



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Étude de la communication entre les kératinocytes humains normaux en sénescence répliquative ou en sénescence induite par les UVB et les cellules environnantes

Hannart, Clotilde

Award date:
2018

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.



Faculté des Sciences

**Etude de la communication entre les kératinocytes humains normaux en sénescence
répllicative ou en sénescence induite par les UVB et les cellules environnantes**

Mémoire présenté pour l'obtention

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

Clotilde HANNART

Janvier 2018

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

Etude de la communication entre les kératinocytes humains normaux en sénescence répllicative ou en sénescence induite par les UVB et les cellules environnantes

Clotilde HANNART

Résumé

Le vieillissement de la population augmente dans le monde et représente un enjeu majeur pour le futur au niveau économique et social. Le vieillissement est caractérisé par diverses caractéristiques dont la sénescence cellulaire. En effet, l'accumulation de cellules sénescents a été observée *in vivo* dans de nombreux tissus, dont la peau, et *in vitro*, après plusieurs passages en culture. Les cellules sénescents sont caractérisées par une série de biomarqueurs tels que des modifications morphologiques, une activité de la β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β Gal), un arrêt du cycle cellulaire et une modification de l'expression génique propre à la sénescence. Les cellules sénescents présentent également un profil de sécrétion particulier appelé SASP (senescence associated secretory phenotype). Lors de ce travail nous nous sommes intéressés à la sénescence du kératinocyte, tant à la sénescence répllicative qu'à la sénescence prématurée induite par les UVB. Premièrement, nous avons réalisé une étude de l'effet des UVB à large spectre (broad-band, BB-UVB) sur l'induction de la sénescence chez les kératinocytes humains normaux. Nous avons déterminé une dose de BB-UVB subcytotoxique (55 mJ/cm^2) et analysé l'induction de la sénescence via l'étude de plusieurs biomarqueurs. La deuxième partie de ce travail consistait en l'étude de la communication entre les kératinocytes (jeunes et en sénescence répllicative ou induite par les UVB) et les kératinocytes jeunes ou les cellules cancéreuses A431. Ceci a été réalisé par l'utilisation de milieu conditionné en tests scratch afin d'étudier le comportement migratoire de ces cellules. Les résultats montrent que le milieu conditionné des kératinocytes jeunes et sénescents n'a pas d'effet sur le comportement migratoire des kératinocytes jeunes. Par contre, nous avons observé un effet positif du milieu conditionné de kératinocytes en sénescence répllicative sur la migration des A431, en comparaison au milieu conditionné de kératinocytes jeunes. Cet effet semble être lié à des facteurs de nature protéique. Nous n'avons observé qu'un léger effet du milieu conditionné de kératinocytes exposés aux UV sur les A431, par rapport au milieu conditionné des cellules contrôles.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2018

Promoteur: Florence Debacq-Chainiaux

Remerciements

Merci à Florence pour sa disponibilité et ses conseils tout au long du mémoire et pendant la rédaction.

Merci à toi, Emi, pour ton dévouement, ta patience et ta disponibilité. Après un démarrage un peu compliqué par moments, je me suis vraiment épanouie et j'ai appris énormément de choses pendant ces dix mois, et ce grâce à toi. Tu m'as appris à devenir une vraie scientifique, à me poser les bonnes questions et à ne pas être déstabilisée par les changements de programme au dernier moment.

Merci à Antoine, Maude, Martine, Noëlle, Catherine et Guy d'avoir toujours été là pour répondre à mes questions au labo.

Merci au LabCeTi de nous avoir permis d'utiliser le cytonote, et pour vos précieux conseils lorsque le programme n'en faisait qu'à sa tête.

Merci à mes coupines de bureau, Ali, An, Jia et Audi. Vous avez rendu ce mémoire vraiment mémorable ! Toujours là pour se marrer mais aussi pour me soutenir dans mes moments difficiles. Vous allez tellement me manquer quand vous serez à l'autre bout du monde pendant le stage ! J'espère que vous reviendrez vite pour qu'on puisse retourner boire nos verres en terrasses à n'importe quelle occasion !

Je tiens également à remercier ici Monsieur Trépant, mon professeur de sciences pendant mes trois premières années du secondaire. Vous avez réussi à me rendre un peu confiance en moi et à me donner le goût des sciences, alors que tous les autres professeurs m'ont vite fait comprendre que je n'étais pas faite pour continuer les études dans la filière générale... J'aimerais que ces professeurs apprennent à ne pas catégoriser les enfants simplement sur les résultats obtenus, mais à aller voir un peu plus loin, essayer de comprendre ce qui peut se passer à l'intérieur d'eux et les tirer vers le haut afin qu'ils puissent donner le meilleur d'eux-mêmes. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est en partie grâce à vous !

Un merci tout particulier à mes parents, à mes frères et sœurs et à mon compagnon de m'avoir supportée pendant toute la durée de mes études, pendant tous ces blocus où j'étais invivable, d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours poussée à me dépasser.

Je suis impatiente de commencer ma vie d'adulte, forte de tout ce que j'ai appris pendant mes années à l'université. Tout ça risque de vite me manquer je pense ...

Clotilde

Liste des abréviations

(6-4) PP	Pyrimidine pyrimidone (6-4) photoproduits
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine
Apo J	Apolipoprotein J
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia Rad3 related
BER	Base excision repair
BPE	Bovine pituitary extract
BRCA1	Breast cancer type-1 susceptibility
BB-UVB	Broad-band UVB
CHK	Checkpoint kinase
CTGF	Connective tissue growth factor
CNV	Copy number variation
CPD	Cumulative population doubling
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	Cyclin-dependent kinase inhibitor
DHG	DMEM High Glucose
DDR	DNA damage response
DSB	Double strand break
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epidermal to mesenchymal transition
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GLB1	Galactosidase beta 1
GG-NER	Global genome NER
GGR	Global genome repair
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HR	Homolog recombination
hTERT	Human telomerase catalytic subunit
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
ImK	Immortal keratinocytes
IGFBP	Insulin growth factor binding protein
IL	Interleukin
K-SFM	Keratinocyte-serum free medium
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Matrix metalloproteinase
MC	Milieu conditionné
MRN	MRE11/RAD50/NBS1
MTT	3, (4,5-diméthyl-thiazol-2-yl) bromure
NB-UVB	Narrow-band UVB
NLR	Nod-like receptor

NHEJ	Non-homologous end joining
NHK	Normal human keratinocytes
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NER	Nucleotide excision repair
OIS	Oncogene-induced senescence
PFA	Paraformaldehyde
PAR	Poly(ADP-ribose)
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1
PCR	Polymerase chain reaction
PVDF	Polyvinilidene fluoride
PSNE	Post-senescence neoplastic emergence
PCNA	Proliferation cell nuclear antigen
PUVA	Psoralen and ultraviolet A
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
ROS	Reactive oxygen species
rEGF	recombinant EGF
Rb	Retinoblastoma
RT	Room temperature
SASP	Senescence associated secretory phenotype
SR	Sénescence rélicative
SA- β Gal	Senescence-associated β -galactosidase
SAASP	Skin aging-associated secreted proteins
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIPS	Stress-induced premature senescence
<i>t</i> -BHP	<i>Tert</i> -butylhydroperoxyde
TC-NER	Transcription-coupled NER
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
UV	Ultraviolet
UVA	Ultraviolet A
UVB	Ultraviolet B
UVC	Ultraviolet C
UPR	Unfolded protein response
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western Blot
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC1	X-Ray Repair Cross Complementing 1

Table des matières

I. Introduction

1	Vieillessement de la population	1
2	Caractéristiques du vieillissement	1
2.1	Instabilité génomique	1
2.2	Raccourcissement des télomères	2
2.3	Altérations épigénétiques	2
2.4	Perte de protéostasie	2
2.5	Mauvaise perception des nutriments	3
2.6	Dysfonction mitochondriale	3
2.7	Epuisement du potentiel des cellules souches	3
2.8	Altération de la communication cellulaire	3
2.9	Sénescence cellulaire.....	4
3	Vieillessement de la peau.....	4
3.1	Histologie de la peau	4
3.1.1	<i>L'hypoderme</i>	4
3.1.2	<i>Le derme</i>	4
3.1.3	<i>L'épiderme</i>	5
3.2	Exposome du vieillissement de la peau.....	5
3.3	Les rayons UV	5
3.4	Domages à l'ADN causés par les UV	6
3.5	Réparation des domages à l'ADN	6
3.6	Caractéristiques du vieillissement intrinsèque et extrinsèque	7
3.7	Effets bénéfiques et thérapeutiques des UV	7
4	Les différents types de sénescences cellulaires	8
4.1	Sénescence rélicative.....	8
4.2	Sénescence prématurée induite par les stress	9
4.3	Sénescence induite par les oncogènes	9
5	Les biomarqueurs de la sénescence	10
5.1	Modifications morphologiques.....	10
5.2	Arrêt permanent du cycle cellulaire	10
5.3	Domages à l'ADN persistants et activation de la DDR	11
5.4	Activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal).....	11
5.5	Modifications de l'expression génique.....	12
5.6	Raccourcissement des télomères	13
5.7	Délétion de l'ADN mitochondrial	14
5.8	Modifications du sécrétome	14

6	Sénescence du kératinocyte.....	15
7	Cancers cutanés	16
7.1	Mélanome.....	16
7.2	Carcinome basocellulaire	16
7.3	Carcinome des cellules squameuses.....	16
8	Communication	17
	Objectifs	19

II. Matériel et méthodes

1	Culture cellulaire	20
1.1	Isolation des kératinocytes	20
	a. <i>Matériel</i>	20
	b. <i>Méthode</i>	20
1.2	Culture des kératinocytes	20
	a. <i>Matériel</i>	20
	b. <i>Méthode</i>	20
1.3	Culture des A431.....	21
	a. <i>Matériel</i>	21
	b. <i>Méthode</i>	21
2	Sénescence prématurée induite par les stress UVB (UVB-SIPS)	21
	a. <i>Matériel</i>	21
	b. <i>Méthode</i>	21
3	Test MTT.....	21
	a. <i>Matériel</i>	21
	b. <i>Méthode</i>	21
4	Activité béta-galactosidase associée à la sénescence (SA-βGal)	22
	a. <i>Matériel</i>	22
	b. <i>Méthode</i>	22
5	Analyse de l'expression génique.....	22
5.1	Extraction de l'ARN total.....	22
	a. <i>Matériel</i>	22
	b. <i>Méthode</i>	22
5.2	Transcription inverse.....	22
	a. <i>Méthode</i>	22
5.3	Real-time PCR.....	23

a.	<i>Matériel</i>	23
b.	<i>Méthode</i>	23
6	Extraction protéique et western blot.....	23
6.1	Extraction protéique totale	23
a.	<i>Matériel</i>	23
b.	<i>Méthode</i>	23
6.2	Dosage protéique	24
b.	<i>Méthode</i>	24
6.3	Western blot	24
a.	<i>Matériel</i>	24
b.	<i>Méthode</i>	24
7	Immunofluorescence	25
a.	<i>Matériel</i>	25
8	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays).....	25
a.	<i>Matériel</i>	25
b.	<i>Méthode</i>	25
9	Influence du milieu conditionné de NHK jeunes et sénescents sur les cellules environnantes.....	26

III. Résultats

1	Etude de l'effet des UVB à large spectre (BB-UVB) sur l'induction de la sénescence des kératinocytes.....	28
1.1	Effet d'une dose croissante de BB-UVB sur la morphologie et la mortalité des NHK.....	28
1.2	SA-βgal chez les NHK exposés aux BB-UVB.....	28
1.3	Etude de l'arrêt du cycle cellulaire chez les NHK exposés aux BB-UVB	29
1.4	Etude de l'expression de gènes associés à la sénescence chez les NHK exposés aux BB-UVB.....	29
1.5	Etude des dommages à l'ADN chez les NHK exposés aux BB-UVB	29
2	Etude de la sénescence répllicative des NHK	30
2.1	Evolution de la culture de NHK jusqu'à la sénescence répllicative	30
2.2	Modifications morphologiques et activité SA-βGal des NHK en sénescence répllicative.....	31
2.3	Sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF dans des NHK en sénescence répllicative	31
3	Impact des NHK en sénescence répllicative et en NB-UVB-SIPS sur des NHK jeunes ou des cellules A431	31
3.1	Effet du milieu conditionné de kératinocytes jeunes et sénescents sur les kératinocytes jeunes	32
3.2	Effet du milieu conditionné de kératinocytes jeunes et sénescents sur les A431	33
3.2.1	Mises au point du milieu à utiliser pour les tests scratch	33

3.2.2	Tests scratch sur les A431, incubés dans du milieu conditionné de NHK jeunes et en sénescence réplivative	34
3.2.3	Etude de l'effet des vésicules extracellulaires issues de milieu conditionné de NHK jeunes et en sénescence réplivative sur la migration des A431	34
3.2.4	Etude de l'effet des protéines présentes dans le milieu conditionné de NHK jeunes et en sénescence réplivative sur la migration des A431	35
3.3	Communication entre les NHK en NB-UVB-SIPS et les cellules A431.....	35

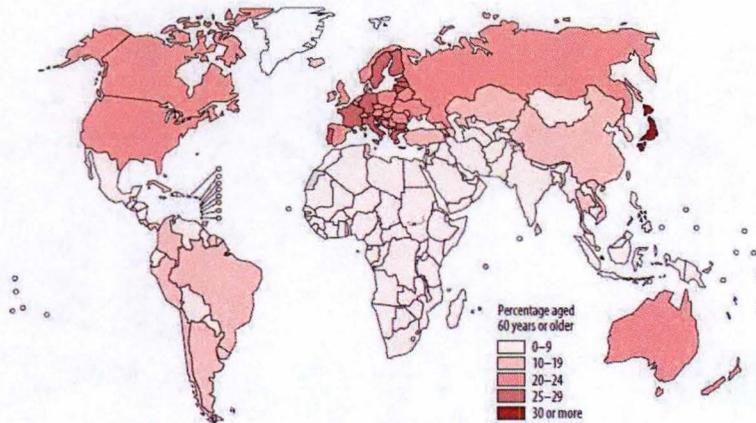
IV. Discussion, Conclusion & Perspectives

Références	45
-------------------------	-----------

I. Introduction

a

Proportion of population aged 60 years or older, by country, 2015



b

Proportion of population aged 60 years or older, by country, 2050 projections

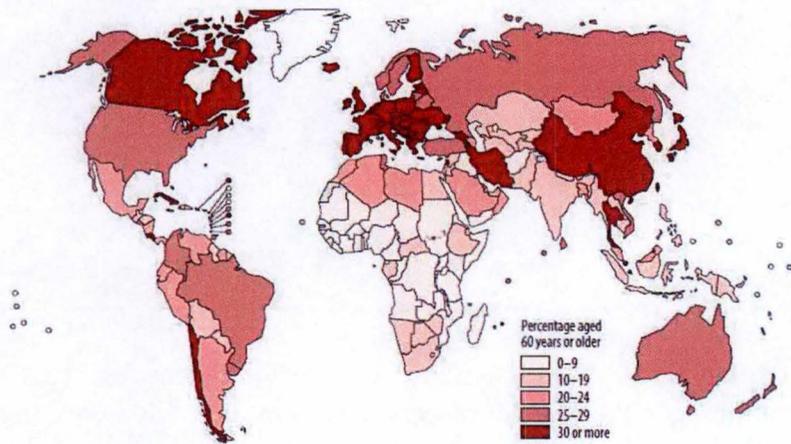


Figure I.1 : Vieillissement de la population

- a. Proportion des personnes âgées de 60 ans et plus en 2015
- b. Projection de la proportion de personnes âgées de 60 ans et plus en 2050
(WHO, 2017)



Figure I.2 : Marqueurs du vieillissement. Le vieillissement est caractérisé par 9 marqueurs : l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, des altérations épigénétiques, la perte de protéostasie, une dérégulation dans l'absorption des nutriments, la dysfonction mitochondriale, l'épuisement du potentiel des cellules souches, l'altération de la communication cellulaire et la sénescence cellulaire (López-Otín *et al.*, 2013).

1 Vieillessement de la population

Un vieillissement global de la population est observé au niveau mondial. Cela est dû à une baisse de la mortalité infantile et à une augmentation du taux de survie chez les personnes âgées grâce au développement socio-économique mondial croissant (Figure I.1) (Beard *et al.*, 2016 ; WHO, 2017). Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé, une autre raison expliquant le déséquilibre entre la proportion de personnes jeunes et âgées est la chute du taux de natalité dû à des méthodes de contraception plus efficaces et à un mode de vie différent, comme le changement des normes sociales et une place différente de la femme dans la société (WHO, 2017). Mais ce vieillissement de la population risque d'engendrer une augmentation du nombre de patients souffrant de maladies liées à l'âge, et crée un challenge économique important ainsi qu'une nécessité de revoir la place de la personne âgée dans notre société (WHO, 2017).

2 Caractéristiques du vieillissement

Le vieillissement est défini comme étant une perte progressive de l'intégrité physiologique menant à l'augmentation du risque de mortalité. Le vieillissement est caractérisé par 9 marqueurs établis dans l'article de Lopez-Otin en 2013 (López-Otín *et al.*, 2013). Chacun de ces marqueurs doit répondre à plusieurs critères. Le premier critère est que cela doit apparaître pendant le vieillissement normal des individus. Le deuxième critère veut que l'aggravation artificielle de ce marqueur accélère le vieillissement. Ceci découle sur le troisième critère selon lequel une amélioration du marqueur doit retarder le processus de vieillissement et améliorer la qualité de vie de l'individu (López-Otín *et al.*, 2013). Ces marqueurs sont : l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, des altérations épigénétiques, la perte de protéostasie, la mauvaise perception des nutriments, la dysfonction mitochondriale, l'épuisement du potentiel des cellules souches, l'altération de la communication cellulaire et la sénescence cellulaire (Figure I.2).

2.1 Instabilité génomique

Le vieillissement est caractérisé par une accumulation de dommages au niveau de l'ADN génomique (Moskalev *et al.*, 2013) et une accumulation de mutations au niveau de l'ADN mitochondrial (Park and Larsson, 2011). Ainsi, il a été observé que certains types de dommages peuvent être associés au vieillissement comme les aneuploïdies chromosomiques (Naylor and van Deursen, 2016) et les variations du nombre de copies d'un ou de plusieurs gènes dans le génome (Copy Number Variation (CNV)). Les CNV sont des segments d'ADN qui présentent de grandes variations d'un individu à l'autre à cause de réarrangements chromosomiques tels que des délétions ou des duplications. Certains de ces réarrangements ont été montrés comme spécifiquement corrélés avec le vieillissement (Kuningas *et al.*, 2011).

