de signalisation du TGF-β (discuté plus loin) [Kuilman, 2009].

La CDKI p16 a également été étudiée. Une étude montre que des kératinocytes immortalisés (NhTERT) exprimant la télomérase et dans lesquels p16 est inactivé [Dickson, 2000] n'entrent pas en sénescence quand ils sont exposés à des doses d'UVB induisant la sénescence dans des NHKs [Bertrand-Vallery, 2010]. Ils semblent par contre entrer en différenciation alternative [Bertrand-Vallery, 2010]. Cela suggère que p16 pourrait être important dans l'UVB-SIPS des kératinocytes normaux.

Dans notre modèle d'UVB-SIPS on peut remarquer qu'aux jours 3 et 4, mais pas aux temps plus précoces, il y a une surexpression de *p16* dans les NHKs exposés aux UVB. Une

augmentation de l'abondance protéique de p16 est également observée aux jours 3 et 7 par rapport aux contrôles.
On remarque également une augmentation de p16 dans le contrôle 7 jour par rapport au contrôle 3 jours, tant au niveau de l'expression génique que de l'abondance protéique. Cela pourrait être du à l'entrée d'une partie des NHKs contrôles en sénescence réplicative. En effet, p16 est associé à la sénescence réplicative des kératinocytes [Nassour, 2016]. Ceci est à mettre en lien avec l'augmentation de la proportion de cellules positives à la SA-βgal observées au jour 7 par rapport au jour 3. Il est donc possible qu'une petite proportion des kératinocytes dans la condition UVB 7 jour soit entrée en sénescence de manière indépendante du stress UVB.

Finalement, la phosphorylation de RB, a aussi été étudiée. Pour rappel, la phosphorylation de RB par les CDKs peut être inhibée par p16 et p21. Une hypophosphorylation de RB est observée au jour 3 et 7 après le dernier stress UVB, par rapport aux contrôles.

L'étude de p16 montre une augmentation de celui-ci dans les cellules en SIPS-UVB, mais seulement à partir du jour 3. Celle-ci est donc plus tardive que l'augmentation de p53 et p21. Il est rapporté que des fibroblastes en SIPS-IR (ionizing radiation) présentent une augmentation de p53 dès les premières heures après le stress alors que l'augmentation de p16 est observée après plusieurs jours [Suzuki et Boothman, 2008].
La diminution de p53 et l'augmentation de p16, dans les NHKs exposés aux UVB, coïncident vers le jour 3. Il est possible que le premier soit important pour l'induction de la SIPS, et le second pour son maintien. Il est en effet rapporté que p53 est nécessaire à l'entrée en sénescence dans un modèle de SIPS-UVB [Lewis, 2008], mais plusieurs études montrent que p16 peut maintenir l'arrêt du cycle indépendamment de p53 [Beauséjour, 2003 ; Kim et al, 2015, Alcorta, 1996]. De plus, comme dit précédemment, p16 pourrait être important pour l'UVB-SIPS des kératinocytes [Bertrand-Vallery, 2009].

Il serait donc intéressant d'investiguer la dynamique de p53, p21 et p16 dans notre modèle d'UVB-SIPS. Cela pourrait par exemple se faire en les inhibant et en observant l'apparition et le maintien des biomarqueurs de la sénescence dans les NHKs exposés aux UVB. L'inhibition de p16, p21 et p53 peut se faire en introduisant des vecteurs rétroviraux contenant des shRNA [Kim et al, 2015].

3) Dommages à l'ADN et activation de la DDR

Les dommages à l'ADN et la DDR ont également été investigués. En effet, la sénescence est associée à des dommages à l'ADN que la cellule ne parvient pas à réparer. La DDR est activée quand des dommages persistants à l'ADN sont détectés [Rodier, 2009 ; Campisi, 2013].

Dans le modèle de SIPS-UVB, les CPDs, des dommages particuliers induits pas les UV, sont observables, et donc persistants, jusqu'au jour 7.

Les cassures doubles brins ont également été observées par l'intermédiaire d'un marquage de 53BP1. Ce médiateur de la DDR est recruté aux cassures doubles brins, formant des SDFs (Senescence associated DNA damage foci) visibles en immunofluorescence. Une augmentation importante de la proportion de cellules avec plus de 4 foci est observée dans les

NHKs exposés aux UVB, par rapport aux contrôles. Cette augmentation est observée au jour 3 et 7, même si le nombre de noyaux marqués est moins important après 7 jours.
Ces résultats suggèrent donc que les NHKs en SIPS-UVB ne parviennent pas à réparer tous les dommages à l'ADN générés par l'exposition répétée aux UVB.

Nous avons également investigué si 53BP1 est recruté de façon préférentielle au niveau des régions télomériques. En effet, les télomères sont particulièrement sensibles à l'accumulation de dommages car ils sont moins efficacement réparés d'une part [Petersen, 1998], et d'autre part parce qu'ils contiennent une proportion élevée de guanines, plus sensibles que les autres bases aux stress oxydatifs. Des dommages importants aux télomères, ainsi que leur décoiffage (perte des protéines de structure aux boucles t) son observés en SIPS-IR [Serakinci, 2007]. De plus, la protéine 53BP1 peut être recrutée aux télomères dysfonctionnels [Rossiello, 2017].
Dans notre modèle d'UVB-SIPS, le marquage de 53BP1 par immunofluorescence et celui des télomères par FISH ne semblent pas co-localiser. Cela indique donc que 53BP1 n'est pas spécifiquement recruté au niveau des télomères et que les dommages induits par les UVB ne se trouvent pas spécialement au niveau de ces régions. Une observation similaire a été faite en SIPS-IR [Takai, 2003].

Les dommages à l'ADN étant persistants jusqu'au jour 7 après le stress, nous avons voulu étudier l'activation de la DDR jusqu'à ce temps.
Des données sur fibroblastes indiquent que la DDR est persistante tout au long de la sénescence [Fumagalli, 2014], alors que d'autres suggèrent qu'elle serait nécessaire uniquement à l'entrée en sénescence mais qu'elle diminuerait par la suite [Falcone et al, 2013 ; Chen et Ozanne, 2006].
De plus, rappelons que la sénescence réplicative des kératinocytes n'est pas associée à la DDR [Nassour, 2016].
Des donnés précédentes (mémoire de Lysianne Ernst, 2017) rapportait que l'abondance de phospho-ATM augmente dans les NHKs exposés aux UVB jusqu'à 24h après le stress, et celle de phospho-CHK2 jusqu'au moins 3 jours. La phosphorylation de p53 sur la sérine 15 fut également observée jusque 3 jours.

Lorsque nous avons étudié la SIPS en cinétique (jusque 7 jours) nous avons observé que la quantité de forme phosphorylée de ATM augmente et ce jusqu'à 4h dans les NHKs exposés aux UVB, par rapport aux contrôles. Ces données suggèrent que ATM est au moins activé à des temps courts. La proportion d'ATM phosphorylé par rapport à la forme totale est toujours plus élevée dans les conditions UVB jusque 24h. Néanmoins, une diminution d'ATM est observée dans les NHKs exposés aux UVB à presque tous les temps étudiés (au delà de 1h), par rapport au contrôle respectif. Une diminution d'ATM dans les NHKs exposés aux UVB avait déjà été observée précédemment (données non publiées d'Emilie Bauwens).

Toutefois, plusieurs études investiguant l'abondance de la forme phosphorylée d'ATM par western blot ne la compare pas à sa forme totale [Song, 2010 ; Kavanaugh, 2011 ; Akasaka, 2014].
Certaines études investiguant la DDR en sénescence sur des temps longs semblent préférer observer le recrutement de phospho-ATM aux foci de dommages en immunofluorescence plutôt que son abondance en western blot [Fumagalli et al, 2014 ; Di Micco, 2006]. D'autres encore étudient les acteurs en aval de ATM mais pas directement celui-ci [Falcone, 2013 ; Chen et Ozanne, 2006 ; Rodier, 2009].

