



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude des voies de signalisation menant à l'apparition de la sénescence prématurée induite par les UVB chez les fibroblastes de derme

Roegiers, Edith

Award date:
2011

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.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude des voies de signalisation menant à l'apparition de la sénescence
prématurée induite par les UVB chez les fibroblastes de derme**

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

Edith Roegiers

Janvier 2011

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
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@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude des voies de signalisation menant à l'apparition de la sénescence prématurée induite par les UVB chez les fibroblastes de derme

ROEGIERS Edith

Résumé

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié les voies de signalisation impliquées dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence prématurée induite par les stress UVB.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à voie de signalisation dépendante du Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), qui est un acteur-clef de l'apparition de biomarqueurs de la sénescence dans différents modèles de Sénescence Induite Prématurément par des Stress (SIPS). Nous avons étudié les biomarqueurs de la sénescence tels que l'activité de la β -galactosidase associée à la sénescence et la modification de l'expression de gènes associés à la sénescence dans des fibroblastes humains de derme (FHDs) en sénescence prématurée induite par une stimulation au TGF- β 1 ou par des expositions répétées aux UVB.

Afin de confirmer l'implication du TGF- β 1 dans l'apparition de la sénescence, nous avons étudié l'effet de la neutralisation du TGF- β 1 par des anticorps neutralisants ou par des siRNA (Small-Interfering RNA) spécifiques. Ensuite, nous avons étudié l'implication des Smads, la principale voie de signalisation activée par le TGF- β 1, après les stress UVB ou la stimulation au TGF- β 1. Nous avons montré une augmentation de l'abondance de ces protéines dans les cellules exposées aux UVB.

Ces résultats ont montré une implication partielle du TGF- β 1 lors de la sénescence prématurée induite par les UVB, suggérant que d'autres voies de signalisation étaient sans doute impliquées dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence. Dès lors, nous avons étudié la voie des MAPK (Mitogen-Associated Protein Kinases), puisqu'elles semblent être de bons candidats, et plus particulièrement p38^{MAPK}. Afin de déterminer si p38^{MAPK} était impliqué dans la sénescence prématurée induite par les UVB, nous avons inhibé son expression en utilisant des siRNA spécifiques. Nos résultats montrent une implication partielle de p38^{MAPK} dans l'induction du phénotype.

Il semble donc que la voie du TGF- β 1 et la voie de p38^{MAPK} soient impliquées, du moins partiellement, dans l'apparition de la sénescence prématurée induite par les UVB.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2011

Promoteur : F. Debacq-Chainiaux

Remerciements

Avant d'entamer le mémoire proprement dit, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de celui-ci.

Tout d'abord, je remercie le directeur du laboratoire, Thierry Arnould, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant au sein de l'équipe de l'« URBC », ainsi que tous les Seniors : Carine Michiels, Martine Raes, Patsy Renard, Olivier Toussaint et Florence Debacq-Chainiaux.

Un merci tout particulier à Florence, pour son talent en tant que tutrice et promotrice. Tu étais toujours disponible et attentive lors de la réalisation de ce mémoire. Merci pour son aide, son soutien et son enthousiasme à toute épreuve.

Je voudrais également remercier tous les membres de l'équipe « Gras ». Merci pour vos conseils avisés, votre accueil et votre sympathie. Un grand merci à Manu pour son aide précieuse et sa bonne humeur à tout moment.

Je tiens également à remercier de tout cœur l'équipe des techniciens « hors pair », pour leur aide et leurs conseils avisés. Un merci particulier à Noëlle, pour avoir analysé mes nombreuses IF, ainsi qu'à Edouard pour ses conseils (autant scientifiques qu'équins) et sa disponibilité.

Evidemment, je n'oublie pas Céline, Anaïs, Alexia, François et Benoît, merci pour l'ambiance mise au sein du bureau. Merci à Céline et Anaïs pour leurs discussions « scientifiques ». Un merci tout particulier à Benoît pour m'avoir « inspirée » lors des schémas de ma conclusion et ses précieux conseils informatiques.

Un tout grand merci à toutes les personnes que j'ai probablement oubliées...

Liste d'abréviations

°C	Degré celcius
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
AP-1	Activated protein-1
APS	Amonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
apo J	Apolipoprotéine J
ATF-2	Activating transcription factor 2
ATP	Adenosine tri-phosphate
β-gal	β-galactosidase
BAMBI	Pseudo-receptor BMP and activin membrane-bound inhibitor
BME	Basal medium eagle
BMP	Bone morphogenic protein
C	Cytosine
Co-Smad	Méiateur commun Smad
CDK	Cycline dependent kinase
CDKI	Cycline dependent kinase inhibitor
CPDs	Cumulative population doublings
CO ₂	Dioxyde de carbone
CTGF	Connective tissue growth factor
CTL	Contrôle
DMF	Dharmafect I
DMSO	Dimethylsulfovide
DTT	Dithiotreitol
E1	Ubiquitin-activating enzyme
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme
E3	Ubiquitin-protein ligase
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EGF	Epidermal growth factor
FCS	Fœtal calf serum
FHD	Fibroblaste humain de derme
G	Guanine
g	gramme
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine exchange factor
GrB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosine triphosphate
h	heure
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
i-Smad	Inhibiteur-Smad

IF	Immunofluorescence
IL	Interleukine
INK4	Inhibitors of Cdk4
J	Joule
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LAP	Latency associated peptide
LTBP	Latent TGF- β binding protein
LLC	Large latent complex
m	mètre
M	Molaire
MH	Mad homology domain
mA	milliampère
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	=MAPKK
MEKK	MEK Kinase
mJ/cm ²	millijoule/centimètre ²
MMP	Matrix metalloproteinase
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NLS	Nuclear localization sequence
nm	Nanomètre
NTS	Non targeting smartpool
pb	paire de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
pRb	Protéine de retinoblastome
PVDF	Polyvinylidène fluoride
r-Smad	Récepteur-Smad
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	Reactive oxygene species
rpm	Rotation par minute
O ₂	Oxygène
RT	Reverse transcription
S	Sérine
SA β -gal	Senescence associated β -galactosidase
SARA	Smad anchor for receptor activation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SH	Src Homology domain
SIPS	Sénescence induite prématurément par des stress
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factor
SOS	Sos of sevenless
SUMO	Small ubiquitin-related modifier

T	Thymine
TAK1	TGF activated kinase-1
T β RI	Récepteur au TGF- β de type I
T β RII	Récepteur au TGF- β de type II
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TGF- β	Transforming growth factor- β
TIMP	Tissue inhibitor of MMP
UVA	Ultraviolets de type A
UVB	Ultraviolets de type B
UV	Ultraviolets
V	Volts
WB	Western blot
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside

Table des matières

Introduction	1
I. Le vieillissement de la population	1
II. Le vieillissement in vitro	2
1. La sénescence répllicative	2
2. La sénescence induite prématurément par les stress	3
3. La sénescence induite par les oncogènes (SIPS)	3
4. Les biomarqueurs de la sénescence	4
a) L'arrêt du cycle cellulaire	4
b) La morphologie cellulaire	4
c) L'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal)	4
d) La modification de l'expression génique	5
e) Le raccourcissement des télomères	6
f) Les délétions d'ADN mitochondrial	6
III. Le vieillissement de la peau	7
1. Structure de la peau:	7
2. Le vieillissement intrinsèque	8
3. Le vieillissement extrinsèque	8
4. Les UV et la peau	8
IV. Les voies de signalisation impliquées dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence	9
1. La voie du TGF- β 1	9
a) La structure du TGF- β 1	9
b) Les récepteurs du TGF- β 1	10
c) Les protéines Smads	11
d) La transmission du signal par les Smads	11
e) L'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β 1	12
2. Les MAP Kinases	13
a) La transmission du signal	13
b) Les différentes cascades	14
3. Les liens entre la voie des MAP Kinases et la voie du TGF- β 1	14
4. L'implication de la voie du TGF- β 1 et des MAPK dans l'induction de la sénescence prématurée	15
Objectifs	16
Matériel et méthodes	17
I. Culture cellulaire	17
1. Matériel :	17
2. Méthode :	17
II. Exposition des cellules aux UVB	17
1. Matériel :	17

2.	Méthode :	17
III.	<i>Stimulation au TGF-β1</i>	18
1.	Matériel :	18
2.	Méthode	18
IV.	<i>Inhibition du TGF-β1 par anticorps neutralisants</i>	18
1.	Principe	18
2.	Matériel :	18
3.	Méthode	18
V.	<i>Tranfection de siRNA</i>	18
1.	Principe	18
2.	Matériel	18
3.	Méthode	19
VI.	<i>Détection de l'activité de la β-galactosidase associée à la sénescence</i>	19
1.	Principe	19
2.	Matériel :	19
3.	Méthode	19
VII.	<i>RT PCR en temps réel</i>	20
1.	Principe	20
2.	Matériel :	20
3.	Méthode	20
VIII.	<i>Les cartes microfluidiques</i>	21
1.	Principe	21
2.	Matériel :	21
3.	Méthode	21
IX.	<i>Western Blot</i>	22
1.	Principe	22
2.	Matériel :	22
3.	Méthode	23
X.	<i>Immunofluorescence</i>	25
1.	Principe	25
2.	Matériel :	25
3.	Méthode	25

Résultats-----27

I. Induction de la sénescence prématurée des fibroblastes humains de derme par le TGF- β 1

1.	Détection de l'activité SA β -gal	27
2.	Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence	28
3.	Analyse de l'expression de gènes associés à la peau	29
4.	Implication des protéines Smads dans l'induction de la sénescence prématurée par le TGF- β 1	30
a)	Profil d'abondance de Smad 2 et de Smad 3 après 2h de stimulation au TGF- β 1 dans des extraits nucléaires et cytoplasmiques	30
b)	Abondance et localisation des protéines Smads après 2h de stimulation au TGF- β 1	30
c)	Profil d'abondance des protéines Smads après 72h de stimulation au TGF- β 1	31
d)	Abondance et localisation des protéines Smads après 72h de stimulation au TGF- β 1	31

II. Induction de la sénescence prématurée des FDHs suite à des expositions répétées aux UVB

1.	Détection de l'activité de la SA β -galactosidase	32
2.	Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence	32
3.	Analyse de l'expression de gènes associés à la peau	32

III. La neutralisation du TGF-β1 inhibe le phénotype associé à la sénescence prématurée induite par les UVB	34
1. Utilisation d'anticorps neutralisants	34
a) Détection de l'activité de la SA β -gal	34
b) Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence	34
2. Utilisation de siRNA TGF-β1	35
a) Mise au point d'un modèle d'inhibition du TGF- β 1 par l'utilisation de siRNA	35
b) Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence après avoir transfecté et exposé les cellules aux UVB	36
3. Implication des protéines Smads dans l'induction de la sénescence prématurée par les UVB	37
a) Profil d'abondance des protéines Smads à 72h après le dernier stress UVB	37
b) Abondance et localisation des protéines Smads, à différents temps après la dernière exposition aux UVB	37
c) Mise au point d'un modèle d'inhibition de Smad 4 par l'utilisation de siRNA	38
d) Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence après avoir transfecté et exposé les cellules aux UVB	39
4. Implication des MAP kinases dans l'induction de la sénescence prématurée par les UVB	40
a) Profil d'abondance de ERK et P-ERK, à différents temps après le dernier stress UVB	40
b) Profil d'abondance de JNK à différents temps après le dernier stress UVB	40
c) Profil d'abondance de p38 ^{MAPK} et de P-p38 ^{MAPK} , à différents temps après le dernier stress UVB	41
d) Abondance et localisation des protéines ERK, P-ERK, JNK, P-JNK, p38 ^{MAPK} , P-p38 ^{MAPK} et P-ATF-2, à 2h et à 72h après l'exposition aux UVB	41
e) Mise au point d'un modèle d'inhibition de p38 ^{MAPK} par l'utilisation de siRNA	42
f) Vérification de l'inhibition d'expression du transcrit et de la protéine p38 ^{MAPK} après transfection avec le siRNA p38 ^{MAPK} et expositions répétées des cellules aux UVB	43
Discussion	44
Bibliographie	51

I. Le vieillissement de la population

Depuis les années 50, l'espérance de vie à la naissance ne cesse d'augmenter en Belgique. En effet, en 1950, les hommes avaient une espérance de vie de 62 ans et les femmes de 67 ans. Cinquante ans plus tard, l'espérance de vie a augmenté de 13 ans pour les hommes (75 ans) et de 14 ans pour les femmes (81 ans) (<http://www.plan.be>). Le bureau du Plan a réalisé des prévisions pour 2050 et prédit que cette espérance de vie à la naissance pourrait atteindre 84 ans pour les hommes et 90 ans pour les femmes (**Figure I.1**). D'autre part, il apparaît également que le pourcentage de la population des plus de 65 ans augmente depuis les années 50. Cette augmentation est d'autant plus marquée lorsqu'on analyse le pourcentage de la population des plus de 80 ans. En 1950, les plus de 80 ans représentaient 1,4% de la population, en 2000, ils représentent plus de 3,5% et en 2050, ils représenteront plus de 10% de la population, selon les prédictions du bureau du Plan (<http://www.plan.be>).

La population vieillit, les conséquences que cela entraîne sont l'apparition de maladies liées à l'âge telles que l'hypertension, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les maladies cardiovasculaires, etc. Au niveau médical, la prise en charge croissante de la population vieillissante nécessite une réorganisation des services de gériatrie. Au niveau scientifique, la gérontologie, science permettant d'étudier et de comprendre les mécanismes impliqués dans le vieillissement, est également en plein essor suite à cette prise de conscience que la population vieillit.

Mais, quelle est la cause du vieillissement chez une personne ? Il existe de nombreuses théories du vieillissement, parmi celles-ci, on peut en citer quatre particulièrement intéressantes.

La première théorie est celle des « radicaux libres » développée par Denham Harman (Harman, 1956). Cette théorie explique que l'accumulation de radicaux libres dérivés de l'oxygène produits par l'organisme entraînent des dommages s'accumulant avec l'âge et entraînant le vieillissement et la mort de l'individu. Les radicaux libres sont produits de façon endogène dans la cellule lors de la respiration cellulaire. Les électrons transportés au cours de la respiration cellulaire peuvent prendre comme accepteur l'oxygène et ainsi former les anions superoxydes qui sont transformés en peroxyde d'hydrogène. A partir de ce dernier peut être créé le radical hydroxyl. Les radicaux libres sont très réactifs et peuvent induire des modifications de l'ADN, comme des modifications de base, les coupures dans l'ADN et des délétions dans l'ADN nucléaire et mitochondrial. Ces dommages peuvent s'accumuler et entraîner le vieillissement de l'individu au cours du temps.

La deuxième théorie découverte par O. Toussaint et al., se base sur la théorie des radicaux libres associée à la thermodynamique (Toussaint et al., 1991). La thermodynamique peut se définir par des échanges d'énergie ou de matière dans un système ouvert ou fermé. On définit la variation d'entropie par la production et l'utilisation de l'énergie. La production d'entropie est égale à la variation d'entropie interne au cours du temps. Plus la production d'entropie est grande, plus on aura une grande activité du métabolisme. Il faut savoir que les cellules possèdent un excès positif d'entropie. Mais plus on avance dans le temps, plus des erreurs apparaissent et la cellule produira un excès négatif d'entropie. D'ailleurs, lorsqu'on applique un stress léthal aux cellules, le métabolisme – production d'entropie - chute fortement.

La théorie de la restriction calorique a été mise en place par Weindruch et al. (Weindruch and Walford, 1982). Elle consiste à diminuer la quantité de nourriture de 30% chez les animaux de laboratoire plutôt que de leur laisser un accès libre à la nourriture (animaux nourris « ad libitum »). S'il est clair que l'âge entraîne des dommages à l'ADN, des modifications épigénétiques et des dommages oxydatifs chez une souris nourrie « ad libitum » ; ils ont remarqué que ces dommages apparaissaient plus tardivement chez les souris en restriction calorique. De plus, ces souris ont une espérance de vie allongée. Une autre étude de Colman et al. a été réalisée sur des singes (Colman et al., 2009). Ils ont montré que la mortalité et l'incidence des maladies liées à l'âge diminuaient lorsque les singes étaient soumis à une restriction calorique.

La dernière théorie est celle de l'« energetic trade-off » (Kirkwood and Austad, 2000). Dans cette théorie, il faut tenir compte des limites du potentiel énergétique, c'est-à-dire qu'il existe un quota d'énergie et qu'il est impossible de le dépasser. Il est dès lors simple de comprendre que les espèces donnant naissance à un nombre élevé de petits vivront moins longtemps que des espèces avec un seul jeune par portée car elles consacrent plus d'énergie à la reproduction.

Afin de développer ces théories, divers modèles ont été mis au point pour étudier le vieillissement. Ainsi, des études sont réalisées dans des organismes « modèles » tels que *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus*, etc. Des études sont également réalisées sur des cultures de cellules *in vitro*. C'est sur ce dernier modèle que se base notre étude.

II. Le vieillissement *in vitro*

En 1961, L. Hayflick a cultivé des fibroblastes *in vitro* pendant plusieurs mois et il a montré que les cellules ne se répliquaient plus après un certain nombre de doublements de population puis finissaient par mourir. C'est ce qu'il a décrit comme étant la sénescence réplivative (Shay and Wright, 2000). Depuis, des modèles ont été développés prenant en considération le stress comme facteur induisant la sénescence. Ceci est décrit comme la sénescence induite prématurément par les stress (SIPS).

1. La sénescence réplivative

Hayflick a découvert en 1961 que les cellules devenaient sénescents après avoir été cultivées quelques mois *in vitro*. En effet, après un nombre fini de doublements de population, les cellules ne sont plus capables de se diviser, ce phénomène est appelé sénescence réplivative. Hayflick a montré que la vie proliférative des cellules pouvait se diviser en trois phases différentes (**Figure I.2**). La première est caractérisée par une adaptation des cellules à leur environnement. Durant cette phase, les cellules se répliquent mais la prolifération n'est pas maximale. La deuxième phase est une phase de division exponentielle, s'arrêtant au moment où les cellules arrêtent de se diviser et entrent en sénescence réplivative. La dernière phase est une phase de dégénérescence précédant la mort cellulaire. Les cellules sénescents peuvent rester métaboliquement actives dans cette phase durant plusieurs mois avant de mourir.

Généralement, les cellules entrent en sénescence réplivative après environ 50 doublements de population pour des fibroblastes de derme. Toutefois, le nombre de division peut dépendre de deux facteurs : le type cellulaire et l'âge du donneur (Shay and Wright, 2000, Campisi, 1996).

Il a été montré que ce phénotype sénescence pouvait être induit de façon prématurée lorsque les cellules sont exposées à différents types de stress ; oxydatif et/ou générant des dommages à l'ADN. Il s'agit de la sénescence induite prématurément par les stress ou SIPS. D'autre part, la sénescence peut également être induite par les oncogènes (OIS).

2. La sénescence induite prématurément par les stress

La sénescence induite prématurément par les stress ou SIPS a été décrite en 2000 (Brack et al., 2000). En effet, il a été montré par diverses équipes de recherche que l'exposition de cellules prolifératives (principalement des fibroblastes et des cellules endothéliales) à différents types de stress non toxiques générant soit un stress oxydatif (H_2O_2 , *t*-BHP), soit des dommages directs à l'ADN (mitomycine c, UV) induisait un phénotype sénescence.

Différents modèles de SIPS ont été développés en fonction du type cellulaire utilisé (transformé ou non), de la nature de l'agent stressant et du protocole expérimental suivi.

Le premier protocole utilisé a été réalisé sur des fibroblastes de peau soumis à une hyperoxie. Les cellules étaient cultivées dans une atmosphère comprenant 40% d'oxygène à la place de 21%. Ce protocole comporte des désavantages puisque d'une expérience à l'autre la sénescence prématurée était induite ou non. La sénescence prématurée n'était pas induite sur tous les types cellulaires testés car la production de ROS n'était pas suffisante (Toussaint et al., 2000).

D'autres types de stress ont été étudiés comme les stress au *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) ou au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces modèles ont comme avantage de pouvoir étudier la réponse adaptative des cellules face aux stress oxydatifs. De plus, la concentration des molécules utilisées a pu être diminuée à une concentration subcytotoxique en utilisant des stress répétés (Dumont et al., 2000).

Un autre modèle de SIPS a été développé sur fibroblastes humains de derme de peau (FHDs) exposés aux UVB, permettant ainsi de se rapprocher de la réalité physiologique. En effet, *in vivo*, les FHDs sont soumis aux UVB, ainsi qu'aux UVA. Le modèle se base sur les UVB puisqu'ils sont plus énergétiques et causent plus de dommages aux cellules (Debacq-Chainiaux et al., 2005, Toussaint et al., 2000).

Les cellules obtenues lors de la sénescence répliquative ou lors de la SIPS sont caractérisées par une série de biomarqueurs spécifiques.

3. La sénescence induite par les oncogènes (SIPS)

En 1997, Serrano montra que la sénescence pouvait être induite par un oncogène, H-Ras V12. L'amplification ou la mutation de cette protéine entraîne généralement la prolifération anormale des cellules amenant au développement d'un cancer. Lors de son étude, il a surexprimé H-Ras V12 dans des fibroblastes primaires. Il a remarqué que le cycle cellulaire des cellules était stoppé en phase G1. Il en conclut que la sénescence prématurée pouvait être induite lorsque H-Ras V12 était surexprimé dans les fibroblastes (Serrano et al., 1997).

Ras est un proto-oncogène permettant de transmettre des signaux extracellulaires à la cellule. Lorsque *ras* est muté, il est appelé oncogène, il induit de façon non contrôlée des signaux intracellulaires permettant la division cellulaire incontrôlée. La mutation de ce gène entraîne une prolifération anormale des cellules (Weinberg et al., 1994). Un oncogène est donc un gène muté ou surexprimé amenant à une division cellulaire incontrôlée (Courtois-Cox et al.,

2006). D'autre part, la mutation de *ras* peut entraîner l'accumulation de p53 et de p16^{INK-4a}. Il a été démontré que ces deux facteurs permettent l'arrêt du cycle cellulaire (Adams, 2001). Certains oncogènes peuvent induire deux phénotypes différents. Soit, ils induisent une division cellulaire anormale entraînant la formation d'un cancer. Soit, ils arrêtent le cycle cellulaire permettant le développement d'une sénescence prématurée. La OIS est généralement induite lors de cancers bénins, elle permettrait de limiter la progression du cancer et des lésions (Courtois-Cox et al., 2006).

4. Les biomarqueurs de la sénescence

a) L'arrêt du cycle cellulaire

Le premier biomarqueur caractérisant la sénescence est l'arrêt de prolifération. Le cycle cellulaire se déroule en plusieurs étapes. Les cellules en phase de quiescence (G0) ne prolifèrent pas. Les cellules peuvent entrer dans une phase G1 (GAP) durant laquelle des protéines sont synthétisées. Ensuite, la cellule réplique son ADN durant la phase S (synthèse). Après, la cellule se prépare à se diviser avant d'entrer en mitose, la phase M (**Figure I.3**) (Jacks, Weinberg, 1988). Lors de la sénescence, les cellules sont immédiatement bloquées en phase G1 et ne peuvent donc plus se répliquer. Plusieurs protéines clefs interviennent dans l'arrêt du cycle cellulaire.