Plusieurs maladies induisant l'apparition prématurée du vieillissement (maladies dites « progéroïdes ») sont liées à une accumulation de dommages à l'ADN (Burtner and Kennedy, 2010), suite à des mutations au niveau des acteurs impliqués dans les mécanismes de réparation de celui-ci. Cela entraîne un vieillissement prématuré du patient qui voit son espérance de vie fortement diminuée (Ahmed *et al.*, 2017).

Dans l'exemple du syndrome de Hutchinson-Gilford, également appelé progeria, la plupart des patients atteints (90 %) présentent une mutation *de novo* au niveau du gène *LMNA*, qui est une

substitution d'une cytosine par une thymine. Ce gène code pour les lamines A et C, protéines impliquées dans la structure des noyaux. Cette mutation mène à une perte de l'architecture de l'enveloppe nucléaire normale, à une expression anormale des gènes, à une augmentation du taux de mitoses et d'apoptose et à une accumulation des dommages à l'ADN (Ahmed *et al.*, 2017).

2.2 Raccourcissement des télomères

Les télomères sont des séquences répétées environ 2000 fois aux extrémités des chromosomes. A chaque cycle de division, entre 25 et 200 paires de bases sont perdues. Cette diminution mène à un arrêt de division cellulaire et à la sénescence cellulaire (Prasad *et al.*, 2017). Ce point sera décrit plus en détails au point 5.

2.3 Altérations épigénétiques

L'épigénétique est un mécanisme de modulation de l'expression génique par des modifications chimiques des histones sans modification de la séquence d'ADN. Les histones, des protéines entourant la double hélice d'ADN, peuvent être modifiées par acétylation, phosphorylation ou méthylation, modifiant la structure de la chromatine, l'expression et la stabilité génique ainsi que la réplication (Park *et al.*, 2017 ; Guillaumet-Adkins *et al.*, 2017). Dans le cas d'une méthylation, un groupement méthyl est ajouté en 5ème position d'une cytosine grâce à l'action d'une ADN méthyltransférase. Cela provoque le « silencing » du gène concerné en empêchant le recrutement des facteurs de transcription sur la zone concernée (Maegawa *et al.*, 2010). Les modifications d'histones peuvent être associées à l'espérance de vie, comme par exemple la méthylation des histones H3K4me3 et H3K27me3. En effet, une inhibition de méthyltransférases spécifiques est associée avec une réduction globale de l'histone H3K4me3, augmentant l'espérance de vie. D'autre part, une inhibition de déméthylases spécifiques diminue l'espérance de vie chez la souris (Guillaumet-Adkins *et al.*, 2017).

2.4 Perte de protéostasie

Le vieillissement est associé à une altération de l'homéostasie protéique assurant le maintien de l'intégrité protéique, aussi appelée protéostasie. Plusieurs mécanismes sont nécessaires au maintien de la stabilité des protéines ainsi qu'à leur dégradation au niveau des lysosomes et du protéasome (Koga *et al.*, 2011). Ces mécanismes sont les protéines chaperonnes, le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie (Koga *et al.*, 2011). Les protéines chaperonnes sont responsables du bon repliement des protéines. Elles jouent donc un rôle important en permettant d'éviter une mauvaise conformation des protéines ou une agrégation de celles-ci, ce qui aurait un effet néfaste. Deux grands types de chaperonnes existent : les chaperonnes cytosoliques, permettant la surveillance des protéines se trouvant dans le cytosol, et les chaperonnes spécifiques des organites, permettant la surveillance des protéines synthétisées par des organites particuliers (Koga *et al.*, 2011). La surveillance constante par ces chaperonnes permet ainsi le maintien de l'homéostasie protéique (Hartl *et al.*, 2011).

Des études chez la drosophile ont pu montrer que le fonctionnement de ces chaperonnes déclinait avec l'âge de l'individu, ayant pour conséquence l'accumulation de protéines mal repliées qui finissent par s'agréger (Tsakiri *et al.*, 2013).

Le système ubiquitine-protéasome est formé par deux composants : la machinerie permettant l'ubiquitylation de la protéine cible à dégrader, et le protéasome où la cible ubiquitylée est dégradée (Koga *et al.*, 2011).

Il a été montré que de nombreuses maladies neurodégénératives liées à l'âge, comme la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer étaient causées par une accumulation toxique de

protéines agrégées due à un dysfonctionnement au niveau du système ubiquitine-protéasome (Zhu *et al.*, 2016).

Le dernier mécanisme, l'autophagie, permet la dégradation des protéines via les lysosomes (Koga *et al.*, 2011). Trois types d'autophagie sont recensées dans les cellules mammifères : la microautophagie, médiée directement par les lysosomes, la macroautophagie, médiée par les autophagosomes et l'autophagie médiée par les chaperonnes (Koga *et al.*, 2011).

Des manipulations génétiques ou pharmacologiques menant à une stimulation du système autophagique augmenterait l'espérance de vie chez les organismes modèles et une inhibition de ce système diminuerait la longévité de l'organisme (Rubinsztein *et al.*, 2011). Ceci démontre que ce critère peut être considéré comme une caractéristique du vieillissement.

2.5 Mauvaise perception des nutriments

Une mauvaise perception des nutriments caractérisée par une résistance à l'insuline ainsi qu'une dysfonction physiologique au niveau des hormones de croissance et sexuelles et au niveau de l'insulin-growth factor 1 (IGF-1) est une caractéristique du vieillissement (Barzilai *et al.*, 2012). Il a d'ailleurs été montré qu'une manipulation génétique atténuant la voie dépendant de l'IGF-1 et de l'insuline permet d'allonger l'espérance de vie de l'animal modèle en décélérant le métabolisme et la croissance cellulaire (Fontana *et al.*, 2010).

La restriction calorique est proposée afin de retarder le vieillissement en agissant sur ces voies métaboliques. Une étude sur une cohorte de singes Rhésus débutée en 1989 a pu montrer que la restriction calorique permettait de retarder l'apparition de maladies liées à l'âge et la mortalité chez ces singes (Colman *et al.*, 2009). Cela pourrait être expliqué par une stimulation moindre de l'axe IGF-1 (Fontana *et al.*, 2010).

2.6 Dysfonction mitochondriale

La fonction mitochondriale a un impact important sur le processus de vieillissement. L'accumulation de mutations au niveau de l'ADN mitochondrial est liée à ce processus (Kujoth, 2005). La dysfonction mitochondriale progressive observée avec le vieillissement résulte en une production de plus en plus importante d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS), causant une détérioration au niveau de la mitochondrie ainsi que des dommages cellulaires (Wickens, 2001).

2.7 Epuisement du potentiel des cellules souches

Les tissus vieillissants présentent un déclin au niveau des capacités prolifératives (Oh *et al.*, 2014). Les causes du vieillissement des cellules souches sont identiques à celles affectant les autres cellules. Les cellules souches sont ainsi concernées par le raccourcissement des télomères, la sénescence cellulaire, l'accumulation de dommages et de mutations, des altérations épigénétiques, un déclin métabolique, mais également la détérioration des niches permettant le maintien de leur fonction (Schultz and Sinclair, 2016). L'accumulation de dommages et de mutations des cellules souches sont responsables de la dysfonction de certains organes. De même, l'arrêt persistant du cycle cellulaire et la diminution de la capacité d'auto-renouvellement empêchent la régénération tissulaire (Soon Won, Choi, Jin Young, Lee, Kyung-Sun, 2017).

2.8 Altération de la communication cellulaire

L'inflammation chronique des tissus est une caractéristique du vieillissement et est appelée « inflammaging ». L'inflammaging est défini comme un état d'inflammation chronique de bas grade constant chez les personnes âgées et résulte de l'accumulation de dommages tissulaires dus à l'inflammation, une dysfonction au niveau du système immunitaire et une dysfonction au niveau de l'autophagie (Pawelec, 2017 ; Salminen *et al.*, 2012). Cela serait en partie dû aux

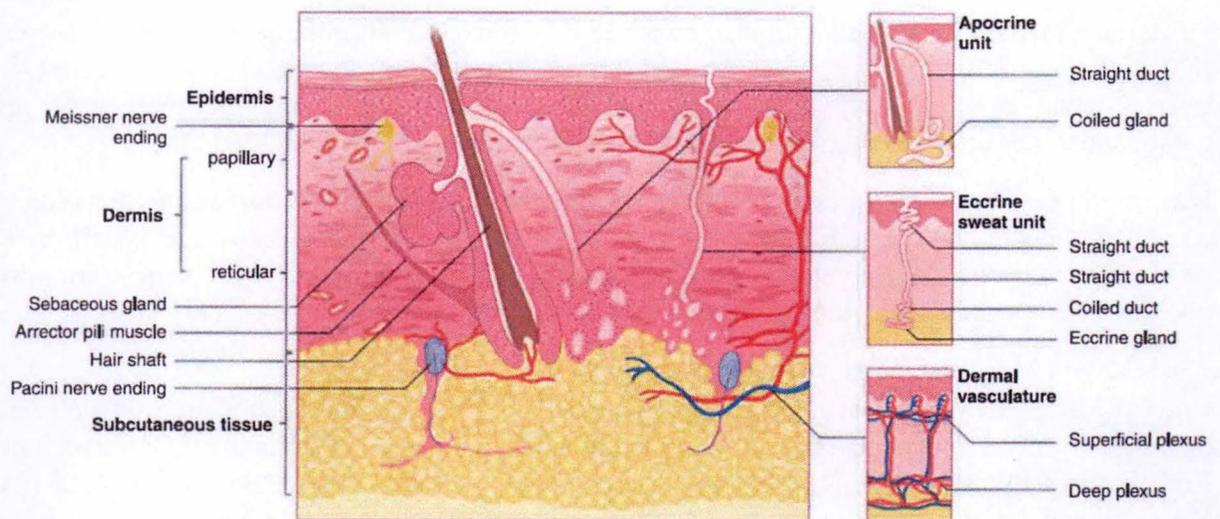


Figure I.3 : Section schématique de la peau. La peau est composée de 3 couches. L'hypoderme, ou tissu sous-cutané est la couche la plus interne. Il est composé principalement d'adipocytes. Le derme est la couche centrale, subdivisée en 2 partie : le derme supérieur et le derme inférieur. L'épiderme est la couche la plus externe de la peau et constitue la première couche de protection du corps (Kolarsick *et al.*, 2011).

cellules du système immunitaire, mais serait en plus grande partie dû à la sénescence répliquative et au SASP (senescence-associated secretory phenotype) correspondant (Pawelec, 2017 ; Salminen *et al.*, 2012). Un tel environnement peut mener à une réduction de l'espérance de vie. Ces 2 causes sont indépendantes et agissent de façon additive sur la mortalité (Pawelec, 2017). Cela mène également à une activation de l'inflammasome NLRP3 (Nod-like receptor P3), menant à la synthèse d'IL-1 β , de TNF- α et d'interférons conduisant également à une inflammation chronique (Salminen *et al.*, 2012). L'inflammation chronique active le facteur de transcription NF- κ B au niveau de l'hypothalamus, induisant la diminution de la synthèse de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon) par les neurones. Cela engendre toute une série de problèmes comme une fragilité osseuse, une fonte musculaire, une atrophie au niveau de la peau et une réduction de la neurogenèse (Zhang *et al.*, 2013).

En plus de « l'inflammaging », il a été montré que l'accumulation de dommages dus au vieillissement dans un tissu pourrait avoir une incidence négative sur les tissus avoisinants par le transfert de cytokines inflammatoires ou de ROS (Nelson *et al.*, 2012).

2.9 Sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire se définit comme un arrêt irréversible du cycle cellulaire et l'apparition de changements phénotypiques (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). La sénescence cellulaire est observée *in vitro* mais également *in vivo* (Abbadie *et al.*, 2017). Nous reviendrons sur la sénescence plus loin dans cette introduction.

Ces 9 marqueurs caractérisant le vieillissement peuvent être rassemblés en trois grandes classes selon leur rôle ou leur contribution dans le phénomène du vieillissement. Il y a tout d'abord les marqueurs primaires, qui sont la cause des dommages observés. Parmi ceux-ci se retrouvent l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, la perte de protéostasie et les altérations génétiques. La deuxième catégorie est composée des marqueurs antagonistes, constituant les réponses aux dommages. Sont considérés comme tels la mauvaise perception des nutriments, les dysfonctions mitochondriales et la sénescence cellulaire. Pour finir, la troisième catégorie comporte les marqueurs responsables du phénotype de vieillissement. S'y retrouvent l'épuisement du potentiel des cellules souches et la communication cellulaire altérée (López-Otín *et al.*, 2013).

3 Vieillessement de la peau

3.1 Histologie de la peau

La peau est le premier organe de protection du corps et représente environ 15 % de la masse totale de celui-ci. Elle constitue également le premier organe exposé aux agents extérieurs. Elle se compose de trois grandes couches : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (Chu, 2011 ; Kolarsick *et al.*, 2011) (Figure I.3).

3.1.1 L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il constitue une réserve d'énergie pour le corps humain (Kolarsick *et al.*, 2011). Il permet l'attachement entre la peau et les tissus sous-jacents (Losquadro, 2017). L'hypoderme est constitué principalement d'adipocytes (Kolarsick *et al.*, 2011). Il est également composé de vaisseaux sanguins et de nerfs (Chu, 2011).

3.1.2 Le derme

Le derme, couche intermédiaire, donne son élasticité à la peau et permet une protection face aux blessures. Il permet également la régulation de la température corporelle et contient des

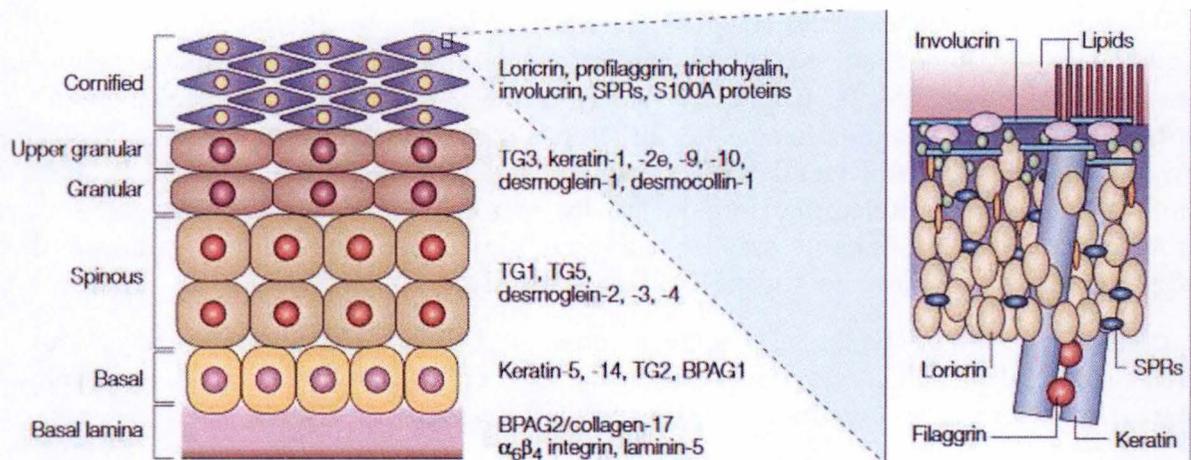


Figure I.4 : Différenciation des kératinocytes en différentes couches au niveau de l'épiderme.

Les kératinocytes se différencient en différentes couches. La couche la plus interne est la couche basale, suivie par la couche épineuse, la couche granuleuse, pour finir par la couche la plus externe qu'est la couche cornée. Chaque couche est caractérisée par la présence de marqueurs spécifiques, repris sur le schéma (Candi *et al.*, 2005).

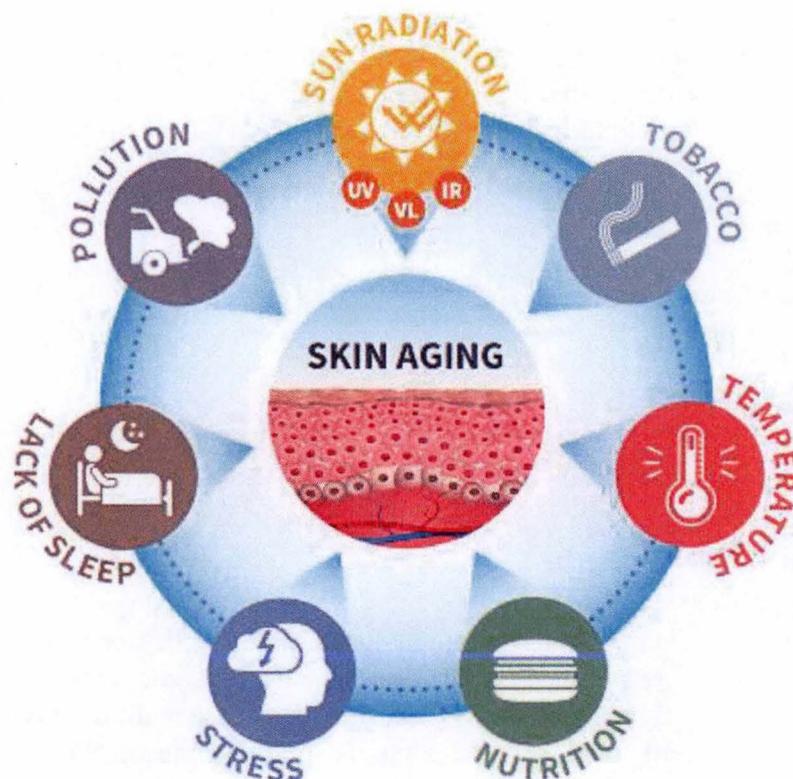


Figure I.5 : Exposome du vieillissement de la peau. Le vieillissement de la peau est modulé par l'exposition de celle-ci à toute une série de facteurs environnants tels que : le tabagisme, les variations de température, la nutrition, le stress, le manque de sommeil, la pollution et les radiations solaires (Krutmann *et al.*, 2017)

récepteurs sensoriels. Le derme est principalement composé de matrice extracellulaire composée de collagène ainsi que d'élastine, de vaisseaux sanguins, de nerfs et de diverses glandes (Losquadro, 2017). Le derme est divisé en 2 grandes régions. Le derme papillaire supérieur et le derme réticulaire inférieur, différant par leur organisation histologique (Kolarsick *et al.*, 2011). Le derme est composé de différents types cellulaires que sont les fibroblastes, les macrophages et les mastocytes (Chu, 2011).

Entre le derme et l'épiderme se trouve la jonction dermo-épidermique, servant d'interface entre ces deux couches. Elle sert de soutien à l'épiderme, permet de déterminer la polarité de la croissance cellulaire ainsi que l'organisation du cytosquelette des cellules basales de l'épidermes, produit des signaux nécessaires au développement, et enfin sert de barrière semi-perméable (Chu, 2011).