Une étude montre une forme totale d'ATM diminuant après le stress, mais avec une forme phosphorylée toujours plus élevée que dans les contrôles [Fletcher, 2017]. Aucune donnée de la littérature ne rapporte donc le constat que nous observons, ne nous permettant d'expliquer cette observation. Il est possible que l'activation persistante d'ATM cause une dégradation de celui-ci. Cela pourrait éventuellement entrainer des dysfonctions de la DDR.

Les acteurs en aval d'ATM, à savoir, CHK2 et p53 phosphorylé ou total ont également été étudiés. Des difficultés ont été rencontrées pour observer la forme totale de CHK2. Une augmentation de la forme phosphorylée de CHK2 est observée dans les conditions UVB au jour 3 et maintenue jusqu'au jour 7 après le dernier stress. Une augmentation de phospho-p53 est nettement observée au jour 3 après le dernier stress par rapport au contrôle. Par contre, au jour 7, il y a une diminution de l'abondance de phospho-p53 par rapport au contrôle, mais cela semble principalement dû à une augmentation importante dans ce dernier. Si l'on compare au contrôle 3 jours, il y a toujours une augmentation. Enfin, comme dit précédemment, il y a une persistance des foci de 53BP1 jusqu'au jour 7 après le stress.
Bien qu'une étude plus complète du maintien de la DDR dans le modèle de SIPS-UVB soit nécessaire, ces résultats préliminaires pourraient indiquer que la DDR est maintenue jusqu'au jour 7 dans les cellules exposés aux UVB.

II) Etude du SASP et de sa régulation dans les NHKs en SIPS-UVB

1) Etudes de facteurs du SASP dans les NHKs en SIPS-UVB et discussion de leur implication dans la sénescence

Le SASP est une des caractéristiques majeures des cellules sénescentes. Dans le but d'investiguer le SASP des NHKs en SIPS-UVB, divers facteurs associés au SASP ont été étudiés. Ces facteurs sont IL-6, IL-8, TNF-α, IGFBP-3 et MMP-9.

IL-6 et IL-8 sont décrites comme étant deux cytokines majeures du SASP des fibroblastes en SR ou en SIPS [Coppé, 2008]. De plus, une augmentation d'expression de ces deux cytokines est observée dans les NHKs en SR [donnée non publiée d'Emilie Bauwens-mémoire de Sébastien Hellin].
TNF-α, une troisième cytokine inflammatoire, est rapportée comme étant un facteur important du SASP associé plus particulièrement aux dysfonctions mitochondriales [Wiley, 2016].

IGFBP-3 est un partenaire de la signalisation de l'IGF (Insulin like growth factor) et a un effet anti-prolifératif. Une sécrétion accrue d'IGFBP-3 par les fibroblastes en sénescence réplicative est connue depuis longtemps [Goldstein, 1991]. Une surexpression de l'IGFBP-3 est également rapportée dans des cellules endothéliales en SR [MuckLucia, 2008], ainsi que dans des fibroblastes en SIPS [Debacq-Chainiaux, 2008 ; Pascal, 2005]. L'expression d'IGFBP-3 peut être induite par p53 [Levine, 2010].

Une augmentation d'expression et de sécrétion de plusieurs MMPs est aussi connue dans les cellules en SR ou en SIPS [Liu, 2007, Krizhanovsky, 2008, Demaria, 2014, Freund, 2010]. Les MMPs peuvent également être induites par les UV et sont associées au photo-vieillissement [Fisher, 2002].

L'expression génique des 3 facteurs pro-inflammatoires, à savoir *IL-6, IL-8 et TNF-* α a été étudiée en cinétique. Ces 3 facteurs sont surexprimés suite à l'exposition aux UVB jusqu'au 4ème jour après le stress, par rapport au t0 et aux contrôles respectifs.
Deux pics successifs sont observés dans les temps courts après les stress. Le premier arrive durant les premières heures après le stress. Le second est observé à 24h après le dernier stress pour *IL-6* et *IL-8*, et à 48h pour *TNF-* α.
Il a été confirmé par test ELISA qu'il y avait également une augmentation d'IL-6 et IL-8 sécrétées dans les milieux conditionnés (MC) UVB à 3 jours, par rapport aux contrôles. Par contre, les MC récoltés au-delà présentent une abondance d'IL-6 et IL-8 similaire aux contrôles. Cela suggère que la sécrétion semble coïncider en terme de timing à l'expression génique.

Il faut noter qu'une surexpression de *IL-6, IL-8* et *TNF-* α est également observée dans les contrôles dans les premières heures par rapport au t0. Cela coïncide avec le premier pic observé dans les NHKs exposés aux UVB. Cette surexpression est moins importante que dans les cellules exposées aux UVB et est probablement liée au stress que les NHKs subissent au jour 0 (sortie de l'incubateur et rinçage au PBS).
Néanmoins, cela pourrait suggérer que la surexpression de ces facteurs observée à ce timing court pourrait être une réponse inflammatoire au stress de culture additionné aux stress UVB.
Il est connu que les UV peuvent induire de l'inflammation dans la peau. Il a déjà été décrit que les kératinocytes sécrètent de l'IL-6, IL-8 et TNF-α suite à une exposition aux UVB, sans qu'un arrêt de prolifération ne soit rapporté [Ahmad, 2017 ; Ulrich, 1995].
Il est également rapporté que ces trois facteurs présentent deux pics d'expression, à des temps similaires à ceux observés dans notre modèle, dans des cellules de carcinomes épidermoïdes exposés à des UVA [Morita, 1996].

Dans notre modèle de SIPS-UVB, une augmentation de l'expression d'*IGFBP-3* est observée à tous les temps dans les NHK exposés aux UVB, par rapport au t0, avec un maximum à 24h.
Une surexpression est également observée jusque 4h dans les contrôles. Cela pourrait de nouveau être dû au fait que ces cellules sont stressées. En effet, IGFBP-3 est un facteur antiprolifératif impliqué dans diverses réponses aux stress [Lebowitz, 2012 ; Goldstein, 1991].

Une augmentation de l'expression de *MMP-9* par rapport aux contrôles respectifs et au t0 est observée à 24h, 48h et 3 jours après le dernier stress, avec un maximum à 48h. L'expression au temps 5 et 6 jours n'a pas pu être étudiée mais au temps 7 jours, l'expression de *MMP-9* dans les cellules exposées aux UVB est redescendue à un niveau basal.

Les facteurs du SASP sont généralement régulés au niveau de l'expression génique [Coppé, 2008]. Néanmoins, comme pour IL-6 et IL-8, il faudrait étudier TNF-α, IGFBP-3 et MMP-9 par ELISA pour vérifier que leur taux de sécrétion suit les modifications d'expression génique.

La surexpression des 5 facteurs étudiés est la plus importante dans les premières 48h. Au delà, l'expression de ces facteurs diminue pour revenir à un niveau basal dans les cellules exposées aux UVB, pour *IL-6*, *IL-8*, *TNF-α* et *MMP-9*, ou à un niveau beaucoup plus bas que dans les temps précédents pour *IGFBP-3*.
La surexpression de ces facteurs à des temps précoces est peut être impliquée dans la mise en place de la sénescence prématurée suite aux stress répétés aux UVB, et semblent plutôt être