Le facteur de transcription p53 est un facteur essentiel dans l'arrêt de prolifération. Son activation permet la surexpression d'un inhibiteur de kinase dépendante de cycline (CDKIs), p21^{waf-1}. Celui-ci bloque le complexe kinase dépendante de cycline 4 et 6 (CDK4,6)/cycline D, responsable de la phosphorylation de la protéine de rétinoblastome (pRb). pRb, hypophosphorylée se lie et inactive le facteur de transcription E2F, nécessaire à la transcription de gènes impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire (**Figure I.4**) (Adams, 2001, Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Il existe une autre voie de signalisation induisant l'arrêt du cycle cellulaire. Cette voie, parallèle à celle de p53/p21^{waf-1} fait intervenir une autre CDKI, p16^{INK-4a} (Adams, 2001, Toussaint et al., 2000). p16^{INK-4a} est également capable d'inhiber les complexes CDK4/cycline D et CDK6/cycline D, responsables de la phosphorylation de pRb (**Figure I.4**) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

La voie de signalisation dépendante de p16^{INK-4a} est irréversible et permet d'arrêter le cycle cellulaire même si les télomères possèdent une longueur suffisante (Beausejour et al., 2003).

b) La morphologie cellulaire

Le changement de morphologie cellulaire est une autre caractéristique des cellules sénescents. En ce qui concerne la morphologie des fibroblastes, sept morphotypes ont été décrits : 3 morphotypes mitotiques, 3 post-mitotiques et un morphotype nécrotique (Bayreuther et al., 1988).

c) L'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal)

Un troisième biomarqueur de la sénescence est la β -galactosidase associée à la sénescence ou SA β -gal. La β -gal est une lysosomale active à pH 4,0. Chez les cellules sénescents, l'enzyme est également active à pH 6,0. Cette activité est essentiellement due à une surexpression de l'enzyme lysosomale dans les cellules sénescents (Kurz et al., 2000).

Ce biomarqueur est particulièrement intéressant puisque c'est un des seuls biomarqueurs de sénescence *in vivo*. En effet, Dimri *et al.* ont montré que l'activité de l'enzyme était détectable à pH 6,0 dans les coupes de peau de personnes âgées (Dimri *et al.*, 1995).

In vitro, l'activité de la SA β -gal est détectée en incubant les cellules dans un tampon à pH 6,0 grâce au clivage du X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) en un composé bleu colorant les cellules (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009).

d) La modification de l'expression génique

L'expression génique est également modifiée chez les cellules sénescents. Ainsi, l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire est modifiée dans les cellules sénescents. Deux gènes impliqués dans l'inhibition du cycle cellulaire sont généralement exprimés dans les cellules sénescents : *p16^{INK-4a}* et *p21^{waf-1}*. D'autres part, des gènes encodant pour des protéines stimulant le cycle cellulaire sont réprimés dans les cellules sénescents tels que le gène codant pour la cycline A, B ou c-fos (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

L'expression d'autres gènes, liés à des fonctions spécifiques assurées dans le type cellulaire étudié, peut également être modifiée. Par exemple, Shelton *et al.* ont montré que des gènes intervenant dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) comme les métalloprotéinases étaient surexprimés chez les cellules sénescents. D'autre part, ils ont également démontré que des gènes impliqués dans le processus d'inflammation étaient surexprimés dans des fibroblastes de derme, par exemple l'*IL-15* (Shelton *et al.*, 1999).

Parmi les gènes dont l'expression est modulée lorsque les cellules sont sénescents, nous pouvons citer une surexpression de l'*apolipoprotéine J (Apo J)*, du *Connective Tissue Growth Factor (CTGF)*, de l'*ostéonectine* et de la *fibronectine* (Dumont *et al.*, 2000, Gonos *et al.*, 1998).

L'apolipoprotéine J (apo J) est une protéine chaperone. Cette protéine ne possède pas de fonction claire mais est impliquée dans beaucoup de mécanismes cellulaires tels que les interactions cellulaires, le transport de lipides, etc. L'expression de l'apo J peut être modifiée par des cytokines et est également modifiée dans les cellules sénescents (Trouwakos and Gonos, 2002).

L'ostéonectine est une glycoprotéine liant le calcium et intervenant dans la migration cellulaire, la prolifération et la morphogenèse. Cette protéine se retrouve dans tous les types cellulaires avec une préférence pour les cellules hautement prolifératives. Elle possède des affinités pour des composants de la MEC. Dans une cellule sénescence, l'expression de la protéine est augmentée et la fonction hypothétique de cette protéine est la modification de la morphologie cellulaire par ses propriétés de liaison aux éléments de la MEC (Neri *et al.*, 1992). De plus, la protéine est connue pour empêcher les cellules de passer de la phase G1 à la phase S en se liant grâce au calcium à des composants de la MEC (Dumont *et al.*, 2000, Funk and Sage, 1991).

L'expression de la *fibronectine* est également augmentée dans les cellules sénescents (Dumont *et al.*, 2000, Kumazaki *et al.*, 1993). La fibronectine est un composant de la matrice extracellulaire. Kumazaki a montré que cette protéine peut intervenir dans les changements morphologiques des cellules sénescents (KUMAZAKI *et al.* 1993).

Un autre gène est également surexprimé dans les cellules sénescents, le *Connective Tissue Growth factor (CTGF)*. La protéine est impliquée dans des processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, la différenciation ou l'ossification enchondrale. D'autre part, il a été démontré que le CTGF est également impliqué dans des conditions particulières telles que la fibrose ou la dysplasie tumorale. Le gène codant pour le CTGF contient dans son

promoteur une séquence d'élément de réponse au TGF- β 1 impliquant que la transcription de l'ARNm du CTGF est dépendante du TGF- β 1 (Moussad and Brigstock, 2000, Kim et al., 2004).

e) Le raccourcissement des télomères

Le raccourcissement des télomères est un mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence répliquative. Les télomères, fragments d'ADN non codant, sont situés aux extrémités des chromosomes et sont composés de séquences répétées 5' TTAGGG 3' chez l'homme. Ces séquences, associées à leurs complexes protéiques formant le télosome, permettent une protection de l'ADN contre des exonucléases dégradant l'ADN ou empêchant des fusions de chromosomes induites par la machinerie de réparation de l'ADN (Beausejour et al., 2003). L'ADN polymérase progresse dans le sens 5'-3' lors de la réplication à partir d'une amorce d'ARN. Suivant l'orientation du brin à répliquer, la synthèse d'un brin continu ou d'un brin discontinu a lieu. Le brin discontinu est formé de fragments de 1 000 paires de bases (pb) appelés fragments d'Okazaki, reliés ensuite entre eux par une ligase. L'amorce d'ARN sera excisée par l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase. La dernière amorce du brin discontinu ne sera pas remplacée, expliquant une réplication incomplète et donc le raccourcissement des télomères. Le nouveau chromosome synthétisé perd à chaque réplication entre 50 et 200 pb situées dans les télomères (**Figure I.5**). Il semble que ce raccourcissement, lorsqu'il atteint une longueur critique, est perçu comme un dommage à l'ADN et induit l'arrêt du cycle cellulaire, et donc, la sénescence répliquative. La télomérase est une enzyme capable de rallonger les télomères. Cette enzyme n'est pas active dans toutes les cellules, uniquement dans les cellules germinales et les cellules souches.

Lors de la SIPS, on remarque que le raccourcissement des télomères est faible pourtant, la sénescence prématurée est tout de même induite. Dumont *et al.* ont montré que la SIPS due à l'H₂O₂ ne nécessite pas un raccourcissement des télomères (Dumont et al., 2000). De plus, les cellules possédant l'unité catalytique de la télomérase (hTERT) active, peuvent présenter des biomarqueurs de la SIPS tels que l'arrêt de prolifération, une augmentation de l'activité SA β -gal, etc (de Magalhaes et al., 2002).

f) Les délétions d'ADN mitochondrial

Le dernier biomarqueur est la délétion dite « commune » de l'ADN mitochondrial (ADNmt) chez les cellules sénescents. L'ADNmt est un ADN bicaténaire présent dans les mitochondries. Il existe de nombreuses délétions survenant dans l'ADNmt lors de la sénescence. La délétion la plus fréquente est une délétion de 4 977 pb, appelée « délétion commune » (Dumont et al., 2000).

Certains de ces marqueurs sont également détectés *in vivo* lors du vieillissement. Ainsi, au niveau de la peau, on détecte lors du vieillissement une augmentation de l'activité SA β -gal (Dimri et al., 1995), et la délétion commune de l'ADN mitochondrial (Berneburg et al., 1999).

III. Le vieillissement de la peau

1. Structure de la peau:

La peau représente 15 % de la masse totale d'un être humain. Elle agit comme barrière protectrice des stress physiques et chimiques, permet la thermorégulation et la photoprotection du corps. C'est un organe tactile et sensoriel possédant beaucoup de terminaisons nerveuses permettant de ressentir des stimuli. Elle possède également des glandes qui permettent sa caractérisation en tant qu'organe sécréteur. La peau permet également de se défendre contre l'entrée de microorganismes tels que les bactéries.

La peau est divisée en 3 parties distinctes : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. L'épiderme est la partie supérieure de la peau et est en contact avec l'extérieur. Le derme se situe entre l'épiderme et l'hypoderme. Ce dernier se trouve en contact avec les organes internes (**Figure I.6**).

L'épiderme, appelé épiderme de Malpighi, est un épithélium stratifié kératinisé et possède plusieurs couches de cellules. Les principales cellules composant l'épithélium sont les kératinocytes. Celles-ci migrent de la couche profonde vers la couche supérieure de l'épiderme et subissent un processus de différenciation caractéristique. La première strate composant l'épiderme est la couche basale, contenant une assise de kératinocytes. La couche basale possède des cellules souches qui permettent la régénération de l'épiderme. Celle-ci est séparée du derme par la jonction épidermo-dermique. Ensuite, les kératinocytes migrent au niveau de la couche épineuse qui est composée de 5 à 15 assises de cellules. Au microscope électronique, la couche apparaît épineuse dû au grand nombre de jonctions de type « desmosome » entre les cellules. La troisième couche est appelée couche granuleuse et possède 1 à 3 assises de kératinocytes. Les cellules possèdent des grains de kératohyaline composés essentiellement de kératine. La morphologie des cellules est différente et elles possèdent des corps lamellaires. La dernière couche est la couche cornée. Cette strate est composée de 10 à 15 assises de cornéocytes (kératinocytes situés à la surface de l'épiderme). Ces cellules ne possèdent plus de noyaux, ni d'organelles. Elles sont essentiellement remplies de kératine et une couche cornée entoure la cellule. Ces cornéocytes desquament c'est-à-dire que les cellules mortes sont éliminées et grâce aux cellules souches de la couche basale, l'épaisseur de l'épiderme reste inchangée.

L'épiderme n'est pas seulement composé de kératinocytes, d'autres types cellulaires s'intègrent entre les couches. Les cellules de Langerhans permettent de présenter un antigène aux cellules T du système immunitaire. Les mélanocytes produisent la mélanine, le pigment de la peau. Les cellules de Merkel ont une fonction de récepteur sensoriel et transmettent l'information au système nerveux.

La deuxième partie composant la peau est le derme. Le derme est composé essentiellement de tissu conjonctif. Son épaisseur varie en fonction de sa localisation anatomique. Un des composants majoritaires du derme est la matrice extracellulaire (MEC) dans laquelle sont enchevêtrées des fibres de collagène et élastiques ainsi que des cellules, principalement des fibroblastes. Les fibres de collagène permettent de conférer une résistance mécanique à la peau. Les fibres élastiques sont responsables de l'élasticité et de la souplesse de la peau. Les fibroblastes permettent la synthèse de la majorité des constituants de la MEC.

Le derme possède également des vaisseaux sanguins permettant l'apport de nutriments et d'oxygène et l'élimination de déchets et de CO₂. De plus, le derme possède des vaisseaux lymphatiques, pour drainer les liquides interstitiels, et des fibres nerveuses permettant l'innervation de la peau.

La troisième couche composant la peau est l'hypoderme, un tissu conjonctif lâche. L'hypoderme est un tissu graisseux composé essentiellement d'adipocytes. Ce tissu permet la thermorégulation et le stockage d'énergie (Kanitakis, 2002).

La peau est caractérisée par un vieillissement intrinsèque, principalement déterminé génétiquement et similaire au vieillissement des autres organes et par un vieillissement extrinsèque, résultant de l'impact des stress environnementaux, et principalement les rayons ultraviolets (UV) (**Figure I.7**).

2. Le vieillissement intrinsèque

Le vieillissement intrinsèque est déterminé de manière génétique et est inévitable pour tous les organes du corps. La peau, soumise uniquement à ce type de vieillissement, possède une morphologie typique. En effet, l'épaisseur de la peau est plus fine, a perdu de l'élasticité et apparaît lisse. Ceci est dû à une dégradation générale des composants de la matrice extracellulaire et plus particulièrement à une désintégration des fibres d'élastine ainsi qu'à une diminution de la quantité d'élastine. Les fibroblastes de derme présentent une morphologie sénescence (Wlaschek et al., 2001).

3. Le vieillissement extrinsèque

Le vieillissement extrinsèque est essentiellement dû à l'impact des facteurs extérieurs à l'organisme et principalement des UV. Ce vieillissement est d'ailleurs également appelé photo-vieillescence. La peau est plus épaisse, profondément ridée et pigmentée de façon irrégulière (présence de « tâches de vieillescence »). Ces observations sont essentiellement dues à des changements au niveau du derme. Les fibres de collagène sont dégradées, les fibres élastiques quant à elles s'accumulent en un matériel dit « élastostatique » provenant d'une réorganisation de l'élastine, de la fibrilline, de protéoglycane et d'acide hyaluronique. Les fibroblastes sont également soumis à un changement morphologique, ils présentent une morphologie sénescence. Leur métabolisme est activé pour synthétiser les composants de la MEC. Les mastocytes sont présents en plus grand nombre tandis que les autres types cellulaires possèdent un taux de prolifération diminué. Lorsque la peau est soumise aux UV, elle semble subir une inflammation chronique (Scharffetter-Kochanek et al., 2000, Jenkins, 2002).

4. Les UV et la peau

Les radiations émises par le soleil et atteignant la surface de la terre sont divisées en trois groupes en fonction de leur longueur d'onde : les ultraviolets, le spectre visible et les infrarouges.

Les ultraviolets sont les rayons de longueur d'onde courte et très énergétiques. Ils sont divisés en trois catégories : UVC, UVB, UVA. Les UVC (260-290 nm) sont les plus énergétiques mais sont stoppés par la couche d'ozone. Les UVB (290-320 nm) quant à eux sont les rayons solaires les plus énergétiques atteignant la surface terrestre, mais ils sont également stoppés en partie par la couche d'ozone. On estime que seulement 5% pénétreront au-delà. Les UVA (320-340 nm) pénétrant également à travers la couche d'ozone à raison de 95% (**Figure I.8**) (Saladi and Persaud, 2005, Ravanat et al., 2001).

La pénétration des UV dans la peau est inversement proportionnelle à leur longueur d'onde. En effet, les UVA pénétrant jusqu'au derme inférieur tandis que les UVB peuvent atteindre le

derme supérieur. Les UV peuvent générer deux types de dommages lorsqu'ils pénètrent à travers la peau : des dommages directs de l'ADN ou un stress oxydatif. Les UVB peuvent entraîner les deux types de dommages tandis que les UVA n'induisent que des stress oxydatifs.

Les UVB peuvent causer des dommages directs à l'ADN en formant des liens covalents entre deux pyrimidines adjacentes et générant ainsi des dimères de pyrimidine cyclobutane ou des pyrimidines (6-4) pyrimidone. Ces dimères sont cytotoxiques et mutagènes (Ravanat et al., 2001).

Le stress oxydatif est engendré par la réaction des UVA et des UVB avec des molécules photosensibles (NADH, quinones, etc), générant des réactions dites de photosensibilisation de type I ou de type II. Lors des réactions de type I, la molécule photosensible excitée réagit directement avec un substrat (par exemple, l'ADN). Dans le cas des réactions de type II, les molécules photosensibles réagissent avec l'oxygène (O₂) pour former des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS). Les ROS sont capables d'oxyder des molécules intracellulaires tels que les protéines, les lipides ou encore l'ADN, entraînant des dommages à ces molécules. Le stress causé par la création excessive de ROS entraîne une cascade de signalisation menant à différentes conséquences tels que l'apoptose ou la sénescence de la cellule (Finkel and Holbrook, 2000, Ravanat et al., 2001).

IV. Les voies de signalisation impliquées dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence

L'apparition des biomarqueurs de la sénescence prématurée induite par les stress implique l'activation de voies de signalisation. Dans la littérature, il a été décrit que le TGF- β 1 est impliqué dans la sénescence prématurée. D'autre part, le TGF- β 1 n'est certainement pas responsable à lui seul de ce phénotype, d'autres voies sont probablement activées. Il existe des croisements décrits dans la littérature entre le TGF- β 1 et les MAPK (Mitogen-Associated Protein Kinases).

1. La voie du TGF- β 1

Le TGF- β 1 est une cytokine importante pour de nombreux phénomènes biologiques tels que le développement, l'homéostasie ou la réparation des tissus de l'organisme. Cette cytokine fait partie de la famille des Transforming Growth Factors (TGF). D'autres molécules se retrouvent dans cette famille comme les Bone Morphogenic Proteins (BMP) ou les activines (ten Dijke and Hill, 2004).

a) La structure du TGF- β 1

Il existe 3 isoformes du TGF- β , appelées TGF- β 1, 2 ou 3. Chacune est encodée par un unique gène présent dans le génome. Ces molécules existent sous deux formes différentes, la forme active et la forme latente (**Figure I.9**).

Le TGF- β 1 est sécrété hors de la cellule sous une forme latente. Lors de sa synthèse, le TGF- β 1 est produit sous forme de dimère et est lié de manière covalente à un propeptide appelé Latency Associated Peptide (LAP). Ce propeptide est clivé de manière protéolytique dans le trans Golgi et reste lié de façon non-covalente au TGF- β 1. Un autre peptide, le LTBP (Latent TGF- β Binding Protein), peut se lier au LAP par des ponts disulfures. Ce complexe, constitué

du TGF- β , de LAP et de LTBP est alors nommé TGF- β Large Latent Complex (LLC). Ce LLC peut se lier à des constituants de la matrice extracellulaire. Le complexe inactif doit être clivé pour libérer le dimère de TGF- β 1. Le TGF- β 1 actif est libéré lorsque LAP est clivé par des protéases comme les thrombines, les élastases, les métalloprotéinases ou les plasmines (Annes et al., 2003).

La forme active du TGF- β 1 est un complexe formé de 2 sous-unités reliées par un pont disulfure. Cette molécule est capable de se lier à son récepteur et de l'activer. Chaque membre de la famille des TGF- β possède 7 cystéines, permettant les d'identifier. Six de ces cystéines permettent de former des ponts disulfures entre les différents feuillets β de la molécule. Cette propriété rend le TGF- β 1 très résistant aux agents dénaturants. La dernière cystéine permet de réaliser le pont disulfure reliant deux monomères entre eux (Lin et al., 2006, Kingsley, 1994).

b) Les récepteurs du TGF- β 1

Après avoir été activé, le TGF- β 1 peut se fixer sur son récepteur possédant une activité sérine/thréonine kinase. Il existe deux types de récepteurs, les récepteurs de types I (T β RI) et II (T β RII). L'association de ces deux récepteurs est nécessaire pour la liaison du TGF- β 1. Les récepteurs possèdent plusieurs domaines : un domaine extracellulaire permettant la liaison du substrat, un domaine transmembranaire et un domaine kinase de type sérine/thréonine kinase permettant la phosphorylation des différents substrats. Le T β RI possède un domaine supplémentaire, le domaine GS (riche en glycines et sérines) permettant de contrôler l'activité kinase du T β RI (Massague, 1998).

Deux modèles sont envisageables lors de la liaison du ligand à son récepteur. Le premier est un modèle de liaison séquentielle, le ligand se lie en premier au T β RII et ensuite, le T β RI est recruté. Ce mode d'action est caractéristique du TGF- β 1. D'autre part, le deuxième modèle se base sur un mécanisme de coopération, le ligand se lie aux deux types de récepteur simultanément.

Lorsque le TGF- β 1 est lié au T β RII, l'activité kinase du T β RII phosphoryle le domaine GS du T β RI. Le T β RI peut ensuite phosphoryler son substrat (par exemple : Smad 2 ou Smad 3) et permettre d'activer la cascade de signalisation (Massague, 1998).

Il a été montré que les récepteurs au TGF- β 1 peuvent subir trois types de modifications post-traductionnelles différentes, permettant de modifier la voie de signalisation du TGF- β (**Figure I.10**). Premièrement, le T β RI et T β RII peuvent être phosphorylés sur des résidus tyrosine en plus des résidus sérine/thréonine. Ainsi, le domaine cytoplasmique du T β RII peut être phosphorylé sur trois tyrosines. T β RII peut être phosphorylé par la protéine Src, permettant ainsi le recrutement de Grb2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) et Shc sur le domaine SH2 (Src Homology Domain) et permettant l'activation de p38^{MAPK} par le TGF- β 1. Le T β RI peut également être phosphorylé sur une tyrosine suite à la liaison du TGF- β 1. Cette modification est nécessaire pour l'activation de la voie de signalisation des MAP Kinases ERK en réponse au TGF- β 1 (Kang et al., 2009).

Deuxièmement, l'ubiquitinylation (**Figure I.11**), un processus intervenant dans la stabilité et la dégradation des protéines, peut être réalisée sur le T β RI afin de le dégrader. L'ubiquitinylation nécessite l'action de trois enzymes ligases appelées E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) et E3 (ubiquitin-protein ligase). E1 active l'ubiquitine en utilisant de l'ATP, ensuite transfère la protéine sur l'E2. E2 s'attache à E3 liée à une protéine spécifique. La formation de ce complexe permet le transfert de

l'ubiquitine sur le substrat au niveau d'une lysine. Cette étape est répétée de manière successive, générant un polypeptide d'ubiquitines. Le polypeptide est reconnu par le protéasome, un complexe protéique. Le protéasome dégrade la protéine et libère les peptides dans le cytoplasme ainsi que les ubiquitines (Welchman et al., 2005). L'ubiquitinylation du T β RI requiert la présence d'une protéine adaptatrice pour recruter E3. Cette protéine adaptatrice est Smad 7, un « inhibiteur-Smad » (i-Smad) empêchant l'activation de Smad 2 ou Smad 3. Cette modification suggère une régulation de la stabilité et de la disponibilité du récepteur au TGF- β 1 (Kang et al., 2009).

La troisième et dernière modification observée au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur est la sumoylation (**Figure I.12**). Comme l'ubiquitinylation, la sumoylation permet l'attachement de petites protéines SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifier) sur des protéines cibles. La sumoylation nécessite l'action d'une cascade de trois protéines nommées E1, E2 et E3 SUMO ligases. Lorsque les protéines sont sumoylées, trois réponses peuvent se produire ; soit la protéine cible n'est plus capable de lier son partenaire, soit elle permet l'appariement avec un autre partenaire ou elle permet de modifier conformationnellement la protéine cible (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Une protéine SUMO peut être liée à un résidu lysine du T β RI au niveau de son domaine cytoplasmique. La sumoylation augmente l'affinité de Smad 2 et Smad 3 pour le T β RI. Elle permet donc de faciliter la cascade de signalisation du TGF- β 1 (Kang et al., 2009).

c) Les protéines Smads

Les Smads sont décrites comme étant un des substrats du T β RI pouvant réguler la transcription de gènes cibles du TGF- β 1. Le génome humain possède 8 Smads différentes réparties en trois groupes distincts. Les « récepteurs-Smads » (r-Smads : Smad1, Smad 2, Smad 3, Smad 5 et Smad 8) sont les substrats du T β RI. Smad 2 et Smad 3 sont les deux r-Smads nécessaires à la transduction du signal spécifique du TGF- β 1. Les médiateurs communs ou « co-Smads » (Smad 4) forment un complexe avec les r-Smads et permettent la translocation de ce complexe dans le noyau. Le dernier groupe de Smads sont des inhibiteurs, les « inhibiteurs-Smads ». Ces protéines (i-Smads : Smad 6 et Smad 7) sont capables de se lier aux récepteurs du TGF- β 1 et d'empêcher la phosphorylation des r-Smads.