3.1.3 L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus externe de la peau et est composé en majorité de kératinocytes à différents stades de différenciation. Les autres cellules composant l'épiderme sont les mélanocytes (cellules dendritiques synthétisant la mélanine), les cellules de Merckel (mécanorécepteurs) et les cellules de Langerhans (cellules immunitaires présentatrices d'antigène). L'épiderme est divisé en 4 couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée qui est la plus externe (Chu, 2011). La couche basale (*Stratum germinativum*), la plus interne, est composée de cellules souches appelées cellules basales (Losquadro, 2017). Les cellules de la couche basale se différencient en cellules de la couche épineuse (*Stratum spinosum*) (Chu, 2011). Les kératinocytes composant cette couche sont polyédrique possèdent un noyau arrondi et sont attachés entre eux via des desmosomes, donnant un aspect épineux (Losquadro, 2017 ; Chu, 2011). La couche granuleuse (*Stratum granulosum*) est formée de cellules contenant des grains basophiles de kératohyaline responsables de la formation des futurs éléments structurels de la barrière épidermique. La kératohyaline est composée de profillagrine, de filaments de kératines et de loricine permettant la future formation de la couche cornée (Chu, 2011 ; Losquadro, 2017). La couche cornée (*Stratum corneum*) est composée de kératinocytes ayant subi une différenciation complète (Chu, 2011). Les cellules ont alors perdu leurs organites et la kératinisation est terminée (Losquadro, 2017). La couche cornée est la couche servant de barrière afin d'éviter la pénétration d'agents extérieurs et la perte d'eau (Proksch *et al.*, 2008) (Figure I.4).

3.2 Exposome du vieillissement de la peau

Un intérêt particulier est porté sur l'étude du vieillissement de la peau car cet organe est soumis au vieillissement chronologique, appelé vieillissement intrinsèque, comme tous les autres organes, mais aussi au vieillissement extrinsèque dû aux expositions exogènes (Toutfaire *et al.*, 2017). En effet, au cours de sa vie, de sa conception à sa mort, la peau d'un individu est exposée à toute une série d'expositions différentes qui peuvent affecter son vieillissement extrinsèque. L'ensemble de ces expositions est appelé exposome (Krutmann *et al.*, 2017) (Figure I.5). Parmi ces expositions se retrouvent le tabagisme (Doshi *et al.*, 2007), les variations de température (Cho *et al.*, 2009), la nutrition (Cosgrove *et al.*, 2007), la pollution (Vierkö Tter *et al.*, 2010), le manque de sommeil (Oyetaquin-White *et al.*, 2015), le stress (Fukuda *et al.*, 2015) et pour finir les radiations solaires (Dupont *et al.*, 2013) et principalement les rayons UV.

3.3 Les rayons UV

Les radiations solaires sont divisées en 3 grandes catégories que sont la lumière visible (400-740 nm) composant 50 % du spectre solaire total, les infrarouges (740 nm à 1000 nm) composant 45 % du spectre, et les ultraviolets (UV) composant les 5 % du spectre solaire restant. Les UV sont composés des UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) et UVA (315-400 nm) (Krutmann *et al.*, 2017).

Les UVC sont très énergétiques mais sont absorbés par la couche d'ozone (Dupont *et al.*, 2013). S'ils arrivaient jusqu'à la croûte terrestre, ils seraient plus absorbés par l'ADN que les autres types d'UV (Schuch *et al.*, 2017) et seraient donc particulièrement nocifs. Les UVB sont les rayons les plus énergétiques atteignant la surface terrestre et sont relativement absorbés par l'ADN. Ils pénètrent dans l'épiderme jusqu'à la couche basale et peuvent atteindre le derme supérieur. Ils sont responsables des coups de soleil et de la production de mélanine. Les UVA sont moins énergétiques mais présents en plus grande quantité dans le spectre solaire. Ils pénètrent plus profondément dans la peau et atteignent le derme profond (Dupont *et al.*, 2013).

3.4 Dommages à l'ADN causés par les UV

Les UV ont diverses actions sur les structures cellulaires via deux mécanismes différents. Le premier mécanisme est l'absorption directe de la lumière incidente par l'ADN génomique et est causé majoritairement par les UVC et les UVB. Cela résulte en la formation de dommages directs que sont les dimères de pyrimidine (cyclobutane pyrimidine dimer ou CPD) et les (6-4) photoproduits ((6-4)PP), via la dimérisation de pyrimidines adjacentes (Pattison and Davies, 2006). Les CPD sont formés à partir de 2 liens covalents entre les carbones C5 et C6 des bases azotées de l'ADN (Schuch *et al.*, 2017). Les CPD peuvent être formés au niveau de l'euchromatine et de l'hétérochromatine, alors que les (6-4)PP peuvent seulement être formés au niveau de l'euchromatine (Han *et al.*, 2016). Le deuxième mécanisme est le mécanisme causant des dommages indirects à l'ADN par photosensibilisation au niveau de molécules photosensibles ou chromophores. Il peut tout d'abord y avoir un transfert d'électrons causant la formation d'intermédiaires radicalaires (réaction de type I) (Pattison and Davies, 2006). Il a été observé que des flavines ou des pterines photoexcitées engendraient une oxydation des 2-deoxyguanine de l'ADN, ce qui cause la formation de 8-oxodG (8-oxo-2'-désoxyguanosine), considéré comme un marqueur de stress oxydatif (Ichihashi *et al.*, 2003), par transfert d'électrons (Hiraku *et al.*, 2007). Il peut également y avoir un transfert d'énergie au niveau de l'oxygène menant à la formation de ROS (type II). Ces radicaux libres réagissent par la suite avec les bases de l'ADN et mènent à des dommages (Pattison and Davies, 2006).

3.5 Réparation des dommages à l'ADN

Afin de réparer ces dommages à l'ADN causés par les UV, la cellule a mis en place toute une série de mécanismes de réparation, spécifiques aux types de dommages.

Un des mécanismes de réparation le plus important est le base-excision repair (BER), permettant la réparation de dommages provenant de désalkylation hydrolytique, des agents alkylants forts, des radiations ionisantes, ou des ROS (8-OHdG). Cette voie de réparation agit via une série d'ADN glycosylases ôtant les bases modifiées (Rastogi *et al.*, 2010).

Un deuxième mécanisme intervenant dans la réparation de dommages induits par les UV, notamment pour la réparation des dimères de pyrimidines, est le nucleotide excision repair (NER). La première étape du NER est la reconnaissance de la lésion au niveau de l'ADN. Il se produit ensuite une incision simple brin de part et d'autre de la lésion, puis une excision de la zone. Cette excision fait environ de 24 à 32 bases. Un nouveau brin d'ADN est ensuite synthétisé afin de remplacer le brin excisé et la dernière étape est la ligation du nouveau segment au brin existant (Ichihashi *et al.*, 2003). Deux types de NER existent : le Global Genome NER (GG-NER) et le Transcription-Coupled NER (TC-NER). Pour le GG-NER, la reconnaissance des dommages se fait au niveau de tout le génome par l'action aléatoire des complexes XPC-RAD23B ou XPE. Le TC-NER, quant à lui, répare les lésions bloquant la réplication de l'ADN. Cette voie est plus rapide que la précédente mais permet la réparation d'un nombre plus limité de lésions (Liakos *et al.*, 2017). La mutation de gènes codant pour des protéines intervenant dans le NER peut induire de maladies dont le *Xeroderma Pigmentosum* (XP), une maladie autosomique récessive. Les patients atteints de cette maladie ont un risque d'être atteint d'un

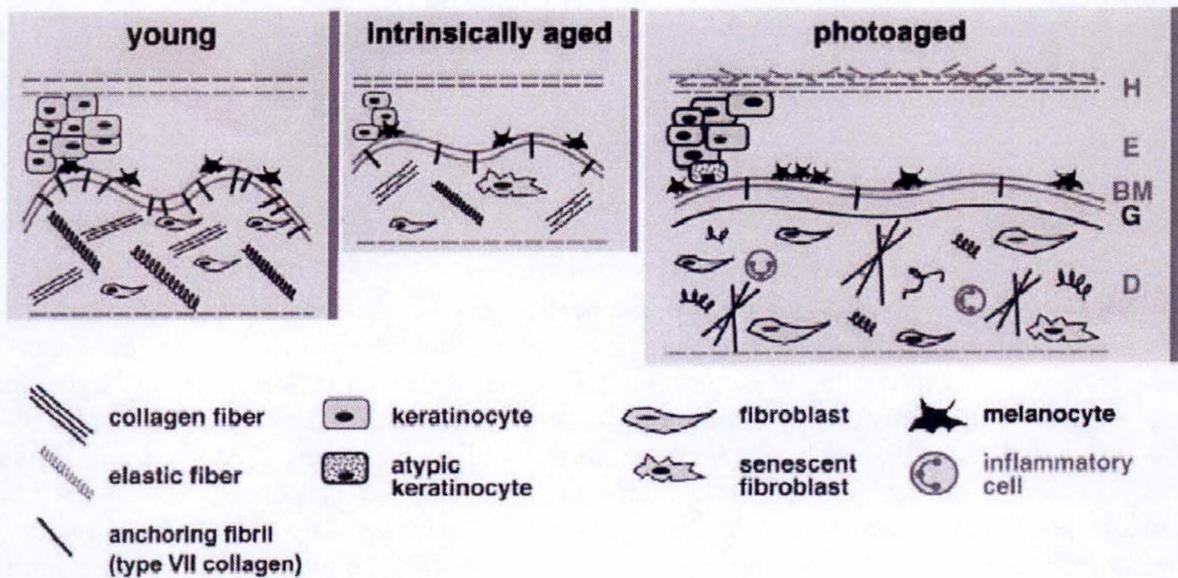


Figure I.6 : Représentation schématique d'une peau jeune (à gauche), d'une peau âgée intrinsèquement (au centre) et d'une peau âgée extrinsèquement ou photoâgée (à droite). La peau intrinsèquement âgée présente une diminution de l'épaisseur de son épiderme et de son derme dû à une diminution de la quantité de fibroblastes et de composants de la matrice extracellulaire. La peau photoâgée est quant à elle plutôt hyperplasique dû à une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et du derme. De plus, la distribution des mélanocytes devient déséquilibrée, ce qui est responsable de l'apparition de tâches de vieillesse. La peau jeune présente une distribution homogène de tous ses composants (Wlaschek *et al.*, 2001).

cancer cutané 1000 fois plus élevé par rapport au reste de la population, ainsi qu'une augmentation de la probabilité de développer une tumeur interne dû à l'accumulation de dommages à l'ADN (Marteijn *et al.*, 2014).

Le MMR (DNA mismatch repair) permet la réparation des erreurs de réplifications, les recombinaisons entre les séquences non-homologues et les désaminations de 5-méthylcytosine. Le MMR a également un rôle dans la réparation des dommages oxydatifs à l'ADN (Skinner and Turker, 2005).

Une autre voie de réparation est la réparation par recombinaison afin de réparer les cassures doubles brins de l'ADN. Les cassures doubles brins peuvent être dues aux radiations ionisantes, aux UV, aux ROS et aux composés génotoxiques. Cette réparation peut se faire par recombinaison homologue (HR) ou par jonctions d'extrémités non homologues (NHEJ). La recombinaison homologue permet une réparation sans erreur, contrairement à la réparation par jonctions d'extrémités non homologues (Rastogi *et al.*, 2010).

3.6 Caractéristiques du vieillissement intrinsèque et extrinsèque

La majorité des dommages causés par les UV est observée au niveau du tissu conjonctif du derme. La figure I.6 présente une représentation schématique d'une peau jeune, d'une peau âgée de manière intrinsèque ou extrinsèque (photoâgée).

La peau jeune présente une répartition homogène et équilibrée des différents éléments cellulaires dans les diverses couches de la peau. Aussi bien dans le vieillissement intrinsèque que dans le vieillissement extrinsèque de la peau, la matrice extracellulaire du derme montre des modifications tant structurelles que fonctionnelles (Blume-Peytavi *et al.*, 2016). Cette matrice extracellulaire confère différentes caractéristiques à la peau. Le collagène permet la résistance de la peau aux forces de compression, l'élastine permet la résistance à l'étirement, alors que les protéoglycans permettent le maintien de l'hydratation. La densité des composants de la matrice extracellulaire tend à diminuer avec l'âge (Blume-Peytavi *et al.*, 2016).

En comparaison, la peau intrinsèquement vieillie présente une épaisseur diminuée de l'épiderme et du derme par rapport à la peau jeune (Wlaschek *et al.*, 2001). Les éléments de la matrice extracellulaire comme le collagène interstitiel et l'élastine ainsi que les cellules, comme les fibroblastes, sont présents en moins grande quantité. Par contre, la peau extrinsèquement vieillie (ou photo-âgée) est hyperplasique et présente une augmentation de l'épaisseur du derme et de l'épiderme par rapport à la peau jeune. L'épiderme présente alors une acanthose ainsi qu'une hyperkératose. La distribution des mélanocytes devient déséquilibrée, ce qui cause des modifications pigmentaires, menant à la formation de taches de vieillesse (Wlaschek *et al.*, 2001).

De plus, le développement des lipides est altéré lors du vieillissement. En effet, les enzymes nécessaires à la formation des céramides, des composants nécessaires au bon fonctionnement de la barrière épidermique, sont présentes en moins grande quantité avec l'âge. Ceci rend la peau plus vulnérable aux blessures et rend la cicatrisation plus difficile (Blume-Peytavi *et al.*, 2016).

3.7 Effets bénéfiques et thérapeutiques des UV

Les UV n'ont pas que des effets néfastes. En effet, les rayons UVB permettent également la formation de vitamine D en permettant la photolyse du 7-dehydrocholesterol en prévitamine D (Holick, 2007).

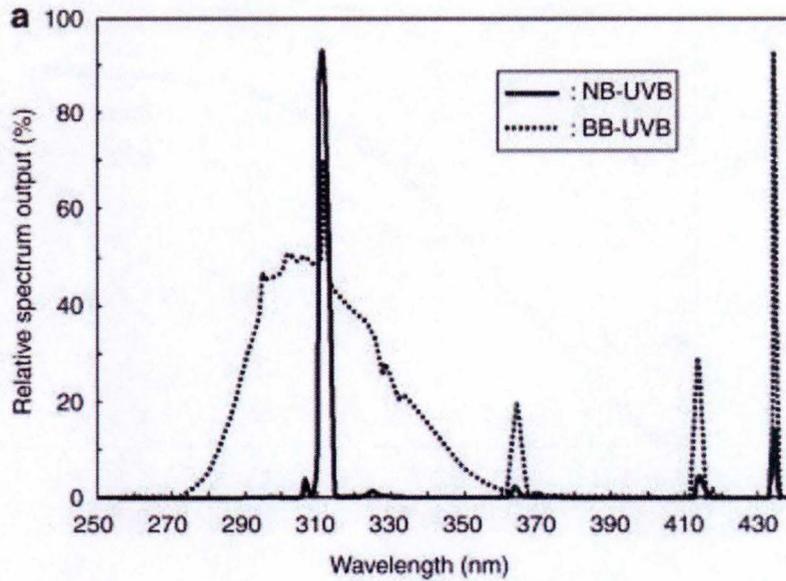


Figure I.7 Différence entre les spectres de longueurs d'ondes des narrow-band UVB (NB-UVB) et des broad-band UVB (BB-UVB). Les narrow-band (trait plein) présentent un spectre d'émission beaucoup plus étroit avec un pic à environ 311 nm alors que les broad-band (trait discontinu) sont caractérisés par un spectre plus large autour de la longueur d'onde de 311 nm (Kunisada *et al.*, 2007).

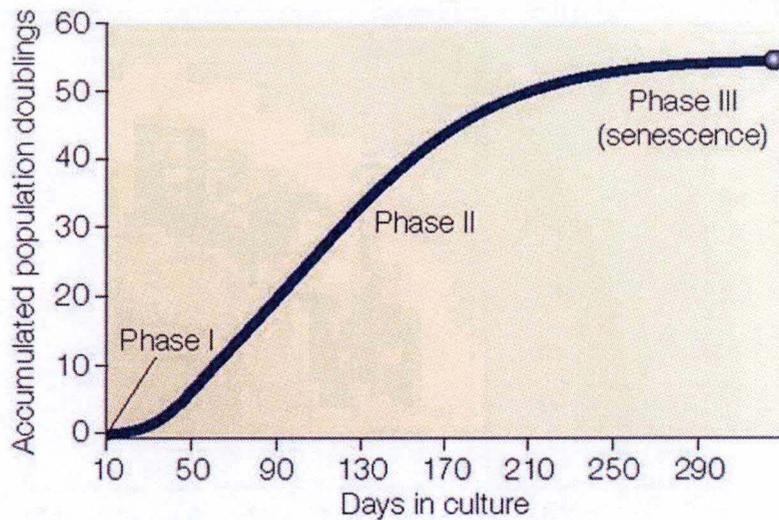


Figure I.8 Les trois phases de culture des fibroblastes. La culture est divisée en 3 phases : la 1^{re} phase est caractérisée par la culture primaire et présente une faible prolifération. La phase suivante est une phase de prolifération exponentielle alors que la 3^{ème} phase constitue le plateau de sénescence (Shay and Wright, 2000).

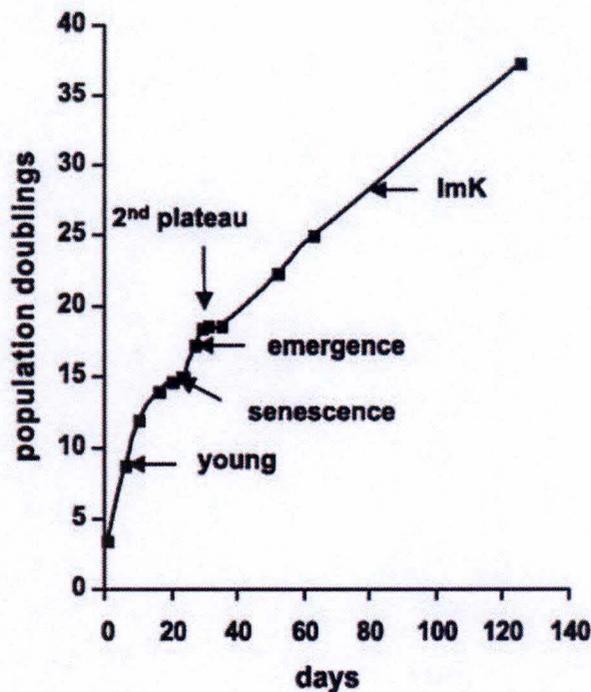


Figure I.9 Les différentes phases de culture lors de la sénescence réplivative du kératinocyte. Les phases de culture des kératinocytes présentent les mêmes phases que le fibroblaste, mais sont caractérisées par une phase de re-prolifération (émergence) suivie d'un 2^{ème} plateau de sénescence (Gosselin *et al.*, 2009).