antérieure au SASP à proprement parler. En effet, les biomarqueurs de la sénescence sont observés après 2-3 jours dans notre modèle ainsi que dans différents modèles de SIPS [Dierick, 2002 ; Bertrand-Vallery, 2010 ; Lewis, 2008, Suzuki et Boothman, 2008, Alekseenko, 2014]. De plus, le SASP peut mettre plusieurs jours à se développer [Coppé, 2008 ; Hoare, 2016]. Plus précisément, Coppé *et al* [2008] ainsi que Hayakawa [2015] observent que le SASP de fibroblastes en SIPS-IR se développe à partir de 7 jours après le stress. Hoare *et al* [2016], observent une première vague de SASP vers le jour 4 dans un modèle de fibroblastes en OIS-Ras et une seconde vague vers le jour 8.
Ces différentes protéines sécrétées précocement (si cela est confirmé par ELISA) pourraient néanmoins être importantes pour l'entrée en SIPS-UVB des NHKs. En effet, IL-6 et IL-8 peuvent renforcer l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence [Acosta, 2008 ; Kuilman, 2008, Cichowski et Hahn, 2008]. Il est rapporté que IL-6 induirait plutôt l'arrêt du cycle via p16, et IL-8 via p53 [Kuilman et Peeper, 2009 ; Acosta, 2013].
IGFBP-3 a également est également impliqué dans le renforcement de la sénescence, et peut même induire des marqueurs de la sénescence à lui seul [Kuilman et Peeper, 2009 ; Kim et al, 2007]. En effet, IGFBP3 (ainsi que les autres IGFBP) inhibe les IGFs (Insulin Growth Factors) par liaison. Les IGFs peuvent induire l'inhibition de p53 (via MDM2) et activer des signaux de prolifération [Levine, 2010 ; Kuilman, 2013].
IGFBP3 peut également activer la signalisation TGF-β en se liant à TβR-I et II (TGF-β Receptor I et II). Comme dit précédemment cette voie pourrait être impliquée dans notre modèle de SIPS-UVB en maintenant l'augmentation de p21. De plus, il est rapporté qu'inhiber TβR-II avec des anticorps neutralisants diminue le phénotype sénescent de fibroblastes en SIPS-UVB [Debacq-Chainiaux, 2005].

Pour l'instant, nous n'avons donc pas mis en évidence d'augmentation d'expression/de sécrétion de facteurs connus du SASP au delà de temps 4 jours après stress. Néanmoins, le milieu conditionné des NHKs exposés aux UVB, incubé pendant 72h et récolté au jour 7 présente un effet pro-migratoire (discuté plus loin) suggérant un profil sécrétoire particulier.

Pour identifier des facteurs du SASP des NHKs en SIPS-UVB il serait intéressant de faire une analyse d'expression génique à haut débit tel qu'un séquençage d'ARN, et surtout une analyse du sécrétome directement, en utilisant une méthode quantitative en spectrométrie de masse, tel que le SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture). Cependant, il ne faut pas oublier que le SASP est également composé de facteurs non protéiques. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres acteurs de la communication cellulaire tels que les microvésicules ou les lipides.

Il serait pareillement intéressant d'explorer le SASP des NHKs en SIPS-UVB à des temps supérieurs à 7 jours après le dernier stress. Nous avons au départ étudié les NHKs en SIPS-UVB jusque 10 jours après le stress (données non montrées). Malheureusement, notre modèle est limitant car l'entrée en sénescence réplicative des NHKs est rapide et arrive après un petit nombre de passages, en comparaison aux fibroblastes par exemple. A des temps plus longs, tels que 10 jours post-stress, nous avons donc un nombre élevé de NHKs sénescents, en sénescence réplicative dans les conditions contrôles.

2) Etude de la régulation du SASP

Dans le but d'investiguer les mécanismes de régulation du SASP des NHKs en SIPS-UVB, l'expression génique de *STING* a été étudiée. STING est un récepteur intracellulaire pouvant induire l'expression de facteurs pro-inflammatoires (dont IL-6 et IL-8) via NF-κB et IRF-3. La voie cGas/STING peut être activée par la détection d'ADN cytoplasmiques, qui peuvent s'accumuler en sénescence, souvent suite aux dommages à l'ADN génomique [Li et Chen, 2018]. La voie cGas/STING peut également être activée suite à la libération d'ADN mitochondrial dans le cytosol quand celle-ci est dysfonctionnelle (au niveau de la structure et la compaction de l'ADNmt) ou stressée [West, 2015]. L'importance de cette voie dans la sénescence et la modulation du SASP a été mise en évidence récemment [Li et Chen, 2018 ; Takahashi, 2018].

L'expression de *STING* est décrite comme étant ubiquitaire, et aucune augmentation de l'abondance protéique de STING n'a été rapportée dans des cellules sénescentes où la voie cGas/STING était activée [Takahashi, 2018]. Néanmoins, une surexpression de *STING* dans les NHKs exposés aux UVB, par rapport au t0, est observée de 16h à 3 jours après le dernier stress, avec un maximum observé à 24h.

La régulation de l'expression de *STING* est mal connue. Récemment, c-Myc et CREB ont été décrit comme des régulateurs positifs de son expression [Wang, 2016]. CREB fait partie de la voie de signalisation $p38^{MAPK}$. Cette dernière peut être activée notamment par les dommages à l'ADN et les stress oxydatifs, et cette activation peut être observée en SIPS [Chrétien, 2008 ; Salminen, 2012].
La transcription de *STING* peut également être induite par une boucle de rétroaction positive par IFN-I, un des principaux facteurs inflammatoires dont l'expression est induite par la voie cGas/STING [Ma, 2015]. Il serait dont intéressant d'étudier ce facteur. De plus, il est connu que les UV pouvaient réguler positivement STING dans les kératinocytes [Kemp, 2015]. Cependant cette régulation ne s'opère pas au niveau transcriptionnel mais post-traductionnel.

Un pic de surexpression est observé à 24h pour *STING* ainsi que *IL-6* et *IL-8*. Il est possible que la voie cGAS/STING soit en amont de cette surexpression. Il est également possible que la surexpression de *STING* soit causée par la surexpression de facteurs inflammatoires tels que IFN-I.

En sénescence, l'activation de cGas/STING est associée à une accumulation d'ADNs cytoplasmiques suite à la sous-expression de deux DNases (DNases 2 et TREX1) [Takahashi, 2018]. Il serait donc plus qu'intéressant d'étudier l'accumulation de ces ADNs cytoplasmiques et l'expression des deux DNases. De plus, la voie cGas/STING induit la phophorylation de TBK1 et IRF3 [Takahashi, 2018], phosphorylations qu'il serait également intéressant d'étudier.

Il faut noter que de nombreuses interactions existent entre les facteurs étudiés (IL-6, IL-8, TNF-α, IGFBP-3 et MMP-9). En effet, TNF-α est un régulateur important de la réponse inflammatoire via l'activation d'un régulateur majeur du SASP pro-inflammatoire, à savoir NF-κB [Palladino, 2003]. Ce dernier est un facteur de transcription pour de nombreux facteurs pro-inflammatoires tels que IL-6 et IL-8. NF-κB peut aussi induire l'expression de *MMP-9* [Bond, 2001]. Par contre, IGFBP-3 est un antagoniste de TNF-α et NF-κB [Lee,

2011]. Il serait donc intéressant de pousser notre investigation vers d'autres régulateurs du SASP tel que NF-κB. Dans un premier temps nous pourrions regarder à la phosphorylation activatrice de IKK et la dégradation de IKβ (induite par cette première) par western blot. Nous pourrions ensuite étudier par immunofluorescence la translocation de NF-κB dans le noyau. Enfin, nous pourrions vérifier l'activation de NF-κB en utilisant un système rapporteur dont le promoteur est sous contrôle de NF-κB.

III) Etude de l'impact des milieux conditionnés sur les SCC

Dans la seconde partie de ce travail nous avons investigué la communication entre les NHKs en SIPS-UVB et les cellules cancéreuses cutanées.
Des données précédentes (données d'Emilie Bauwens-mémoire de Clotilde Hannart) ont montré un effet pro-migratoire du milieu conditionné (incubé pendant 72h) des NHKs en SR, par rapport à celui des NHKs en passage précoce. Cet effet n'était plus observé quand les milieux conditionnés étaient préalablement traités à la protéinase K, suggérant que l'effet pro-migratoire est dû à des acteurs protéiques.

Dans le but d'investiguer l'effet du sécrétome des NHKs en SIPS-UVB sur les cellules cancéreuses, les milieux conditionnés des NHKs ont été récoltés, après une incubation de 72h, à 3 et 7 jours après le dernier stress UVB. La migration de deux lignées de SCC, A431 et MET1, à été étudiée.