Les Smads possèdent un domaine N-terminal Mad Homology 1 (MH1) et un domaine C-terminal Mad Homology 2 (MH2) reliés par une région de liaison « linker ». Le domaine MH1 permet la liaison à l'ADN des r-Smads et Smad 4. Le MH1 possède également dans sa séquence, un domaine NLS (Nuclear Localization Sequence) permettant la translocation des Smads dans le noyau. Le domaine MH2 est impliqué dans les interactions avec d'autres protéines. La région « linker » peut être phosphorylée par les MAP kinases empêchant la translocation du complexe protéique dans le noyau (Ross and Hill, 2008, Massague et al., 2005).

d) La transmission du signal par les Smads

Les Smads sont présentes dans le cytoplasme de la cellule. Lorsque le T β RI est activé et phosphorylé, une liaison transitoire se forme entre le récepteur et les r-Smads (Smad 2 et Smad 3) (**Figure I.13**). La liaison entre les r-Smads et le T β RI est favorisée par la protéine SARA (Smad Anchored for Receptor Activation) qui permet une interaction entre les r-Smads et le T β RI. Lorsque Smad 2 ou Smad 3 est phosphorylée, la liaison entre le récepteur et les Smads est interrompue. Smad 2 et Smad 3 phosphorylées peuvent interagir avec Smad 4, nécessaire pour permettre la translocation nucléaire et l'activation de la transcription. Le

complexe, formé de deux protéines Smad 2 (ou Smad 3) et d'une protéine Smad 4, est transloqué dans le noyau, où il active la transcription de gènes cibles spécifiques du TGF- β 1 soit directement soit indirectement en coopérant avec des facteurs de transcription comme ATF-2 (Activating Transcription Factor 2) (Moustakas et al., 2001) ou des co-facteurs tel que p300/CBP (ten Dijke and Hill, 2004).

Il existe au sein des promoteurs des gènes sous la dépendance du TGF- β 1 des séquences consensus reconnues par les complexes Smads, appelés Smads Binding Element ou SBE. De plus, les complexes peuvent également se lier aux motifs riches en GC des séquences des gènes cibles grâce au domaine MH1 des protéines Smads. Enfin, les complexes peuvent également recruter des co-activateurs ou des co-répresseurs impliqués dans la régulation de la transcription. Par exemple, la transcription du gène *PAI-1* (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) nécessite l'association du complexe Smad avec le facteur de transcription TFE3 (Transcription Factor E3) (Piek et al., 1999).

Après avoir activé ou réprimé la transcription de gènes cibles, l'activation des complexes Smads doit être arrêtée pour récupérer un niveau basal de transcription des gènes. Les protéines SnoN et Ski sont capables de se lier aux complexes Smads et d'empêcher l'activation de la transcription. De plus, elles sont capables d'interagir avec des co-répresseurs tels que N-CoR (Nuclear hormone receptor Co-Repressor) ou mSin3A. Ski ou SnoN inhibe la transcription des gènes cibles des complexes Smads en empêchant l'interaction entre Smad 4 et le récepteur-Smad phosphorylé (Luo, 2003).

e) L'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β 1

Il existe plusieurs façons d'inhiber la voie du TGF- β 1. Tout d'abord, les inhibiteurs-Smads, essentiellement Smad 7 pour la voie du TGF- β 1, se lient au T β RI et inhibent ainsi la phosphorylation des r-Smads (**Figure I.14**) (Lin et al., 2006).

Ensuite, il existe des récepteurs au TGF- β 1 n'étant pas capables d'activer la voie de signalisation des Smads. En effet, ces récepteurs, appelés « pseudo-receptor BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor » (BAMBI), ne possèdent pas de domaine intracellulaire. Le T β R β II n'est plus capable de phosphoryler le T β RI après liaison du ligand sur le domaine extracellulaire (**Figure I.15**) (Lin et al., 2006).

De plus, des protéines peuvent séquestrer le ligand pour l'empêcher de se lier à son récepteur. Ces molécules sont des récepteurs solubles capables de se lier au ligand des T β R. Dans le cas du TGF- β 1, le T β R β II soluble lie le TGF- β 1, empêchant la liaison de la cytokine à son récepteur transmembranaire (**Figure I.15**) (Lin et al., 2006).

Enfin, les r-Smads peuvent être ubiquitinylées afin d'être dégradées par le protéasome. Les enzymes E3 sont différentes en fonction du type des r-Smads. Les principales E3 sont les Smurf 1/2 (**Figure I.14**) (Derynck and Zhang, 2003).

2. Les MAP Kinases

Les MAP kinases sont des sérine/thréonine kinases capables de phosphoryler des substrats afin de transmettre un signal à la cellule après un stimulus. La caractéristique principale de ces voies est la multitude de kinases successives permettant la transmission du signal. Une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK ou MEKK) phosphoryle et active une MAP kinase kinase (MAPKK ou MEK) qui à son tour phosphoryle et active une MAPK (**Figure I.16**).

Il existe trois grandes familles de MAPK: ERK 1-2 (Extracellular signal-Regulated Kinases), p38^{MAPK}, et JNK (Jun N-terminal Kinases). Toutes les protéines membres de la famille des MAP kinases possèdent une séquence de double phosphorylation (Thréonine-X-Tyrosine) dans leur structure (Ono and Han, 2000).

Les fonctions générales des MAP Kinases sont la régulation de l'expression des gènes, la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la survie cellulaire (Barr and Bogoyevitch, 2001).

a) La transmission du signal

Plusieurs étapes sont nécessaires à la cellule pour transmettre le signal de l'extérieur jusqu'au noyau et ainsi permettre la transcription de gènes d'intérêt. Il faut activer un récepteur, qui permet l'activation de GTPases qui phosphorylent leur substrat. Ensuite, la cascade de kinase peut commencer jusqu'à phosphoryler des MAP kinases capables de transloquer dans le noyau et d'activer des facteurs de transcription permettant l'activation ou la répression de la transcription (Pearson et al., 2001).

Concrètement, les récepteurs membranaires impliqués dans l'activation de MAPK sont des récepteurs à tyrosine kinase. Lorsque leur substrat se lie au domaine extracellulaire, ils dimérisent et la partie intracellulaire du domaine est phosphorylée. Ensuite, une GTPase doit être activée pour pouvoir transformer le GDP en GTP et ainsi permettre la phosphorylation de son substrat (**Figure I.17**). Pour ce faire, deux protéines sont nécessaires, Grb2, une protéine adaptatrice et SOS (Son Of Sevenless) une Guanine Exchange Factor (GEF). Grb2 contient un domaine SH2 capable de se lier à une tyrosine du récepteur phosphorylé, ainsi que deux domaines SH3 liant et activant SOS. SOS est capable de catalyser la conversion du GDP lié à la GTPase en GTP. La GTPase est une protéine nommée Ras, continuellement liée à du GDP. En présence d'une GEF, la GTPase se lie de façon covalente préférentiellement à du GTP à la place du GDP. Ras active la cascade de signalisation en recrutant Raf qui permet l'activation d'une MAPKKK (**Figure I.18**). Raf inactivé est lié à une protéine, appelée 14-3-3. Lorsque Raf est liée à Ras, le GTP est hydrolysé pour permettre la phosphorylation de Raf qui se détache de 14-3-3. Ras n'est plus actif puisqu'il n'est plus attaché à du GTP mais du GDP. Raf est dès lors active et phosphoryle la MAPKKK, permettant son activation. Lorsque MAPKKK est active, elle phosphoryle une MAPKK, une kinase pouvant phosphoryler des résidus sérine/thréonine ou tyrosine. La MAPKK phosphoryle la dernière kinase, une MAPK. La MAPK dimérise dans le cytosol de la cellule et peut ensuite transloquer dans le noyau.

Cette kinase possède plusieurs fonctions. En effet, elle peut phosphoryler des kinases dans le cytosol qui elles-mêmes peuvent pénétrer dans le noyau et phosphoryler des facteurs de transcription. Les dimères de MAPK peuvent également transloquer dans le noyau où elles phosphorylent des facteurs comme le TCF (Ternary Complex Factor). Les deux facteurs de transcription agissent ensemble pour permettre la transcription de certains gènes tels que *c-fos* (Pearson et al., 2001).

b) Les différentes cascades

Il existe principalement 3 types de cascades qui se basent sur le même mécanisme de signalisation mais utilisant pas les mêmes protéines et n'étant pas activées par les mêmes conditions (**Figure I.16**).

La première cascade est la cascade menant à l'activation des MAPK ERK 1 et 2. Cette voie de signalisation est activée en réponse à des facteurs de croissance ou des facteurs mitogènes. La MAPKKK utilisée est la protéine Raf. Raf active la MAPKK MEK 1-2 qui elle-même active ERK 1-2. Le résultat de l'action de cette voie de signalisation est une induction de la croissance, ou de la différenciation cellulaire.

Les cascades des JNK et des $p38^{\text{MAPK}}$ sont activées en réponse à différents stress ou par des cytokines. Il existe plusieurs MAPKKK, dont une qui est en commun dans les deux voies de signalisation. Les MAPK sont soit des protéines $p38^{\text{MAPK}}$ ou JNK. L'activation de ces molécules permet d'activer le mécanisme d'inflammation ou l'apoptose. Le substrat principal des JNK est le facteur de transcription c-Jun. L'activation de c-Jun augmente son activité transcriptionnelle via la formation du facteur de transcription AP-1 (Activator Protein 1) qui intervient dans divers processus biologiques tels que la prolifération cellulaire (Barr and Bogoyevitch, 2001).

$p38^{\text{MAPK}}$ est responsable de l'activation de certains facteurs de transcription tels que ATF-2 (Activating Transcription Factor-2), ATF-1 et p53. $p38^{\text{MAPK}}$ est impliqué dans l'inflammation, dans l'apoptose, dans le cycle cellulaire et dans la différenciation cellulaire. $p38^{\text{MAPK}}$ semblerait jouer un rôle dans l'expression de la cycline D1 (Ono and Han, 2000).

3. Les liens entre la voie des MAP Kinases et la voie du TGF- β 1

La régulation des voies du TGF- β 1 et des MAPK est un phénomène complexe puisqu'il est possible qu'une voie interagisse avec une autre voie pour définir une nouvelle réponse cellulaire. Certaines régulation de la voie du TGF- β 1 par les MAPK et vice-versa ont été décrites (**Figure I.19**) (Javelaud and Mauviel, 2005).

Premièrement, la protéine TAK1 (TGF- β 1 Activated Protein) peut être phosphorylée et activée lorsque les cellules sont stimulées au TGF- β 1. Cette protéine est en réalité une MAPKKK, qui, lorsqu'elle est activée, peut phosphoryler une MAPKK et permettre l'activation de la protéine JNK. Le TGF- β 1 pourrait être également responsable de l'activation de $p38^{\text{MAPK}}$ par la phosphorylation de TAK (Derynck and Zhang, 2003).

Ensuite, l'activité des Smads peut être modulée par la voie de signalisation des MAPK. En effet, le domaine « linker » des Smads possède des régions reconnues par les ERK et les JNK. La phosphorylation de ces sites inhibe ou active la cascade signalitique du TGF- β 1 (Piek et al., 1999). Smad 3 peut être phosphorylée par des kinases activées par la voie des ERK. Cette phosphorylation empêche Smad 3 d'activer la transcription de gènes mais n'empêche pas la translocation dans le noyau (Guo and Wang, 2009). Le résultat de la modulation de la voie de signalisation du TGF- β 1 par les MAPK dépend de deux facteurs. La finalité de la voie dépend de la molécule qui phosphoryle le substrat et du type cellulaire dans lequel on se trouve (Blanchette et al., 2001).

De plus, les MAPK sont capables d'activer les protéines Smads de manière indépendante du TGF- β 1. En effet, Brown et ses collègues ont montré que la protéine MEKK-1 phosphoryle Smad 2 afin de permettre la transcription de gènes cibles dans les cellules endothéliales.

MEKK-1 est une MAPKKK pouvant activer la voie de signalisation phosphorylant le facteur de transcription c-Jun. Des régulations de ces voies signalitiques existent également. Smad 7 est capable d'interagir avec la kinase qui phosphoryle Smad 2, inhibant l'activation de Smad 2 par MEKK-1 (Brown et al., 1999).

Les MAPK interagissent avec les r-Smads, les i-Smads mais également avec les co-Smad. En effet, les MAPK JNK et p38^{MAPK} phosphorylent Smad 4 afin de dégrader la protéine par le protéasome (Guo and Wang, 2009).

4. L'implication de la voie du TGF-β1 et des MAPK dans l'induction de la sénescence prématurée

Plusieurs études ont montré que le TGF-β1 était un acteur intervenant dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence induite prématurément par les stress à l'H₂O₂ (Fripiat et al., 2001), à l'éthanol, au *t*-BHP (Debacq-Chainiaux et al., 2008) et aux UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

Ces études ont montré que d'une part, la stimulation des fibroblastes au TGF-β1 induisait l'apparition de certains biomarqueurs de la sénescence tels que la morphologie cellulaire, l'activité SA β-gal ou la modification de l'expression de certains gènes. De plus, le TGF-β1 induit une augmentation cellulaire du peroxyde d'hydrogène pouvant déclencher les cascades de signalisation induisant la sénescence prématurée (Fripiat et al., 2001). D'autre part, il a été montré que la neutralisation du TGF-β1 par des anticorps neutralisants ou par un siRNA spécifique après les stress, protégeait de l'apparition des biomarqueurs (Chretien et al., 2008).

Fripiat et al. ont également montré que p38^{MAPK} est activé dans les cellules exposées au peroxyde d'hydrogène à court temps après le stress. Cette protéine est capable de phosphoryler et d'activer le facteur de transcription ATF-2 qui permet d'une part l'arrêt du cycle cellulaire et d'autre part une surexpression du TGF-β1. Le TGF-β1 sécrété, active p38^{MAPK} à long terme et permet l'induction des biomarqueurs de la SIPS par la formation du complexe ATF-2/pRb (**Figure I.20**) (Fripiat et al., 2002).

Objectifs

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le vieillissement, il est important de développer et de caractériser des modèles *in vitro* permettant de les étudier.

Parmi les modèles existants, nous nous sommes intéressés aux modèles de sénescence induite prématurément par des stress chez des fibroblastes humains de derme (FHDs).

Ainsi, lors de ce mémoire, nous avons décidé d'étudier les voies de signalisation impliquées dans l'apparition du phénotype sénescence chez des FHDs soumis à des expositions répétées aux UVB. Il a été montré précédemment au laboratoire que le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) était impliqué dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence suite aux stress oxydatifs (H_2O_2 , *t*-BHP) ou autre (éthanol, UVB) (Debacq-Chainiaux et al., 2008, Fripiat et al., 2001).

Pour ce faire, nous comparerons les modèles de sénescence induite prématurément par une stimulation au TGF- β 1 ou par des expositions répétées aux UVB chez des FHDs. De plus, nous caractériserons les modifications d'expression génique dans ces modèles par l'utilisation d'une carte microfluidique permettant l'analyse de 92 gènes d'intérêt liés à la physiologie de la peau.

Ensuite, nous étudierons si la voie de signalisation majoritairement activée par le TGF- β 1, la voie des Smads, est activée ou non dans ces deux modèles de sénescence induite. Nous nous intéresserons également à la voie des MAPK, puisqu'elles semblent également impliquées dans d'autres modèles de sénescence induite par des stress.

I. Culture cellulaire

Lors de ce mémoire, des fibroblastes humains de peau ont été utilisés. Ces cellules sont vendues commercialement sous le code AG04431 et proviennent de l'Institut Coriell (USA). Ces cellules ont été prélevées dans le derme de la peau.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture T75 contenant 15 ml de milieu de culture complet. Ces boîtes sont placées dans une étuve humide à 37°C contenant 5% de CO₂ pour permettre la prolifération cellulaire.

1. Matériel :

Tableau II.1

2. Méthode :

Lors du repiquage des cellules, le milieu est complètement retiré et les cellules sont rincées deux fois au PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile chauffé à 37°C. Après avoir décanté le PBS, les cellules sont détachées grâce à l'ajout de 1 ml de trypsine. La boîte de culture T75 peut ensuite être placée dans l'étuve à 37°C. Lorsque les cellules sont détachées, 10 ml de milieu complet (contenant 10% de sérum de veau foetal) est ajouté afin d'inhiber l'action de l'enzyme. Les cellules sont récupérées dans un tube de 10 ml et centrifugées pendant 8 min à 1 000 rpm. Après la centrifugation, le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans du milieu complet contenant 10% de sérum de veau foetal (FCS). En culture de routine, 5 ml de cette resuspension sont distribués dans deux nouvelles T75 et du milieu + 10% FCS est rajouté afin d'obtenir 15 ml/T75. Avant les stress, les cellules sont resuspendues dans du milieu + 1% FCS, comptées et placées dans de nouvelles T75 ou dans des boîtes de culture adaptées aux expériences (T25, plaques 24-puits, plaques 6-puits) à une confluence de 10 000 cellules/cm². Les boîtes de cultures sont placées dans une étuve humide à 37°C contenant 5% de CO₂.

II. Exposition des cellules aux UVB

1. Matériel :

Tableau II.2

2. Méthode :

Avant d'exposer les cellules aux UVB, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml (5 ml pour les T25) de PBS stérile. Pour éviter que les cellules ne sèchent durant l'exposition, 3 ml de PBS sont ajoutés par T75 ou 1 ml par T25 avant l'exposition.

Les cellules sont ensuite soumises à 250 mJ/cm² d'UVB. Pour ce faire, les boîtes sont placées dans un caisson à UVB contenant 3 lampes Philips émettant à 311 nm. Pour permettre la mesure exacte de 250 mJ/cm², un radiomètre UVR muni d'un capteur UVB a été placé dans une T75 (ou T25) vide, permettant ainsi de calculer les déperditions dues au plastique. Lorsque l'irradiation est terminée, le PBS est décanté et remplacé par 10 ml (5 ml pour les T25) de milieu de culture complet.

Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions que les cellules exposées à la différence qu'elles ne sont pas soumises aux UVB. Afin d'induire la sénescence prématurée,

les cellules sont exposées aux UVB deux fois par jour pendant 5 jours, en suivant le protocole mis au point au laboratoire (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

III. Stimulation au TGF- β 1

1. Matériel :

Tableau II.3

2. Méthode

Le TGF- β 1 doit être resuspendu dans de l'HCl 4 mM 0,1% BSA à une concentration de 10 μ g/ml. Lorsque le TGF- β 1 est resuspendu, il est ajouté au milieu de culture contenant 1% de sérum de veau foetal pour obtenir différentes concentrations (1, 5 ou 10 ng/ml). Les cellules sont incubées pendant 2h ou 72h avec le TGF- β 1, avec un changement de milieu contenant le TGF- β 1 toutes les 24 heures. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions, sans ajout de TGF- β 1.

IV. Inhibition du TGF- β 1 par anticorps neutralisants

1. Principe

Le TGF- β 1 est une protéine sécrétée par la cellule, il peut donc être inhibé par la présence d'anticorps ciblés contre la protéine (anticorps neutralisants). La liaison de l'anticorps au TGF- β 1 ne permet plus à la protéine de s'attacher à son récepteur et donc inhibe son action.

2. Matériel :

Tableau II.4

3. Méthode

Après le dernier stress aux UVB, les cellules sont cultivées dans du milieu de culture contenant 3 μ g/ml d'anticorps anti-TGF- β 1. Le milieu contenant l'anticorps est renouvelé une fois par jour durant 3 jours après le dernier stress.

V. Transfection de siRNA

1. Principe

Afin d'inhiber l'expression d'un gène, il est possible de transfecter les cellules avec des ARN interférant, les siRNA (Small Interfering RNA). Ces molécules se fixent sur l'ARNm de leur cible et permettent la dégradation de celui-ci en utilisant des complexes protéiques.

2. Matériel

Tableau II.5

3. Méthode

Les cellules sont transfectées la veille du premier jour de stress UVB et une seconde fois le 4^{ème} jour de stress (après le 8^{ème} stress UVB) (Tableau II.6). Comme contrôle de transfection, les cellules seront avec un siRNA Smartpool appelé contrôle négatif (Non Targeting Smartpool (NTS)) ne reconnaissant aucune séquence d'ARNm spécifique.

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de culture T25. 48h après le repiquage les cellules sont transfectées soit avec le siRNA contrôle négatif soit avec le siRNA d'intérêt. Pour cela, il faut diluer les siRNA afin d'obtenir une concentration de 2 µM dans de l'eau distillée filtrée. Ensuite, il faut préparer deux tubes par siRNA, le premier contenant 20 nM de siRNA dilué dans du milieu de culture sans sérum et le second possédant l'agent transfectant, Dharmafect I (DMF I) dilué également dans du milieu de culture sans FCS. Après avoir vortexé les tubes, une incubation de 5 min à température ambiante est nécessaire avant de mélanger les deux tubes ensemble, vortexer et incuber pendant 20 min à température ambiante. Finalement, pour chaque siRNA, un tube contenant 19,2 ml de BME + 1% FCS est préparé, et le contenu du tube avec les siRNA y est ajouté.

Finalement, le milieu de culture est décanté des cellules, celles-ci sont rincées une fois au PBS et 4 ml de milieu avec siRNA est ajouté par T25.

VI. Détection de l'activité de la β-galactosidase associée à la sénescence

1. Principe

La détection à pH 6,0 de l'activité de la β-galactosidase est considérée comme un biomarqueur de la sénescence et nommée Senescence Associated β-galactosidase ou SA β-gal. La β-gal, habituellement active à pH 4,0, est en effet détectable à pH 6,0 chez les cellules sénescents.

Pour mettre en évidence cette activité enzymatique, nous avons utilisé un test cytochimique basé sur le clivage du X-gal. En effet, lorsque la β-gal est active, elle est capable de cliver le X-gal, générant un composé bleu. En incubant les cellules dans un tampon à pH 6,0 contenant du X-gal, il est possible de discriminer les cellules positives à l'activité SA β-gal des autres.

2. Matériel :

Tableau II.7

3. Méthode

A 72h après la dernière exposition aux UVB, les cellules sont repiquées à une densité de 1 000 cellules par cm² dans une plaque 6-puits. Le lendemain, le milieu de culture est retiré des cellules. Elles sont ensuite rincées 2 fois au PBS avant d'être fixées. Pour être fixées, les cellules sont incubées 5 min avec une solution de fixation contenant 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde dilués dans du PBS. Après l'incubation, les cellules sont rincées 2 fois au PBS avant d'être colorées. Les cellules sont incubées dans la solution de coloration à l'abri de la lumière pendant 12 à 16h dans une étuve humide à 37°C sans CO₂. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois au PBS puis une fois au méthanol puis séchées.