Les UV peuvent également être utilisés à des fins thérapeutiques pour traiter des maladies cutanées telles que le psoriasis, la dermatite atopique, le vitiligo et certains types de lymphomes (Matsumura and Ananthaswamy, 2004). En effet, depuis 1984, le traitement PUVA est utilisé pour soigner ces maladies de peau. La PUVA, un type de photochimiothérapie, se base sur l'interaction entre les psoralènes et les UVA. Les psoralènes pénètrent à l'intérieur des cellules et s'intercalent entre les acides nucléiques. Les UVA permettent ensuite la formation de liaisons entre les psoralènes et les bases pyrimidiques. Ceci résulte en une inhibition de la synthèse d'ADN et de la prolifération cellulaire au niveau de l'épiderme. L'intensité des effets obtenus dépend de la dose d'UVA, de la durée d'exposition et du nombre de produits formés par l'interaction entre les psoralènes et les bases pyrimidiques (Stern, 2007).

Les UVB peuvent également être utilisés en thérapies, pour soigner le vitiligo et le psoriasis, par l'utilisation d'UVB à spectre étroit (NB-UVB), un type particulier d'UVB dont la longueur d'onde d'émission se trouve à environ 311 nm, à raison de plusieurs expositions par semaine (Hamzavi *et al.*, 2012). Il semblerait que les UVB induisent l'apoptose des cellules T présentes dans la peau et induisent également une réaction inflammatoire en augmentant la présence des ligands aux récepteurs de mort chez les kératinocytes (Hamzavi *et al.*, 2012).

Ces techniques présentent néanmoins des effets secondaires comme l'apparition d'érythèmes à court terme (24 à 48 h pour le PUVA et 4 à 6 h pour le traitement aux NB-UVB) et une augmentation à long terme de l'apparition de carcinomes des cellules squameuses (SCC) chez les patients (Matsumura and Ananthaswamy, 2004).

En laboratoire ou à des fins médicales, deux types de lampes UVB existent : les UVB à spectre étroit (NarrowBand-UVB) et les UVB à spectre large (broad band-UVB). Les narrow-band UVB présentent un pic à une longueur d'onde de 311 nm alors que les broad-band UVB présentent une gamme de longueur d'onde plus large allant de 280 à 320 nm avec un pic vers 312 nm (figure I.7) (Kunisada *et al.*, 2007).

4 Les différents types de sénescences cellulaires

4.1 Sénescence répllicative

La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois *in vitro* par Léonard Hayflick et Paul Moorhead en 1961 dans des fibroblastes humains (Hayflick and Moorhead, 1961). Ils ont observé que, après une période de faible prolifération suivant la mise en culture (phase I), et une phase de prolifération rapide (phase II), la croissance cellulaire atteint une phase plateau et les cellules arrêtent de se diviser mais restent métaboliquement actives (phase III), jusqu'à leur mort (figure I.8) (Kuilman *et al.*, 2010). Ceci a été appelé sénescence répllicative et a été par la suite associé au raccourcissement des télomères (Harley *et al.*, 1990). La sénescence cellulaire est donc décrite comme un arrêt stable et irréversible de la capacité proliférative des cellules, tout en conservant leur viabilité et leur activité métabolique (Kuilman *et al.*, 2010). Le fibroblaste est le type cellulaire le plus étudié en sénescence, bien que d'autres types cellulaires puissent également entrer en sénescence, avec certaines particularités propres.

Ainsi, la sénescence répllicative des kératinocytes est quelque peu différente. Les kératinocytes normaux atteignent une phase plateau de sénescence et présentent alors toutes les caractéristiques de la sénescence cellulaire (Soroka *et al.*, 2008). Cependant, cette phase peut être suivie soit par la mort cellulaire par une suractivation de la macroautophagie (Abbadie *et al.*, 2017) soit par une nouvelle phase de prolifération appelée émergence (figure I.9) (Abbadie *et al.*, 2017). En effet, certains kératinocytes sénescents sont capables de ré-entrer dans une

phase de prolifération jusqu'à atteindre un second plateau, générant ainsi des cellules émergentes. Environ 50 % des gènes qui voient leur expression se modifier pendant l'émergence des kératinocytes sont impliqués dans la transformation cellulaire, mais ces cellules présentent toujours un caryotype normal (Gosselin *et al.*, 2009). Après le 2^{ème} plateau de sénescence, les cellules peuvent développer une 2^{ème} phase d'émergence dans laquelle, cette fois, elles présentent des caractéristiques de cellules transformées et ont été nommées ImK (Immortal Keratinocytes). Ces cellules comportent un caryotype totalement anormal avec un grand nombre de translocations chromosomiques (Gosselin *et al.*, 2009).

Après injection de cellules émergentes en phase de re-prolifération, ainsi que des ImK près le 2^{ème} plateau de sénescence dans des souris nude, celles-ci développent des tumeurs (Gosselin *et al.*, 2009).

Ce phénomène d'émergence serait expliqué par un mécanisme de réparation défectueux des cassures simples brins de l'ADN, amenant à l'accumulation de cassures dans les cellules émergentes. Lorsque ce mécanisme est fonctionnel, cela active PARP1, qui se lie avec la zone lésée de l'ADN. Cette liaison active l'activité de polymérisation de PAR dont l'accumulation va permettre le recrutement de XRCC1 permettant le recrutement des enzymes de réparation (Nassour *et al.*, 2016).

Un défaut dans cette voie de réparation des cassures simples brins induit une accumulation des cassures et l'émergence des kératinocytes (Nassour *et al.*, 2016) (Nassour and Abbadie, 2016).

4.2 Sénescence prématurée induite par les stress (SIPS)

Il a été observé que l'exposition de cellules jeunes à divers stress à des doses sublétales est responsable de l'apparition d'une sénescence cellulaire prématurée (Toussaint *et al.*, 2000). Ces stress peuvent être une exposition chronique à de l'hyperoxie, une exposition aigüe à l'H₂O₂, au *tert*-buthylhydroperoxyde (Toussaint *et al.*, 2000), ou une exposition aux UVB (Chainiaux *et al.*, 2005).

La sénescence prématurée induite par les stress est indépendante du raccourcissement des télomères (de Magalhães and Passos, 2017). Il a été montré que ce type de sénescence prématurée était médiée par la voie du TGF- β 1, une cytokine impliquée dans la croissance cellulaire, la différenciation et la synthèse de composants de la matrice extracellulaire (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005).

4.3 Sénescence induite par les oncogènes

De façon surprenante, certains oncogènes peuvent également amener à une sénescence prématurée appelée « oncogene induced senescence » ou OIS. Ce phénomène a été observé la première fois avec une forme mutée du gène *RAS* (Serrano *et al.*, 1997). *RAS* est impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire normale, ainsi que dans la transformation maligne lorsque celui-ci est muté. Trois membres de la famille des *RAS* (*HRAS*, *NRAS* et *KRAS*) sont connus pour être activés suite à des mutations dans les processus tumoraux (Downward, 2003).

Des études sur une forme mutée de *RAS* (*RAS*^{V12}) ont permis de montrer que celui-ci est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire lorsqu'il est introduit dans des cellules primaires. Les cellules utilisées par Serrano *et al.*, étaient des IMR90 et des WI-38, toutes deux des fibroblastes humains diploïdes primaires, et des MEF, des fibroblastes murins primaires embryonnaires (Serrano *et al.*, 1997).

Par la suite, d'autres membres de la voie de signalisation de *RAS*, comme *RAF*, *MEK*, *MOF*, *BRAF*, ainsi que des protéines nucléaires pro-prolifératives, comme *E2F*, ont été montrés

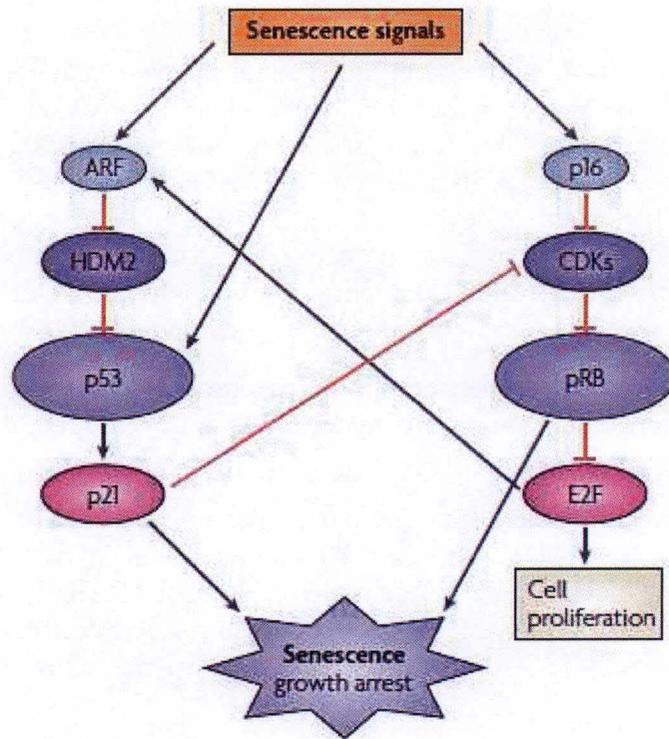


Figure I.10 Arrêt du cycle cellulaire caractérisant la sénescence. ARF régule négativement HDM2 levant ainsi l'inhibition de p53 par celui-ci. L'activation de p53 induit un arrêt du cycle cellulaire via l'expression de p21, une CDKI, supprimant la phosphorylation de pRb. P16 permet également l'hypophosphorylation de pRb. pRb hypophosphorylé est alors capable de s'associer et d'empêcher l'action de E2F, un facteur de transcription impliqué dans la progression du cycle cellulaire (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

comme entraînant la sénescence lorsqu'ils sont surexprimés ou exprimés dans leur version mutée (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Tout comme la SIPS, la sénescence induite par les oncogènes est indépendante du raccourcissement des télomères (Wei *et al.*, 1999).

Ces trois types de sénescence sont caractérisés par l'apparition de biomarqueurs caractérisant les cellules sénescents.

5 Les biomarqueurs de la sénescence

Parmi les biomarqueurs caractérisant les cellules sénescents se retrouvent des modifications morphologiques, l'arrêt du cycle cellulaire, le raccourcissement des télomères, la présence de dommages à l'ADN conduisant à l'activation de la DNA Damage Response (DDR), une augmentation de l'activité β -galactosidase, des modifications de l'expression génique caractéristiques, une délétion de l'ADN mitochondrial, et des modifications du sécrétome appelé SASP (senescence-associated secretory phenotype) (Kuilman *et al.*, 2010).

5.1 Modifications morphologiques

Lorsqu'elles arrivent en sénescence, les cellules présentent une morphologie plus large et des bords irréguliers. Les mécanismes sous-jacents de cette modification morphologique ne sont pas encore complètement élucidés mais cela pourrait être dû aux détériorations fonctionnelles que subissent les cellules sénescents. En effet, Cho *et al.* ont émis l'hypothèse qu'une interaction plus forte entre les cavéolines 1 et les intégrines serait responsable de la modification de morphologie des cellules sénescents (Cho *et al.*, 2004).

En 2016, Druelle *et al.* ont étudié les modifications de morphologie due à la sénescence chez le fibroblaste et ont identifié la voie UPR (unfolded protein response) et ATF6 α (senseur de stress au niveau de réticulum cytoplasmique) comme étant des acteurs de cette modification de morphologie (Druelle *et al.*, 2016).

5.2 Arrêt permanent du cycle cellulaire

L'arrêt permanent du cycle cellulaire caractérisant la sénescence est enclenché par divers signaux et dommages induisant l'activation de la DNA Damage Response (DDR) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

L'arrêt irréversible du cycle cellulaire caractérisant la sénescence est médié par l'activation des voies p53/p21^{WAF-1} et p16^{INK-4A}/pRb (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007) (figure I.10).

P16^{INK-4A} est une CDKI qui inhibe la phosphorylation de pRb (protéine du rétinoblastome). Cela induit la séquestration de E2F, un facteur de transcription impliqué dans la progression du cycle cellulaire, la synthèse d'ADN et la réplication de l'ADN (Johnson *et al.*, 2016). Cela bloque ainsi la progression du cycle cellulaire en phase G1 (Kuilman *et al.*, 2010).

Il a été montré que p16^{INK-4A} a un rôle important lors de la sénescence cellulaire mais également lors du vieillissement. En effet, l'expression de p16^{INK-4A} est augmentée *in vivo* dans la peau de donneurs âgés et constitue un biomarqueur robuste aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Ressler *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que l'élimination de cellules exprimant p16^{INK-4A} chez la souris permet de retarder l'apparition de maladies liées à l'âge (Baker *et al.*, 2011 ; Baker *et al.*, 2016).

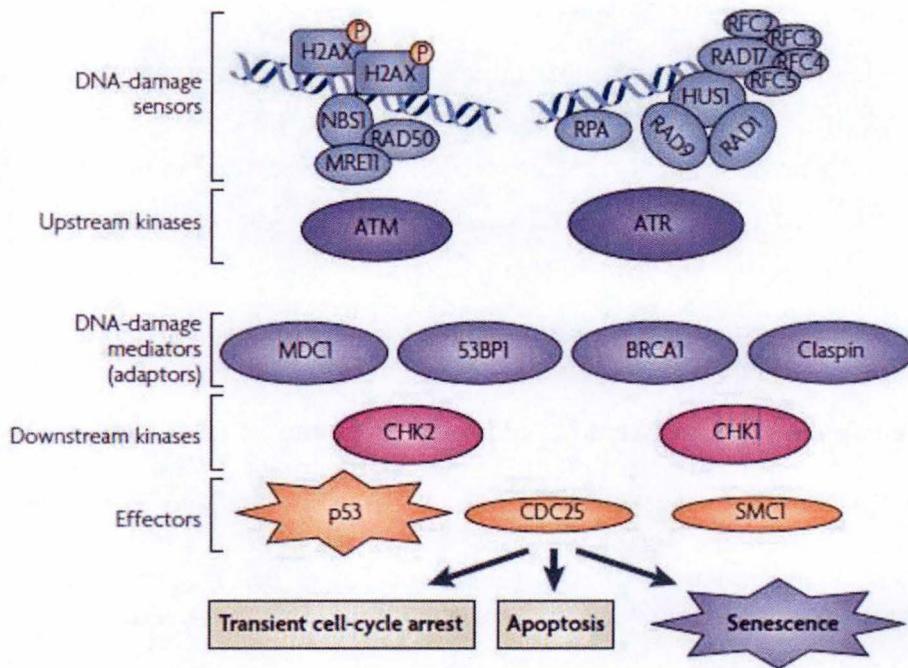


Figure I.11 Effecteurs de la DNA Damage Response (DDR). Les dommages à l'ADN activent le complexe 911 (RAD9-HUS1-RAD1) ainsi que le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1). Cela mène à l'activation de ATM et ATR. Cela active les kinases CHK1 et CHK2, permettant ainsi l'activation d'effecteurs comme p53 ou cdc25 menant à l'arrêt du cycle cellulaire. Si les dommages peuvent être réparés, l'arrêt du cycle cellulaire n'est que transitoire. Si ces dommages sont trop importants pour être réparés, la cellule entre en apoptose ou en sénescence (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

P53, quant à lui, est activé par des stimuli responsables de l'induction de la DDR comme la présence de dommages à l'ADN et le raccourcissement des télomères par l'activation de kinases en aval (Figure I.10). P53 est régulé négativement par HDM2, une H3 ubiquitin-protein ligase, permettant sa dégradation. HDM2 est lui-même régulé négativement par ARF (alternate-reading-frame protein) (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). P21 est une cible transcriptionnelle de p53, activée grâce à la transactivation de CDKN1A (Sherr and McCormick, 2002 ; Bielak-Zmijewska and Mosieniak, 2017).

La figure I.10 montre l'interaction existant entre la voie p53/p21^{WAF-1} et p16^{INK-4A}/pRb.

5.3 Dommages persistants à l'ADN et activation de la DDR

La DDR est une voie activée en cas de dommages au niveau de l'ADN (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Les cassures doubles brins au niveau de l'ADN sont repérées par le complexe MRN composé de MRE11, RAD50 et NBS1, alors que les cassures simples brins sont repérées par le RPA (replication protein A) et le complexe 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1) (Rodier *et al.*, 2009) (Figure I.11). Cela permet le recrutement et l'activation de la protéine ataxia telangiectasia mutated (ATM) (via le complexe MRN) et de la protéine ATM et Rad-3 related (ATR) (via RPA et le complexe 9-1-1). L'activation d'ATM mène à son autophosphorylation au niveau de sa sérine 1981. Afin de propager le signal de la DDR, l'histone H2AX est phosphorylé par ATM au niveau de sa sérine 139, au niveau de la région proximale au dommage à l'ADN (Sulli *et al.*, 2012). P-H2AX ou γ H2AX recrute alors MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1), permettant l'amplification du signal de la DDR et l'accumulation de complexe MRN au niveau de la lésion. BRCA1 est alors activé au niveau des lésions par phosphorylation par ATM et ATR. P53 binding protein 1 (53BP1), un autre médiateur, est nécessaire à l'amplification de l'activation d'ATM. L'activation d'ATM mène à la phosphorylation de CHK2 alors que l'activation de ATR engendre l'activation de CHK1, considérées comme deux kinases en aval de la réponse DDR (Durocher and Jackson, 2001). Cela permet la propagation du signal de la DDR grâce aux effecteurs comme SMC1, CDC25 ou encore p53. L'activation de la DDR peut mener à l'arrêt transitoire du cycle cellulaire afin de permettre la réparation de la lésion, et, si cette réparation est impossible, à la sénescence cellulaire ou à la mort cellulaire par apoptose (Sulli *et al.*, 2012) (figure I.11).

Les protéines de la DDR s'accumulent au niveau du site de cassures de l'ADN, résultant en la formation de foci appelés DDF (DNA damage Foci). La présence de ces foci permet le recrutement de la machine de réparation de l'ADN (Bartek and Lukas, 2007).

Certaines maladies, telle que l'*Ataxia telangiectasia*, sont dues à des mutations au niveau de gènes codant pour des acteurs de la DDR. Les personnes souffrant d'*Ataxia telangiectasia* présentent une mutation au niveau du gène codant pour ATM. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive se manifestant par une télangiectasie cutanée, une radiosensibilité, des déficiences au niveau du système immunitaire et une augmentation de probabilité de développer des cancers lymphoïdes. Ceci est expliqué par le rôle d'ATM dans la réparation des dommages à l'ADN. Une mutation au niveau du gène *ATM* est également responsable d'une maladie neurodégénérative du cervelet chez l'enfant. Cela serait dû à une dysfonction dans le rôle antioxydant d'ATM (Nissenkorn and Ben-Zeev, 2015).