Aucun effet du MC de la condition UVB 3 jours sur les A431 n'est observé, par scratch assay ainsi qu'en chambre de Boyden. Par contre, un effet pro-migratoire du MC UVB 7 jours est observé en scratch assay et confirmé en chambre de Boyden. Soulignons que l'effet est observé pour chaque réplicat, malgré que les NHKs utilisés proviennent de donneurs différents.

Par contre, il n'y a pas d'effets détectés par scratch assay sur les cellules MET1.

1) Discussion et perspectives sur la différence de réponse observée entre les milieux conditionnés des NHKs en SIPS-UVB récoltés à 3 et 7 jours.

Il est rapporté que le SASP des fibroblastes a un effet pro-EMT sur des cellules épithéliales de cancer du sein non agressives et un effet pro-invasion sur des cellules épithéliales de cancer du sein prémalignes et malignes. Il est montré que cet effet était notamment lié à la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8 [Coppé, 2008]. L'EMT donne aux cellules des capacités migratoires et d'invasion [Fu et Wang, 2017 ; Razidlo, 2017]. En effet la perte des caractéristiques épithéliales vers des caractéristiques mésenchymales diminue l'adhésion et augmente la motilité des cellules. Soulignons cependant que l'IL-6 peut augmenter la migration de cellules cancéreuses avec ou sans EMT (cellules dérivées d'une tumeur primaire de la prostate) [Razidlo, 2017].

Ces cytokines semblent également plus abondantes dans les milieux conditionnés des NHKs en SR en comparaison au MC des cultures plus précoces, mais l'étude montre une tendance qui est cependant non significative (donnée d'Emilie Bauwens-mémoire de Clotilde

Hannart). Néanmoins, nous pourrions penser que l'impact pro-migratoire de ce MC en condition de SR sur les A431 pourrait être lié en partie à ces interleukines. Par contre, leur abondance dans le MC en UVB 7 jours est à un niveau basal, alors qu'elle est plus élevée dans le MC UVB 3 jours, or c'est à 7 jours que l'effet pro-migratoire sur les A431 est détecté.

MMP-9 sont également connues pour exercer un effet pro-migratoire sur des cellules dérivées de cancer du sein [Rolli, 2003]. Cette métalloprotéinase est fortement surexprimée à 24h, 48h et 3 jours, mais plus à 7 jours. Il manque néanmoins les temps intermédiaires et il faudrait étudier son abondance protéique sécrétée dans les MC par ELISA.

Le MC en UVB 3 jours semble contenir une hausse de plusieurs facteurs ayant été associés à un effet pro-migratoire sur diverses cellules cancéreuses. On peut alors se demander pourquoi aucun effet (ou très limité) de ce milieu n'est observé.

Premièrement, *IGFBP-3* est plus fortement exprimé dans les NHKs exposés aux UVB à 16h, 24h, 48h et 3 jours. Bien que cela doive être confirmé par ELISA, nous pourrions supposer qu'il y ait une corrélation entre l'expression génique et le niveau de sécrétion protéique de IGFBP-3. Or, IGFBP-3 diminue la capacité migratoire de plusieurs lignées de cellules cancéreuses (cellules de cancer gastrique et de cancer de l'endomètre) [Gribben, 2011 ; Xue, 2013 ; Lin, 2011]. IGFBP-3 pourrait donc inhiber l'effet des facteurs pro-migratoires et expliquer le manque d'effet du MC de la condition UVB 3 jours.
Néanmoins, il est également rapporté qu'IGFBP-3 pourrait avoir un effet pro-migratoire sur d'autres cellules cancéreuses (cellules cancéreuses hépatique et SCC orale) [Lin, 2011 ; Yen 2015].

Récemment, une étude dans notre équipe, utilisant des milieux conditionnés de fibroblastes en SIPS-UVB n'a pas montré d'effet des ces derniers sur la migration des A431. De façon intéressante, ces fibroblastes surexpriment également *IL-6*, *IL-8* et *IGFBP-3* [Toufaire, 2018]. Cette même étude n'a pas non plus montré d'effet du milieu conditionné de fibroblastes en SR sur les A431, alors que Farsam et al [2016] ont précédemment montré un effet pro-migratoire des milieux conditionnés de fibroblastes en SR sur cette même lignée de SCC. Ils ont rapporté qu'un des facteurs du SASP responsable de cet effet était la chemerine. Les SCC (dont les A431) surexpriment le récepteur de cette dernière, CCRL2.

Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de la chemerine dans les NHKs en SIPS-UVB et son abondance dans les milieux conditionnés.
Comme déjà mentionné, il serait intéressant d'étudier le SASP des NHKs en SIPS-UVB de manière plus globale. Cela permettrait d'identifier des facteurs responsables de l'effet pro-migratoire du MC UVB 7 jours.

2) Discussion et perspectives sur la différence de réponse observée entre les A431 et les MET1

L'effet pro-migratoire du MC UVB 7 jours est observé sur les A431 mais pas sur les MET1. L'effet du sécrétome des NHKs en SIPS-UVB sur la migration de SCC semble donc être modulé en fonction du temps, mais aussi de la lignée de SCC.

Les A431 et les MET1 sont deux lignées de SCC agressives. Néanmoins, les A431 présentent un profil plutôt épithélial alors que les MET1 ont un profil mésenchymal. En effet, pour les A431, les cellules adhèrent encore entre elles et poussent en grappes [Barette et al, 2014]. Elles ne présentent pas une expression importante de vimentine (marqueur mésenchymal) [Wu, 2016].
Pour les MET1, les cellules n'adhèrent plus entre elles et ont une EMT avancée [Barette, 2014, Garnier, 2012]. Les MET1 étant à un stade de tumorigénèse élevé et possédant déjà une capacité migratoire importante, il n'est peut être pas facile de voir une effet pro-migratoire sur celles-ci.
Néanmoins, les MET1 n'ont pas une migration maximale car celle-ci peut encore être accrue (par surexpression d'un microARN protumoral) [Olasz, 2015].

Les MET1 font partie de 3 lignées uniques isolées d'un même patient immunodéprimé. Ces lignées, appelées PM1, MET1 et MET4, sont dérivées respectivement d'une dysplasie du front, d'un carcinome primaire de cellules squameuses et d'une métastase des ganglions axillaires [Barette, 2014]. Il serait donc finalement intéressant de tester l'effet du MC UVB à 7 jours sur les PM1 et MET4 pour étudier une possible différence en fonction du stade de tumorigénèse.

En conclusion, dans la première partie de ce travail, nous avons mis en lumière le fait que l'induction et le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire pourraient se faire via des acteurs différents. Il serait donc intéressant d'inactiver p16, p21 et p53 pour vérifier cette hypothèse. Dans la seconde partie de ce travail nous avons mis en évidence que le sécrétome des NHKs dans notre modèle d'UVB-SIPS était dynamique et que sa composition, ainsi que ses effets sur la migration de cellules cancéreuses variaient avec le temps. Il serait intéressant d'étudier plus globalement le SASP des NHKs en UVB-SIPS via des analyses d'expression génique ou protéique (sécrétome) à haut débit. Il serait également intéressant d'étudier l'effet du milieu conditionné sur d'autres lignées cancéreuses, d'investiguer si la réponse varie avec le stade de tumorigénèse et d'étudier l'effet du milieu conditionné sur l'invasion et la prolifération des cellules cancéreuses.

REFERENCES

Acosta, J., O'Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., Takatsu, Y., Melamed, J., d'Adda di Fagagna, F., Bernard, D., Hernando, E. and Gil, J. (2008). Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. Cell, 133(6), pp.1006-1018.

Ahamad S. (2017) Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment. Springer.

Aird, K. and Zhang, R. (2012). Detection of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF). Methods in Molecular Biology, pp.185-196.

AKASAKA, T., TSUJII, M., KONDO, J., HAYASHI, Y., YING, J., LU, Y., KATO, M., YAMADA, T., YAMAMOTO, S., INOUE, T., TSUJII, Y., MAEKAWA, A., FUJINAGA, T., SHIRAISHI, E., HIYAMA, S., INOUE, T., SHINZAKI, S., WATABE, K., NISHIDA, T., IIJIMA, H. and TAKEHARA, T. (2014). 5-FU resistance abrogates the amplified cytotoxic effects induced by inhibiting checkpoint kinase 1 in p53-mutated colon cancer cells. International Journal of Oncology, 46(1), pp.63-70.