Pour déterminer la proportion de cellules positives pour la SA β -gal, 400 cellules sont comptées par puits. Le rapport entre les cellules colorées et le total des cellules permet de déterminer la proportion de cellules positives.

VII. RT PCR en temps réel

1. Principe

La PCR en temps réel, ou PCR semi-quantitative, permet de mesurer la quantité d'ADNc présent dans un échantillon. En sachant que la quantité d'ADNc est proportionnelle à la quantité d'ARNm, cette dernière peut être facilement quantifiée et comparée les différentes conditions testées.

Le principe de cette technique se base sur la mesure de la fluorescence émise par un agent intercalant se liant à l'ADN double brin, appelé SYBR green.

2. Matériel :

Tableaux II.8, 9 et 10

3. Méthode

Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN est une manipulation délicate qui doit se faire dans un environnement « RNase-free ». En effet, les RNases sont des enzymes dégradant l'ARN et donc la moindre contamination des échantillons par ces enzymes peut dégrader ceux-ci. Pour éviter la présence des RNases, la paillasse est entièrement nettoyée avec du SDS 1% et le matériel utilisé doit également être « RNase-free ».

Aux différents temps après la dernière exposition aux UVB ou après les stimulations au TGF- β 1, l'ARN des cellules est extraits en utilisant le RNeasy mini kit®. Le milieu de culture des cellules est décanté et 350 μ l de tampon RTL est ajouté aux cellules. Les cellules sont raclées dans ce tampon de lyse et le lysat cellulaire est transféré dans un eppendorf. Les lysats sont homogénéisés grâce à une seringue possédant une aiguille de 0,9 mm de diamètre. Ensuite, un volume de 350 μ l d'éthanol 70% est ajouté aux échantillons. 700 μ l de chaque échantillon sont transférés sur une colonne RNeasy placée dans un tube de 2 ml et centrifugé 15 sec à 10 000 rpm. Après la centrifugation, le tube est vidé et 700 μ l de tampon RW1 sont ajoutés à la colonne. De nouveau, les échantillons sont centrifugés 15 sec à 10 000 rpm. Ensuite, 500 μ l de tampon RPE sont ajoutés à la colonne et celle-ci est également centrifugée 15 sec à 10 000 rpm. 500 μ l de RPE sont de nouveau ajoutés, la centrifugation se fait à 10 000 rpm durant 2 min. La dernière étape est l'élution de l'ARN avec 25 μ l d'eau « RNase-free » qui sont ajoutés à la colonne placée dans un nouvel eppendorf, puis centrifugée à 10 000 rpm pendant 1 min. Les échantillons d'ARN sont conservés au congélateur à -20°C.

Le dosage d'ARN se fait en utilisant le spectromètre Nanodrop® (Spectrophotometer ND-100, Isogene, Life Science, Belgique).

Rétro-transcription

Cette technique permet de synthétiser de l'ADNc à partir d'ARN. La manipulation doit également se faire dans des conditions « RNase-free ».

La rétro-transcription se fait grâce au kit Transcriptor Reverse Transcription®. 1µg d'ARN total dilué dans 12 µl d'eau « RNase-free » est utilisé pour la rétro-transcription. 1 µl d'amorce oligo-dT est ajouté aux échantillons. Ce mélange est incubé pendant 10 min à 65°C pour ensuite être centrifugé brièvement. Après la centrifugation, 7 µl de mélange réactionnel (Tableau II.9) sont ajoutés à chaque échantillon. Les échantillons sont incubés 30 min à 55°C, centrifugés brièvement et ensuite, incubés 5 min à 85°C. L'ADNc obtenu se conserve à -20°C après une brève centrifugation.

PCR en temps réel

L'ADNc obtenu grâce à la rétro-transcription peut être utilisé pour effectuer la PCR en temps réel. Cependant, il doit être préalablement dilué 100 fois dans de l'eau « RNase-free » avant l'utilisation. La PCR en temps réel se fait dans une plaque 96-puits. Le mélange réactionnel est constitué de 2,5 µl d'amorce sens, de 2,5 µl d'amorce anti-sens, de 2,5 µl d'eau distillée et de 12,5 µl de SYBR green. Les amorces utilisées lors de la PCR en temps réel sont récapitulées dans le Tableau II.11. On ajoute à ce mélange 5 µl d'ADNc dilué 100 x.

Lorsque tous les puits sont remplis, la plaque est scellée avec un papier adhésif puis centrifugée 1 min à 600 rpm. La plaque est introduite dans l'appareil de real-time ABI PRISM 7900 HT.

La réaction PCR commence par 5 min à 95°C. Ensuite, les 40 cycles PCR s'effectuent de cette façon : 95°C pendant 15 sec suivies d'une min à 60°C.

Le principe de base de la quantification est le cycle seuil ou Ct. En effet, le cycle seuil est le cycle à partir duquel la fluorescence émise est différente du bruit de fond. Lorsque la quantité d'ADN est faible au départ, le Ct est élevé. La quantification de nos résultats a été réalisée par la méthode des Ct décrite par Shmittgen (Schmittgen, 2001).

VIII. Les cartes microfluidiques

1. Principe

Cette technique permet d'analyser l'expression de 384 gènes simultanément en réalisant pour chaque gène une réaction PCR. Pour ce faire, il faut d'abord rétrotranscrire l'ARN en ADNc et ensuite réaliser la PCR en temps réel sur ces cartes contenant dans chacun des puits une sonde Taqman et un couple d'amorces spécifiques.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'analyser de 1 à 8 échantillons en parallèle et d'analyser jusqu'à 384 réactions PCR en même temps.

La carte microfluidique utilisée lors de l'expérience a été mise au point pour être spécifique de la physiologie de la peau et pour permettre l'analyse simultanée de 96 gènes pour 4 échantillons par plaque (92 gènes d'intérêt et 4 gènes de référence) (**Tableau 12**).

2. Matériel :

Tableaux II.12, 13 et 14

3. Méthode

Extraction d'ARN

Cfr point précédent

Rétro-transcription

Avant de réaliser la rétro-transcription, il faut vérifier la qualité de l'ARN extrait. Cette étape est exécutée en utilisant un bio-analyseur Agilent 2100 d'Agilent Technologies, Belgique.

Si la qualité de l'ARN des échantillons est correcte, ceux-ci peuvent être employés pour la rétro-transcription, utilisant le kit « High-Capacity cDNA reverse transcription » (Applied Biosystems) (Tableau II.13).

Premièrement, 2 µg d'ARN sont dilués dans de l'eau « RNase-free » afin d'obtenir une concentration finale de 2 µg/10 µl. Ensuite, le mix de rétro-transcription est préparé, il contient 2 µl de RT buffer, 0,8 µl de dNTP mix, 2 µl de RT Random Primer, 1 µl de reverse transcriptase, 1 µl d'inhibiteurs de RNAses et 3,2 µl d'eau « RNase free ». Dans un tube PCR, 10 µl de mix sont ajoutés aux 10 µl d'échantillons d'ARN. Les tubes sont homogénéisés délicatement et centrifugés. La dernière étape est la rétro-transcription des échantillons en utilisant le thermocycler. La réaction se fait en 4 étapes, 10 min à 25°C suivies de 2h à 37°C puis 5 sec à 85°C pour terminer par un temps infini à 4°C. Lorsque la réaction est terminée, les échantillons sont conservés à -20°C.

Cartes microfluidiques

Par échantillon, il faut préparer un mélange contenant 100 ng d'ADNc dilué dans de l'eau RNase free pour atteindre 50 µl et 50 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (2 x). Le mélange est alors vortexé délicatement et est déposé dans une piste de chargement de la plaque 384 puits (Tableau II.14).

La plaque est ensuite centrifugée pour permettre la distribution du mélange dans les puits. La centrifugation se fait à 12 000 rpm pendant 1 min, et répétée 2 fois. La plaque est ensuite scellée. Finalement, la plaque est prête et peut être installée dans l'appareil pour réaliser la réaction de PCR en temps réel. Les cycles réalisés sont les suivant : 2 min à 50°C, 10 min à 94,5°C, suivi de 40 cycles de 30 s à 97°C et 1 min à 59,7°C.

IX. Western Blot

1. Principe

Cette technique permet de quantifier l'abondance d'une protéine se trouvant dans un échantillon cellulaire. Il est possible de mettre en évidence une différence d'abondance de la protéine entre les différentes conditions testées. La technique comprend 5 étapes : l'extraction protéique, le dosage protéique, l'électrophorèse, le transfert et la révélation.

Après avoir extrait les protéines des cellules, le lysat est chargé sur un gel de polyacrylamide. Les protéines migrent dans le gel et sont séparées en fonction de leur masse. Les protéines sont chargées négativement et sont soumises à un champ électrique, cette étape s'appelle l'électrophorèse. Lorsque la migration des protéines dans le gel est terminée, toutes les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF). Afin de détecter la protéine d'intérêt, un anticorps dirigé contre cette protéine est ajouté. Pour révéler la protéine d'intérêt, il faut incuber un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome avec la membrane. Cet anticorps reconnaît la partie fc de l'anticorps primaire. La révélation se fait en scannant la fluorescence.

2. Matériel :

Tableaux II.15, 16, et 17

3. Méthode

Extraction des protéines

Deux types d'extraction protéique ont été réalisés au cours de ce mémoire : l'extraction des protéines totales et l'extraction des protéines nucléaires.

Extraction des protéines totales :

Aux différents temps après le dernier stress UVB ou la stimulation au TGF- β 1, les protéines totales sont extraites à partir des fibroblastes de peau. Les cellules sont placées sur glace et rincées deux fois au PBS. Ensuite, 200 μ l tampon de lyse sont ajoutés et le tapis cellulaire est raclé. Finalement, le lysat cellulaire est transféré dans un eppendorf afin d'être centrifugé 10 min à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant est conservé à -20°C.

Extraction des protéines nucléaires :

Après les stimulations aux TGF- β 1 ou à 72h après le dernier stress UVB, les protéines nucléaires sont extraites. Pour réaliser l'extraction, deux boîtes de culture T75 par condition sont placées sur glace. Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées avec 5 ml de tampon de rinçage. Après avoir décanté le tampon de rinçage, les cellules sont incubées 8 min en présence de 10 ml de HB 1 x et ensuite, l'HB est enlevé.

Les cellules sont ensuite raclées dans 500 μ l de tampon de lyse 0,5% NP-40. Après cette étape, le lysat cellulaire est récupéré dans un eppendorf et il est possible de mettre ensemble les lysats cellulaires d'une même condition dans un même eppendorf. Ensuite, les échantillons sont centrifugés 30 sec à 13 000 rpm. Le surnageant est décanté et conservé à -20°C (il contient les protéines cytoplasmiques), le culot est resuspendu dans 25 μ l de RE complet. Après avoir resuspendu le culot, 25 μ l de SA complet est ajouté aux échantillons. Ceux-ci sont placés sur une roue à 4°C pendant 30 min, puis centrifugés 10 min à 13 000 rpm à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est conservé à -20°C.

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Cette technique permet de mesurer la quantité de protéines présente dans chacun des échantillons en utilisant un spectrophotomètre.

La solution utilisée est une solution de Bradford (Bio-Rad, Belgique) concentrée 5x à diluer dans de l'eau distillée. La solution doit être filtrée et conservée à l'abri de la lumière. Pour chaque mesure, 1 ml est mis dans un tube auquel on ajoute 2 μ l d'échantillon. Après avoir vortexé le mélange et l'avoir incubé 5 min, la lecture de l'absorbance peut se faire à 595 nm au spectrophotomètre.

Afin de doser la quantité de protéines présentes dans les échantillons, il faut réaliser une mesure avec un échantillon dont la concentration est connue. L'échantillon utilisé est de la BSA (Bovine Serum Albumine) concentrée à 2 ng/ml (Thermoscientifique, USA).

Pour calculer la concentration de protéines présentes dans les échantillons, une formule doit être utilisée :

$$\mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{(\text{moyenne DO}_{\text{échantillon}} - \text{moyenne DO}_{\text{blanc échantillon}}) / (\text{moyenne DO}_{\text{étalon}} - \text{moyenne DO}_{\text{eau}}) \times 5}{\text{Volume échantillon}}$$

Electrophorèse

La première étape de l'électrophorèse est le montage des plaques dans lequel le gel de polyacrylamide pourra polymériser. Les plaques sont rincées à l'eau distillée avant d'être placées l'une sur l'autre séparées par des spacers, elles sont ensuite placées dans le support. Le « running gel » ou gel de migration peut alors être préparé et coulé entre les plaques. Le gel est recouvert d'une couche d'isobutanol afin d'éviter qu'il ne soit en contact avec l'oxygène et ainsi permettre la polymérisation. Une fois que le gel est polymérisé, le « stacking gel » ou gel concentrateur peut être préparé. Il faut enlever l'isobutanol et bien rincer à l'eau distillée le gel avant de couler le gel concentrateur. Dès que le gel est coulé, le peigne est introduit afin de créer les puits de chargement lors de la polymérisation. Pendant la polymérisation du gel concentrateur, les échantillons sont préparés sur glace pour éviter la dégradation des protéines. Dans un eppendorf, 10 µg de protéines sont dilués dans du tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 dans un volume maximum de 20 µl. 5 µl de bleu de charge 5 x concentré sont ajoutés au mélange sous une hotte chimique. Les échantillons sont centrifugés avant d'être bouillis 4 min à 100°C. La dernière étape de la préparation des échantillons est une centrifugation pendant 5 min à 13 000 rpm.

Lorsque le gel concentrateur est polymérisé, le support contenant le gel est placé dans la cuve d'électrophorèse. Celle-ci est remplie de tampon d'électrophorèse. Les échantillons peuvent être chargés dans les puits de chargement, ainsi que l'étalon de poids moléculaire. L'électrophorèse peut commencer lorsque les électrodes sont branchées. Le programme de migration est de 200 volts, 15 watts (pour un seul gel) pendant 1h.

Transfert

Avant que la migration ne soit finie, il faut préparer le transfert. Premièrement, il faut découper une membrane et 4 papiers Whattman de la même taille que le gel. Ensuite, il faut réhydrater la membrane pendant 1 min dans du méthanol. La membrane est ensuite plongée dans du tampon de transfert pendant 15 min.

Lorsque la migration est finie, le gel peut être démoulé, le gel est déposé dans le tampon de transfert pendant le montage du système en « sandwich ». Une éponge et deux papiers Whattman sont posés dans l'appareil de transfert, puis la membrane et le gel sur la membrane. Pour terminer, deux papiers Whattman et une éponge sont posés sur le gel. Finalement, le transfert peut commencer en utilisant un voltage dépendant de la taille du gel ($1 \text{ cm}^2 = 1 \text{ mA}$), le temps de transfert est de 2h afin que les protéines soient bien transférées du gel sur la membrane.

Blocking et révélation

Après le transfert, la membrane doit être bloquée dans la solution bloquante licor diluée 2 x dans du PBS pendant 1h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Ce blocage évite que l'anticorps primaire ne se fixe de manière aspécifique aux protéines présentes sur la membrane. Ensuite, la membrane est incubée 30 min à 37°C avec l'anticorps primaire dilué dans de la solution licor non diluée contenant 0,1% tween (Tableau II.18). La membrane est rincée 4 fois pendant 5 min avec du PBS-T 0,1% après l'incubation. Elle est ensuite incubée pendant une heure à l'abri de la lumière avec l'anticorps secondaire dilué dans de la solution licor non diluée contenant 0,1% de tween (Tableau II.19). La membrane est de nouveau rincée 4 fois pendant 5 min au PBS-T 0,1% et deux fois au PBS sans tween pendant 1 min.

Pour révéler la membrane, il faut la faire sécher pendant 30 min dans une chambre à 37°C à l'abri de la lumière. La révélation peut ensuite se faire en utilisant le scanner odyssey licor (Li-Cor, Biosciences, USA). La quantification des bandes se fait grâce au logiciel Odyssey. La membrane peut soit être utilisée pour réhybrider une autre protéine soit être conservée entre deux papiers Whattman. Pour la réutiliser, il faut la réhydrater 1 min dans du méthanol, puis la bloquer et recommencer le protocole.

X. Immunofluorescence

1. Principe

Cette technique permet de localiser et de détecter la présence d'une protéine d'intérêt dans la cellule en fluorescence.

Le marquage en immunofluorescence se base sur le principe de l'anticorps qui reconnaît son antigène. En effet, après avoir perméabilisé les cellules, les anticorps ciblés contre la protéine d'intérêt peuvent s'y fixer. Pour permettre la visualisation, il faut ajouter un anticorps secondaire, reconnaissant le premier anticorps, couplé à un fluorochrome. La visualisation se fait grâce au fluorochrome qui en absorbant de la lumière est capable de la réémettre sous forme de lumière fluorescente. Les lames sont ensuite analysées à l'aide d'un microscope confocal.

2. Matériel :

Tableau II.20

3. Méthode

Les images d'immunofluorescence ont été obtenues sur des cellules qui ont été soit stimulées au TGF- β 1 soit exposées aux UVB. D'autre part, les protéines d'intérêt ont été analysées à long terme et à court terme après les stress ou la stimulation, entraînant des modifications de protocole.

Pour étudier la réponse cellulaire après une stimulation au TGF- β 1, les cellules ont été repiquées à une densité de 10 000 cellules par puits dans une plaque 24-puits. Le lendemain, les cellules ont été stimulées 2h avec du TGF- β 1.

Pour étudier les protéines d'intérêt lorsque les cellules sont stimulées 72h au TGF- β 1, les cellules sont repiquées dans des plaques 24-puits juste après la stimulation.

La réponse cellulaire peut être analysée 2h après le stress UVB. Pour ce faire, 1h après le 8^{ème} stress UVB, les cellules sont repiquées sur des couvre-objet stériles dans les plaques 24-puits à une densité de 10 000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules sont soumises aux 2 derniers stress UVB.

Pour obtenir la visualisation des protéines d'intérêt à long terme, les cellules sont repiquées dans du milieu de culture complet contenant 1% FCS, à une densité de 10 000 cellules par puits 72h après le dernier stress UVB.

Après 2h de stimulation ou de stress sur couvre-objets ou 24h après le repiquage sur couvre-objets, les cellules sont fixées 10 min avec 500 μ l de PBS-PFA 4% et ensuite rincées 3 x au PBS. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec du PBS-Triton X-100 0,3% pendant 5 min. Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS-BSA 3%. Le PBS-BSA 3% du dernier rinçage est incubé pendant 30 min avec les cellules pour permettre de les bloquer. Pendant le temps

d'incubation, une chambre humide est préparée, elle est composée d'une boîte de pétri, d'une feuille de papier Whatman humidifiée de la dimension de la boîte et d'un morceau de parafilm. Sur le parafilm, une goutte de 30 μ l de l'anticorps dilué dans du PBS-BSA 3% est posée (Tableau II.18). Ensuite, chaque couvre-objet est retourné de manière à déposer la face du couvre-objet avec les cellules sur la goutte d'anticorps. La chambre humide est refermée, entourée de parafilm et incubée à 4°C pendant toute la nuit. Le lendemain, les couvre-objets sont rincés 3 fois au PBS-BSA 3%. De nouveau, une chambre humide est préparée, et une goutte de 30 μ l d'anticorps secondaire dilué est déposée sur le parafilm et les couvre-objets sont placés pendant 1h à température ambiante sur l'anticorps secondaire (Tableau II.19). La chambre humide est préservée à l'abri de la lumière pour éviter de dégrader le fluorochrome. La dernière étape de l'immunofluorescence est le marquage des cellules au TO-PRO-3 pour marquer les noyaux. Après avoir été incubées une heure avec l'anticorps secondaire, les cellules sont de nouveau rincées 2 fois au PBS-BSA 3% et une fois au PBS. Dans la chambre humide, une goutte de 30 μ l de TO-PRO-3 dilué 80x dans de la RNase est déposée sur le parafilm et les cellules incubées 35 min avec le TO-PRO-3. Après l'incubation, les cellules sont rincées 3 fois au PBS avant que les couvre-objets ne soient montés sur des lames porte-objets. Le montage se fait grâce à du Mowiol préchauffé à 60°C. Les lames sont placées dans la chambre à 4°C pour être regardées au microscope confocal (Leica, Allemagne).

Lors de ce travail, nous avons essayé de comprendre quels étaient les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence induite prématurément par les stress UVB.

La première étape a été d'induire la sénescence prématurée par le TGF- β 1 et d'étudier si les protéines de la voie de signalisation du TGF- β 1 et plus particulièrement la voie des Smads étaient activées.

Ensuite, nous avons induit la sénescence prématurée des fibroblastes humains de derme (FHDs) en les exposant aux UVB. Nous avons analysé si la voie du TGF- β 1 était impliquée lorsque la sénescence était induite par les UVB. Pour cela, nous avons supprimé l'action de cette cytokine grâce à des anticorps neutralisants ou des siRNA après les stress UVB.

La dernière partie de ce travail consiste à étudier l'implication d'autres voies de signalisation dans l'induction de la sénescence prématurée par les UVB. Nous avons analysé l'implication des MAPK et plus particulièrement de p38^{MAPK} qui semble être un candidat intéressant dans la SIPS. Nous avons donc utilisé des siRNA spécifiques de l'ARNm de p38^{MAPK} afin d'étudier si l'inhibition de son expression avait un impact sur l'apparition des biomarqueurs de la sénescence induits après les stress UVB.

I. Induction de la sénescence prématurée des fibroblastes humains de derme par le TGF- β 1

Divers travaux menés au laboratoire (Fripiat et al., 2001, Fripiat et al., 2002, Debacq-Chainiaux et al., 2005) ont montré que le TGF- β 1 est capable d'induire la sénescence prématurée des fibroblastes. Toutefois, les mécanismes moléculaires par lesquels sont induits les biomarqueurs de la sénescence prématurée après cette stimulation au TGF- β 1 sont toujours inconnus. Lors de ce travail, nous avons vérifié l'induction de la sénescence prématurée après stimulation des FHDs pendant 72h au TGF- β 1 (1 ng/ml). Plusieurs biomarqueurs spécifiques de la sénescence seront étudiés tels que l'activité de la SA β -galactosidase (SA β -gal) et la modification de l'expression de gènes associés à la sénescence. La deuxième partie de ce travail consiste à étudier si les Smads, des protéines impliquées dans la voie de transduction du signal du TGF- β 1, sont activées lors de la sénescence prématurée induite par le TGF- β 1.

1. Détection de l'activité SA β -gal

La SA β -gal est décrite comme un biomarqueur efficace de la sénescence prématurée induite par les stress et de la sénescence répliquative autant *in vitro* qu'*in vivo* (Dimri et al., 1995). Nous avons étudié ce biomarqueur pour vérifier si la sénescence prématurée était induite par le TGF- β 1.