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

L'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal) est le biomarqueur le plus utilisé pour caractériser la sénescence. Celui-ci a été découvert par Dimri *et al.* en 1995 (Dimri *et al.*, 1995). La β -D galactosidase est une hydrolase lysosomiale clivant les résidus galactosyl. Le pH optimal de cette hydrolase est le pH lysosomal (pH 4-4,5). Son activité dans les cellules sénescentes peut toutefois être détectée à pH 6, et a été appelée « Senescence-Associated β -

galactosidase activity » (Dimri *et al.*, 1995). La détection de cette activité à un pH suboptimal est due à une augmentation de la masse lysosomiale pendant la sénescence ainsi qu'à une augmentation de l'expression du gène codant la β -galactosidase 1 (*GLB1*). Ceci entraîne une augmentation de l'abondance de l'enzyme, dont l'activité peut alors être également détectée à pH 6. Ceci permet l'identification de cellules sénescents tant *in vivo* que *in vitro* via l'utilisation de X-gal, un substrat chromogénique artificiel donnant un précipité bleu une fois clivé (Kurz *et al.*, 2000).

5.5 Modifications de l'expression génique

La sénescence cellulaire est caractérisée par une modification de l'expression de divers gènes. Parmi les gènes concernés se retrouvent des gènes connus pour réguler le cycle cellulaire mais également des gènes codant pour des protéines altérant le microenvironnement.

En effet, pendant la sénescence, l'expression de *p16^{INK-4A}* et *p21^{WAF-1}*, deux régulateurs du cycle cellulaire, augmente, entraînant un arrêt du cycle cellulaire (Campisi, 2001). De plus, la sénescence cellulaire est caractérisée par la répression de gènes codant pour des protéines permettant la poursuite du cycle cellulaire, comme par exemple *PCNA* (prolifération cellulaire nucléaire) ou *Ki-67*. Ces gènes sont réprimés car le facteur de transcription E2F est inactivé par pRb. Or, E2F est primordial à l'induction de l'expression de ces gènes (Narita *et al.*, 2003). L'expression de gènes codant pour des protéines interagissant avec le microenvironnement est également modifiée avec la sénescence. Par exemple, l'expression de certaines métalloprotéases (MMPs) impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire augmente avec la sénescence. Au niveau de peaux âgées, il est observé que les MMPs dégradent le collagène ainsi que d'autres éléments de la matrice extracellulaire donnant à la peau le phénotype âgé. MMP-1 est responsable de l'initiation de la fragmentation du collagène dû à l'âge. MMP-3, 10, 12 sont surexprimés lors de la sénescence du fibroblaste (Freitas-Rodríguez *et al.*, 2017). Les MMPs sont considérées comme des médiateurs majeurs des dommages causés aux tissus conjonctifs lors du vieillissement (Quan and Fisher, 2015).

Plusieurs gènes sont étudiés dans le cadre de la sénescence du fibroblaste, cellule modèle pour l'étude du vieillissement cellulaire, autres que les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. Parmi ces gènes se retrouvent l'apolipoprotéine J (ou *clusterin*) (Petropoulou *et al.*, 2001), la fibronectine (Kumazaki *et al.*, 1991), *TGF β 1* (Wu *et al.*, 2014), *IGFBP-3* (Wu *et al.*, 2013), *IGFBP-5* (Kim *et al.*, 2007) et *CTGF* (Kim *et al.*, 2004).

L'apolipoprotéine J, est une glycoprotéine de 80 kDa dont l'expression est augmentée dans les fibroblastes sénescents (Petropoulou *et al.*, 2001). Elle a un rôle dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques comme l'inflammation, la sénescence cellulaire, la réponse aux stress, l'apoptose, ou encore l'interaction cellulaire (Buquicchio *et al.*, 2017). Une surexpression de l'apolipoprotéine J a été observée lors de la sénescence prématurée induite par l'éthanol et le *tert*-buthylhydroperoxyde chez le fibroblaste. Cela aurait un rôle protecteur contre la cytotoxicité et la sénescence prématurée. Ce rôle protecteur serait dû à la capacité de l'apolipoprotéine J à former des complexes avec les protéines endommagées afin d'éviter leur précipitation (Dumont *et al.*, 2002). Il a été montré que la surexpression de l'apolipoprotéine J ne cause pas la sénescence cellulaire mais est une conséquence de l'état de sénescence (Petropoulou *et al.*, 2001).

L'expression de la fibronectine voit également son niveau augmenter pendant la sénescence des fibroblastes. La fibronectine est une glycoprotéine majeure de la matrice extracellulaire et joue un rôle essentiel dans l'adhésion cellulaire. Elle jouerait un rôle dans la modification de morphologie caractéristique des cellules sénescents (Kumazaki *et al.*, 1991).

TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1) est connu pour induire la sénescence cellulaire chez les fibroblastes exposés à un stress subcytotoxique d'H₂O₂ (Frippiat *et al.*, 2001) à un stress répété à l'éthanol, au *tert*-butylhydroperoxyde (Pascal *et al.*, 2005) et aux UVB (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005). TGF β 1 a un rôle essentiel dans le développement et la carcinogénèse (Derynck and Zhang, 2003).

Il a été montré que le niveau d'expression d'*IGFBP-3* augmente au niveau des fibroblastes sénescents et est associé avec l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Il inhibe la prolifération cellulaire en empêchant la liaison d'IGF-1 avec son récepteur et induit l'apoptose (Kim *et al.*, 2007a). Il a été montré qu'*IGFBP-3* régule l'apparition des marqueurs de sénescence après l'exposition de fibroblastes primaires à l'éthanol ou au *tert*-butylhydroperoxyde (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2008) (Wu *et al.*, 2013).

Le niveau de transcrits d'*IGFBP-5* est aussi connu pour augmenter pendant la sénescence cellulaire et *IGFBP-5* un rôle important dans les phénomènes de croissance cellulaire, d'apoptose et de différenciation (Kim *et al.*, 2007b).

L'expression de *CTGF* (connective tissue growth factor) augmente également avec la sénescence cellulaire chez le fibroblaste. Cette surexpression serait sous le contrôle de la voie dépendant de TGF- β 1 (Kim *et al.*, 2004). *CTGF* a un rôle dans l'adhésion cellulaire, la production de matrice extracellulaire, l'angiogénèse, la différenciation cellulaire, ainsi que la prolifération cellulaire (Ungvari *et al.*, 2017).

5.6 Raccourcissement des télomères

Les séquences télomériques ont été découvertes en 1938 par Hermann Muller. Il s'agit de séquences répétées (TTAGGG) retrouvées aux extrémités des chromosomes et qui permettent de les protéger de la dégradation ou de la fusion par les processus de réparation de l'ADN (Rizvi *et al.*, 2015 ; d'Adda di Fagagna *et al.*, 2004 ; Popli *et al.*, 2017). Comme déjà mentionné, la longueur des télomères se réduit à chaque cycle de réplication jusqu'à atteindre une longueur limite à partir de laquelle les cellules entrent en sénescence répllicative. Ce phénomène d'érosion est dû à l'incapacité de l'ADN polymérase à répliquer les extrémités des brins d'ADN (Rizvi *et al.*, 2015 ; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Le raccourcissement des télomères va induire l'activation de la DDR, aboutissant à un arrêt du cycle cellulaire caractéristique de la sénescence cellulaire (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). La longueur des télomères varie d'un individu à un autre, et d'un tissu à l'autre chez un même individu (Oeseburg *et al.*, 2010). La longueur des télomères est associée avec l'apparition de maladies liées à l'âge comme l'hypertension, les maladies cardiovasculaires, le diabète, la maladie d'Alzheimer ou encore le cancer (Rizvi *et al.*, 2015).

Des études menées par la suite ont permis de montrer que la taille des télomères était sous la dépendance d'une enzyme appelée télomérase. La télomérase résout ce problème de réplication au niveau des extrémités chromosomiques grâce à son domaine catalytique (telomerase reverse transcriptase, hTERT) et une séquence d'ARN permettant d'ajouter des séquences répétées d'ADN aux extrémités des chromosomes, et de contrecarrer la réduction de leur taille (Collins and Mitchell, 2002). Les cellules somatiques n'expriment pas la télomérase, ce qui ne permet pas de compenser la diminution de la taille des télomères (Masutomi *et al.*, 2003). Certaines cellules telles que les cellules germinales, cancéreuses ou immortalisées expriment la télomérase et gardent une longueur télomérique stable au fur et à mesure des passages en culture (Masutomi *et al.*, 2003). L'expression ectopique de hTERT dans les cellules normales prévient l'apparition de la sénescence répllicative en empêchant le raccourcissement des télomères (Bodnar *et al.*, 1998).

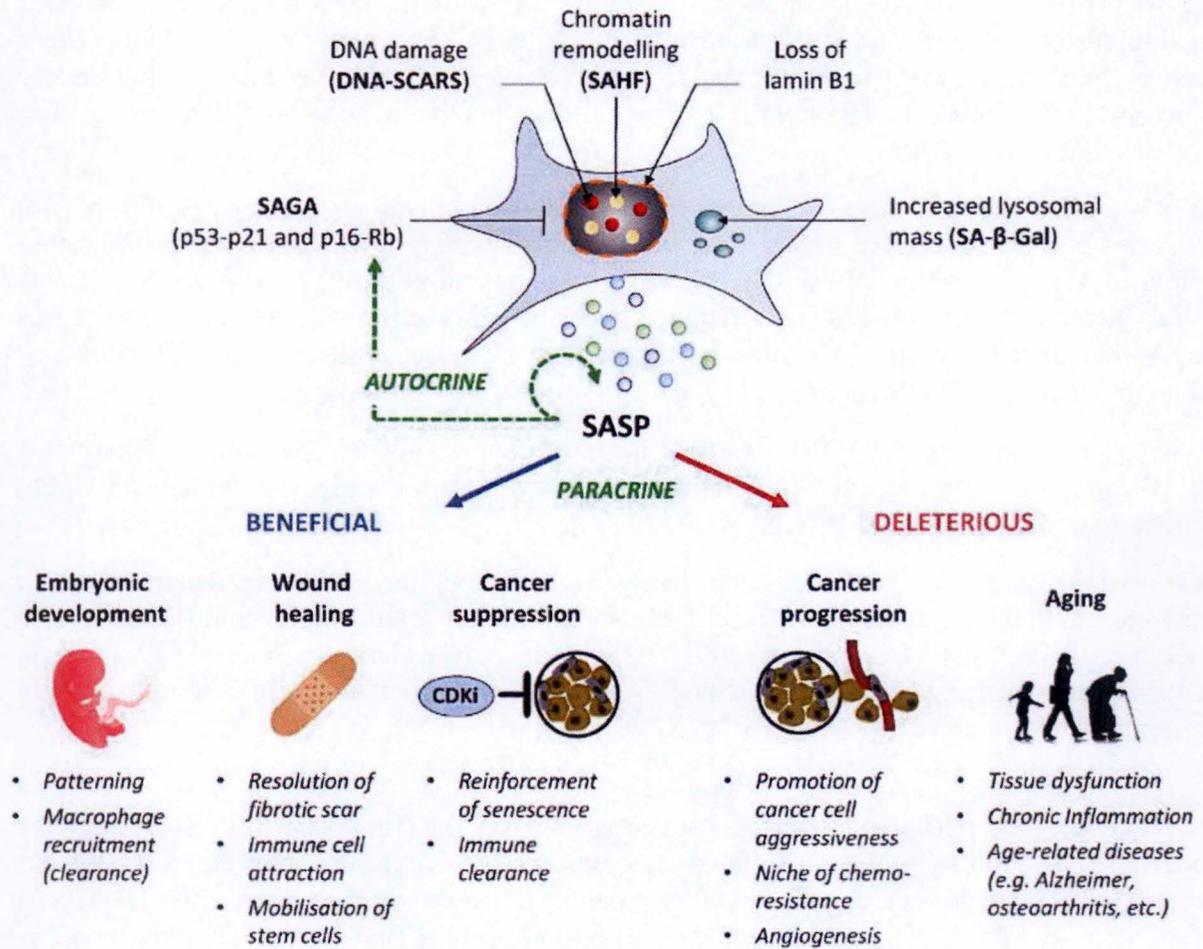


Figure I.12 Effets bénéfiques et délétères du SASP. Parmi les effets bénéfiques se retrouvent le développement embryonnaire, la cicatrisation de blessures, la suppression des développements tumoraux. Parmi les effets délétères se retrouvent la progression tumorale ainsi que le vieillissement (Malaquin *et al.*, 2016).

5.7 Délétion de l'ADN mitochondrial

La sénescence est caractérisée par l'apparition de délétions au niveau de l'ADN mitochondrial (Gadaleta *et al.*, 1992). Ainsi, une délétion caractéristique de l'ADN mitochondrial de 4,977 paires de bases est observée dans les cellules en sénescence, et est appelée « Common Deletion » (Dumont *et al.*, 2000). Des études *in vivo* ont montré la présence de cette délétion dans le derme âgé et photoâgé. Cette délétion serait associée à la présence d'un stress oxydatif au niveau de la peau âgée (Quan *et al.*, 2015).

5.8 Modifications du sécrétome

Les cellules sénescents possèdent un profil sécrétoire qui leur est propre et qui est nommé SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) (Coppé *et al.*, 2010 ; Kuilman and Peeper, 2009). Le SASP est composé de toute une série de facteurs solubles et insolubles comme des chémokines (growth-related oncogen (GRO)), des cytokines inflammatoires (IL-6 ou IL-8), des facteurs de croissance (Insulin Growth Factor Binding Protein (IGFBP)), des métalloprotéinases matricielles (MMP), mais aussi des glycoprotéines insolubles (Fibronectine) (Coppé *et al.*, 2010).

Le SASP peut avoir des effets positifs mais également des effets délétères (figure I.12). Les effets positifs du SASP passent par une communication autocrine via certains facteurs comme l'IL-6, l'IL-8, le GRO α et l'IGFBP-7 permet le renforcement de l'arrêt du cycle cellulaire induit par la sénescence (Kuilman *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2006 ; Wajapeyee *et al.*, 2008). Ces facteurs agissent en collaboration avec p53 et pRb afin de réduire le risque de transformation oncogénique. De plus, le SASP stimule l'élimination des cellules sénescents par le système immunitaire via une activation de p53 (Xue *et al.*, 2007). Ceci démontre que le SASP a une action importante directement après l'induction de la sénescence pour la maintenir et pour stimuler le système immunitaire à éliminer les cellules sénescents (Erusalimsky and Kurz, 2005). Le système immunitaire est activé par diverses chémokines sécrétées par le SASP et permettant le recrutement des cellules de l'immunité (Sagiv and Krizhanovsky, 2013). Malgré la stimulation du système immunitaire, une partie des cellules sénescents sont toujours présentes, ce qui cause une accumulation de ces cellules *in vivo* (Erusalimsky and Kurz, 2005).

Les effets négatifs du SASP sont principalement dus à la création d'un microenvironnement inflammatoire, favorable à la tumorigénèse. Le SASP est impliqué dans la formation de métastases tumorales en favorisant l'invasion cellulaire et le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans un environnement pro-tumoral (Krtolica *et al.*, 2001). Cette tumorigénèse est également favorisée par le fait que le SASP favorise l'angiogénèse (Freund *et al.*, 2010).

Le SASP est initié au même moment que l'arrêt du cycle cellulaire, mais est indépendant de celui-ci. Il est mature environ 10 jours après son induction grâce à son auto-amplification (Coppé *et al.*, 2008). La génération du SASP est dû à l'effet paracrine de la DDR, via l'activation de ATM et de p38^{MAPK} (Malaquin *et al.*, 2015). Cela mène à l'activation de 2 facteurs de transcription que sont NF- κ B (nuclear factor kappa B) et C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta), impliqués dans la régulation du stress cellulaire et dans la réponse inflammatoire (Toutfaire *et al.*, 2017 ; Pahl, 1999).

Comme dit plus haut, la DDR est activée en cas de dommages à l'ADN. Les cellules ayant subi des dommages trop importants et ne sachant pas les réparer entrent alors en sénescence. L'accumulation de médiateurs de la DDR seraient entre autres à l'origine de la production du SASP. La DDR n'est cependant pas la seule voie nécessaire à la production du SASP. Une autre voie impliquée dans l'activation du SASP est la voie p38^{MAPK}, contribuant à l'activation des voies dépendantes de p53 et p16. Cependant, contrairement à la DDR, p38^{MAPK} n'est pas activé

directement après l'induction de la sénescence, mais quelques jours après, permettant ainsi la maturation du SASP (Malaquin *et al.*, 2016).

Glück *et al.*, ont montré que l'induction du SASP et de ses effets étaient également régulés par STING (Glück *et al.*, 2017). En effet, les cellules sénescents relargueraient des fragments de chromatine à partir du noyau jusque dans le cytoplasme (Cytoplasmic Chromatin Fragments (CCF)). Ces CCF sont positifs pour le marquage de γ H2AX (de Galarreta and Lujambio, 2017). Ils sont reconnus par cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), un senseur de cassures doubles-brins de l'ADN menant à, lorsqu'il est activé, la production d'un second messager (cGAMP), qui à son tour active STING. Cela mène à l'activation de IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) et de NF- κ B, induisant l'expression d'interférons et de cytokines inflammatoires (de Galarreta and Lujambio, 2017).

Le concept de SASP a une variante propre à la peau, découvert *ex vivo* en isolant des fibroblastes de peau intrinsèquement âgées, alors nommé SAASP pour Skin Aging-Associated Secreted Protein (Waldera Lupa *et al.*, 2015).

6 Sénescence du kératinocyte

Le fibroblaste est le modèle historique utilisé par Léonard Hayflick et Paul Moorhead dans les années 60 pour l'étude de la sénescence répliquative. Cependant, d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les mélanocytes et les kératinocytes sont également capables d'entrer en sénescence répliquative, avec toutefois des particularités propres par rapport à celle du fibroblaste (Toutfaire *et al.*, 2017).

La sénescence est bien étudiée chez les fibroblastes aussi bien au niveau de la sénescence répliquative qu'au niveau de la sénescence prématurée induite par des stress et de la sénescence prématurée induite par les oncogènes (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2012 ; Tigges *et al.*, 2014).

En comparaison, la sénescence du kératinocyte est beaucoup moins bien connue. En effet, comme expliqué au point 4 de ce travail, la courbe de prolifération des kératinocytes est différente de celle des fibroblastes. Après avoir atteint un premier plateau de sénescence, ceux-ci entrent en phase de re-prolifération jusqu'à atteindre un second plateau de sénescence. Ceci est appelé le phénomène d'émergence (Gosselin *et al.*, 2009).