Alcorta, D., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D. and Barrett, J. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93(24), pp.13742-13747.

Alekseenko, L., Zemelko, V., Domnina, A., Lyublinskaya, O., Zenin, V., Pugovkina, N., Kozhukharova, I., Borodkina, A., Grinchuk, T., Fridlyanskaya, I. and Nikolsky, N. (2013). Sublethal heat shock induces premature senescence rather than apoptosis in human mesenchymal stem cells. Cell Stress and Chaperones, 19(3), pp.355-366.

Allsopp, R., Chang, E., Kashefi-Aazam, M., Rogaev, E., Piatyszek, M., Shay, J. and Harley, C. (1995). Telomere Shortening Is Associated with Cell Division in Vitro and in Vivo. Experimental Cell Research, 220(1), pp.194-200.

Arnoult, N. and Karlseder, J. (2015). Complex interactions between the DNA-damage response and mammalian telomeres. Nature Structural & Molecular Biology, 22(11), pp.859-866.

Baker, D., Childs, B., Durik, M., Wijers, M., Sieben, C., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K., Verzosa, G., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. and van Deursen, J. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. Nature, 530(7589), pp.184-189.

Baker, D., Weaver, R. and van Deursen, J. (2013). p21 Both Attenuates and Drives Senescence and Aging in BubR1 Progeroid Mice. Cell Reports, 3(4), pp.1164-1174.

Bandyopadhyay, D., Timchenko, N., Suwa, T., Hornsby, P., Campisi, J. and Medrano, E. (2001). The human melanocyte: a model system to study the complexity of cellular aging and transformation in non-fibroblastic cells.Experimental Gerontology, 36(8), pp.1265-1275.

Baumann, L. (2007). Skin ageing and its treatment. The Journal of Pathology, 211(2), pp.241-251.

Bavik, C., Coleman, I., Dean, J., Knudsen, B., Plymate, S. and Nelson, P. (2006). The Gene Expression Program of Prostate Fibroblast Senescence Modulates Neoplastic Epithelial Cell Proliferation through Paracrine Mechanisms. Cancer Research, 66(2), pp.794-802.

Baxter, R. (2001). Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. Molecular Pathology, 54(3), pp.145-148.

Beausejour, C. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. The EMBO Journal, 22(16), pp.4212-4222.

Bertrand-Vallery, V., Boilan, E., Ninane, N., Demazy, C., Friguet, B., Toussaint, O., Poumay, Y. and Debacq-Chainiaux, F. (2009). Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16INK-4A. Biogerontology, 11(2), pp.167-181.

Blackburn, E. (2001). Switching and Signaling at the Telomere. Cell, 106(6), pp.661-673.
Bodnar, A. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. Science, 279(5349), pp.349-352.

Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells.Cardiovasc Res. 2001;50:556–565

Brack, C. (2000). EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. The EMBO Journal, 19(9), pp.1929-1934.

Bringold, F. and Serrano, M. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence⋆. Experimental Gerontology, 35(3), pp.317-329.

Burton, D. and Krizhanovsky, V. (2014). Physiological and pathological consequences of cellular senescence.Cellular and Molecular Life Sciences, 71(22), pp.4373-4386.

C. J. Jones, J. (2000). Evidence for a Telomere-Independent “Clock” Limiting RAS Oncogene-Driven Proliferation of Human Thyroid Epithelial Cells. Molecular and Cellular Biology

Campisi, J. (1996). Replicative Senescence: An Old Lives' Tale?. Cell, 84(4), pp.497-500.

Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. Annual Review Of Physiology, 75(1), 685-705.

Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 8(9), pp.729-740.

Chandhasin, C., Ducu, R., Berkovich, E., Kastan, M. and Marriott, S. (2008). Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Attenuates the ATM-Mediated Cellular DNA Damage Response. Journal of Virology, 82(14), pp.6952-6961.

Childs, B., Gluscevic, M., Baker, D., Laberge, R., Marquess, D., Dananberg, J. and van Deursen, J. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. Nature Reviews Drug Discovery, 16(10), pp.718-735.

Cho, S. and Hwang, E. (2012). Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence.Molecules and Cells, 33(6), pp.597-604.

Chrétien, A. (2008). Sénescence prématurée induite par un stress au peroxyde d'hydrogène chez des fibroblastes diploïdes de poumon humain: Etude de la néosynthèse protéique, de marqueurs associés aux membranes et du rôle de Cdc42, Rac1 et p38MAPK.

Cichowski, K. and Hahn, W. (2008). Unexpected Pieces to the Senescence Puzzle. Cell, 133(6), pp.958-961.

Cipriano, R., Kan, C., Graham, J., Danielpour, D., Stampfer, M. and Jackson, M. (2011). TGF- signaling engages an ATM-CHK2-p53-independent RAS-induced senescence and prevents malignant transformation in human mammary epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(21), pp.8668-8673.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J., Barbacid, M., Beach, D. and Serrano, M. (2005). Senescence in premalignant tumours. Nature, 436(7051), pp.642-642.

Coppé, J., Patil, C., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D., Goldstein, J., Nelson, P., Desprez, P. and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. PLoS Biology, 6(12), p.e301.

Counter, C., Avilion, A., LeFeuvre, C., Stewart, N., Greider, C., Harley, C. and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. The EMBO Journal, 11(5), pp.1921-1929.

Coussens, L. (2002). Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer--Trials and Tribulations. Science, 295(5564), pp.2387-2392.

Debacq-Chainiaux, F. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- 1 signaling pathway. Journal of Cell Science, 118(4), pp.743-758.

Debacq-Chainiaux, F., Pascal, T., Boilan, E., Bastin, C., Bauwens, E. and 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 Radical Biology and Medicine, 44(10), pp.1817-1832.

Demaria, M., Desprez, P., Campisi, J. and Velarde, M. (2015). Cell Autonomous and Non-Autonomous Effects of Senescent Cells in the Skin. Journal of Investigative Dermatology, 135(7), pp.1722-1726.

Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J., Laberge, R., Vijg, J., Van Steeg,

H., Dollé, M., Hoeijmakers, J., de Bruin, A., Hara, E. and Campisi, J. (2014). An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA.Developmental Cell, 31(6), pp.722-733.

Di Mitri, D. and Alimonti, A. (2016). Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. Trends in Cell Biology, 26(3), pp.215-226.

Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, Louis DN, Li FP, Rheinwald JG (2000) Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. Mol Cell Biol 20:1436–1447

Dierick, J., Eliaers, F., Remacle, J., Raes, M., Fey, S., Larsen, P. and Toussaint, O. (2002). Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. Biochemical Pharmacology, 64(5-6), pp.1011-1017.

Dimri, G., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E., Linskens, M., Rubelj, I. and

Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(20), pp.9363-9367.

Druelle, C., Drullion, C., Deslé, J., Martin, N., Saas, L., Cormenier, J., Malaquin, N., Huot, L., Slomianny, C., Bouali, F., Vercamer, C., Hot, D., Pourtier, A., Chevet, E., Abbadie, C. and Pluquet, O. (2016). ATF6α regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts.Oncotarget, 7(42).

Dutta, S., Warshall, C., Bandyopadhyay, C., Dutta, D. and Chandran, B. (2014). Interactions between Exosomes from Breast Cancer Cells and Primary Mammary Epithelial Cells Leads to Generation of Reactive Oxygen Species Which Induce DNA Damage Response, Stabilization of p53 and Autophagy in Epithelial Cells. PLoS ONE, 9(5), p.e97580.

Fagagna, F., Reaper, P., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. and Jackson, S. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. Nature, 426(6963), pp.194-198.

Falcone, G., Mazzola, A., Michelini, F., Bossi, G., Censi, F., Biferi, M., Minghetti, L., Floridia, G., Federico, M., Musio, A. and Crescenzi, M. (2012). Cytogenetic analysis of human cells reveals specific patterns of DNA damage in replicative and oncogene-induced senescence.Aging Cell, 12(2), pp.312-315.