Lorsque les cellules sont stimulées avec 1 ng/ml de TGF- β 1 pendant 72h, une augmentation de l'activité de la SA β -gal est observée (**Figure III.1**). On observe une augmentation hautement significative de 1,4 x du nombre de cellules positives à la SA β -gal chez les cellules stimulées par rapport aux cellules dites « contrôles ». Debacq-Chainiaux *et al.* avait précédemment montré que la stimulation des cellules au TGF- β 1 permettait d'augmenter la proportion de cellules positives pour cette activité enzymatique (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

2. Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence

Gonos et al. ont montré que certains gènes étaient surexprimés lors de la sénescence répliquative. Parmi ceux-ci, on retrouve l'*apolipoprotéine J*, l'*ostéonectine*, la *fibronectine* et la *transgéline (SM22)* (Gonos et al., 1998). Dumont *et al.* ont montré que ces gènes pouvaient être aussi associés à la sénescence induite prématurément par les stress (Dumont et al., 2000). Nous avons également analysé l'expression du *CTGF (Connective Tissue Growth Factor)*, un gène dépendant du TGF- β 1 et surexprimé lors de la sénescence répliquative et de la SIPS (Kim et al., 2004), ainsi que l'expression de *p21^{waf-1}* et *p53* intervenant dans l'arrêt du cycle cellulaire, de l'*IGFBP3 (Insulin like Growth FactorBinding protein 3)* et du *TGF- β 1* lui-même. Nous avons analysé l'expression de ces gènes lorsque les cellules sont stimulées 72h avec 1 ng/ml de TGF- β 1. L'abondance relative des transcrits a été réalisée par une PCR en temps réel semi-quantitative (**Figure III.2**). La *GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate déshydrogénase)* a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation des données. Nous avons considéré qu'une abondance relative de l'ARNm devait être supérieure à 1,3 pour être considérée comme surexprimée et inférieure à 0,7 pour être considérée comme réprimée.

L'expression relative de l'*apo J* est surexprimée de 3,6 x lorsqu'on compare le niveau relatif d'ARNm dans les cellules stimulées et dans les cellules contrôles. Il a été montré que l'expression du gène de l'*apo J* peut être modulée par des cytokines telles que le TGF- β 1. Le TGF- β 1 permet l'expression du gène via le site de liaison d'AP-1 présent dans le promoteur du gène de l'*apo J* (Jin and Howe, 1997). Les abondances relatives de l'*ostéonectine* et de la *fibronectine* sont également surexprimées de l'ordre de 1,3 et de 2,8 x respectivement chez les cellules stimulées. Reed et al. ont montré qu'une stimulation au TGF- β 1 (10 ng/ml) pendant 44h de fibroblastes de derme augmentait l'expression de l'*ostéonectine* (Reed et al., 1994). Le niveau relatif d'ARNm du *CTGF* est augmenté significativement de 3,6 x dans ces conditions. Le *CTGF* est un gène dépendant du TGF- β 1, il possède dans son promoteur un élément de réponse au TGF- β 1 (Kim et al., 2004).

Au niveau de gènes codants pour des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, nous détectons une surexpression de *p21^{waf-1}* (2,5 x) et une répression de *p53* (0,57 x).

Enfin, l'abondance relative du *TGF- β 1* est surexprimée de 1,5 x dans les cellules stimulées au *TGF- β 1*. Frippiat *et al.* et Debacq-Chainiaux *et al.* avaient montré dans les fibroblastes de poumon fœtal que la stimulation avec du TGF- β 1 entraînait une augmentation de l'expression de son propre gène. L'expression de l'*IGFBP3* n'est pas modifiée lors de la stimulation (Frippiat et al., 2001, Debacq-Chainiaux et al., 2005).

Au vu de ces résultats, nous avons confirmé les résultats observés précédemment au laboratoire (Frippiat et al., 2001, Frippiat et al., 2002, Debacq-Chainiaux et al., 2005). L'apparition de ces biomarqueurs de la sénescence permet de confirmer que le TGF- β 1 est un inducteur de la sénescence prématurée chez les FHDs.

3. Analyse de l'expression de gènes associés à la peau

Afin de réaliser une étude plus complète des modifications de l'expression génique suite à une stimulation des FHDs au TGF- β 1 durant 72h, nous avons analysé l'expression de 92 gènes associés à la physiologie de la peau en utilisant une carte microfluidique personnalisée (Applied Biosystems, voir partie matériel et méthode). La *GAPDH* a été utilisée comme gène de référence pour l'analyse des résultats.

Parmi ces 92 gènes, nous avons trouvé 15 gènes dont l'abondance relative est augmentée et dont l'abondance est diminuée (**Figure III.3**).

Parmi les gènes dont l'expression est surexprimée chez les cellules stimulées au TGF- β 1 pendant 72h, on trouve le gène *CDKN2A* (*p16^{INK4-a}*). Ce gène code pour une protéine inhibitrice de kinases dépendantes de cyclines (CDKI) qui intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire (Herbig and Sedivy, 2006). De même, *Gadd45a* (*Growth-arrest and DNA Damage-inducible 45a*), un gène codant pour une protéine impliquée dans la prolifération cellulaire, dans la réplication et la réparation de l'ADN, est également surexprimé dans les cellules stimulées au TGF- β 1 (Hildesheim et al., 2002). Dans l'article de Kloth et al., *Gadd45a* est surexprimé dans les cellules HeLa après une stimulation de 6 jours au TGF- β 1 (Kloth et al., 2005). Nous avons également remarqué la surexpression de gènes permettant un réarrangement de la matrice extracellulaire (MEC). L'abondance relative de l'ARNm de *TIMP-1* (*Tissue inhibitor metalloproteinases 1*), un inhibiteur de métalloprotéinases et de *MMP-2*, une métalloprotéinase, est augmentée chez les cellules stimulées au TGF- β 1. *MMP-2* hydrolyse le collagène de la MEC. Il a été rapporté que l'expression de *MMP-2* est augmentée dans les HNEC (Human Nasal Epithelial Cells) lorsque les cellules sont stimulées avec 5 ng/ml de TGF- β 1 pendant 24h (Lechapt-Zalcman et al., 2006). L'expression du gène *COL7A1* est également augmentée dans les cellules stimulées au TGF- β 1. Ce gène code pour le collagène de type VII, une protéine de la MEC. Naso et al. ont montré que l'expression du gène était augmentée dans des kératinocytes de souris lorsque l'on ajoutait du TGF- β 1 dans le milieu de culture (Naso et al., 2003). L'expression de la *transgeline* (*SM22*) est également surexprimée dans les cellules stimulées au TGF- β 1. Frippiat *et al.* avait également montré que l'abondance relative de l'ARNm de la *transgeline* était augmentée lorsqu'on stimulait des fibroblastes avec 1 ng/ml de TGF- β 1 pendant 72h (Frippiat et al., 2001).

L'expression de facteurs de croissance est également modifiée lorsque les cellules sont stimulées au TGF- β 1. L'expression de *GDF15* (*Growth and differentiation Factor 15*) est surexprimée dans les cellules stimulées au TGF- β 1. Cette protéine sécrétée appartient à la famille du TGF- β . L'expression de *GDF15* est activée par différentes cytokines telles que le TGF- β ou l'IL-1 (Ago and Sadoshima, 2006). L'expression de l'*IGFBP7* (Insulin Growth Factor Binding Protein 7) est également modulée positivement après traitement des cellules avec le TGF- β 1. Dans des cellules A549, une lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome de poumon, il s'est avéré que l'*IGFBP7* est surexprimé lorsque les cellules sont stimulées avec 5 ng/ml de TGF- β 1 pendant 24h (Ranganathan et al., 2007). Ce gène est responsable de la régulation de la signalisation de l'insuline (Nousbeck et al., 2010). L'expression de l'*aquaporine 3* (*AQP 3*) est également modifiée lorsque le TGF- β 1 est ajouté aux cellules. L'*AQP3* est une protéine canal qui est induite après des stress (**Figure III.3**) (Hara-Chikuma and Verkman, 2008).

Parmi les gènes dont l'expression est réprimée chez les cellules stimulées au TGF- β 1, on retrouve *MMP-1* et la *fibromoduline* (*FMOD*), deux gènes dont les protéines sont impliquées dans la composition de la MEC. *FMOD* est une protéine liant le collagène, elle permet de

faire le lien entre différents éléments de la MEC, démontrant son importance dans le remodelage de la MEC. Elle est également capable de lier le TGF- β 1 permettant ainsi une régulation de son action (Levens et al., 2005). MMP-1 est une métalloprotéinase dégradant les collagènes de type I, II et III (**Figure III.3**).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé des vérifications par PCR en temps réel «classique» au SYBR Green. Nous avons confirmé le changement d'expression de *p16^{INK-4a}*, de *Gadd45a* et de l'*IL-8* (**Tableau III.1**), d'un ordre de grandeur comparable aux valeurs obtenues par carte microfluidique.

4. Implication des protéines Smads dans l'induction de la sénescence prématurée par le TGF- β 1

Après avoir confirmé que le TGF- β 1 induisait la sénescence prématurée, nous avons voulu analyser si les protéines Smads étaient impliquées dans l'induction de ce phénotype. Les Smads permettent la transduction du signal par le TGF- β 1. En effet, après avoir été activées par le récepteur, elles permettent ou inhibent la transcription de gènes cibles du TGF- β 1. Nous avons premièrement étudié l'activation des Smads après une courte stimulation (2h) des cellules au TGF- β 1. Ensuite, nous avons analysé si les protéines étaient activées lorsque la sénescence prématurée était induite par une stimulation de 72h à 1 ng/ml de TGF- β 1.

a) Profil d'abondance de Smad 2 et de Smad 3 après 2h de stimulation au TGF- β 1 dans des extraits nucléaires et cytoplasmiques

Pour tester si l'abondance de Smad 2 et Smad 3 est modifiée après une stimulation de 2h avec 10 ng/ml TGF- β 1, nous avons réalisé des extraits protéiques nucléaires et cytoplasmiques après la stimulation. Nup 98 a été utilisé comme contrôle de charge.

En analysant la **Figure III.4**, nous pouvons remarquer une augmentation de l'abondance des protéines Smad 2 et Smad 3 dans les échantillons nucléaires lorsque les cellules sont stimulées pendant 2h au TGF- β 1. D'autre part, nous remarquons une légère diminution de l'abondance des deux protéines dans les extraits cytoplasmiques des cellules stimulées par rapport aux cellules contrôles.

Ces observations confirment une modification d'abondance protéique de Smad 2 et Smad 3 après 2h de stimulation au TGF- β 1 ainsi qu'une localisation nucléaire de ces deux protéines. Ceci laisse suggérer une activation et une translocation nucléaire de Smad 2 et de Smad 3 à court terme après une stimulation au TGF- β 1.

b) Abondance et localisation des protéines Smads après 2h de stimulation au TGF- β 1

Nous avons testé si, par marquage en immunofluorescence, nous pourrions mettre en évidence une modification de l'abondance ainsi qu'une translocation nucléaire des protéines Smads. Nous avons analysé la localisation de P-Smad 2, Smad 2, P-Smad 3 et Smad 3 après avoir stimulé les cellules avec 10 ng/ml de TGF- β 1 pendant 2h, sur les cellules préalablement repiquées sur couvre-objet (C.O.).

Au niveau de la localisation des Smads, nous observons une localisation cytoplasmique et nucléaire de Smad 2 et Smad 3. Les formes phosphorylées des deux protéines sont quant à elles essentiellement détectées au niveau du noyau (**Figure III.5**).

Au niveau de l'abondance de ces protéines, nous remarquons une augmentation de l'abondance de Smad 2, P-Smad 2 et Smad 3 chez les cellules stimulées au TGF- β 1, et ce, principalement au niveau du noyau, ce qui confirme les résultats obtenus par western blot (**Figure III.4**).

Au vu de ces résultats, nous pouvons dire qu'une courte stimulation au TGF- β 1 induit une activation rapide des Smads. En effet, dans plusieurs lignées cellulaires différentes, il a été démontré que les Smads sont activées rapidement après la stimulation au TGF- β 1. Ensuite, l'abondance de ces protéines diminue au cours du temps (Nicolas and Hill, 2003).

c) Profil d'abondance des protéines Smads après 72h de stimulation au TGF- β 1

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'abondance et à la localisation des protéines Smads après 72h de stimulation avec 1 ng/ml de TGF- β 1, condition induisant la sénescence prématurée des FHDs. Pour ce faire, les protéines totales ont été extraites des cellules contrôles ou stimulées pendant 72h avec 1 ng/ml de TGF- β 1.

On peut remarquer que l'abondance des protéines Smad 3 et P-Smad 3 augmente lorsqu'on stimule les cellules au TGF- β 1 pendant 72h. Ces protéines sont activées par le TGF- β 1 lors de l'induction de la sénescence prématurée par la cytokine (**Figure III.6**).

d) Abondance et localisation des protéines Smads après 72h de stimulation au TGF- β 1

Nous avons réalisé un marquage en immunofluorescence afin d'étudier si l'abondance et la localisation des protéines Smads étaient modifiées lors de l'induction de la sénescence prématurée suite à une stimulation de 72h au TGF- β 1 (1 ng/ml).

Au niveau de l'abondance des Smads après stimulation au TGF- β 1, nous pouvons noter une augmentation de Smad 2, Smad 3 et Smad 4 chez les cellules stimulées et ce, principalement au niveau du noyau. Une modification plus légère a également pu être mise en évidence pour P-Smad 2 et P-Smad 3 après stimulation au TGF- β 1. Au niveau de la localisation, elle semble essentiellement nucléaire, exceptée pour Smad 2, on détecte également la protéine dans le cytoplasme (**Figure III.7**). Ces observations confirment les résultats obtenus par western blot.

En conclusion, nous avons montré que lorsque les FHDs étaient stimulés 72h au TGF- β 1 (1 ng/ml), ceci induisait une sénescence prématurée (activation de la SA β -gal, modification de l'expression de gènes associés à la sénescence). Dans ces conditions, nous avons montré que les protéines Smads étaient surexprimées et principalement localisées au niveau des noyaux, ce qui semble confirmer une activation de la voie de transduction du signal dépendante des Smads.

Dans la deuxième partie de ces résultats, nous étudierons l'implication du TGF- β 1 via la voie des Smads dans l'induction de la sénescence prématurée induite par les UVB.

II. Induction de la sénescence prématurée des FHDs suite à des expositions répétées aux UVB

Afin d'induire la sénescence prématurée par les UVB, nous avons suivi le protocole utilisé dans le modèle de Debacq-Chainiaux *et al.* (Debacq-Chainiaux et al., 2005). Les FHDs ont été exposés deux fois par jour pendant 5 jours à 250 mJ/cm² d'UVB. La quantité d'UVB est subcytotoxique et n'entraîne donc aucune mortalité cellulaire.

Nous avons étudié si l'exposition aux UVB entraîne une sénescence prématurée en étudiant l'activité de la SA β -gal et la modification de l'expression de gènes associés à la sénescence.

1. Détection de l'activité de la SA β -galactosidase

Nous observons une augmentation hautement significative de 1,5 x de la proportion de cellules positives à la SA β -gal chez les cellules stressées aux UVB par rapport aux cellules contrôles (**Figure III.8**). Ces résultats sont concordants avec les résultats préalablement obtenus au laboratoire (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

2. Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence

Après avoir étudié l'activité de la SA β -gal, nous nous sommes intéressés à l'expression de gènes associés à la sénescence. Nous avons étudié l'expression des mêmes gènes que lorsque la sénescence était induite par le TGF- β 1 : l'*apo J*, l'*ostéonectine*, la *fibronectine*, le *CTGF*, *p21^{waf-1}*, *p53*, l'*IGFBP3* et le *TGF- β 1*. Nous avons étudié l'expression de ces gènes à différents temps après le dernier stress UVB : 1h, 16h, 40h et 72h. Nous avons utilisé l'abondance relative de la *GAPDH* pour normaliser nos résultats (**Figure III.9**).

Nous pouvons noter la surexpression de ces 8 gènes à 72h après le dernier stress UVB confirmant ainsi l'induction de la SIPS. De plus, nous pouvons grâce à cette cinétique mettre en évidence différents types de profils d'expression. En effet, certains gènes tels que l'*apo J*, l'*ostéonectine*, le *CTGF* et *p21^{waf-1}* sont surexprimés directement après le dernier stress UVB et cette surexpression est maintenue jusque 72h. D'autres gènes, tels que la *fibronectine*, *p53*, le *TGF- β 1* et l'*IGFBP3* ne montrent pas ou peu de modification d'expression aux différents temps testés, mais sont tous surexprimés à long terme (72h) après le dernier stress, lorsque la SIPS est installée.

Nous avons montré que 10 expositions de 250 mJ/cm² en cinq jours induisaient la sénescence prématurée des FHDs. En effet, on détecte une proportion plus élevée de cellules positives à l'activité SA β -gal et certains gènes associés à la sénescence sont surexprimés.

3. Analyse de l'expression de gènes associés à la peau

Afin d'étudier les modifications de l'expression d'un plus grand nombre de gènes lorsque la SIPS est induite par les UVB, nous avons également utilisé la carte microfluidique permettant l'analyse de l'expression de 92 gènes associés à la physiologie de la peau.

Nous constatons une surexpression de 45 gènes lorsqu'on expose les cellules aux UVB. Aucune répression n'a été mise en évidence (**Figure III.10**).

Parmi ces gènes, nous trouvons des gènes associés à la sénescence tels que *SPARC* (*ostéonectine*), *FN* (*fibronectine*), *GLB1* (β -*galactosidase*) et *TGF- β 1* (Debacq-Chainiaux et al., 2005, Debacq-Chainiaux et al., 2009). D'autres gènes sont également surexprimés, tels que des gènes intervenant dans l'arrêt du cycle cellulaire tels que *CDKN1A* (*p21^{waf-1}*), *CDKN2A* (*p16^{INK-4a}*) et *p53*.

Nous remarquons également que l'expression de gènes intervenants dans la composition de la MEC est également surexprimée : *MMP-1*, *MMP-3*, *TIMP-1*, *TIMP-2*, *COL4A5*, *COL3A1*. Il a été montré que les métalloprotéinases MMP-1 et MMP-3 sont surexprimées lorsque les cellules sont exposées aux UVB ou aux UVA (Brenneisen et al., 1999). *COL4A5* et *COL3A1* sont deux gènes surexprimés en fonction de l'âge du donneur (de Magalhaes et al., 2009).

Un troisième groupe de gènes rassemble des gènes intervenants dans la réparation de dommages. L'abondance relative de l'ARNm de *MSRA* et *MSRB2* (*Methionine sulfoxide reductase*) est également surexprimée chez les cellules exposées aux UVB. Les protéines MSRA et MSRB ont une fonction de réparation des protéines modifiées par l'oxydation. Elles éliminent l'oxydant par la formation de sulfoxydes de méthionine. Rappelons qu'il a été montré que les UVB pouvaient induire l'apparition de ROS dans la cellule, ce qui peut engendrer des modifications des protéines (Cabreiro et al., 2006). MSRA et MSRB2 ont peut-être une action d'élimination des dommages dus aux ROS lors de la sénescence prématurée induite par les UVB. D'autres gènes pouvant également avoir une fonction de réparation sont également surexprimés dans les cellules exposées aux UVB: *Gadd45a* et *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*), intervenants dans la réparation des dommages à l'ADN.

L'expression des gènes codant pour les récepteurs de l'acide rétinoïque α et β (*RAR α/β*) est également surexprimée dans les cellules exposées aux UVB. Dans des fibroblastes humains où l'acide rétinoïque a été induit, on se rend compte que *RAR β* est surexprimé dans les cellules avec une capacité de prolifération limitée (Swisshelm et al., 1994).

L'expression de l'*AQP3* est également modifiée lorsque les cellules sont soumises aux UVB. Cette protéine joue un rôle essentiel dans l'homéostasie des fluides du corps puisqu'elle permet le passage du glycérol et de l'urée (Li et al., 2010). L'expression de l'*AQP3* est augmentée dans la peau humaine lorsque celle-ci est soumise à des stress (Hara-Chikuma and Verkman, 2008).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé des vérifications par PCR en temps réel semi-quantitative avec SYBR Green. Nous avons confirmé le changement d'expression de *p21^{waf-1}*, de *p16^{INK-4a}*, de *Gadd45a*, de *p53*, de l'*ostéonectine*, de la *fibronectine*, de *SM22* et du *TGF- β 1*, dans des ordres de grandeurs comparables, ce qui confirme les résultats obtenus par carte microfluidique (**Tableau III.2**).

III. La neutralisation du TGF- β 1 inhibe le phénotype associé à la sénescence prématurée induite par les UVB

Précédemment, nous avons confirmé que la stimulation des FHDs au TGF- β 1 permettait d'induire la sénescence prématurée des cellules. De plus, nous avons montré que l'abondance relative de l'ARNm du TGF- β 1 était surexprimée après les stress UVB. Des résultats préalablement obtenus au laboratoire avaient également montré que le niveau protéique du TGF- β 1 était augmenté après les stress UVB.

A présent, nous voulons étudier si l'inhibition du TGF- β 1 après les stress UVB permet d'empêcher l'apparition du phénotype sénescence. Pour ce faire, nous avons utilisé des anticorps neutralisant le TGF- β 1 ou des siRNA dont la cible est l'ARNm du TGF- β 1. Nous avons étudié l'apparition des biomarqueurs de la sénescence tels que la détection de la SA β -gal et la modification de l'expression de gènes associés à la sénescence.

1. Utilisation d'anticorps neutralisants

Le TGF- β 1 est une cytokine sécrétée dans le milieu par la cellule. Le TGF- β 1 induit une cascade de signalisation en se fixant sur la partie extracellulaire de son récepteur (Derynck and Zhang, 2003). En utilisant des anticorps capables de se lier à la cytokine, la cascade de signalisation ne se produit plus et les réponses induites par le TGF- β 1 seront inhibées.

Les cellules sont exposées à une dose subcytotoxique d'UVB (250 mJ/cm²) deux fois par jour pendant 5 jours. Après le dernier stress, les cellules sont incubées avec l'anticorps neutralisant le TGF- β 1 (3 μ g/ml) dilué dans le milieu de culture pendant 72h. Ce milieu de culture est renouvelé toutes les 24h. Les différents biomarqueurs sont étudiés 72h après le dernier stress UVB.

a) Détection de l'activité de la SA β -gal

Nous observons une augmentation de 1,8 x de la proportion de cellules positives pour la SA β -gal chez les cellules exposées aux UVB par rapport aux cellules contrôles. Par contre, une fois que les cellules sont incubées avec les anticorps neutralisant le TGF- β 1 après la dernière exposition aux UVB, nous ne détectons plus de différence entre les cellules contrôles et les cellules exposées aux UVB. La neutralisation du TGF- β 1 a donc bloqué l'apparition de ce biomarqueur (**Figure III.11**).

b) Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence

Nous avons analysé l'expression de gènes associés à la sénescence après inhibition du TGF- β 1 par des anticorps neutralisants. L'expression de l'*apo J*, l'*ostéonectine*, la *fibronectine*, le *CTGF*, *p21^{waf-1}*, *p53*, l'*IGFBP3* et le *TGF- β 1* ont été analysées par PCR en temps réel semi-quantitative. La *GAPDH* a été utilisée comme gène de référence.

Nous avons pu remarquer que l'expression de certains gènes était fortement réprimée lorsqu'on incubait les cellules avec les anticorps neutralisant le TGF- β 1 (**Figure III.12**). Par

exemple, l'expression de la *fibronectine*, du *CTGF* de l'*IGFBP3* et de *p21^{waf-1}* est réprimée chez les cellules incubées avec les anticorps neutralisants. Toutefois, il semble que ce soit le niveau « basal » d'expression de ces gènes qui soit affecté et non le niveau d'expression induit par les UVB. En effet, on remarque toujours une augmentation d'abondance relative de l'*apo J*, de l'*ostéonectine*, de la *fibronectine*, du *CTGF*, de *p21^{waf-1}*, du *TGF-β1* et de l'*IGFBP3* chez les cellules exposées aux UVB et incubées avec les anticorps neutralisants par rapport aux cellules contrôles, incubées avec l'anticorps anti-TGF-β1.