Les kératinocytes et les fibroblastes présentent des caractéristiques différentes au niveau de l'arrêt du cycle cellulaire induisant la sénescence. En effet, une augmentation de l'expression de p53 est observée chez les fibroblastes sénescents et donc une augmentation de l'expression de p21^{WAF-1}. Une augmentation de l'expression de p16^{INK-4A} est également observée chez les fibroblastes sénescents mais de manière retardée (Cavinato and Jansen-Dürr, 2017).

Chez les kératinocytes, contrairement aux fibroblastes, l'expression de p53 diminue lors de la sénescence alors que le niveau d'expression de p16^{INK-4A} augmente, induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. La diminution de p53 lors de la sénescence des kératinocytes n'est cependant pas due à une augmentation de la dégradation de p53 mais par une désacétylation de l'histone H3, responsable de la transcription du gène p53 (Kim *et al.*, 2015).



Figure I.13 Mélanome
(Cummins *et al.*, 2006)



Figure I.14 Carcinome des cellules basales
(Marzuka and Book, 2015)



Figure I.15 Carcinome des cellules squameuses
(Gordon, 2013)

7 Cancers cutanés

Trois types de cancers cutanés existent, subdivisés en 2 branches : les carcinomes (NMSC : non melanoma cell carcinoma) et les mélanomes. Les NMSC regroupent deux types de carcinomes, les carcinomes basocellulaires (BCC) et les carcinomes spinocellulaires (SCC) (Gordon, 2013).

7.1 Mélanome

Les mélanomes cutanés représentent environ 4 % des cancers cutanés mais causent 65 % des décès suite à un cancer de la peau dû à leur capacité accrue à métastaser (Zbytek *et al.*, 2008). Ils dérivent des mélanocytes épidermiques (Gordon, 2013). Les mélanomes sont diagnostiqués suivant la règle « ABCDE » (Asymétrie; irrégularité des Bords; Couleur; Diamètre; Evolution) (Cummins *et al.*, 2006) (Figure I.13). Selon une étude de l'Organisation Mondiale de la santé, l'apparition des mélanomes se fait vers l'âge de 50 ans (Lucas *et al.*, 2006).

Le traitement des mélanomes à un stade précoce consiste en l'exérèse de la tumeur avec une marge de 1 à 2 cm autour de celle-ci, ainsi que l'exérèse des ganglions lymphatiques périphériques si ceux-ci sont atteints par des métastases. Suivant la gravité et l'origine du mélanome, le patient peut être traité par radiothérapie, par chimiothérapie conventionnelle ou par un traitement personnalisé (thérapie ciblée) (Zbytek *et al.*, 2008).

7.2 Carcinome basocellulaire

Environ 80 % des NMSC sont des carcinomes des cellules basales ou basocellulaires (BCC : basal cell carcinoma). Le développement de ce type de carcinome serait dû principalement à une exposition intermittente aux radiations UV et à une surexposition aux UV durant l'enfance (Montagna and Lopes, 2017). Les BCC apparaissent sans lésions préalables. Ils sont caractérisés par l'apparition de boutons nacrés engorgés par des vaisseaux sanguins et ulcérés au niveau central (Gordon, 2013). Les métastases sont rares, mais, si elles apparaissent, ont un effet désastreux (Madan *et al.*, 2010) (Figure I.14). Les BCC apparaissent vers l'âge de 75 ans, plus tardivement que pour les mélanomes (Lucas *et al.*, 2006).

Le traitement consiste en une exérèse chirurgicale, suivie d'une radiothérapie. Des crèmes à application locale existent également, comme une crème à base de 5 % d'iquimod. L'iquimod est un médicament agoniste du toll-like récepteur 7 (TLR-7) activant les interférons ainsi que d'autres cytokines et permettant l'apoptose médiée par les cellules T des cellules cancéreuses. Ce traitement n'est utilisé qu'en cas de BCC superficiel. Des thérapies ciblées peuvent également être utilisées (Marzuka and Book, 2015 ; Amaral and Garbe, 2017).

7.3 Carcinome des cellules squameuses

Les carcinomes des cellules squameuses ou spinocellulaires (SCC : spinocellular carcinoma) sont des tumeurs invasives causées par les radiations UV, par l'inflammation chronique, par l'exposition à divers agents chimiques, ou encore par la suppression immunitaire nécessaire aux greffes d'organes (Voiculescu *et al.*, 2016). Un carcinome des cellules squameuses se caractérise par l'apparition de boutons, de plaques ou de nodules ainsi que l'apparition de lésions érosives, hyperkératosiques ou lisses. Cela peut aussi être caractérisé par des saignements suivant un petit choc ou par l'apparition d'une lésion ulcérate (Gordon, 2013). Les carcinomes des cellules squameuses sont en général facilement soignables et causent peu de métastases, si ceux-ci sont soignés à temps (Gordon, 2013) (Figure I.15). Les SCC apparaissent le plus souvent vers l'âge de 70 ans (Lucas *et al.*, 2006).

Le traitement habituel est encore une fois l'exérèse chirurgicale. La radiothérapie ainsi que la chimiothérapie conventionnelle sont également utilisées en cas de récurrence, ainsi que des thérapies ciblées en fonction de la source du carcinome (Amaral and Garbe, 2017).

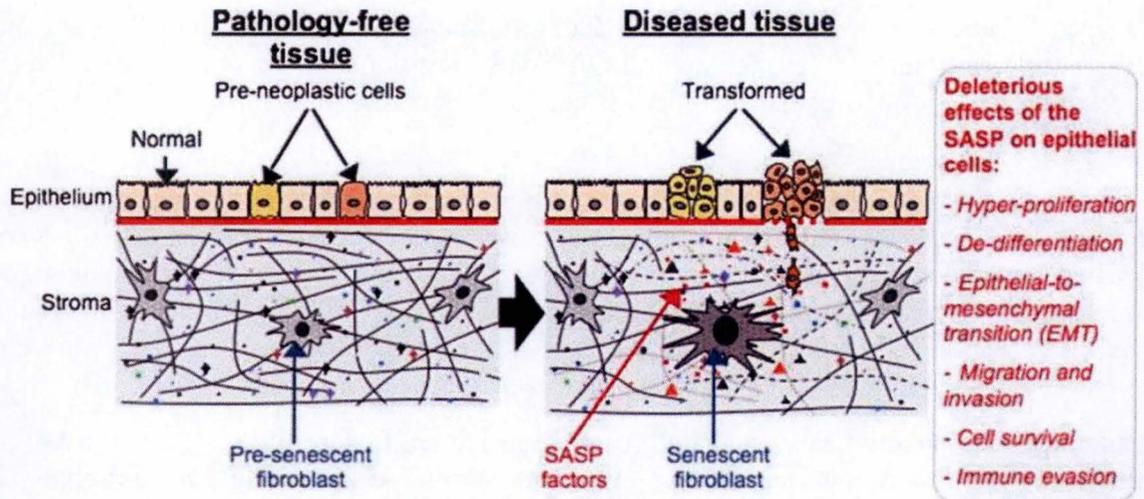


Figure I.16 Effets paracrines pro-tumorigéniques des cellules sénescents. Les facteurs sécrétés par le SASP ont des effets délétères sur les cellules épithéliales comme l'hyperprolifération, une dédifférenciation, l'induction de l'EMT, la migration et l'invasion, la survie cellulaire et l'évasion du système immunitaire (Davalos *et al.*, 2010).

Comme dit plus haut, divers facteurs de risques existent, favorisant l'apparition d'un cancer cutané. Ces facteurs de risques sont de source endogène ou exogène (Gordon, 2013). Le risque exogène prédominant sont les radiations UV. Ce risque est tout à fait contrôlable car environ 80 % des NMSC peuvent être évités par un comportement préventif adéquat (Geller *et al.*, 2002).

Le phénotype des patients est également une composante importante. En effet, une peau claire, des taches de rousseur, des yeux et des cheveux clairs, souvent associés à un bronzage difficile sont des signes d'une plus grande sensibilité aux rayonnements UV. Une échelle de classification, l'échelle de Fitzpatrick, a d'ailleurs été mise en place pour classer le risque en fonction du type de peau. La classe I de cette échelle correspond à une peau qui brûle toujours mais qui ne bronze jamais alors que le type IV correspond à des peaux qui ne brûlent jamais mais qui bronzent toujours (Fitzpatrick, 1988). Un autre risque augmentant la probabilité de développer un cancer de la peau est la transplantation d'organes causant une immunosuppression à vie du patient transplanté (Ulrich *et al.*, 2004).

8 Communication des cellules sénescentes et cancéreuses

Comme déjà mentionné auparavant, le SASP a divers effets sur l'environnement et les cellules environnantes via trois types de facteurs sécrétés : les chémokines, les cytokines inflammatoires et les protéases (Toutfaire *et al.*, 2017).

En 2016, Farsam *et al.* ont montré l'effet du SASP des fibroblastes sénescents via l'utilisation du milieu conditionné de ceux-ci sur la migration des cellules issues de carcinomes des cellules squameuses (SCC) (Farsam *et al.*, 2016).

Le SASP a un effet sur la prolifération cellulaire. En effet, il a été montré que le milieu conditionné de fibroblastes sénescents stimule la prolifération des cellules cancéreuses avoisinantes (Coppé *et al.*, 2008). Le SASP a également des effets sur la migration cellulaire et l'invasion en créant un gradient via des chémokines. Des études sur le cancer du sein ont montré que cette invasion était augmentée par une présence plus importante d'IL-6 et d'IL-8 sécrétée par les fibroblastes sénescents (Yuan *et al.*, 2005 ; Badache and Hynes, 2001) (Figure I.16). De plus, il a été montré que l'incubation avec du milieu conditionné de fibroblastes sénescents induisait une EMT stimulant l'invasion au niveau deux lignées non agressives de cancer du sein (Coppé *et al.*, 2008). L'angiogenèse est aussi stimulée par les facteurs du SASP des fibroblastes sénescents. Cela serait dû à la sécrétion de VEGF et à la création d'un gradient de chémokines (Coppé *et al.*, 2006 ; Strieter *et al.*, 2006). De plus, l'IL-1 sécrétée par les cellules sénescentes a un rôle activateur de l'endothélium, permettant aux cellules cancéreuses d'y adhérer et de créer des sites métastatiques (Orr and Wang, 2001).

Cette stimulation de l'angiogenèse par les substances sécrétées dans le SASP n'est pas observée dans tous les types cellulaires. En effet, les kératinocytes sénescents surexpriment la maspaine, un inhibiteur de la migration et de l'invasion des cellules endothéliales faisant partie de la famille des serpines (serin protease inhibitor) (Nickoloff *et al.*, 2004 ; Bircan *et al.*, 2010).

Le SASP a un effet sur le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Laberge *et al.*, 2012). Les cellules de types mésenchymateuses sont mobiles et fournissent un support structurel aux cellules épithéliales en produisant la matrice extracellulaire. Les cellules épithéliales forment des liens entre elles, permettant de former une barrière entre l'organe et l'environnement extérieur. Sous certaines conditions, un type cellulaire peut opérer un switch

vers l'autre type cellulaire. Les marqueurs principaux de l'EMT sont la vimentine (marqueur mésenchymateux) et l'E-cadhérine (Micalizzi *et al.*, 2010 ; Laberge *et al.*, 2012).

Récemment, Murtas *et al.*, ont montré que l'EMT a un rôle primordial dans le caractère métastatique des mélanomes cutanés (Murtas *et al.*, 2017). En effet, l'EMT induit une perte de contact entre les cellules du mélanome et les kératinocytes adjacents et permet une interaction avec les fibroblastes et avec les cellules endothéliales afin de permettre leur migration et la création de métastases tant au niveau dermique que vasculaire (Murtas *et al.*, 2017).

Les effets du SASP pourraient également agir via les vésicules extracellulaires par l'échange d'ARNm, de miARN, de protéines et de lipides. De plus, la présence d'ADN génomique et mitochondrial dans les vésicules a été rapportée (Urbanelli *et al.*, 2016). Peu de détails sont connus sur ce mode de communication des cellules sénescents (Toutfaire *et al.*, 2017). Le terme de vésicules extracellulaires reprend trois types de vésicules que sont les microvésicules provenant du bourgeonnement de la membrane plasmique, les exosomes provenant du compartiment endosomal et les corps apoptotiques (Mathivanan *et al.*, 2010).

Une augmentation du relargage des exosomes a été montré chez les fibroblastes sénescents (Lehmann *et al.*, 2008 ; Urbanelli *et al.*, 2016). Des études récentes ont également montré que les vésicules extracellulaires avaient un rôle important dans la communication entre cellules dans un environnement tumoral (Bayraktar *et al.*, 2017). Les facteurs relargués par les vésicules extracellulaires affectent le comportement des cellules avoisinantes, au même titre que les facteurs du SASP. Ils peuvent avoir des effets favorables sur le microenvironnement, comme par exemple l'élimination des cellules sénescents, ou des effets néfastes comme une inflammation tissulaire (Urbanelli *et al.*, 2016).

Objectifs

L'objectif de ce mémoire sera dans un premier temps d'étudier l'effet des UVB à spectre large (BB-UVB) sur la sénescence prématurée des kératinocytes humains normaux (NHK). Le but sera de déterminer une dose subcytotoxique, afin d'étudier si celle-ci est capable d'entraîner la sénescence cellulaire sans causer de mort cellulaire trop importante.

Un modèle de SIPS-UVB existe déjà dans notre équipe, via l'utilisation d'UVB à spectre étroit (NB-UVB) à raison de 3 expositions à 675 mJ/cm^2 et à 3 h d'intervalle.

Dans un deuxième temps, l'objectif de ce travail sera d'étudier la communication entre les NHK et les cellules environnantes. Les cellules environnantes que nous étudierons ici sont les NHK jeunes et les cellules A431, des cellules dérivées d'un carcinome des cellules squameuses agressif. L'étude de la communication sera réalisée par l'intermédiaire de tests scratch avec l'utilisation de milieux conditionnés issus de NHK jeunes, en sénescence répliquative et de NHK exposés aux NB-UVB.

Nous étudierons ensuite l'effet de ces milieux conditionnés sur l'expression de gènes connus pour avoir leur expression modifiée lors de la sénescence ou lors du processus de transition épithélio-mésenchymateuse.

II. Matériel et méthodes

Table II.1 : Matériel nécessaire pour l'isolation et la culture de kératinocytes humains normaux

Matériel	Firme
Milieu Leibowitz L15	Gibco, USA
Mix antibiotique/antimycotique	Gibco, USA
Gentamycine	Gibco, USA
Ethanol	Acros Organics, USA
PBS : - NaCl 150 mM - Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 - H ₂ O	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Trypsine + 0,05 % EDTA	Gibco, USA
Sérum bovin fœtal (FBS)	Gibco, USA
Dispase II	Roche Applied Science, Suisse
Peniciline-streptomycine 1 %	Gibco, USA
Keratinocytes Serum-Free Medium (K-SFM) Suppléments: - Facteur de croissance épidermique humain recombinant (rEGF) (2,5 mg/500 ml) - Extrait pituitaire bovin (BPE) (25 mg/500 ml)	Gibco, USA
Tamis cellulaire - taille des pores (70 µm)	Greiner Bio One, Autriche
Flasques de culture, 25 ou 75 cm ²	Greiner Bio One, Autriche
Compteur cellulaire	ThermoFisher Scientific, USA
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne

1 Culture cellulaire

1.1 Isolation des kératinocytes

a. Matériel

Voir Table II.1.

b. Méthode

Les kératinocytes sont isolés à partir de biopsies issues de circoncisions de jeunes donneurs (âgés de 1 an à 12 ans) obtenus à l'hôpital Saint Luc de Bouge (Dr de Vlisscher). La procédure d'isolation a été approuvée par le comité d'éthique du CHU Dinant Godinne. Les biopsies sont conservées dans du milieu Leibowitz L15 à 4 °C en présence d'un mélange d'antimycotique/antibiotique et de gentamycine. Le protocole d'isolation des kératinocytes se déroule sur deux jours. Tout d'abord, le tissu adipeux est retiré et le tissu restant est découpé en morceaux d'approximativement 5 mm². Les morceaux sont débarrassés des traces de L15 et décontaminés par un passage dans trois bains successifs (PBS - éthanol 70 % - PBS), puis sont incubés overnight à 4 °C dans de la dispase II avec 1 % de streptomycine/pénicilline. Le deuxième jour, l'épiderme est séparé du derme à l'aide de pinces, et est incubé pendant 20 minutes dans de la trypsine-EDTA (0,05 %) à 37°C. L'effet de la trypsine-EDTA est ensuite neutralisé grâce à l'ajout d'une solution de PBS-sérum bovin fœtal 10 % (FBS). Les cellules sont finalement culotées par centrifugation (200 g durant 8 minutes) après passage sur tamis cellulaire dont la taille des pores est de 70 µm. Les cellules sontensemencées dans une flasque de culture T75 avec du milieu « keratinocyte serum-free (K-SFM) » complété avec du facteur de croissance épidermique humain recombinant (rEGF) et de l'extrait pituitaire bovin (BPE). Les kératinocytes sont placés dans un incubateur à 37°C avec 5 % de CO₂ dans une atmosphère humide.

1.2 Culture des kératinocytes

a. Matériel

Voir Table II.1.

b. Méthode

Les kératinocytes sont cultivés dans des flasques de culture T75 avec du milieu K-SFM complet. Lorsqu'ils atteignent environ 80 % de confluence, ils sont passés à une dilution de 1:2. Les cellules sont trypsinisées avec de la trypsine-EDTA à 37°C (1,5 ml/T75 ou 1 ml/T25). Lorsque les cellules se détachent, l'effet de la trypsine-EDTA est neutralisé avec du PBS-FBS 10 %. Les cellules sont ensuite centrifugées 8 minutes à 200 g, resuspendues dans du milieu frais complet et transférées dans de nouvelles flasques. Les kératinocytes sont placés dans un incubateur à 37°C avec 5 % de CO₂ dans une atmosphère humide. Les cellules sont comptées à l'aide du Cell Counter afin de déterminer les doublements cumulés de population (Cumulative Population Doublings ou CPD).