Fisher, G., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S. and Voorhees, J. (2002). Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. Archives of Dermatology, 138(11).

Fridlyanskaya, I., Alekseenko, L. and Nikolsky, N. (2015). Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. Experimental Gerontology, 72, pp.124-128.

Frippiat, C., Chen, Q., Zdanov, S., Magalhaes, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000). Subcytotoxic H2O2Stress Triggers a Release of Transforming Growth Factor-β1, Which Induces Biomarkers of Cellular Senescence of Human Diploid Fibroblasts. Journal of Biological Chemistry, 276(4), pp.2531-2537.

Fumagalli, M., Rossiello, F., Mondello, C. and d'Adda di Fagagna, F. (2014). Stable Cellular Senescence Is Associated with Persistent DDR Activation. PLoS ONE, 9(10), p.e110969.

Garnier, D., Magnus, N., Lee, T., Bentley, V., Meehan, B., Milsom, C., Montermini, L., Kislinger, T. and Rak, J. (2012). Cancer Cells Induced to Express Mesenchymal Phenotype Release Exosome-like Extracellular Vesicles Carrying Tissue Factor. Journal of Biological Chemistry, 287(52), pp.43565-43572.

Gire, V. and Dulić, V. (2015). Senescence from G2 arrest, revisited. Cell Cycle, 14(3), pp.297-304.

Glück, S., Guey, B., Gulen, M., Wolter, K., Kang, T., Schmacke, N., Bridgeman, A., Rehwinkel, J., Zender, L. and Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. Nature Cell Biology, 19(9), pp.1061-1070.

Goldstein, R. (1991). Insulin-like growth factor binding protein 3 accumulates to high levels in culture medium of senescent and quiescent human fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,

Gordon, R. (2013). Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. Seminars in Oncology Nursing, 29(3), pp.160-169.

Solanas, G. and Benitah, S. (2013). Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 14(11), pp.737-748.

Griffith, J., Bryant, J., Fordyce, C., Gilliland, F., Joste, N. and Moyzis, R. (1999). Reduced telomere DNA content is correlated with genomic instability and metastasis in invasive human breast carcinoma. Breast Cancer Research and Treatment, 54(1), pp.59-64.

Hayakawa, T., Iwai, M., Aoki, S., Takimoto, K., Maruyama, M., Maruyama, W. and Motoyama, N. (2015). SIRT1 Suppresses the Senescence-Associated Secretory Phenotype through Epigenetic Gene Regulation. PLOS ONE, 10(1), p.e0116480.

Hayflick, L. and Moorhead, P. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Experimental Cell Research, 25(3), pp.585-621.

Herbig, U. (2006). Cellular Senescence in Aging Primates. Science, 311(5765), pp.1257-1257.

Hiraku, Y., Ito, K., Hirakawa, K. and Kawanishi, S. (2007). Photosensitized DNA Damage and its Protection via a Novel Mechanism†. Photochemistry and Photobiology, 83(1), pp.205-212.

Hoare, M. and Narita, M. (2016). NOTCH and the 2 SASPs of senescence. Cell Cycle, 16(3), pp.239-240.

HSU, C. and CHUNG, Y. (2006). Influence of Interleukin-6 on the Invasiveness of Human Colorectal Carcinoma. Anticancer Research

Ito, Y., Hoare, M. and Narita, M. (2017). Spatial and Temporal Control of Senescence. Trends in Cell Biology, 27(11), pp.820-832.

Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., van Tuyn, J., Nelson, D., Rai, T., Shah, P., Hewitt, G., Korolchuk, V., Passos, J., Wu, H., Berger, S. and Adams, P. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. The Journal of Cell Biology, 202(1), pp.129-143.

Jacobs, J. and de Lange, T. (2004). Significant Role for p16INK4a in p53-Independent Telomere-Directed Senescence. Current Biology, 14(24), pp.2302-2308.

Jeyapalan, J., Ferreira, M., Sedivy, J. and Herbig, U. (2007). Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. Mechanisms of Ageing and Development, 128(1), pp.36-44.

Johnson, J., Thijssen, B., McDermott, U., Garnett, M., Wessels, L. and Bernards, R. (2016). Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. Oncogene, 35(37), pp.4829-4835.

Jun, J. and Lau, L. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing.Nature Cell Biology, 12(7), pp.676-685.

Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tsolou, A., Gonos, E., Thrasivoulou, C., Jill Saffrey, M., Cameron, K. and von Zglinicki, T. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response.Aging Cell, 11(6), pp.996-1004.

Jurk, D., Wilson, C., Passos, J., Oakley, F., Correia-Melo, C., Greaves, L., Saretzki, G., Fox, C., Lawless, C., Anderson, R., Hewitt, G., Pender, S., Fullard, N., Nelson, G., Mann, J., van de Sluis, B., Mann, D. and von

Kagawa, S. et al. (2015) Cellular senescence checkpoint function determines differential Notch1-dependent oncogenic and tumor- suppressor activities. Oncogene 34, 2347–2359

Kajstura, J., Pertoldi, B., Leri, A., Beltrami, C., Deptala, A., Darzynkiewicz, Z. and Anversa, P. (2000). Telomere Shortening Is an in Vivo Marker of Myocyte Replication and Aging. The American Journal of Pathology, 156(3), pp.813-819.

Kaur, A., Webster, M., Marchbank, K., Behera, R., Ndoye, A., Kugel, C., Dang, V., Appleton, J., O'Connell, M., Cheng, P., Valiga, A., Morissette, R., McDonnell, N., Ferrucci, L., Kossenkov, A., Meeth, K., Tang, H., Yin, X., Wood, W., Lehrmann, E., Becker, K., Flaherty, K., Frederick, D., Wargo, J., Cooper, Z., Tetzlaff, M., Hudgens, C., Aird, K., Zhang, R., Xu, X., Liu, Q., Bartlett, E., Karakousis, G., Eroglu, Z., Lo, R., Chan, M., Menzies, A., Long, G., Johnson, D., Sosman, J., Schilling, B., Schadendorf, D., Speicher, D., Bosenberg, M., Ribas, A. and Weeraratna, A. (2016). sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. Nature, 532(7598), pp.250-254.

Kavanaugh, G., Wise-Draper, T., Morreale, R., Morrison, M., Gole, B., Schwemberger, S., Tichy, E., Lu, L., Babcock, G., Wells, J., Drissi, R., Bissler, J., Stambrook, P., Andreassen, P., Wiesmüller, L. and Wells, S. (2011). The human DEK oncogene regulates DNA damage response signaling and repair.Nucleic Acids Research, 39(17), pp.7465-7476.

Kemp, M., Lindsey-Boltz, L. and Sancar, A. (2015). UV Light Potentiates STING (Stimulator of Interferon Genes)-dependent Innate Immune Signaling through Deregulation of ULK1 (Unc51-like Kinase 1). Journal of Biological Chemistry, 290(19), pp.12184-12194.

Kim, K., Kim, M., Seu, Y., Chung, H., Kim, J. and Kim, J. (2007). Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells. Aging Cell, 6(4), pp.535-545.

Kim, R., Kang, M., Kim, T., Yang, P., Bae, S., Williams, D., Phung, S., Shin, K., Hong, C. and Park, N. (2015). Regulation of p53 during senescence in normal human keratinocytes. Aging Cell, 14(5), pp.838-846.
Kolarsick, P., Kolarsick, M. and Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. Journal of the Dermatology Nurses' Association, 3(4), pp.203-213.

Kolly, C., Suter, M. and Müller, E. (2005). Proliferation, Cell Cycle Exit, and Onset of Terminal Differentiation in Cultured Keratinocytes: Pre-Programmed Pathways in Control of C-Myc and Notch1 Prevail Over Extracellular Calcium Signals. Journal of Investigative Dermatology, 124(5), pp.1014-1025.

Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L. and Lowe, S. (2008). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. Cell, 134(4), pp.657-667.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(21), pp.12072-12077.