Lorsque nous analysons ces résultats, nous pouvons remarquer que le blocage de la voie du TGF-β1 grâce à des anticorps neutralisants semble protéger les cellules exposées aux UVB de l'augmentation de la proportion des cellules positives à la SA β-gal. De plus, ce blocage induit une répression de certains gènes associés à la sénescence. Malheureusement, nous avons essayé de répéter l'expérience plusieurs fois mais les résultats obtenus étaient différents, l'anticorps neutralisant ne semblait plus fonctionner correctement. Cette variabilité inter-lot d'anticorps neutralisants a été également détectée par d'autres chercheurs de notre équipe.

Afin de pallier cette variabilité, nous avons décidé d'étudier l'apparition des biomarqueurs de la sénescence en bloquant la voie du TGF-β1 via l'utilisation de siRNA spécifiques de l'ARNm du TGF-β1.

2. Utilisation de siRNA TGF-β1

Les siRNA (Small Interfering RNA) sont des petits ARN simple brin de 21-23 pb. Ces ARN sont capables de s'hybrider à un brin d'ARN complémentaire. Les cellules reconnaissent le complexe d'ARN double brin et entraînent la dégradation de cette molécule. Différents complexes protéiques interviennent pour dégrader l'ARN double brin tels que RISC (RNA-Induced Silencing Complex).

Dans la nature, les cellules utilisent ce mécanisme pour se défendre contre les virus à ARN double brin. A présent, il est possible de synthétiser des siRNA ciblés contre l'ARNm d'une protéine d'intérêt. Ainsi, l'ARNm de la protéine est dégradé et l'abondance de la protéine est diminuée dans la cellule (Mello and Conte, 2004).

Nous nous basons sur ce principe afin de supprimer l'ARNm du TGF-β1 et de supprimer la protéine de la cellule.

a) Mise au point d'un modèle d'inhibition du TGF-β1 par l'utilisation de siRNA

Nous avons utilisé un mélange de 4 siRNA spécifiques du TGF-β1 (Smartpool siRNA, Dharmacon) qui assure une inhibition spécifique et quasi complète de l'ARNm d'intérêt. Dans un premier temps, nous avons testé différentes concentrations de siRNA contre le TGF-β1 afin d'établir la concentration optimale de siRNA lors de la transfection afin d'inhiber l'expression du TGF-β1.

Afin d'inhiber l'expression du TGF-β1 dès le début de la semaine de stress, nous avons transfecté une première fois les cellules avec 20 nM, 50 nM et 100 nM de siRNA TGF-β1 la veille du premier jour de stress. Etant donné que le protocole de stress nécessite une culture cellulaire assez longue (10 jours), nous avons réalisé une deuxième transfection avec les mêmes concentrations le 4^{ème} jour de stress, après le dernier stress UVB, afin de prolonger

l'inhibition du TGF- β 1 (**Tableau III.3**). Nous avons également transfecté des cellules avec un siRNA Non Targeting Smartpool (NTS). Ce siRNA est un mélange de 4 séquences d'acides nucléiques non spécifiques. Le NTS sert de contrôle afin de savoir si la transfection a un effet sur le phénotype observé avec le siRNA d'intérêt. L'expression du *TGF- β 1* a été étudiée à 72h après le dernier stress UVB par PCR semi-quantitative en utilisant la *GAPDH* comme gène de référence.

En analysant l'expression du *TGF- β 1* après la transfection, nous remarquons une répression de 98% à toutes les concentrations testées. Nous avons décidé d'utiliser une concentration de 20 nM lors de nos expériences puisque c'est la concentration la plus faible permettant une inhibition quasi complète du TGF- β 1 (**Figure III.13**).

b) Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence après avoir transfecté et exposé les cellules aux UVB

Afin d'étudier l'effet de l'inhibition du TGF- β 1 par siRNA lors de la SIPS induite par les UVB, nous avons utilisé le même protocole que celui utilisé lors des mises au point du siRNA, c'est-à-dire deux transfections durant la semaine de stress.

Nous avons étudié l'expression de gènes associés à la sénescence, 72h après le dernier stress UVB. Tout d'abord, nous avons analysé si l'expression du *TGF- β 1* était bien réprimée suite à l'utilisation des siRNA. Nous confirmons que l'expression du *TGF- β 1* est bien supprimée lorsque les cellules sont transfectées avec le siRNA spécifique du TGF- β 1 (**Figure III.14**).

Lorsque nous analysons l'expression de gènes associés à la sénescence, nous observons que certains d'entre eux sont réprimés lorsque les cellules sont transfectées avec le siRNA TGF- β 1 (**Figure III.14**).

Au niveau basal, nous observons une diminution de l'abondance relative de l'ARNm de la *fibronectine*, du *CTGF* et le *IGFBP3*. Les modifications d'expression de la *fibronectine* et du *CTGF* confirment les résultats obtenus avec l'anticorps neutralisant. En ce qui concerne l'effet du siRNA TGF- β 1 sur l'expression de *IGFBP3*, il faut rester prudent car on remarque également une diminution de son expression chez les cellules transfectées avec le siRNA négatif, il s'agit donc peut-être d'un effet aspécifique de la transfection.

Notons également que l'utilisation de siRNA TGF- β 1 réduit la surexpression de l'*apo J* de l'*ostéonectine*, de la *fibronectine*, du *CTGF*, du *TGF- β 1* et de *IGFBP3* après les expositions répétées aux UVB. Nous n'observons par contre aucun impact de la transfection sur l'expression de *p21^{waf-1}* et *p53*.

Les résultats semblent donc indiquer une protection des cellules exposées aux UVB lorsque l'expression du *TGF- β 1* est inhibée, ce qui renforce l'implication du TGF- β 1 dans l'apparition du phénotype sénescence.

Nous avons essayé d'étudier la proportion de cellules positives à la SA β -gal après transfection du siRNA, mais les cellules probablement fragilisées par la transfection ne réadhéraient pas après le repiquage à faible confluence. Ce biomarqueur n'a donc pas pu être testé.

Toutefois, les résultats obtenus avec l'anticorps neutralisant et le siRNA TGF- β 1 semblent confirmer une implication du TGF- β 1 dans l'apparition de certains biomarqueurs de la sénescence. Dans la partie suivante, nous avons voulu tester si la voie de transduction du signal dépendante des Smads, voie privilégiée suite à l'activation des récepteurs du TGF- β 1, était activée après les stress UVB.

3. Implication des protéines Smads dans l'induction de la sénescence prématurée par les UVB

Puisque nous avons montré que les cellules entraient en sénescence prématurée suite aux expositions répétées aux UVB et que certains biomarqueurs de la sénescence étaient modifiés lorsque la voie du TGF- β 1 était bloquée, nous avons voulu étudier le rôle des Smads dans l'induction de ce phénotype. En effet, le TGF- β 1 est capable d'induire la sénescence prématurée, il se peut donc que cette voie de signalisation soit activée lors de la sénescence induite prématurément par les stress UVB.

a) Profil d'abondance des protéines Smads à 72h après le dernier stress UVB

Les cellules ont été exposées deux fois par jour pendant 5 jours à une dose subcytotoxique de 250 mJ/cm² d'UVB. A différents temps après le dernier stress UVB, les protéines totales ont été extraites des FHDs. L'abondance des protéines a été étudiée par western blot. L' α -tubuline a été utilisée pour permettre la normalisation des résultats. Nous avons utilisé cette protéine puisque l'abondance ne varie dans aucune des conditions.

Nous observons une augmentation de l'abondance de P-Smad 2, Smad 2, P-Smad 3 et Smad 3 dans les cellules exposées aux UVB, à 72h après le dernier stress UVB (**Figure III.15**). Nous pouvons remarquer une légère diminution de la protéine Smad 2 dans les cellules exposées aux UVB à 40h après le dernier stress UVB. Ensuite, l'abondance de la protéine est augmentée à 72h.

b) Abondance et localisation des protéines Smads, à différents temps après la dernière exposition aux UVB

Nous avons remarqué dans la première partie de nos résultats que les protéines Smads étaient rapidement activées après une stimulation au TGF- β 1. En effet, lorsque les cellules sont stimulées pendant 2h, nous observons une modification de l'abondance et de la localisation des protéines.

Nous avons donc réalisé un marquage en immunofluorescence à court temps (2h) et à long temps (72h) après le dernier stress UVB afin de déterminer si les Smads sont activées après les stress répétés aux UVB.

- Analyse de l'abondance et de la localisation des protéines Smads, 2h après le dernier stress UVB

Les cellules sont repiquées sur couvre-objet (C.O.) le 4^{ème} jour de stress, environ 1 heure après le 8^{ème} stress UVB. Les deux derniers stress UVB sont donc réalisés sur C.O.. Deux heures après le 10^{ème} stress UVB, les cellules sont fixées et marquées.

A court terme après le dernier stress UVB, nous observons une augmentation de l'abondance de Smad 2, P-Smad 2, P-Smad 3 et Smad 4 avec une localisation principalement nucléaire. Notons que pour Smad 2, on détecte la protéine au niveau du cytoplasme chez les cellules contrôles, avec une translocation nucléaire marquée après stress UVB. Aucune modification de l'abondance de Smad 3 n'a été mise en évidence (**Figure III.16**).

Ces observations permettent de conclure que les protéines Smads, principalement Smad 2, P-Smad 2, P-Smad 3 et Smad 4 sont activées rapidement après le dernier stress UVB et sont principalement localisées dans le noyau, où elles pourront modifier l'expression de certains gènes. En analysant l'abondance et la localisation de ces protéines à 72h après le stress UVB, nous pourrions savoir si les protéines restent activées jusqu'à l'établissement des biomarqueurs de la sénescence.

- Analyse de l'abondance et de la localisation des protéines Smads, 72h après le dernier stress UVB

A 72h après le dernier UVB stress, les cellules sont repiquées sur C.O.. Les cellules sont fixées et marquées 24h plus tard avec les anticorps adéquats.

Au niveau de l'abondance protéique des Smads, nous constatons que l'abondance de Smad 2, P-Smad 2, P-Smad 3 et Smad 4 sont légèrement augmentées dans les cellules exposées aux UVB comparées aux cellules contrôles. Nous ne remarquons aucune différence d'abondance pour Smad 3.

Au niveau de la localisation cellulaire, P-Smad 2, Smad 3 et Smad 4 ont une localisation nucléaire dans les cellules contrôles et exposées aux UVB. Tandis que Smad 2 et P-Smad 3 ont une localisation cytoplasmique et nucléaire. La localisation nucléaire est plus marquée pour P-Smad 3 que pour Smad 2 (**Figure III.17**).

Nous pouvons remarquer que l'abondance de Smad 4 est augmentée à court terme et à long terme après les stress UVB. Nous savons que Smad 4 est nécessaire à la translocation des récepteurs-Smads dans le noyau, nous avons utilisé des siRNA contre son ARNm afin d'étudier si l'action du TGF- β 1 est dépendante des Smads ou d'autres voies de signalisation.

c) Mise au point d'un modèle d'inhibition de Smad 4 par l'utilisation de siRNA

Smad 4 est une protéine impliquée dans la cascade de signalisation du TGF- β 1. Smad 4 est responsable de la translocation du complexe r-Smads phosphorylées/Co-Smad dans le noyau. Lorsque le complexe est présent dans le noyau, les Smads peuvent permettre la transcription ou la répression de la transcription de certains gènes cibles de la voie du TGF- β 1.

Nous nous sommes intéressés à Smad 4 puisque c'est l'une des protéines effectrices après l'activation des récepteurs par le TGF- β 1. Pour inhiber la protéine, nous avons utilisé des siRNA ciblés contre l'ARNm de Smad 4 (siRNA Smartpool, Dharmacon).

Afin de déterminer la dose optimale de siRNA Smad 4 à utiliser, nous avons transfecté les cellules de la même manière que lors des expériences avec le siRNA TGF- β 1. Nous avons transfecté les cellules avec 20, 50 et 100 nM de siRNA Smad 4, la veille du premier jour de stress UVB et le 4^{ème} jour de stress. Nous avons également transfecté les cellules avec un siRNA Non Targeting Smartpool (NTS). L'expression de *Smad 4* a été étudiée à 72h après le dernier stress UVB par PCR semi-quantitative en utilisant la *GAPDH* comme gène de référence.

L'expression de *Smad 4* est réprimée lorsqu'on transfecte les cellules avec le siRNA Smad 4. L'inhibition de l'expression de l'ARNm de *Smad 4* est efficace à 20 nM (95%). Nous avons décidé d'utiliser cette concentration puisqu'il s'agit de la dose la plus faible induisant une répression quasi-totale de l'expression de Smad 4 (**Figure III.18**).

d) Analyse de l'expression de gènes associés à la sénescence après avoir transfecté et exposé les cellules aux UVB

Afin de mettre en évidence un éventuel impact de la voie des Smads sur l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après les stress UVB, nous avons transfecté les FHDs avec le siRNA Smad 4 à 20 nM et puis nous les avons exposés à 10 stress répétés d'UVB induisant la sénescence prématurée. Nous avons étudié l'expression de gènes associés à la sénescence.

Tout d'abord, l'expression de *Smad 4* est bien réprimée lorsque les cellules sont transfectées avec le siRNA Smad 4. Notons qu'aucune modification de l'expression de Smad 4 n'est détectable après expositions des cellules aux UVB (**Figure III.19**). En ce qui concerne l'expression des autres gènes testés, nous observons une répression du *CTGF*, chez les cellules transfectées avec le siRNA Smad 4. De plus, nous n'observons plus l'augmentation d'abondance relative de l'ARNm du *CTGF* après stress UVB chez les cellules transfectées avec le siRNA Smad 4. Ces résultats doivent être toutefois analysés avec précaution puisque nous remarquons également cet effet avec le siRNA négatif.

Contrairement à ce qui avait été obtenu avec le siRNA TGF- β 1, nous remarquons cette fois une augmentation de l'abondance relative de l'ARNm de l'*apo J*, de la *fibronectine*, du *TGF- β 1* et de l'*IGFBP3* chez les cellules transfectées avec le siRNA Smad 4 (**Figure III.20**).

Les résultats semblent quelque peu déconcertants et ne reproduisent pas ce qui avait été obtenu avec le siRNA TGF- β 1. Il ne semble donc pas que Smad 4 intervient dans la modification de l'expression génique après stress UVB.

Il semble donc que d'autres voies activées par le TGF- β 1 sont nécessaires pour permettre l'expression de certains gènes associés à la sénescence. En effet, l'expression de l'*ostéonectine* est réprimée lorsque l'on utilise des siRNA TGF- β 1 mais ne l'est plus lorsqu'on utilise les siRNA Smad 4.

Dans la littérature, certaines équipes se sont intéressées aux cross-talks possibles entre la voie de signalisation du TGF- β 1 et d'autres cascades signalitiques. Plusieurs voies ont ainsi été répertoriées pour interagir avec le TGF- β 1, indépendamment des Smads (Zhang, 2009). Parmi ces voies, nous avons décidé d'étudier l'induction de la voie des MAPK après stress UVB.

4. Implication des MAP kinases dans l'induction de la sénescence prématurée par les UVB

D'après la littérature, il existe beaucoup d'interactions entre la voie du TGF- β 1 et les MAP kinases. En effet, le TGF- β 1 est capable d'activer les ERK, JNK et p38^{MAPK}. La phosphorylation des tyrosines des T β RI et T β RII, permet le recrutement des facteurs nécessaires à l'activation des ERK. D'autre part, JNK et p38^{MAPK} sont activées suite au recrutement de TRAF6 au niveau du récepteur phosphorylé du TGF- β 1. TAK1 est recruté par TRAF6 et permet l'activation des deux kinases (Zhang, 2009).

Nous nous sommes intéressés à l'abondance des différentes MAPK lorsque les cellules sont exposées aux UVB.

a) Profil d'abondance de ERK et P-ERK, à différents temps après le dernier stress UVB

Les cellules sont exposées à une dose subcytotoxique d'UVB (250 mJ/cm²), deux fois par jour pendant 5 jours. Les protéines totales ont été extraites à différents temps après le dernier stress UVB : 1h, 16h, 40h et 72h. Nous avons analysé l'abondance de ERK et de P-ERK par western blot. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge puisque son abondance n'est pas modifiée lorsqu'on expose les cellules aux UVB.

Nous remarquons que la forme phosphorylée et la forme totale des protéines ERK sont activées juste après le stress UVB (1h). L'abondance relative des protéines diminue lorsqu'on analyse à 16h, 40h et 72h après le stress (**Figure III.21**). On ne remarque aucune différence d'abondance des protéines entre les cellules contrôles et les cellules exposées aux UVB. Sasagawa et al. ont montré que les ERK étaient activées très rapidement et que leur activité diminue pour atteindre un niveau stable au cours du temps après une stimulation avec l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Sasagawa et al., 2005).

b) Profil d'abondance de JNK à différents temps après le dernier stress UVB

Les cellules sont exposées à une dose subcytotoxique d'UVB (250 mJ/cm²), deux fois par jour pendant 5 jours. Les protéines totales ont été extraites à différents temps après le dernier stress UVB : 1h, 16h, 40h et 72h. Nous avons analysés l'abondance de JNK par western blot. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge puisque son abondance n'est pas modifiée lorsque l'on expose les cellules aux UVB.

Nous pouvons remarquer sur la **Figure III.22** que l'abondance de JNK est augmentée chez les cellules exposées aux UVB à seulement 1h après le dernier stress UVB. Ensuite, on peut noter une diminution des protéines à 16h et 40h après le dernier stress UVB. A 72h après le dernier stress UVB, on peut remarquer que l'abondance relative de JNK est égale chez les cellules contrôles et les cellules exposées aux UVB.

c) Profil d'abondance de p38^{MAPK} et de P-p38^{MAPK}, à différents temps après le dernier stress UVB

Les cellules sont exposées à une dose subcytotoxique d'UVB (250 mJ/cm²), deux fois par jour pendant 5 jours. Les protéines totales ont été extraites à différents temps après le dernier stress UVB : 1h, 40h et 72h (également 16h pour p38^{MAPK}). Nous avons analysé l'abondance de p38^{MAPK} et de P-p38^{MAPK} par western blot. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge puisque son abondance n'est pas modifiée lorsqu'on expose les cellules aux UVB.

Nous avons remarqué que l'abondance relative de P-p38^{MAPK} était augmentée dans les cellules exposées aux UVB, une heure après le dernier stress UVB (**Figure III.23** et **III.24**). Notons que l'abondance de la protéine reste légèrement augmentée lors de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence (72h). L'abondance de p38^{MAPK}, quant à elle n'est pas modifiée.

Ces observations nous permettent de penser que p38^{MAPK} a probablement un rôle dans l'induction de la sénescence prématurée induite par les UVB. Cette protéine serait nécessaire à court temps et à long temps après les stress UVB.

d) Abondance et localisation des protéines ERK, P-ERK, JNK, P-JNK, p38^{MAPK}, P-p38^{MAPK} et P-ATF-2, à 2h et à 72h après l'exposition aux UVB

Afin de déterminer si les MAPK étaient impliquées dans la sénescence prématurée induite par les UVB, nous avons réalisé un marquage en immunofluorescence. Nous avons analysé l'abondance et la localisation des MAPK et d'ATF-2 phosphorylé puisque dans la littérature, il a été montré que ce facteur de transcription est activé par la phosphorylation de p38^{MAPK}. ATF-2 peut former un hétérodimère avec c-Jun afin de se lier sur le site de liaison AP-1 (Zarubin and Han, 2005).

- Analyse de l'abondance et de la localisation des protéines ERK, JNK, P-JNK, P-p38^{MAPK} et P-ATF-2, 2h après le dernier stress UVB

Les cellules sont repiquées sur couvre-objet (C.O.) le 4^{ème} jour de stress, environ 1 heure après le 8^{ème} stress UVB. Les deux dernier stress UVB sont donc réalisés sur C.O.. Deux heures après le 10^{ème} stress UVB, les cellules sont fixées et marquées.

A court temps après le stress, on remarque une augmentation de l'abondance protéique de ERK, JNK, P-JNK, P-p38^{MAPK} et P-ATF-2 chez les cellules exposées aux UVB (**Figure III.25**). Au niveau de la localisation des différentes protéines, si on détecte un bruit de fond cytoplasmique et nucléaire chez les cellules contrôles, on remarque une augmentation d'abondance de ces protéines principalement dans les noyaux des cellules stressées.

- Analyse de l'abondance et de la localisation des protéines ERK, P-ERK, JNK, P-JNK, p38^{MAPK}, P-p38^{MAPK} et P-ATF-2, 2h après le dernier stress UVB

Les cellules ont été stressées deux fois par jour pendant 5 jours avec une dose subcytotoxique d'UVB (250 mJ/cm²). A 72h après le dernier stress UVB, les cellules ont été repiquées sur C.O.. Le lendemain, les cellules sont fixées et marquées.

Nous pouvons remarquer sur la **Figure III.26**, que l'abondance des ERK et P-ERK reste inchangée lorsque l'on expose les cellules aux UVB et leur localisation est cytoplasmique. L'abondance de P-JNK est augmentée chez les cellules exposées aux UVB tandis que l'abondance de JNK n'est pas modifiée. L'abondance de P-p38^{MAPK} est augmentée dans les cellules exposées aux UVB. La localisation de P-p38^{MAPK} est cytoplasmique tandis que p38^{MAPK} est également nucléaire. L'abondance de p38^{MAPK} n'est pas modifiée lorsque l'on expose les cellules aux UVB.

Lorsque nous analysons la **Figure III.26**, nous remarquons une augmentation de l'abondance de P-ATF-2 et une localisation principalement nucléaire chez les cellules exposées aux UVB.

En conclusion, lorsque les cellules sont exposées 10 fois aux UVB, on remarque une augmentation de l'abondance de ERK, de P-JNK, de JNK, P-p38^{MAPK} et de P-ATF-2 à court terme. Won et al. ont montré par western blot, sur des cellules épidermiques murines (JB6), que l'abondance de la plupart de ces protéines était augmentée lorsqu'on exposait les cellules aux UVB (50 mJ/cm²) pendant 2h (Won et al., 2004). A long terme après les stress on remarque que l'abondance de P-p38^{MAPK}, P-JNK et P-ATF-2 est toujours augmentée chez les cellules exposées aux UVB par rapport aux cellules contrôles.

Lorsqu'on compare les résultats obtenus par western blot et par marquage en immunofluorescence, on peut penser que p38^{MAPK} intervient lors de la sénescence prématurée induite par les UVB puisque les abondances de P-p38^{MAPK} et P-ATF-2 sont augmentées dès le dernier stress UVB jusqu'à l'installation de la SIPS (72h).

e) Mise au point d'un modèle d'inhibition de p38^{MAPK} par l'utilisation de siRNA

Nous avons montré que l'abondance relative de p38^{MAPK} et de P-p38^{MAPK} étaient augmentées dans les cellules exposées aux UVB à court temps et à long temps après le stress. De plus, Frippiat et al. ont montré que p38^{MAPK} permettait l'arrêt du cycle cellulaire et la surexpression du TGF-β1 via le facteur de transcription ATF-2. De plus, ils ont également montré que p38^{MAPK} était activé par le TGF-β1 (Frippiat et al., 2002). Cette étude nous permet de penser que p38^{MAPK} peut également être impliqué lors de l'induction de la sénescence prématurée par les stress UVB.

Pour tester si p38^{MAPK} a une activité dans l'induction de la sénescence prématurée induite par les stress UVB, nous avons bloqué son expression en un mélange de 4 siRNA spécifiques de p38^{MAPK} (siRNA Smartpool, Dharmacon).