Table II.2 : Matériel nécessaire pour la culture des A431

Matériel	Firme
PBS : - NaCl 150 mM - Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 - H ₂ O	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Trypsine + 0,05 % EDTA	Gibco, USA
Sérum bovin fœtal (FBS)	Gibco, USA
Dubelcco's Modified Eagle Medium high glucose (DHG)	ThermoFischer Scientific, USA
Flasques de culture, 25 ou 75 cm ²	Greiner Bio One, Autriche
Compteur cellulaire	ThermoFischer Scientific, USA
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne

Table II.3 : Matériel nécessaire pour le modèle de sénescence induite par les UVB

Matériel	Firme
PBS : - NaCl 150 mM - Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 - H ₂ O	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Broadband Philips Lamps TL20W/12 RS	Philips, Pays-Bas
Narrowband Philips Lamps TL20W/01 RS	Philips, Pays-Bas
Radiomètre	Viber Lourmat, France
Détecteur d'UVB	Viber Lourmat, France
Keratinocytes Serum-Free Medium (K-SFM) Suppléments : voir table 1	Gibco, USA

Table II.4 : Matériel nécessaire pour le test MTT

Matériel	Firme
PBS : - NaCl 150 mM - Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 - H ₂ O	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Keratinocytes Serum-Free Medium (K-SFM) Suppléments : voir table 1	Gibco, USA
MTT - (3, (4,5-diméthyl-thiazol-2-yl) bromure)	Sigma-Aldrich, USA
Solution de lyse : pH 7,5 - SDS 30 % - N,N-diméthylformamide	Merck Millipore, USA Sigma-Aldrich, USA
Spectrophotomètre	Bio-Rad, USA

1.3 Culture des A431

a. Matériel

Voir Table II.2.

b. Méthode

Les cellules A431 sont cultivées dans des flasques T75 en présence de Dubelcco's Modified Eagle Medium high glucose + 10 % de FBS (DHG). Les cellules sont passées à une dilution de 1:20 ou 1:30. Elles sont rincées au PBS afin d'éliminer le sérum résiduel qui empêcherait l'action de la trypsine et détachées à l'aide de trypsine-EDTA à 37 °C. L'effet de la trypsine est ensuite neutralisé grâce à l'ajout de DHG + 10 % FBS. Les cellules sont ensuite centrifugées 5 minutes à 200 g, resuspendues dans du milieu frais et transférées dans des nouvelles flasques de culture. Les cellules sont placées dans un incubateur à 37 °C avec 5 % de CO₂ dans une atmosphère humide.

2 Sénescence prématurée induite par les stress UVB (UVB-SIPS)

a. Matériel

Voir Table II.3.

b. Méthode

72 heures avant les stress, les kératinocytes jeunes (passage 5 ou 6) sont repiqués à une densité de 12,000 cellules/cm² pour la condition UVB et à une densité de 8,000 cellules/cm² pour la condition contrôle.

Avant le stress, le milieu est enlevé et les cellules sont rincées au PBS stérile. Après avoir enlevé le PBS de rinçage, 1 ml de PBS est ajouté aux T25 ou 3 ml aux T75. Les cellules sont ensuite exposées aux lampes UVB. Une exposition unique est réalisée entre 45 et 85 mJ/cm² pour les lampes BB-UVB, ou répétée trois fois avec un intervalle de trois heures à une dose de 675 mJ/cm² pour les lampes NB-UVB. L'exposition aux UVB se réalise dans un caisson contenant 3 tubes UVB situés à environ 30 cm des flasques. La radiation UVB émise est mesurée grâce à un senseur d'UVB à 312 nm, lui-même placé dans une flasque de culture. Les cellules contrôles sont soumises aux mêmes conditions, excepté aux radiations UVB.

3 Test MTT

a. Matériel

Voir Table II.4.

b. Méthode

Le MTT (3, (4,5-diméthyl-thiazol-2-yl) bromure) est dilué à une concentration de 2,5 mg/ml dans du PBS. Les cellules sont incubées durant 4 heures dans un mélange 50/50 MTT-milieu de culture à 37 °C avec 5 % de CO₂ dans une atmosphère humide. Après incubation, le

Table II.5 : Matériel nécessaire pour la détection de l'activité de la bêta-galactosidase associée à la sénescence (SA-βgal)

Matériel	Firme
PBS : - NaCl 150 mM - Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 - H ₂ O	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Solution de Fixation : - 2 % formaldéhyde - 0,2 % glutaraldéhyde - PBS	Belgolabo, Belgique Merck Millipore, USA
Solution de coloration : - Tampon phosphate, pH 6,0 NaH ₂ PO ₄ 0,1 M Na ₂ HPO ₄ 0,1 M - Ferrocyanure de potassium 0,1 M - Ferricyanure de potassium 0,1 M - NaCl 2,5 M - MgCl ₂ 1 M - Solution de x-gal (20 mg/ml) dilué dans du N,N-diméthylformamide - H ₂ O	Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Merck, Allemagne Amresco, USA Janssen Chimica, Belgique
Méthanol	VWR chemicals, France
Microscope	Leitz, Allemagne

Table II.6 : Matériel nécessaire pour l'extraction d'ARN total

Matériel	Firme
RLT	Qiagen, Allemagne
Qiacube	Qiagen, Allemagne
RNeasy minikit with DNase digest	Qiagen, Allemagne
Nanodrop	Isogen Life Science

surnageant est enlevé et est remplacé par la solution de lyse. Après une incubation d'une heure à 37 °C, la densité optique est lue à 570 nm grâce à un spectrophotomètre.

4 Activité bêta-galactosidase associée à la sénescence (SA-βGal)

a. Matériel

Voir table II.5.

b. Méthode

L'activité SA-βGal est mesurée 72 heures après le dernier stress ou au passage adéquat pour la sénescence répllicative. Le jour précédent le test, les cellules sont repiquées à une faible densité de 1200 cellules par cm² dans une plaque 6-puits (3 puits par conditions). Les cellules sont rincées deux fois avec 2 ml de PBS par puit et fixées à l'aide d'une solution de fixation (2 ml/puit) pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées deux fois au PBS (2 ml/puit) et incubées 16 heures dans une solution de coloration (2 ml/puit) fraîchement préparée contenant du x-gal (20 mg/ml), du tampon phosphate à pH 6,0, du ferricyanure de potassium (100 mM), du ferrocyanure de potassium (100 mM), du NaCl (2,5 M), et du MgCl₂ (1M). Après incubation, les cellules sont rincées deux fois au PBS (2 ml/puit) et deux fois au méthanol (2 ml/puit). Les cellules positives pour la SA-βGal sont visualisées et quantifiées par microscopie en comptant 300 cellules par puit (3 puits/conditions).

5 Analyse de l'expression génique

5.1 Extraction de l'ARN total.

a. Matériel

Voir table II.6.

b. Méthode

Les cellules sont lysées dans du tampon RLT (350 µl si moins de 5x10⁶ cellules ou 600 µl à partir de 1x10⁷ cellules). Le lysat est collecté dans des tubes de 2 ml et conservé à -80 °C ou utilisé directement pour l'isolation d'ARN. L'ARN total est extrait à l'aide du Qiacube en utilisant le RNeasy minikit DNase digest (Qiagen) et en suivant la procédure recommandée par la firme. La concentration d'ARN est déterminée par une lecture à 260 nm avec un spectrophotomètre Nanodrop. La qualité de l'extraction est déterminée par le ratio 260/230 pour la contamination en sels et par le ratio 260/280 pour la contamination en protéines.

5.2 Transcription inverse

a. Méthode

2 µg d'ARN totaux sont engagés pour la rétro-transcription avec le kit First strand cDNA synthesis (Roche). Le volume de l'échantillon est porté à 12 µl avec de l'eau RNase-free, auxquels sont ajoutés 1 µl d'oligo dT (250 ng/µl). Le mélange est incubé 10 minutes à 65 °C afin de permettre aux oligo-dT de se fixer à la queue poly-A de l'ARN. La réaction est ensuite

Table II.7 : Matériel nécessaire pour la real-time PCR

Matériel	Firme
Plaque 96-puits	Greiner Bio-One, Autriche
H ₂ O	
SYBR Select Master Mix	Applied Biosystems, USA
Centrifugeuse	Thermo Scientific, USA
StepOne Plus	Applied Biosystem, USA
SDS Software 2.2	Applied Biosystem, USA

Table II.8 : Liste des primers utilisés pour la real-time PCR

Gène	Primer forward	Primer reverse
GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate-deshydrogenase)	ACC CAC TCC ACC TTT GAC	GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA
RPL13 (Ribosomal protein L13)	GCC TAC AAG AAA GTT TGC CTA	TGA GCT GTT TCT TCT TCC GGT
p16	GCC CAA CGC ACC GAA TAG T	CGC TGA CAA TCA TCA TGA C
p21	GCA GAC CAG CAT GAC AGA TTT	GGA TTA GGG CTT CCT CTT GGA
ApoJ (Apolipoprotein J)	GGA TGA AGG ACC AGT GTG ACA AG	CAG CGA CCT GGA GGG ATT C
Fibronectine	TGT GGT TGC CTT GCA CGA T	GCT TGT GGG TGT GAC CTG AGT
TGF-β1 (Transforming Growth Factor Beta 1)	CAG CCC TGC TCA CCG TCG TG	GGT TTG TGG CTC CCG AGG GC
IGFBP3 (Insulin-like growth factor binding protein 3)	CAG AGC ACA GAT ACC CAG AAC TTC	CAC ATT GAG GAA CTT CAG GTG ATT
IGFBP5 (Insulin-like growth factor binding protein 5)	GTC TCC TCG GCC ATC TCA	ACC GCC AGC AAG TCA AGA T
CTGF (Connective tissue growth factor)	CAA GGG CCT CTT CTG TGA CT	ACG TGC ACT GGT ACT TGC AG
Vimentin	GAG GCT GCC AAC CGG AAC AATG	TCC ATT TCA CGC ATC TGG CGT TC
E-cadherin	TGA AGG TGA CAG AGC CTC TGG A	TGG GTG AAT TCG GGC TTG TT
SNAIL	GAA AGG CCT TCA ACT GCAAA	TGA CAT CTG AGT GGG TCT GG
MMP9	TCG AAG GCG ACC TCA AGT G	TTC GGT GTA GCT TTG GAT CCA
IL-6	CCA GCT ATG AAC TCC TTC TC	GCT TGT TCC TCA CAT CTC TC
IL-8	AAG AGA GCT CTG TCT GGA CC	GAT ATT CTC TTG GCC CTT GG
PCNA	CCA TCC TCA AGA AGG TGT TGG	GTG TCC CAT ATC CGC AAT TTT AT
Ki-67	CGT AGC AGC ACA GAA AT	TGA TGG TTG AGG TCG TTC CTT GAT G

Table II.9 : Matériel nécessaire pour l'extraction protéique totale

Matériel	Firme
PBS : - NaCl 150 mM - Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 - H ₂ O	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Tampon de lyse DLA (pH 8,5) - Thiourée 2 M - Urée 7 M - Chaps 2 % - ASB 14 2 % - Tris 30 mM	Sigma-Aldrich, USA Merck Millipore, USA Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA MP Biomedicals, USA
PIB (Protease Inhibitor Buffer) - Na ₃ VO ₄ 25 mM - PNPP (4-nitrophenylphosphate) 250 mM) - B-glycérophosphate 250 mM - NaF 125 mM	Sigma-Aldrich, USA Sigma-Aldrich, USA VWR, USA Merck Millipore, USA
PIC (Protease Inhibitor Cocktail) - Comprimé dissous dans 2 ml d'H ₂ O	Sigma-Aldrich, USA
Sonicateur	Hielscher, Allemagne
Thermomixeur	Eppendorf, Allemagne
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne

directement stoppée sur glace. 7 µl de mixture réactionnelle par échantillon sont ensuite ajoutés. Ce mix comprend 4 µl de tampon de réaction (conditions adéquates pour la réaction de transcription), 0,5 µl de reverse transcriptase, 0,5 µl d'inhibiteur de ribonucléase et 2 µl de déoxynucléotides. Les échantillons sont incubés 30 minutes à 55 °C, puis 5 minutes à 85 °C. La réaction est finalement stoppée sur glace. Les cDNA sont stockés à -20 °C.

5.3 Real-time PCR

a. Matériel

Voir Tables II.7 et II.8.

b. Méthode

5 µl de cDNA dilués 100 fois sont ajoutés à 20 µl de mixture réactionnelle composée des primers forward et reverse (300 nM) (voir Table II.8) et de SYBR green mastermix. Chaque échantillon est réalisé en duplicat dans une plaque 96-puits. La réaction d'amplification est réalisée grâce à la machine StepOne Plus (Applied Biosystems). Le programme est composé d'une étape de dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes suivi de 40 cycles à 95 °C pendant 30 secondes et 65 °C pendant 1 minute. Les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel SDS 2.2. L'abondance relative des différents transcrits est déterminée par les delta CT et est normalisée avec l'expression du gène de référence qui est ici le gène codant pour la GAPDH.

6 Extraction protéique et western blot

6.1 Extraction protéique totale

a. Matériel

Voir Table II.9.

b. Méthode

Le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées au PBS pour être ensuite lysées avec le tampon DLA agrémenté avec du PIC et du PIB (40 µl pour 500 µl DLA) (150 µl/T75 or 50 µl/T25). Les cellules sont grattées et l'échantillon est collecté dans des microtubes avant d'être soniqué trois fois pendant 10 secondes à faible amplitude. Le lysat est ensuite agité pendant 15 minutes à 12 °C à 800 rpm, puis centrifugé 10 minutes à 13,400 g à 12 °C afin d'ôter les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est collecté et conservé à -80 °C.

Table II.10 : Matériel nécessaire pour le dosage protéique

Matériel	Firme
Plaque 96-puits	Greiner Bio-One, Autriche
H ₂ O	
Bovine Serum Albumin (BSA) 2 µg/µl	Santa Cruz Biotechnology, USA
Pierce 660 Protein Assay reagent	Thermo Scientific, USA
Ion Detergent Compatibility reagent	Thermo Scientific, USA
Spectrophotomètre	Bio-Rad, USA
Logiciel Microplate Manager 6	Bio-Rad, USA

Table II.11 : Matériel nécessaire pour le western blot

Matériel	Firme
Tampon de charge	
- SDS 20 %	MP Biomedicals, USA
- Glycérol 85 %	Merck Millipore, USA
- Bleu de bromophénol	GE Healthcare, UK
- B-mercaptoéthanol	Fluka, USA
- Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	Merck Millipore, USA
H ₂ O	
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne
Tampon de migration pH 8,3/8,5	
- Tris 25 mM	Merck Millipore, USA
- Glycine 0,192 M	Merck Millipore, USA
- SDS 1%	MP Biomedicals, USA
- H ₂ O	
Gels pré-coulés 10 ou 15 puits	BioRad, USA
Membrane PVDF	Thermo Scientific, USA
Marqueur de poids moléculaire	
- Blue prestained Protein Standard	Biolabs, USA
- Precision Plus Kaleidoscope Standard	BioRad, USA
Méthanol 85 %	Acros Organics, USA
Tampon de transfert pH 8,3	
- Tris 25 mM	Merck Millipore, USA
- Glycine 150 mM	Merck Millipore, USA
- Méthanol 20 %	Acros Organics, USA
- H ₂ O	
PBS :	
- NaCl 150 mM	Merck Millipore, USA
- Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4	Merck Millipore, USA
- H ₂ O	
Solution de blocking Licor	LI-COR, USA
Tween 20	BioRad, USA
Scanner Odyssey	LI-COR, USA
Logiciel Odyssey V3.0	LI-COR, USA

Table II.12 : Liste des anticorps utilisés pour les western blots

Anticorps primaires	Firme	Clonalité	Source	Dilution	Référence
γ H2AX	Cell Signalling Technology	Monoclonal	Lapin	1/ 200	#9718
E-cadhérine	Cell Signalling Technology	Monoclonal	Lapin	1/ 1000	#4065
p16	Abcam	Monoclonal	Lapin	1/ 1000	Ab108349
α -tubuline	Sigma	Monoclonal	Souris	1/ 20,000	T5168
Anticorps secondaires	Firme	Clonalité	Source	Dilution	Référence
IRDye800CW Goat anti- Rabbit IgG	LI-COR	Polyclonal	Chèvre	1/ 10,000	#926-32211
IRDye680RD Goat anti- Mouse IgG	LI-COR	Polyclonal	Chèvre	1/ 10,000	#926-68070

6.2 Dosage protéique

a. Matériel

Voir Table II.10.

b. Méthode

L'abondance protéique est quantifiée en utilisant le Thermo scientific Pierce 660 nm dans lequel est dilué un agent de compatibilité avec les détergents ioniques (Ion Detergent Compatibility Reagent). Le dosage est réalisé dans une plaque 96-puits et chaque échantillon est dosé en duplicat en plaçant 9 μ l d'eau et 1 μ l d'échantillon. La droite d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une solution de BSA (Bovin Serum Albumin) de concentration connue. Un blanc est également réalisé en plaçant 9 μ l d'eau et 1 μ l de tampon de lyse. 150 μ l de Thermo scientific Pierce 660 nm complété de l'agent de compatibilité est ajouté par puit. Après 5 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

6.3 Western blot

a. Matériel

Voir Tables II.11 et II.12.

b. Méthode

15 μ g de protéines totales sont utilisés par condition. Les échantillons sont préparés avec du Tris-HCl (0,5M, pH 6,8), SDS 20 %, β -mercaptoéthanol, glycérol et bleu de bromophénol pour atteindre un volume de 20 μ l. Les échantillons sont bouillis 5 minutes à 100 °C et brièvement centrifugés. Les protéines sont ensuite chargées dans les puits de gels pré-coulés en polyacrylamide et soumis à une tension de 70 volts pendant 2 heures ou 130 volts pendant 1 heure. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane en polyvinylidène difluoride (PVDF) préalablement activée 1 minute dans le méthanol puis rincée 10 minutes dans le tampon de transfert. Le transfert liquide est réalisé comme suit : la membrane est placée dans un sandwich composé aux extérieurs d'une éponge et de 2 papiers whatman imbibés de tampon de transfert. Le dispositif est ensuite placé dans une cuve remplie de tampon de transfert, qui est elle-même placée dans un bac de glace. Le transfert se réalise sous une tension de 70 volts pendant 2 heures. Après le transfert, la membrane est bloquée dans du PBS-Licor (50 %-50 %) pendant 1 heure. Les anticorps primaires (voir Table II.12) sont dilués dans du Licor-Tween 20 0,1 % et sont incubés avec la membrane overnight à 4 °C sous agitation. Après 3 rinçages au PBS-Tween 20 0,1 %, la membrane est incubée avec les anticorps secondaires (voir Table II.12) dilués dans du PBS-Licor-Tween 20 0,1%, pendant 1 heure à température ambiante. La membrane est ensuite rincée à 3 reprises pendant 5 minutes au PBS-Tween 20 0,1 % et 2 fois au PBS seul. La protéine d'intérêt est finalement révélée et quantifiée en scannant la membrane avec le programme Odyssey V3.0 (LI-COR, USA). Afin de normaliser le résultat obtenu, la tubuline est utilisée comme contrôle de charge.