Krutmann, J., Bouloc, A., Sore, G., Bernard, B.A., and Passeron, T. (2017). The skin aging exposome. J. Dermatol. Sci. 85, 152–161.

Kuilman, T. and Peeper, D. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. Nature Reviews Cancer, 9(2), pp.81-94.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. and Peeper, D. (2010). The essence of senescence. Genes & Development, 24(22), pp.2463-2479.

Kurz, D., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. Journal of Cell Science, [online] 113(20), pp.3613-3622.

Lecot, P., Alimirah, F., Desprez, P., Campisi, J. and Wiley, C. (2016). Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development.British Journal of Cancer, 114(11), pp.1180-1184.
Lee, H., Pang, C., Hsu, H. and Wei, Y. (1994). Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing.Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1226(1), pp.37-43.

Lee, H., Yin, P., Chi, C. and Wei, Y. (2002). Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence.Journal of Biomedical Science, 9(6), pp.517-526.

Lee, Y., Jogie-Brahim, S., Lee, D., Han, J., Harada, A., Murphy, L. and Oh, Y. (2011). Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 (IGFBP-3) Blocks the Effects of Asthma by Negatively Regulating NF-κB Signaling through IGFBP-3R-mediated Activation of Caspases. Journal of Biological Chemistry, 286(20), pp.17898-17909.

Leibowitz, B., Agostini-Dreyer, A., Jetzt, A., Krumm, C. and Cohick, W. (2012). IGF binding protein-3 mediates stress-induced apoptosis in non-transformed mammary epithelial cells. Journal of Cellular Physiology, 228(4), pp.734-742.

Levine, A. and Puzio-Kuter, A. (2010). The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Science, 330(6009), pp.1340-1344.

Levy, M., Allsopp, R., Futcher, A., Greider, C. and Harley, C. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging.Journal of Molecular Biology, 225(4), pp.951-960.

Lewis, D., Yi, Q., Travers, J. and Spandau, D. (2008). UVB-induced Senescence in Human Keratinocytes Requires a Functional Insulin-like Growth Factor-1 Receptor and p53. Molecular Biology of the Cell, 19(4), pp.1346-1353.

Li, T. and Chen, Z. (2018). The cGAS–cGAMP–STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. The Journal of Experimental Medicine, 215(5), pp.1287-1299.

Liu, D. and Hornsby, P. (2007). Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. Cancer Research, 67(7), pp.3117-3126.

Liu, J., Fang, H., Chi, Z., Wu, Z., Wei, D., Mo, D., Niu, K., Balajee, A., Hei, T., Nie, L. and Zhao, Y. (2015). XPD localizes in mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative DNA damage. Nucleic Acids Research, 43(11), pp.5476-5488.

Liu, Z.-J. et al. (2012) Notch activation induces endothelial cell senescence and pro-inflammatory response: implication of Notch signaling in atherosclerosis. Atherosclerosis 225, 296–303

López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M. and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. Cell, 153(6), pp.1194-1217.

Losquadro, W. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. Facial Plastic Surgery Clinics of North America, 25(3), pp.283-289.

Ma, F., Li, B., Yu, Y., Iyer, S., Sun, M. and Cheng, G. (2015). Positive feedback regulation of type I interferon by the interferon-stimulated gene STING. EMBO reports, 16(2), pp.202-212.

Malaquin, N., Vercamer, C., Bouali, F., Martien, S., Deruy, E., Wernert, N., Chwastyniak, M., Pinet, F., Abbadie, C. and Pourtier, A. (2013). Senescent Fibroblasts Enhance Early Skin Carcinogenic Events via a Paracrine MMP-PAR-1 Axis. PLoS ONE, 8(5), p.e63607.

Moy, R. (2000). Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. Journal of the American Academy of Dermatology, 42(1), pp.S8-S10.

Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X. and Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence. Molecular and Cellular Biology, 29(16), pp.4495-4507.

Morita, A., Grewe, M., Grether-Beck, S., Olaizola-Horn, S. and Krutmann, J. (1997). Induction of Proinflammatory Cytokines in Human Epidermoid Carcinoma Cells by in vitro Ultraviolet A1 Irradiation. *Photochemistry and Photobiology*, 65(4), pp.630-635.

Muñoz-Espín, D. and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 15(7), pp.482-496.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-

Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M. and Serrano, M. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. Cell, 155(5), pp.1104-1118.

Murtas, D., Maxia, C., Diana, A., Pilloni, L., Corda, C., Minerba, L., Tomei, S., Piras, F., Ferreli, C. and Perra, M. (2017). Role of epithelial–mesenchymal transition involved molecules in the progression of cutaneous melanoma. Histochemistry and Cell Biology, 148(6), pp.639-649.

Nishio, K., Inoue, A., Qiao, S., Kondo, H. and Mimura, A. (2001). Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. Histochemistry and Cell Biology, 116(4), pp.321-327.

Notaro, R., Cimmino, A., Tabarini, D., Rotoli, B. and Luzzatto, L. (1997). In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(25),

pp.13782-13785.

Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonia, T., Tiniakos, D., Wilson, C., Lahat, A., Day, C., Burt, A., Palmer, A.,

Anstee, Q., Grellscheid, S., Hoeijmakers, J., Barnhoorn, S., Mann, D., Bird, T., Vermeij, W., Kirkland, J.,

Passos, J., von Zglinicki, T. and Jurk, D. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. Nature Communications, 8, p.15691.

Olasz, E., Seline, L., Schock, A., Duncan, N., Lopez, A., Lazar, J., Flister, M., Lu, Y., Liu, P., Sokumbi, O., Harwood, C., Proby, C., Neuburg, M. and Lazarova, Z. (2015). MicroRNA-135b Regulates Leucine Zipper Tumor Suppressor 1 in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. PLOS ONE, 10(5), p.e0125412.

Orjalo, A., Bhaumik, D., Gengler, B., Scott, G. and Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1 is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(40), pp.17031-17036.

Palladino, M., Bahjat, F., Theodorakis, E. and Moldawer, L. (2003). Anti-TNF-α therapies: the next generation. Nature Reviews Drug Discovery, 2(9), pp.736-746.

Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chrétien, A., Bastin, C., Dabée, A., Bertholet, V., Remacle, J. and Toussaint, O. (2005). Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. FEBS Letters, 579(17), pp.3651-3659.

Passos, J., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M., Harold, G., Schaeuble, K., Birch-Machin, M., Kirkwood, T. and von Zglinicki, T. (2007). Mitochondrial Dysfunction Accounts for the Stochastic Heterogeneity in Telomere-Dependent Senescence. PLoS Biology, 5(5), p.e110.

Prieur, A., Besnard, E., Babled, A. and Lemaitre, J. (2011). p53 and p16INK4A independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. Nature Communications, 2(1).

Proby, C., Purdie, K., Sexton, C., Purkis, P., Navsaria, H., Stables, J. and Leigh, I. (2000). Spontaneous keratinocyte cell lines representing early and advanced stages of malignant transformation of the epidermis. Experimental Dermatology, 9(2), pp.104-117.

Rajagopalan, S. and Long, E. (2012). Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(50), pp.20596-20601.

Ramirez, R. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. Genes & Development, 15(4), pp.398-403.

Randal S. Tibbetts, R. (1999). A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. Genes & Development, [online] 13(2), p.152.

Ratushny, V., Gober, M., Hick, R., Ridky, T. and Seykora, J. (2012). From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. Journal of Clinical Investigation, 122(2), pp.464-472.

Rodier, F., Coppé, J., Patil, C., Hoeijmakers, W., Muñoz, D., Raza, S., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. Nature Cell Biology, 11(8), pp.973-979.

Rodriguez-Brenes, I. and Peskin, C. (2010). Quantitative theory of telomere length regulation and cellular senescence. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(12), pp.5387-5392.

Rolli, M., Fransvea, E., Pilch, J., Saven, A. and Felding-Habermann, B. (2003). Activated integrin v 3 cooperates with metalloproteinase MMP-9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(16), pp.9482-9487.