Afin de déterminer la dose optimale de siRNA à utiliser, nous avons réalisé une double transfection suivant le protocole détaillé pour les siRNA TGF-β1 et Smad 4. Nous avons transfecté les cellules avec 20, 50 et 100 nM de siRNA p38^{MAPK} la veille du premier jour de stress UVB. Le 4^{ème} jour de stress, les cellules sont transfectées une seconde fois afin d'inhiber totalement l'expression de p38^{MAPK}. L'ARN est extrait 4 jours après la seconde transfection (**Tableau III.3**). Nous avons également transfecté les cellules avec un siRNA Non Targeting Smartpool (NTS). L'expression de p38^{MAPK} a été étudiée par PCR semi-quantitative en utilisant la *GAPDH* comme gène de référence.

Nous avons remarqué que l'expression de p38^{MAPK} était réprimée de 90% lorsque les cellules sont transfectées avec 20 nM de siRNA p38^{MAPK} (**Figure III.27**). Nous avons donc utilisé cette concentration pour réprimer l'expression de p38^{MAPK}.

f) Vérification de l'inhibition d'expression du transcrite et de la protéine p38^{MAPK} après transfection avec le siRNA p38^{MAPK} et expositions répétées des cellules aux UVB

Les cellules ont été transfectées avec le siRNA p38^{MAPK} ou le siRNA NTS, 24 heures avant le premier jour de stress UVB. Pour assurer l'inhibition totale de l'expression de p38^{MAPK}, les cellules sont transfectées une seconde fois après le 8^{ème} stress UVB. L'ARN et les protéines ont été extraits à 72h après le dernier stress UVB. Nous avons étudié l'abondance relative de l'ARNm et des protéines p38^{MAPK} et P-p38^{MAPK} afin de vérifier que leur abondance était diminuée lorsque les cellules étaient transfectées avec un siRNA p38^{MAPK}.

Premièrement, nous avons étudié si l'abondance relative de l'ARNm p38^{MAPK} était diminuée lorsqu'on transfectait et exposait les cellules aux UVB. De fait, l'abondance relative de l'ARNm de p38^{MAPK} diminue de 86% dans les cellules transfectées non exposées aux UVB lorsqu'on compare aux cellules contrôles, non transfectées (**Figure III.28**). Dès lors, nous avons analysé l'expression de gènes associés à la sénescence pour étudier si p38^{MAPK} jouait un rôle dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence prématurée induite par les UVB.

Ensuite, nous avons vérifié l'abondance relative de la protéine par western-blot. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge (**Figure III.29**). Nous pouvons noter que l'abondance des deux protéines étudiées est effectivement diminuée lorsque les cellules ont été transfectées avec le siRNA p38^{MAPK}.

Nous pouvons donc confirmer que l'expression relative de l'ARNm et l'abondance protéique de p38^{MAPK} sont réprimées lorsque les cellules sont transfectées deux fois avec un siRNA spécifique de p38^{MAPK}. Nous pouvons dès lors étudier l'abondance de gènes associés à la sénescence afin de déterminer si p38^{MAPK} joue un rôle dans l'induction de la SIPS.

L'expression de p21^{waf-1} et du TGF- β 1 sont légèrement réprimées lorsque l'on transfecte les cellules avec le siRNA p38^{MAPK}. Frippiat a démontré que p38^{MAPK} permettait l'expression du TGF- β 1 (Frippiat et al., 2002).

L'expression du CTGF et de l'ostéonectine ne sont pas modifiées lorsque les cellules sont transfectées avec le siRNA p38^{MAPK}.

L'expression de l'apo J, et de p53 sont surexprimées lorsque les cellules sont transfectées. Il a été montré que p38^{MAPK} permettait la phosphorylation de p53 (She et al., 2000).

Enfin, l'expression de l'IGFBP3 est réprimée dans les cellules transfectées avec le siRNA p38^{MAPK} mais, l'expression de ce gène est également réprimée lorsque l'on transfecte avec le siRNA NTS. La transfection a probablement un effet sur l'expression de ce gène (**Figure III.30**).

En conclusion, nous pouvons confirmer l'induction de la sénescence prématurée par les stress UVB et par la stimulation au TGF- β 1. L'abondance des protéines Smads est augmentée lors de la sénescence prématurée induite par les UVB ou le TGF- β 1. Nous pouvons penser que les Smads ont une implication dans l'induction du phénotype. D'autre part, il est possible que p38^{MAPK} intervienne lors de l'arrêt cellulaire des cellules sénescents.

Les UV sont les rayons les plus dangereux émis par le soleil capables de passer à travers la couche d'ozone. Les UV induisent, en plus du vieillissement intrinsèque, un vieillissement extrinsèque de la peau. De fait, les UV peuvent entraîner la formation de dimères de pyrimidines ou de ROS, entraînant l'oxydation de composés cellulaires tels que les protéines (Ravanat et al., 2001). Le vieillissement extrinsèque est principalement caractérisé par une altération de la matrice extracellulaire suite à un remodelage du tissu conjonctif (fibres de collagène, fibres élastiques, etc) (Jenkins, 2002).

Hayflick a montré que le vieillissement cellulaire pouvait être obtenu *in vitro*. En effet, lorsqu'on cultive des fibroblastes, on se rend compte qu'après un certain nombre de doublements de population, les cellules ne sont plus capables de se diviser. Dès lors, les cellules entrent en sénescence répllicative et restent métaboliquement actives durant plusieurs mois. La sénescence peut également être induite par les stress oxydatifs (H_2O_2 , éthanol ou *t*-BHP) et/ou générant des dommages à l'ADN (UVB). Les UVB ont été utilisés pour induire la sénescence prématurée des fibroblastes humains de derme (FHDs) mais également pour mimer le vieillissement extrinsèque subi par les cellules. En effet, la dose d'UVB utilisée est une dose subcytotoxique relativement équivalente à la dose reçue par les cellules de la peau humaine *in vivo* (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

Les mécanismes moléculaires induisant la sénescence répllicative sont toujours méconnus. Les modèles de sénescence prématurée peuvent aider dans la découverte des voies de signalisation menant à la sénescence. Le TGF- β 1 est un candidat intéressant puisqu'il intervient lors de la sénescence prématurée induite par l' H_2O_2 (Fripiat et al., 2001), par le *t*-BHP, l'éthanol (Debacq-Chainiaux et al., 2008) et par les UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle du TGF- β 1 dans l'induction de la sénescence prématurée. Nous avons premièrement analysé si le TGF- β 1 induisait la sénescence prématurée. Ensuite, nous avons analysé si les voies de signalisation des Smads étaient activées lorsque le TGF- β 1 induisait la sénescence prématurée des FHDs. Dans un second temps, nous avons étudié la sénescence prématurée induite par les UVB. Ensuite, nous avons analysé si la sénescence prématurée était toujours induite par les UVB lorsqu'on inhibait l'action du TGF- β 1. Nous avons également analysé l'implication de la voie de signalisation des Smads lors de la sénescence prématurée induite par les stress. Enfin, nous nous sommes intéressés aux autres voies de signalisation possibles dans l'induction de la sénescence prématurée aux UVB. Nous avons étudié les MAPK (Mitogen Associated Protein Kinases) et plus particulièrement l'action de p38^{MAPK}.

Tout d'abord, nous avons étudié le rôle du TGF- β 1 dans l'induction de la sénescence prématurée des FHDs (**Figure IV.1**). Fripiat et al. ont montré que dans des fibroblastes IMR-90, l'incubation des cellules avec 5 ng/ml de TGF- β 1 durant 72h entraînait la sénescence prématurée. En effet, la proportion de cellules positives pour la SA β -gal est augmentée lorsque les cellules sont stimulées avec le TGF- β 1. Toutefois, la proportion de cellules possédant l'activité SA β -gal est inférieure dans les cellules stimulées au TGF- β 1 par rapport aux cellules traitées à l' H_2O_2 (Fripiat et al., 2001). Nous avons montré que lorsqu'on stimule les FHDs au TGF- β 1 (1 ng/ml) pendant 72h, la proportion de cellules positives pour la SA β -gal est également augmentée.

L'expression de gènes associés à la sénescence prématurée est également modifiée lors du modèle développé par Fripiat *et al.*. L'expression de l'*apolipoprotéine J*, l'*ostéonectine*, la *transgéliline* et la *fibronectine* étaient surexprimées chez les cellules stimulées au TGF- β 1. Nous avons montré que l'expression de l'*apolipoprotéine J*, de l'*ostéonectine*, et de la

fibronectine était surexprimée chez les FHDs stimulées pendant 72h au TGF- β 1 (1 ng/ml). De plus, l'expression du *CTGF*, de *p21^{waf-1}* et du *TGF- β 1* lui-même était également surexprimée. Nous avons étudié l'expression du *CTGF* puisqu'elle est dépendante du TGF- β 1. *p21^{waf-1}* est un inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines intervenant dans l'arrêt du cycle cellulaire. Datto *et al.* ont montré que l'expression *p21^{waf-1}* pouvait être induit par le TGF- β 1 dans les HaCat. Cette surexpression pourrait expliquer comment le TGF- β 1 induit l'arrêt de prolifération des cellules (Datto et al., 1995).

L'expression relative de *p53* est réprimée chez les cellules stimulées au TGF- β 1. Debacq-Chainiaux *et al.* n'avait pas montré de surexpression de l'abondance relative de l'ARNm (Debacq-Chainiaux et al., 2005). Datto et al., a montré que l'induction de *p21^{waf-1}* par le TGF- β 1 était indépendante de *p53*. Ceci pourrait expliquer l'arrêt de prolifération induit par le TGF- β 1 (Herrera et al., 1996) sans observer aucune modification de l'expression de *p53*.

L'expression de l'*IGFBP3* n'est pas induite lorsque les cellules sont stimulées au TGF- β 1. Pourtant, il a été montré que la stimulation des fibroblastes humains de poumon WI-38 avec du TGF- β 1 augmentait l'expression de l'*IGFBP3* de 20 x (Debacq-Chainiaux et al., 2008).

Nous pouvons conclure que la stimulation des FHDs avec 1 ng/ml de TGF- β 1 pendant 72h peut induire la sénescence prématurée des cellules puisque certains biomarqueurs apparaissent chez les cellules stimulées au TGF- β 1 tels que la SA β -gal et la modification de l'expression de gènes associés à la sénescence.

Dès lors, nous nous sommes intéressés au rôle des Smads lorsque la SIPS est installée. Les Smads sont activées par le TGF- β 1 et transloquent dans le noyau pour activer ou réprimer l'expression de gènes cibles du TGF- β 1. Nous avons étudié si les Smads étaient activées après l'induction de la sénescence prématurée par le TGF- β 1. Nous avons montré que l'abondance de P-Smad 3, Smad 3, P-Smad 2 et Smad 2 était augmentée chez les cellules stimulées au TGF- β 1. De plus, la localisation de P-Smad 3, Smad 3, P-Smad 2 et Smad 4 est principalement nucléaire, ce qui confirme la translocation des Smads pour permettre la transcription de certains gènes. Nous avons également étudié l'abondance et la localisation des Smads à court terme puisque dans la littérature, on a remarqué que la translocation nucléaire des Smads se réalisait déjà après une heure de stimulation au TGF- β 1 (2 ng/ml) dans différents types cellulaires. Cette translocation est transitoire puisqu'après 9h de stimulation au TGF- β 1, on ne peut plus observer la translocation (Nicolas 2003). En stimulant les FHDs avec 10 ng/ml de TGF- β 1 pendant deux heures, nous avons pu remarquer l'augmentation de l'abondance de P-Smad 2, Smad 2, P-Smad 3 et Smad 3 dans le noyau. Nous pouvons noter que la localisation de Smad 2 est nucléaire et cytoplasmique lorsque les cellules sont stimulées pendant 2h au TGF- β 1. Tandis que la localisation de la protéine est principalement cytoplasmique chez les cellules stimulées au TGF- β 1 pendant 72h. Dans la littérature, il a été décrit que les protéines Smad 2 et Smad 3 ont un rôle différentiel dans le développement embryonnaire d'une souris (Brown et al., 2007). Lorsque l'on étudie l'expression de certains gènes suite à l'induction du TGF- β 1 dans des cellules épithéliales, il apparaît que Smad 3 est nécessaire à l'expression du *CTGF* tandis que Smad 2 est nécessaire à l'expression de *MMP-2* (Phanish et al., 2006). Nous pouvons donc penser que Smad 2 intervient au début de la stimulation au TGF- β 1 et son activité disparaît au cours du temps.

La deuxième partie de ce travail était consacrée à l'étude de l'induction de la sénescence prématurée de FHDs par les stress UVB. Après avoir stressé les cellules deux fois par jour pendant 5 jours à une dose subcytotoxique (250 mJ/cm^2), nous avons analysé si la sénescence prématurée était induite à 72h après le dernier stress UVB (**Figure IV.2**). La proportion de cellules positives pour la SA β -gal est augmentée lorsqu'on expose les cellules aux UVB. Il est intéressant de signaler que la proportion de cellules positives à la SA β -gal est plus importante chez les cellules exposées aux UVB par rapport aux cellules stimulées au TGF- β 1.

L'expression de gènes associés à la sénescence prématurée est également augmentée 72h après le dernier stress UVB. C'est le cas pour l'*apolipoprotéine J*, l'*ostéonectine*, la *fibronectine*, le *CTGF*, *p21^{waf-1}*, *p53*, le *TGF- β 1* et l'*IGFBP3*. L'expression de l'*apolipoprotéine J*, de l'*ostéonectine*, de la *fibronectine*, de *p21^{waf-1}* et de *p53* sont augmentées d'un ordre de grandeur comparable à l'étude de Debacq-Chainiaux (Debacq-Chainiaux et al., 2005). Il est intéressant de pointer que l'expression de *p53* est augmentée lorsqu'on expose les cellules aux UVB mais on ne retrouve pas cette augmentation lorsqu'on stimule les cellules aux TGF- β 1. On pourrait penser que le TGF- β 1 n'est pas nécessaire dans l'induction de *p53*. Il est possible que l'induction de *p53* dépende d'autre autre voie de signalisation, comme par exemple, la voie des dommages à l'ADN.

Nous avons montré que certains biomarqueurs de la sénescence prématurée sont induits lorsqu'on expose les cellules aux UVB. Nous avons également pu mettre en évidence que certains gènes étaient exprimés à court temps après le dernier stress UVB et que leur expression était maintenue jusqu'à l'apparition des biomarqueurs de la sénescence.

Après avoir étudié l'expression de gènes associés à la sénescence prématurée, induite par les stress UVB ou le TGF- β 1, nous avons étudié l'expression de gènes associés à la physiologie de la peau. Pour cela, nous avons utilisé une carte microfluidique, réalisée sur mesure et permettant l'analyse de l'expression de 92 gènes associés à la physiologie de la peau et de 4 gènes de référence. Nous nous sommes rendu compte que lorsqu'on compare les profils d'expression de gènes associés à la physiologie de la peau chez les cellules exposées aux UVB et chez les cellules stimulées au TGF- β 1, on remarque certaines différences. Par exemple, chez les cellules exposées aux UVB, on retrouve une surexpression de nombreux de gènes dont les protéines sont impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire. De plus, l'expression des *Méthionine sulfoxyde reductases* n'est pas augmentée chez les cellules stimulées au TGF- β 1, entraînant peut-être moins d'oxydation des protéines dans cette condition.

Toutefois, nous avons aussi remarqué que l'abondance relative de l'ARNm de 7 gènes étaient augmentée lors de la sénescence prématurée induite par les stress UVB et le TGF- β 1. Parmi ces gènes, on retrouve une augmentation de l'expression de *p16^{INK-4a}* (*CDKN2A*), de l'*aquaporine 3*, de la *desmogléine-2*, de la *filaggrine*, de *TIMP-1*, de *Gadd45a* et du *récepteur α à l'acide rétinoïque (RARA)*. L'expression de *p16^{INK-4a}* est bien connue pour être augmentée dans les cellules sénescences. *p16^{INK-4a}* permet l'arrêt du cycle cellulaire par la phosphorylation de la protéine de rétinoblastome (Rb). *Gadd45a* est une protéine induite par les stress. Il a été démontré dans des cellules de la moëlle osseuse de souris que *Gadd45a* réduisait la proportion d'apoptose chez les cellules exposées à 25 J/m^2 d'UV (Gupta et al., 2006).

Il a été montré de l'abondance de la protéine AQP3 diminue en fonction de l'âge au niveau de l'épiderme (Li et al., 2010). Lors de nos expériences, nous travaillons sur les FHDs de la peau. Il faut se rendre compte que le contexte cellulaire est différent et il serait intéressant d'étudier l'impact des UVB sur l'épiderme en entier pour étudier de manière plus physiologique la réponse obtenue.

Dans la littérature, il n'y a aucune association entre l'expression de ces gènes et le TGF- β 1.

La troisième partie de ce travail consistait à étudier si la sénescence prématurée induite par les UVB pouvait toujours être établie lorsqu'on inhibe l'action du TGF- β 1. Dans cette partie, nous avons réalisé une inhibition du TGF- β 1 par des anticorps neutralisants ou par un siRNA spécifique de la séquence d'ARNm du TGF- β 1. Dans un premier temps, nous avons inhibé le TGF- β 1 avec des anticorps neutralisants entraînant une protection de l'augmentation de la proportion des cellules positives pour la SA β -gal chez les cellules exposées au UVB et incubées avec les anticorps neutralisants. On détecte des proportions semblables de cellules positives à la SA β -gal chez les cellules stressées et contrôles incubées avec l'anticorps. Cette observation signifie que sans le TGF- β 1, l'activité de l'enzyme reste à un niveau basal, même après expositions des cellules aux UVB. Ceci avait été montré par Debacq-Chainiaux et al. (Debacq-Chainiaux et al., 2005). Nous avons également vérifié si l'expression des gènes associés à la sénescence était également réprimée lorsqu'on incube les cellules avec les anticorps après les avoir exposées aux UVB. L'abondance relative de l'ARNm du *CTGF*, de la *fibronectine* de *p21^{waf-1}* et de l'*IGFBP3* sont diminuées en présence des anticorps neutralisant le TGF- β 1 dans les cellules exposées ou non aux UVB. L'expression du *CTGF* et de l'*IGFBP3* sont utilisées comme contrôles puisqu'elles sont activées par le TGF- β 1 (Kim et al., 2004, Kveiborg et al., 2001). L'expression de la *fibronectine* et de *p21^{waf-1}* seraient sous la dépendance du TGF- β 1 puisqu'on réprime leur expression lorsqu'on ajoute des anticorps neutralisant le TGF- β 1. On remarque également que l'expression de ces gènes est augmentée chez les cellules incubées avec l'anticorps anti-TGF- β 1 exposées ou non. Cette observation nous permet de penser que d'autres voies de signalisation permettent d'induire l'expression de gènes associés à la sénescence prématurée.

L'abondance relative de l'ARNm de l'*apolipoprotéine J* et de l'*ostéonectine* sont légèrement réprimées tandis que l'expression de *p53* est augmentée les cellules sont incubées avec les anticorps neutralisant le TGF- β 1.

Dès à présent, nous pouvons penser que le TGF- β 1 joue un rôle dans l'activité de la SA β -gal et dans l'expression de nombreux gènes associés à la sénescence prématurée induite par les UVB. Malheureusement, nous n'avons pas pu réaliser cette expérience plusieurs fois. En effet, en fonction du lot des anticorps neutralisants utilisé, nous ne reproduisons pas les mêmes résultats.

Dans un second temps, nous avons inhibé l'ARNm du TGF- β 1 grâce à des siRNA ciblés contre la séquence du TGF- β 1 afin de pallier la variabilité de l'anticorps. Pour vérifier que l'effet obtenu dépendait spécifiquement de l'inhibition du TGF- β 1 et pas de la transfection, nous avons transfecté les cellules avec un siRNA contrôle (NTS). Nous avons étudié uniquement les modifications de l'expression de gènes associés à la sénescence puisque nous n'avons pas réussi à analyser la proportion de cellules positives pour la SA β -gal. En effet, il était impossible de repiquer les cellules à faible confluence après avoir transfecté les cellules deux fois et les avoir exposés 10 fois aux UVB.

D'une part, nous avons montré que l'expression du *TGF- β 1* était bien réprimée dans les cellules transfectées et exposées aux UVB. L'abondance relative de la *fibronectine* et du *CTGF* est réprimée lorsqu'on transfecte les cellules et qu'on les expose aux UVB. Par contre, l'expression de *p21^{waf-1}* n'est plus réprimée contrairement à ce qu'on obtenait en incubant les cellules avec les anticorps neutralisants. L'expression de l'*ostéonectine* est également légèrement réprimée chez les cellules transfectées avec le siRNA TGF- β 1 ou incubées avec l'anticorps anti-TGF- β 1.

Il n'y a pas de modifications de l'abondance relative de l'ARNm de *p53* et de l'*apolipoprotéine J*. De plus, lorsque les cellules sont stimulées au TGF- β 1, nous ne remarquons aucune modification d'expression de *p53*. Le TGF- β 1 n'est probablement pas une cytokine induisant la surexpression du facteur de transcription lors de la SIPS induite par les UVB. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'induction de *p53* dépend sans doute de la voie de signalisation des dommages à l'ADN.

Nous ne pouvons pas discuter les résultats obtenus pour l'*IGFBP3* puisque son expression est également diminuée lorsqu'on transfecte les cellules avec le contrôle négatif.

L'utilisation de siRNA TGF- β 1 permet de réprimer l'expression de certains gènes associés à la sénescence. Cependant, l'utilisation du siRNA réprime également l'augmentation obtenue en comparant les cellules exposées ou non aux UVB. Toutefois, nous pouvons penser que le TGF- β 1 est impliqué dans l'induction de la SIPS par les stress UVB puisque son inhibition réprime l'expression de certains gènes associés à la sénescence.

A partir de ces observations, nous avons étudié l'implication des Smads lors de la sénescence prématurée induite par les stress UVB, afin de déterminer si le TGF- β 1 agit via la voie des Smads ou d'autres voies de signalisation. Nous avons étudié l'abondance des Smads lorsque la SIPS est induite par les UVB. Nous pouvons remarquer que l'abondance de P-Smad 2, Smad 2 et Smad 4 était augmentée chez les cellules exposées aux UVB. Nous remarquons une légère modification de l'abondance de P-Smad 3 et aucune de modification pour Smad 3. Nous avons également analysé l'abondance des Smads à court temps après le dernier stress UVB pour étudier si les mêmes Smads étaient activées, nous pouvons réaliser les mêmes observations. Toutefois, l'abondance de P-Smad 3, Smad 3 et Smad 4 sont d'autant plus surexprimées lorsque la SIPS est installée. Smad 4 est nécessaire pour permettre la translocation du complexe r-Smads dans le noyau.

Afin de mettre en évidence une implication de la voie des Smads dans la modification d'expression des gènes associés à la sénescence après expositions répétées aux UVB, nous avons utilisé un siRNA spécifique de Smad 4, nécessaire à la translocation des récepteurs-Smads dans le noyau. Lorsque le complexe est dans le noyau, il peut médier ou réprimer la transcription de gènes cibles du TGF- β 1. En inhibant l'expression de Smad 4, on inhibe la transduction du signal induite par le TGF- β 1 utilisant la voie des Smads.

Nous avons analysé l'expression de Smad 4 lorsqu'on transfecte avec le siRNA Smad 4, on remarque que son expression est bien réprimée. Nous avons également analysé l'abondance relative de l'ARNm de ce gène et nous ne remarquons aucune modification d'expression dans les cellules exposées aux UVB par rapport aux cellules contrôles. Lorsque nous étudions l'expression de gènes associés à la sénescence après avoir transfecté les cellules avec le siRNA Smad 4, on ne remarque plus aucune répression d'expression mis à part pour le *CTGF* et l'*ostéonectine*. De plus, l'expression de la *fibronectine* et du TGF- β 1 est augmentée chez les cellules transfectées. Ce qui semblerait vouloir dire que d'autres voies que la voie des Smads sont nécessaires à leur expression. L'expression de l'*apolipoprotéine J* est surexprimée dans les cellules transfectées.

En analysant les résultats obtenus avec le siRNA TGF- β 1 et siRNA Smad 4, on peut remarquer que l'expression de certains gènes nécessite le TGF- β 1 via une autre voie que Smad 4, tels que la *fibronectine* et le TGF- β 1. Hocevar et al. ont montré que l'expression de la fibronectine suite à une stimulation au TGF- β 1 était induite par une autre voie de signalisation que la voie de smad 4 : JNK. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'expression de la *fibronectine* n'est pas réprimée lorsqu'on inhibe l'action de Smad 4 (Hocevar et al., 1999).

La dernière partie de ce mémoire était consacrée à l'étude de l'implication des MAPK dans l'induction de la sénescence prématurée suite aux UVB. Les MAPK sont un ensemble de kinases pouvant phosphoryler plusieurs substrats et capables de transcrire des gènes spécifiques lorsqu'elles sont activées. En analysant les résultats obtenus, nous pouvons conclure que la voie des ERK est faiblement activée puisqu'on remarque une légère augmentation de l'abondance de ERK et de P-ERK juste après le dernier stress UVB quand les cellules sont exposées aux UVB. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la voie de p38^{MAPK} puisque d'une part, p38^{MAPK} a été décrit pour jouer un rôle dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence suite à un stress à l'H₂O₂ (Fripiat et al., 2002). De plus, Iwasa *et al.* a montré l'implication de p38^{MAPK} lors de la sénescence répliquative et de la sénescence prématurée induite par les stress. Ils ont montré que l'abondance de P-p38^{MAPK} était augmentée dans des fibroblastes humains de poumon WI-38 en sénescence répliquative (60 doublements de population) par rapport à des WI-38 « jeunes » (40 doublements de population). Par contre, l'abondance de p38^{MAPK} n'est pas modifiée dans les deux conditions. Ils ont également analysé l'effet d'un inhibiteur chimique de p38^{MAPK} sur l'induction de la sénescence répliquative et ont montré que la proportion de cellules positives à la SA β-gal est diminuée, ainsi que le nombre de cellules, tandis que la capacité de prolifération est augmentée (Iwasa et al., 2003). Ce qui permet de penser que p38^{MAPK} est impliqué dans la sénescence répliquative.

D'autre part, en analysant nos résultats, nous remarquons une modification rapide prononcée de l'abondance de P-p38^{MAPK} chez les cellules exposées aux 10 stress UVB. Nous avons également analysé un substrat de p38^{MAPK}, ATF-2 afin de déterminer si la kinase était active. Dans les cellules exposées aux UVB, on remarque une augmentation de l'abondance de P-ATF-2 ainsi qu'une localisation nucléaire.

Nous avons étudié si p38^{MAPK} était impliqué lors de l'induction de la sénescence prématurée des FHDs par les UVB. Pour ce faire, nous avons inhibé l'expression par l'utilisation de siRNA spécifiques de son ARNm. Après avoir vérifié que l'expression et l'abondance de p38^{MAPK} étaient bien réprimées après transfection, nous avons étudié l'expression de gènes associés à la sénescence. Nous avons remarqué une diminution de l'expression de *p21^{waf-1}* chez les cellules transfectées. *p21^{waf-1}* a été identifié par Mouchet *et al.*, comme étant un gène exprimé dans des biopsies de peau soumises à 2000 mJ/cm² d'UV (5% d'UVB et 95% d'UVA). De plus, ils ont montré que cette surexpression était dépendante de p38^{MAPK} en utilisant un inhibiteur chimique spécifique de la protéine (Mouchet et al., 2010).

L'expression de certains gènes n'a pas pu être analysée puisque leur expression était également diminuée chez les cellules transfectées avec le siRNA contrôle négatif, tels que le *CTGF* et l'*IGFBP3*. Cependant, leur expression est diminuée chez les cellules transfectées avec le siRNA p38. Ces résultats correspondent aux résultats obtenus par Zdanov *et al.* après avoir induit la sénescence prématurée des IMR-90 hTERT par l'H₂O₂ et les avoir incubées avec un inhibiteur chimique de p38^{MAPK}. De fait, Zdanov obtenait une diminution significative de l'expression du *CTGF* et de l'*IGFBP3* chez les cellules incubées avec l'inhibiteur (Zdanov et al., 2006).

Nous pouvons conclure de cette étude que p38^{MAPK} est probablement impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire puisque l'inhibition de p38^{MAPK}, diminue l'expression de *p21^{waf-1}*. Il faudrait réaliser des tests de prolifération cellulaire lorsque l'on inhibe p38^{MAPK} et ainsi pouvoir observer si, sans la protéine, nous avons toujours un arrêt de prolifération après les stress entraînant la sénescence prématurée. D'autres voies sont probablement impliquées pour surexprimer l'abondance de l'ARNm de ces protéines.

En comparant les résultats obtenus pour l'inhibition du TGF- β 1 et de p38^{MAPK}, on peut constater que dans les deux conditions, aucune répression de l'abondance relative de l'apolipoprotéine J et de p53 n'est observable. Ceci nous fait penser que l'expression de p53 et de l'apolipoprotéine J ne serait ni dépendante du TGF- β 1 ni de p38^{MAPK}.

Nous avons essayé après transfection des différents siRNA, d'étudier la proportion de cellules positives à la SA β -gal. Malheureusement, les cellules fragilisées par la double transfection ne réadhéraient pas après repiquage à faible confluence nécessaire pour mettre en évidence l'activité SA β -gal. Il serait intéressant de mettre au point cette expérience afin de pouvoir analyser un autre biomarqueur que la modification de gènes associés à la sénescence. De plus, il aurait été intéressant d'analyser l'abondance protéique des Smads après transfection des cellules avec les différents siRNA.

En conclusion, nous avons confirmé que le TGF- β 1 et les UVB induisent la sénescence prématurée des FHDs. De plus, nous avons montré que les Smads, protéines activées par le récepteur du TGF- β 1 sont activées dans les deux modèles de sénescence prématurée. Ces résultats nous permettent de penser que le TGF- β 1 joue un rôle important dans l'induction de la sénescence prématurée par les UVB. En inhibant son action, nous avons également montré qu'il intervenait dans l'apparition de certains biomarqueurs de la sénescence et que d'autres voies sont probablement activées lors de la sénescence prématurée induite par les UVB. p38^{MAPK} est un bon candidat et on a remarqué qu'il intervenait dans la régulation du cycle cellulaire via la régulation de l'expression de p21^{waf-1} (**Figure IV.3**). Il serait intéressant de bloquer la protéine TAK1, activée par le TGF- β 1 et activant p38^{MAPK} afin de savoir si p38^{MAPK} est activée lors des stress UVB par le TGF- β 1, ou si p38^{MAPK} est activée par une autre voie.

On se rend compte également que d'autres voies que les voies du TGF- β 1 et de p38^{MAPK} interviennent dans l'apparition de certains biomarqueurs de la sénescence. Nous savons que les stress UVB induisent un stress oxydatif dans la cellule. Des voies dépendantes de ces stress sont activées tels que Nrf2 lors de la sénescence prématurée induite par les stress UVB (Kannan and Jaiswal, 2006). Il serait donc également intéressant d'analyser cette voie de signalisation.

- ADAMS, P. D. 2001. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta*, 1471, M123-33.
- AGO, T. & SADOSHIMA, J. 2006. GDF15, a cardioprotective TGF-beta superfamily protein. *Circ Res*, 98, 294-7.
- ANNES, J. P., MUNGER, J. S. & RIFKIN, D. B. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*, 116, 217-24.
- BARR, R. K. & BOGOYEVITCH, M. A. 2001. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int J Biochem Cell Biol*, 33, 1047-63.
- BAYREUTHER, K., RODEMANN, H. P., HOMMEL, R., DITTMANN, K., ALBIEZ, M. & FRAN CZ, P. I. 1988. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5112-6.
- BEAUSEJOUR, C. M., KRTOLICA, A., GALIMI, F., NARITA, M., LOWE, S. W., YASWEN, P. & CAMPISI, J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*, 22, 4212-22.
- BERNEBURG, M., GRE THER-BECK, S., KURTEN, V., RUZICKA, T., BRIVIBA, K., SIES, H. & KRUTMANN, J. 1999. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem*, 274, 15345-9.
- BLANCHETTE, F., RIVARD, N., RUDD, P., GRONDIN, F., ATTISANO, L. & DUBOIS, C. M. 2001. Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem*, 276, 33986-94.
- BRACK, C., LITHGOW, G., OSIEWACZ, H. & TOUSSAINT, O. 2000. EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *EMBO J*, 19, 1929-34.
- BRENNEISEN, P., WENK, J., WLASCHEK, M., BLAUDSCHUN, R. & SCHARFFETTER-KOCHAN EK, K. 1999. A newly adapted pulsed-field gel electrophoresis technique allows to detect distinct types of DNA damage at low frequencies in human dermal fibroblasts upon exposure to non-toxic H2O2 concentrations. *Free Radic Res*, 31, 405-18.
- BROWN, J. D., DICHIARA, M. R., ANDERSON, K. R., GIMBRONE, M. A., JR. & TOPPER, J. N. 1999. MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J Biol Chem*, 274, 8797-805.
- BROWN, K. A., PIETENPOL, J. A. & MOSES, H. L. 2007. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem*, 101, 9-33.
- CABREIRO, F., PICOT, C. R., FRIGUET, B. & PETROPOULOS, I. 2006. Methionine sulfoxide reductases: relevance to aging and protection against oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*, 1067, 37-44.
- CAMPISI, J. 1996. Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell*, 84, 497-500.
- CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.
- CHRETIEN, A., DIERICK, J. F., DELAIVE, E., LARSEN, M. R., DIEU, M., RAES, M., DEROANNE, C. F., ROEPSTORFF, P. & TOUSSAINT, O. 2008. Role of TGF-beta1-independent changes in protein neosynthesis, p38alphaMAPK, and cdc42 in hydrogen peroxide-induced senescence-like morphogenesis. *Free Radic Biol Med*, 44, 1732-51.

- COLEMAN, M. L., MARSHALL, C. J. & OLSON, M. F. 2004. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 355-66.
- COLMAN, R. J., ANDERSON, R. M., JOHNSON, S. C., KASTMAN, E. K., KOSMATKA, K. J., BEASLEY, T. M., ALLISON, D. B., CRUZEN, C., SIMMONS, H. A., KEMNITZ, J. W. & WEINDRUCH, R. 2009. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325, 201-4.
- COURTOIS-COX, S., GENTHER WILLIAMS, S. M., RECZEK, E. E., JOHNSON, B. W., MCGILLICUDDY, L. T., JOHANNESSEN, C. M., HOLLSTEIN, P. E., MACCOLLIN, M. & CICHOWSKI, K. 2006. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, 10, 459-72.
- DATTO, M. B., LI, Y., PANUS, J. F., HOWE, D. J., XIONG, Y. & WANG, X. F. 1995. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5545-9.
- DE MAGALHAES, J. P., CHAINIAUX, F., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2002. Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett*, 523, 157-62.
- DE MAGALHAES, J. P., CURADO, J. & CHURCH, G. M. 2009. Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinformatics*, 25, 875-81.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., BORLON, C., PASCAL, T., ROYER, V., ELIAERS, F., NINANE, N., CARRARD, G., FRIGUET, B., DE LONGUEVILLE, F., BOFFE, S., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2005. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci*, 118, 743-58.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J. D., CAMPISI, J. & TOUSSAINT, O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*, 4, 1798-806.
- DEBACQ-CHAINIAUX, F., PASCAL, T., BOILAN, E., BASTIN, C., BAUWENS, E. & TOUSSAINT, O. 2008. Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, 44, 1817-32.
- DERYNCK, R. & ZHANG, Y. E. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425, 577-84.
- DIMRI, G. P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E. E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O. & ET AL. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9363-7.
- DUMONT, P., BURTON, M., CHEN, Q. M., GONOS, E. S., FRIPPIAT, C., MAZARATI, J. B., ELIAERS, F., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, 28, 361-73.
- FINKEL, T. & HOLBROOK, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-47.
- FRIPPIAT, C., CHEN, Q. M., ZDANOV, S., MAGALHAES, J. P., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2001. Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, 276, 2531-7.

- FRIPPIAT, C., DEWELLE, J., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2002. Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, 33, 1334-46.
- FUNK, S. E. & SAGE, E. H. 1991. The Ca²⁺(+)-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2648-52.
- GEISS-FRIEDLANDER, R. & MELCHIOR, F. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 947-56.
- GONOS, E. S., DERVENTZI, A., KVEIBORG, M., AGIOSTRATIDOU, G., KASSEM, M., CLARK, B. F., JAT, P. S. & RATTAN, S. I. 1998. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res*, 240, 66-74.
- GUO, X. & WANG, X. F. 2009. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res*, 19, 71-88.
- GUPTA, M., GUPTA, S. K., HOFFMAN, B. & LIEBERMANN, D. A. 2006. Gadd45a and Gadd45b protect hematopoietic cells from UV-induced apoptosis via distinct signaling pathways, including p38 activation and JNK inhibition. *J Biol Chem*, 281, 17552-8.
- HARA-CHIKUMA, M. & VERKMAN, A. S. 2008. Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *J Invest Dermatol*, 128, 2145-51.
- HARMAN, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300.
- HERBIG, U. & SEDIVY, J. M. 2006. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev*, 127, 16-24.
- HERRERA, R. E., MAKELA, T. P. & WEINBERG, R. A. 1996. TGF beta-induced growth inhibition in primary fibroblasts requires the retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell*, 7, 1335-42.
- HILDESHEIM, J., BULAVIN, D. V., ANVER, M. R., ALVORD, W. G., HOLLANDER, M. C., VARDANIAN, L. & FORNACE, A. J., JR. 2002. Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res*, 62, 7305-15.
- HOCEVAR, B. A., BROWN, T. L. & HOWE, P. H. 1999. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J*, 18, 1345-56.
- IWASA, H., HAN, J. & ISHIKAWA, F. 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells*, 8, 131-44.
- JAVELAUD, D. & MAUVIEL, A. 2005. Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene*, 24, 5742-50.
- JENKINS, G. 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev*, 123, 801-10.
- JIN, G. & HOWE, P. H. 1997. Regulation of clusterin gene expression by transforming growth factor beta. *J Biol Chem*, 272, 26620-6.
- KANG, J. S., LIU, C. & DERYNCK, R. 2009. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol*, 19, 385-94.
- KANITAKIS, J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, 12, 390-9; quiz 400-1.
- KANNAN, S. & JAISWAL, A. K. 2006. Low and high dose UVB regulation of transcription factor NF-E2-related factor 2. *Cancer Res*, 66, 8421-9.
- KIM, K. H., PARK, G. T., LIM, Y. B., RUE, S. W., JUNG, J. C., SONN, J. K., BAE, Y. S., PARK, J. W. & LEE, Y. S. 2004. Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a

- transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 318, 819-25.
- KINGSLEY, D. M. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, 8, 133-46.
- KIRKWOOD, T. B. & AUSTAD, S. N. 2000. Why do we age? *Nature*, 408, 233-8.
- KLOTH, J. N., FLEUREN, G. J., OOSTING, J., DE MENEZES, R. X., EILERS, P. H., KENTER, G. G. & GORTER, A. 2005. Substantial changes in gene expression of Wnt, MAPK and TNFalpha pathways induced by TGF-beta1 in cervical cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 26, 1493-502.
- KUMAZAKI, T., KOBAYASHI, M. & MITSUI, Y. 1993. Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Exp Cell Res*, 205, 396-402.
- KURZ, D. J., DECARY, S., HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J. D. 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, 113 (Pt 20), 3613-22.
- KVEIBORG, M., FLYVBJERG, A., ERIKSEN, E. F. & KASSEM, M. 2001. Transforming growth factor-beta1 stimulates the production of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in human bone marrow stromal osteoblast progenitors. *J Endocrinol*, 169, 549-61.
- LECHAPT-ZALCMAN, E., PRULIERE-ESCABASSE, V., ADVENIER, D., GALIACY, S., CHARRIERE-BERTRAND, C., COSTE, A., HARF, A., D'ORTHO, M. P. & ESCUDIER, E. 2006. Transforming growth factor-beta1 increases airway wound repair via MMP-2 upregulation: a new pathway for epithelial wound repair? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290, L1277-82.
- LEVENS, E., LUO, X., DING, L., WILLIAMS, R. S. & CHEGINI, N. 2005. Fibromodulin is expressed in leiomyoma and myometrium and regulated by gonadotropin-releasing hormone analogue therapy and TGF-beta through Smad and MAPK-mediated signalling. *Mol Hum Reprod*, 11, 489-94.
- LI, J., TANG, H., HU, X., CHEN, M. & XIE, H. 2010. Aquaporin-3 gene and protein expression in sun-protected human skin decreases with skin ageing. *Australas J Dermatol*, 51, 106-12.
- LIN, S. J., LERCH, T. F., COOK, R. W., JARDETZKY, T. S. & WOODRUFF, T. K. 2006. The structural basis of TGF-beta, bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction*, 132, 179-90.
- LUO, K. 2003. Negative regulation of BMP signaling by the ski oncoprotein. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 3, 39-43.
- MASSAGUE, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67, 753-91.
- MASSAGUE, J., SEOANE, J. & WOTTON, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev*, 19, 2783-810.
- MELLO, C. C. & CONTE, D., JR. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431, 338-42.
- MOUCHET, N., ADAMSKI, H., BOUVET, R., CORRE, S., COURBEBASSE, Y., WATIER, E., MOSSER, J., CHESNE, C. & GALIBERT, M. D. 2010. In vivo identification of solar radiation-responsive gene network: role of the p38 stress-dependent kinase. *PLoS One*, 5, e10776.
- MOUSSAD, E. E. & BRIGSTOCK, D. R. 2000. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab*, 71, 276-92.
- MOUSTAKAS, A., SOUCHELNYTSKYI, S. & HELDIN, C. H. 2001. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*, 114, 4359-69.

- NASO, M., UITTO, J. & KLEMENT, J. F. 2003. Transcriptional control of the mouse Col7a1 gene in keratinocytes: basal and transforming growth factor-beta regulated expression. *J Invest Dermatol*, 121, 1469-78.
- NERI, M., DESCALZI-CANCEDDA, F. & CANCEDDA, R. 1992. Heat-shock response in cultured chick embryo chondrocytes. Osteonectin is a secreted heat-shock protein. *Eur J Biochem*, 205, 569-74.
- NICOLAS, F. J. & HILL, C. S. 2003. Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest. *Oncogene*, 22, 3698-711.
- NOUSBECK, J., SARIG, O., AVIDAN, N., INDELMAN, M., BERGMAN, R., RAMON, M., ENK, C. D. & SPRECHER, E. 2010. Insulin-like growth factor-binding protein 7 regulates keratinocyte proliferation, differentiation and apoptosis. *J Invest Dermatol*, 130, 378-87.
- ONO, K. & HAN, J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, 12, 1-13.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B. E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. & COBB, M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22, 153-83.
- PHANISH, M. K., WAHAB, N. A., COLVILLE-NASH, P., HENDRY, B. M. & DOCKRELL, M. E. 2006. The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *Biochem J*, 393, 601-7.
- PIEK, E., HELDIN, C. H. & TEN DIJKE, P. 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J*, 13, 2105-24.
- RANGANATHAN, P., AGRAWAL, A., BHUSHAN, R., CHAVALMANE, A. K., KALATHUR, R. K., TAKAHASHI, T. & KONDAIAH, P. 2007. Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: differential regulation in normal and tumour cells. *BMC Genomics*, 8, 98.
- RAVANAT, J. L., DOUKI, T. & CADET, J. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*, 63, 88-102.
- REED, M. J., VERNON, R. B., ABRASS, I. B. & SAGE, E. H. 1994. TGF-beta 1 induces the expression of type I collagen and SPARC, and enhances contraction of collagen gels, by fibroblasts from young and aged donors. *J Cell Physiol*, 158, 169-79.
- ROSS, S. & HILL, C. S. 2008. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 383-408.
- SALADI, R. N. & PERSAUD, A. N. 2005. The causes of skin cancer: a comprehensive review. *Drugs Today (Barc)*, 41, 37-53.
- SASAGAWA, S., OZAKI, Y., FUJITA, K. & KURODA, S. 2005. Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat Cell Biol*, 7, 365-73.
- SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K., BRENNEISEN, P., WENK, J., HERRMANN, G., MA, W., KUHR, L., MEEWES, C. & WLASCHEK, M. 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol*, 35, 307-16.
- SCHMITTGEN, T. D. 2001. Real-time quantitative PCR. *Methods*, 25, 383-5.
- SERRANO, M., LIN, A. W., MCCURRACH, M. E., BEACH, D. & LOWE, S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593-602.
- SHAY, J. W. & WRIGHT, W. E. 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 72-6.

- SHE, Q. B., CHEN, N. & DONG, Z. 2000. ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem*, 275, 20444-9.
- SHELTON, D. N., CHANG, E., WHITTIER, P. S., CHOI, D. & FUNK, W. D. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol*, 9, 939-45.
- SWISSHELM, K., RYAN, K., LEE, X., TSOU, H. C., PEACOCKE, M. & SAGER, R. 1994. Down-regulation of retinoic acid receptor beta in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ*, 5, 133-41.
- TEN DIJKE, P. & HILL, C. S. 2004. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*, 29, 265-73.
- TOUSSAINT, O., MEDRANO, E. E. & VON ZGLINICKI, T. 2000. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, 35, 927-45.
- TOUSSAINT, O., RAES, M. & REMACLE, J. 1991. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mech Ageing Dev*, 61, 45-64.
- TROUGAKOS, I. P. & GONOS, E. S. 2002. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 34, 1430-48.
- WEINBERG, W. C., AZZOLI, C. G., KADIWAR, N. & YUSPA, S. H. 1994. p53 gene dosage modifies growth and malignant progression of keratinocytes expressing the v-rasHa oncogene. *Cancer Res*, 54, 5584-92.
- WEINDRUCH, R. & WALFORD, R. L. 1982. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science*, 215, 1415-8.
- WELCHMAN, R. L., GORDON, C. & MAYER, R. J. 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 599-609.
- WLASCHEK, M., TANTCHEVA-POOR, I., NADERI, L., MA, W., SCHNEIDER, L. A., RAZI-WOLF, Z., SCHULLER, J. & SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B*, 63, 41-51.
- WON, Y. K., ONG, C. N., SHI, X. & SHEN, H. M. 2004. Chemopreventive activity of parthenolide against UVB-induced skin cancer and its mechanisms. *Carcinogenesis*, 25, 1449-58.
- ZARUBIN, T. & HAN, J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, 15, 11-8.
- ZDANOV, S., DEBACQ-CHAINIAUX, F., REMACLE, J. & TOUSSAINT, O. 2006. Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H2O2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett*, 580, 6455-63.
- ZHANG, Y. E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*, 19, 128-39.