Romanov, S., Kozakiewicz, B., Holst, C., Stampfer, M., Haupt, L. and Tlsty, T. (2001). Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. Nature, 409(6820), pp.633-637.

Rossiello, F., Aguado, J., Sepe, S., Iannelli, F., Nguyen, Q., Pitchiaya, S., Carninci, P. and d'Adda di Fagagna, F. (2017). DNA damage response inhibition at dysfunctional telomeres by modulation of telomeric DNA damage response RNAs. Nature Communications, 8, p.13980.

S. Petersen, G. Saretzki, T. von ZglinickiPreferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts

Sagiv, A. and Krizhanovsky, V. (2013). Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. Biogerontology, 14(6), pp.617-628.

Salminen, A., Kauppinen, A. and Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF-κB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). Cellular Signalling, 24(4), pp.835-845.

Schmittgen, T. and Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), pp.1101-1108.

Serakinci, N., Christensen, R., Graakjaer, J., Cairney, C., Keith, W., Alsner, J., Saretzki, G. and Kolvraa, S. (2007). Ectopically hTERT expressing adult human mesenchymal stem cells are less radiosensitive than their telomerase negative counterpart. Experimental Cell Research, 313(5), pp.1056-1067.

Serrano, M. and Blasco, M. (2001). Putting the stress on senescence.Current Opinion in Cell Biology, 13(6), pp.748-753.

Serrano, M., Lin, A., McCurrach, M., Beach, D. and Lowe, S. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. Cell, 88(5), pp.593-602.

Shamblott, M., Axelman, J., Littlefield, J., Blumenthal, P., Huggins, G., Cui, Y., Cheng, L. and Gearhart, J. (2001). Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(1), pp.113-118.

Shaw, A., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A. and Lord, J. (2010). Aging of the innate immune system. Current Opinion in Immunology, 22(4), pp.507-513.

Shay, J. and Wright, W. (2000). Hayflick, his limit and cellular ageing. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 1(1), pp.72-76.

So, S., Davis, A. and Chen, D. (2009). Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. The Journal of Cell Biology, 187(7), pp.977-990.

Song, J., Kandasamy, K., Zemskova, M., Lin, Y. and Kraft, A. (2010). The BH3 Mimetic ABT-737 Induces Cancer Cell Senescence. Cancer Research, 71(2), pp.506-515.

Sperka, T., Wang, J. and Rudolph, K. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 13(9), pp.579-590.

Sturmlechner, I., Durik, M., Sieben, C., Baker, D. and van Deursen, J. (2016). Cellular senescence in renal ageing and disease. Nature Reviews Nephrology, 13(2), pp.77-89.

Sulli, G., Di Micco, R. and di Fagagna, F. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. Nature Reviews Cancer, 12(10), pp.709-720.

SUZUKI, M. and BOOTHMAN, D. (2008). Stress-induced Premature Senescence (SIPS). Journal of Radiation Research, 49(2), pp.105-112.

Takahashi, A., Loo, T., Okada, R., Kamachi, F., Watanabe, Y., Wakita, M., Watanabe, S., Kawamoto, S., Miyata, K., Barber, G., Ohtani, N. and Hara, E. (2018). Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. Nature Communications, 9(1).

Takai, H., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2003). DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. Current Biology, 13(17), pp.1549-1556.

Takaoka M, Harada H, Deramaudt TB, Oyama K, Andl CD, Johnstone CN, Rhoades B, Enders GH, Opitz OG, Nakagawa H (2004) Ha-Ras(G12V) induces senescence in primary and immortalized human esophageal keratinocytes with p53 dysfunction

Toussaint, O., Dumont, P., Remacle, J., Dierick, J., Pascal, T., Frippiat, C., Magalhaes, J., Zdanov, S. and Chainiaux, F. (2002). Stress-Induced Premature Senescence or Stress-Induced Senescence-Like Phenotype: OneIn VivoReality, Two Possible Definitions?.The Scientific World JOURNAL, 2, pp.230-247.

Toussaint, O., Medrano, E. and von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes.Experimental Gerontology, 35(8), pp.927-945.

Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J., Pascal, T., Frippiat, C., Zdanov, S., Magalhaes, J., Royer, V. and Chainiaux, F. (2002). From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 34(11), pp.1415-1429.

Toussaint, O., Royer, V., Salmon, M. and Remacle, J. (2002). Stress-induced premature senescence and tissue ageing. Biochemical Pharmacology, 64(5-6), pp.1007-1009.

Toutfaire, M., Bauwens, E. and Debacq-Chainiaux, F. (2017). The impact of cellular senescence in skin ageing: A notion of mosaic and therapeutic strategies. Biochemical Pharmacology, 142, pp.1-12.

Toutfaire, M., Dumortier, E., Fattaccioli, A., Van Steenbrugge, M., Proby, C. and Debacq-Chainiaux, F. (2018). Unraveling the interplay between senescent dermal fibroblasts and cutaneous squamous cell carcinoma cell lines at different stages of tumorigenesis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 98, pp.113-126.

Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. Am J Respir Crit Care Med. 2006;174(8):886–93.

van Deursen, J. (2014). The role of senescent cells in ageing. Nature, 509(7501), pp.439-446.

von Zglinicki, T., Pilger, R. and Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. Free Radical Biology and Medicine, 28(1), pp.64-74.

Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C. and Von Zglinicki, T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. Aging Cell, 8(3), pp.311-323.

Wang, Y., Jin, R., Zhou, G. and Xu, H. (2016). Mechanisms of transcriptional activation of the stimulator of interferon genes by transcription factors CREB and c-Myc. Oncotarget, 7(51).

Weilner, S., Schraml, E., Redl, H., Grillari-Voglauer, R. and Grillari, J. (2013). Secretion of microvesicular miRNAs in cellular and organismal aging.Experimental Gerontology, 48(7), pp.626-633.

Weiskopf, D., Weinberger, B. and Grubeck-Loebenstein, B. (2009). The aging of the immune system. Transplant International, 22(11), pp.1041-1050.

West, A., Khoury-Hanold, W., Staron, M., Tal, M., Pineda, C., Lang, S., Bestwick, M., Duguay, B., Raimundo, N., MacDuff, D., Kaech, S., Smiley, J., Means, R., Iwasaki, A. and Shadel, G. (2015). Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. Nature, 520(7548), pp.553-557.

Wiley, C., Velarde, M., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H., Davis, S., Ramanathan, A., Gerencser, A., Verdin, E. and Campisi, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. Cell Metabolism, 23(2), pp.303-314.

Williams, G. (1957). PLEIOTROPY, NATURAL SELECTION, AND THE EVOLUTION OF SENESCENCE.Evolution, 11(4), pp.398-411.

Wlaschek, M., Tantcheva-Poór, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L., Razi-Wolf, Z., Schüller, J. and Scharffetter-Kochanek, K. (2001). Solar UV irradiation and dermal photoaging. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 63(1-3), pp.41-51.

World Health Organization. (2018). Health effects of UV radiation. [online] Available at: http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html [Accessed 4 Dec. 2018].

WU, Y., LIU, Q., YAN, X., KATO, Y., TANAKA, M., INOKUCHI, S., YOSHIZAWA, T., MOROHASHI, S. and KIJIMA, H. (2016). Podoplanin-mediated TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition and its correlation with bHLH transcription factor DEC in TE-11 cells.International Journal of Oncology, 48(6), pp.2310-2320.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C. and Lowe, S. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature, 445(7128), pp.656-660.

Yu, H. (2000). Role of the Insulin-Like Growth Factor Family in Cancer Development and Progression. Journal of the National Cancer Institute, 92(18), pp.1472-1489.

Yuan A, e. (2018). The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction, Frontiers in Bioscience 10, 853-865

Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., Fagagna, F. and Jackson, S. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. Mechanisms of Ageing and Development, 126(1), pp.111-117.

Zglinicki, T. (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. Nature Communications, 5(1).

Ziegler, D., Wiley, C. and Velarde, M. (2014). Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. Aging Cell, 14(1), pp.1-7.