Table II.13 : Matériel nécessaire pour l'immunofluorescence

Matériel	Firme
Paraformaldéhyde	Merck Millipore, USA
PBS : - NaCl 150 mM - Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 - H ₂ O	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Triton X 100	Sigma-Aldrich, USA
BSA	Santa Cruz Biotechnology, USA
Hoechst	Molecular Probes, USA
DAPI	Sigma, USA
Couvre-objets	VWR, USA
Mowiol	Sigma-Aldrich, USA
Microscope confocal	Leica, Allemagne

Table II.14 : Liste d'anticorps utilisés pour l'immunofluorescence

Anticorps primaire	Firme	Clonalité	Source	Dilution	Référence
γ H2AX	Cell Signalling Technology	Monoclonal	Lapin	1/800	#9718
Anticorps secondaires	Firme	Clonalité	Source	Dilution	Référence
Goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 conjugate	Molecular Probe	Polyclonal	Chèvre	1/1000	#A11008
Goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 conjugate	Molecular Probe	Polyclonal	Chèvre	1/1000	#A11001

Table II.15 : Matériel nécessaire à l'ELISA

Matériel	Firme
Quantikine ELISA VEGF DVE00 kit	R&D Systems, USA
Quantikine ELISA IL-6 D6050 kit	R&D Systems, USA
Quantikine ELISA IL-8 D8000C kit	R&D Systems, USA

7 Immunofluorescence

a. Matériel

Voir Tables II.13 et II.14.

b. Méthode

Les cellules sont repiquées à une densité de 40,000 cellules par couvre-objet. Le lendemain du repiquage, les cellules sont fixées pendant 10 minutes à température ambiante dans du PBS-paraformaldéhyde (PFA) 4 %. Après 3 rinçages dans du PBS, les cellules sont perméabilisées avec du PBS-Triton X-100 1 % pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois pendant 10 minutes avec une solution de PBS-BSA 2 % afin d'éviter un marquage non-spécifique. Les cellules sont incubées 2 heures à température ambiante ou overnight à 4°C avec l'anticorps primaire (30 µl/couvre-objet) (voir table II.14) dilué dans du PBS-BSA 2 %. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois au PBS-BSA 2 % pendant 10 minutes et incubées avec l'anticorps secondaire (voir table II.14) dilué dans la solution de PBS-BSA 2 %, pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont rincées 3 fois au PBS-BA 2 % puis une fois avec du PBS seul. Les noyaux sont marqués avec du DAPI (1/2500 dans du PBS) ou avec du Hoechst (1/500 dans du PBS) pendant 10 minutes ou 30 minutes, respectivement, à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont finalement rincées 3 fois au PBS et les couvre-objets sont montés sur lame à l'aide de Mowiol préchauffé à 56°C. Les cellules sont ensuite visualisées au microscope confocal. Comme contrôle positif pour le marquage de γ H2AX, les cellules sont incubées 1 heure dans de l'étoposide (Sigma Aldrich, USA, E1383-25MG) dilué dans du K-SFM à une concentration finale de 100 µM.

8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays)

a. Matériel

Voir table II.15

b. Méthode

Le milieu conditionné a été récolté après 72h d'incubation avec des NHK qui ont atteint la sénescence réplivative, ou avec des NHK jeunes. Ils ont ensuite été centrifugés 8 min à 200 g. Le surnageant est récolté et stocké à -80 °C, ou utilisé directement. Trois kits Quantikine ELISA de chez R&D Systems ont été utilisés : IL-6 (interleukine-6), IL-8 (interleukine-8) et VEGF (vascular endothelial growth factor). Les tests ELISA ont été réalisés suivant les recommandations du fournisseur. Pour chaque test, une droite d'étalonnage a été réalisée également selon les données du fournisseur. Les standards et les contrôles ont été réalisés en duplicat et les échantillons ont été réalisés en triplicat. En résumé, un diluant est tout d'abord placé dans le fond des puits (100 µl pour l'IL-6 et l'IL-8 et 50 µl pour VEGF). Ensuite, les milieux conditionnés ou les standards sont ajoutés (100 µl pour l'IL-6, 50 µl pour IL-8 et 200 µl pour VEGF) et incubés 2 h à température ambiante (la plaque est recouverte avec un plastique auto-collant). Les puits sont ensuite rincés 3 fois avec du tampon de rinçage. Des anticorps anti-IL-6, IL-8 et VEGF humains et couples à la peroxidase (horseradish peroxidase) sont ajoutés

Table II.16 : Matériel nécessaire à la préparation des milieux conditionnés et aux tests de scratch

Matériel	Firme
PBS : - NaCl 150 mM - Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4 - H ₂ O	Merck Millipore, USA Merck Millipore, USA
Keratinocytes Serum-Free Medium (K-SFM) Suppléments : voir table 1	Gibco, USA
Sérum bovin fœtal (FBS)	Gibco, USA
Dubelcco's Modified Eagle Medium high glucose (DHG)	ThermoFischer Scientific
Mitomycine C (10 µg/ml)	Sigma, USA
Tubes ultracentrifugeuse	Beckman coulter, USA
Adaptateurs tubes ultracentrifugeuse	Beckman coulter, 355919, USA
Ultracentrifugeuse	Ultracentrifugeuse de table optima TLX, Beckman coulter, USA
Centrifugeuse	Eppendorf, Allemagne
Protéinase K (100 µg/ml)	Sigma, USA
Cytonote	Iprasense, France
Logiciel Horus	

aux différents puits et incubés pendant 2 h pour l'IL-6 et VEGF et 1 h pour l'IL-8 à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés à trois reprises avec le tampon de lavage et la solution de coloration est ajoutée pour 30 min. 50 µl de la solution stop est ensuite ajoutée aux différents puits et une lecture de l'absorbance à une longueur d'onde de 450 nm au spectrophotomètre, est réalisée. Cette lecture a été corrigée par la valeur d'absorbance obtenue à 540 nm. Les résultats finaux sont normalisés par rapport à la quantité de protéines totales obtenue après lyse du tapis cellulaire correspondant au milieu conditionné utilisé.

9 Influence du milieu conditionné de NHK jeunes et sénescents sur les cellules environnantes

a. Matériel

Voir table II.16.

b. Méthode

Préparation des milieux conditionnés

Le milieu conditionné a été récolté après 72h à partir de cultures de cellules jeunes et sénescentes ou de cellules soumises à la SIPS-UVB ainsi que leurs contrôles. Le milieu est ensuite centrifugé 8 minutes à 200 g afin d'éliminer les cellules mortes. Le surnageant est récolté et stocké à -80 °C, ou utilisé directement.

Afin d'enlever les vésicules extracellulaires du milieu conditionné, celui-ci subit une série de centrifugations successives. Après la centrifugation de 8 minutes à 200 g, le surnageant est récolté et centrifugé 30 minutes à 10,000 g à 4 °C. Le surnageant est ensuite transvasé dans un tube stérile adapté aux ultracentrifugations et centrifugé durant 1h30 à 100,000 g à 4°C (rotor TLA 100.3 avec adaptateurs). Le culot de vésicules extracellulaires est resuspendu dans du K-SFM frais.

Afin d'éliminer les protéines du milieu conditionné, celui-ci est traité avec de la protéinase K à une concentration finale de 100 µg/ml. Après une incubation de 2 h sur roue à 37 °C, le milieu est chauffé 15 min à 100 °C afin d'inactiver l'enzyme. Le milieu est ensuite centrifugé 10 min à 2500 g. Le milieu est ensuite filtré (filtre avec pores de 0,22 µm).

Tests scratch

Les cellules sont repiquées dans une boîte de pétri (10 cm²) le jour avant le scratch à une densité de 90,000 cellules/cm² pour les A431, et 75,000 cellules/cm² pour les kératinocytes jeunes afin d'obtenir une confluence de 100 % après 24 heures.

Avant le scratch, les cellules sont rincées au PBS et leur prolifération est stoppée grâce à une incubation de 3 heures avec de la mitomycine C diluée dans le milieu de culture à une concentration finale de 10 µg/ml pour les A431, et 15 µg/ml pour les kératinocytes, à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite rincées avec du milieu. Le scratch est alors réalisé avec un grattoir coupé en pointe. Les cellules sont à

nouveau rincées pour éliminer les cellules détachées. Pour les tests scratch sur les NHK jeunes, les cellules sont incubées avec un mélange 50 % de milieu conditionné adéquat et 50 % de K-SFM frais, ou avec 100 % de K-SFM frais pour la condition contrôle. Pour les tests scratch réalisés avec les A431, les cellules sont incubées avec un mélange 50 % de milieu conditionné adéquat et 50 % de DHG frais + 20 % sérum (afin d'obtenir une concentration finale de 10% de sérum), ou avec un mélange 50 % de K-SFM frais et 50 % de DHG frais + 20 % sérum. Les cellules sont incubées 24 heures dans l'incubateur à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et équipé du cytonote. Des micrographies sont prises par le cytonote toutes les 30 minutes pendant 24 heures. Les images sont reconstruites grâce à un algorithme holographique basé sur la lumière diffractée par les cellules. Les micrographies sont ensuite traitées avec le software Horus.

Extraction protéique et d'ARN des cellules incubées avec le milieu conditionné

Afin d'étudier l'effet du milieu conditionné de NHK jeunes et sénescents sur les NHK jeunes et les A431, ces cellules sont repiquées à une densité de 250,000 cellules par puit (plaque 6-puits). Le lendemain, elles sont incubées avec un mélange 50 % de milieu conditionné adéquat et 50 % de K-SFM ou 50 % de DHG 20% sérum pour les NHK et les A431, respectivement. Les conditions contrôles sont incubées uniquement avec du K-SFM pour les NHK ou le mélange 50 % K-SFM / 50 % DHG + 20 % sérum pour les A431. Les protéines ou ARN totaux sont ensuite extraits après 24, 48 et 72 h d'incubation comme expliqué aux point 5.1 et point 5.2.

III. Résultats

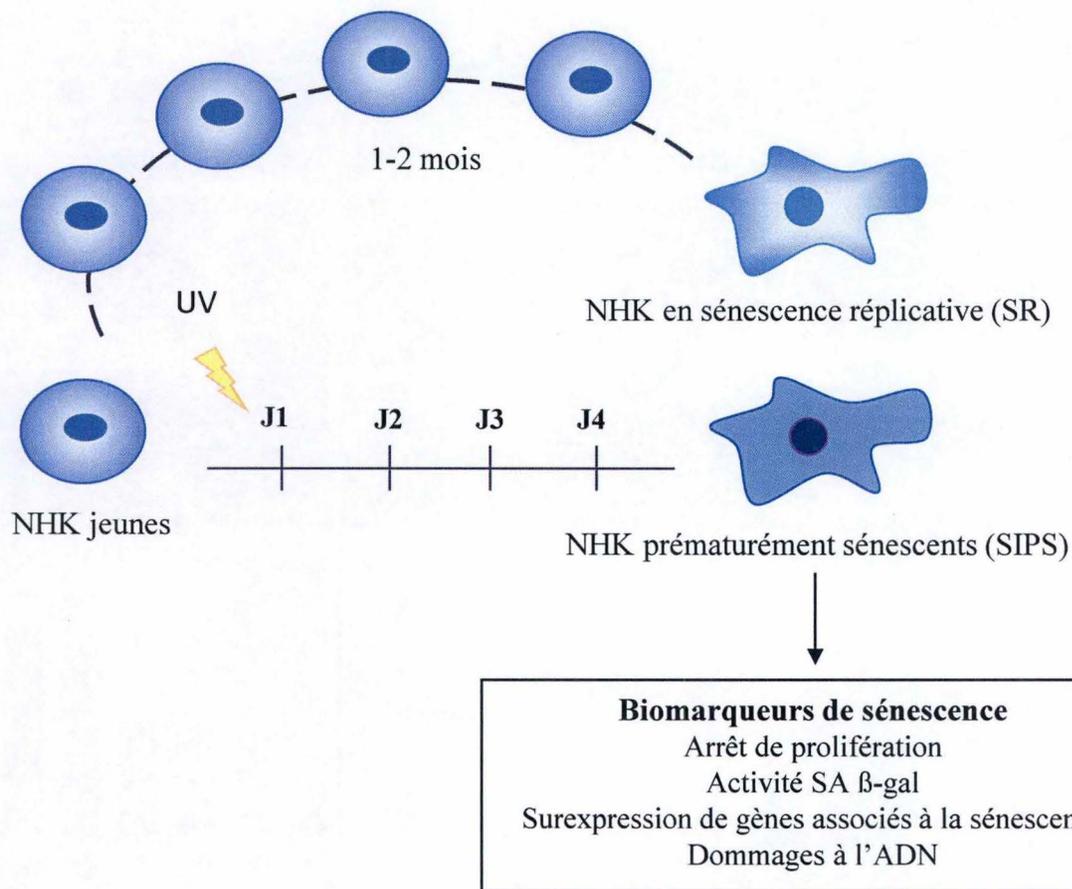


Figure III.1 Schéma des modèles de sénescence répliquative et UVB-SIPS chez les NHK. Pour la sénescence répliquative, les NHK sont passés lorsqu'ils atteignent 80 % de confluence, jusqu'à la sénescence. Pour la SIPS-UVB, les NHK sont repiqués à un passage jeune (5 ou 6) 72 h avant le stress à une densité de 12,000 cellules/cm² pour la condition UV et 8,000 cellules/cm² pour la condition contrôle. Les NHK sont exposés à une dose subcytotoxique de BB-UVB ou à trois doses répétées à un intervalle de 3 heures pour les NB-UVB, afin d'atteindre la sénescence. Les NHK contrôles sont soumis aux mêmes conditions de culture sans l'exposition aux UVB. Les biomarqueurs de sénescence sont analysés 72 h après le dernier stress.

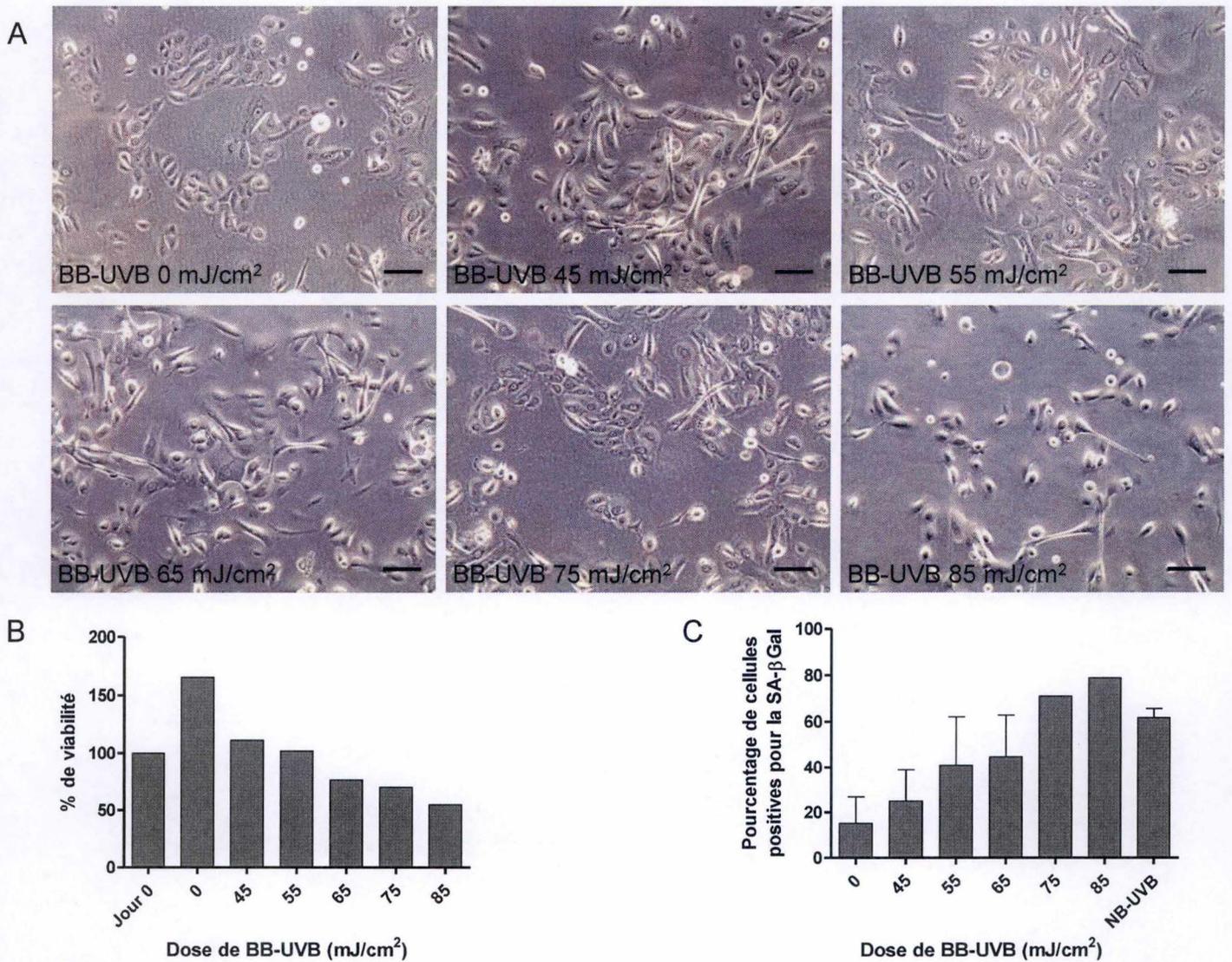


Figure III.2 Etude des changements morphologiques, de la cytotoxicité et de l'activité SA-βGal après une exposition à des doses croissantes de BB-UVB. **A** : Observation des modifications morphologiques 72 h après le stress par microscopie de phase (grossissement 100x, barre d'échelle = 1 mm). **B** : Tests de cytotoxicité. Afin de déterminer la dose subcytotoxique de BB-UVB, nous avons analysé la viabilité cellulaire via un test MTT 72 h après l'exposition aux BB-UVB, le jour 0 est considéré comme 100 % (n=2). **C** : Tests SA-βGal. La proportion de cellules positives pour l'activité SA-βGal a été déterminée 72 h après le stress et comparé aux cellules totales (300 cellules comptées par puit, 3 puits comptés par condition) (n=3 pour 0, 45, 55, 65 mJ/cm² and n= 1 pour 75 et 85 mJ/cm²). Les NHK contrôles sont soumises aux mêmes conditions de culture sans l'exposition aux BB-UVB (0 mJ/cm²).

Lors de ce travail, nous nous sommes focalisés sur la sénescence du kératinocyte humain normal (NHK) via l'utilisation de 3 modèles de sénescence que sont la sénescence répllicative et la SIPS-UVB, subdivisée en deux types d'UVB : les UVB à spectre étroit (narrow-band, NB-UVB), déjà mis au point dans l'équipe, et les UVB à spectre large (broad-band, BB-UVB) (Figure III.1).

Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à l'impact des UVB à large spectre afin de déterminer une dose subcytotoxique et d'étudier si celle-ci induit une sénescence prématurée. Nous avons testé la toxicité de différentes doses de BB-UVB allant de 45 mJ/cm² à 85 mJ/cm², et des marqueurs de sénescence ont été étudiés 72 heures après le stress.

1 Etude de l'effet des UVB à large spectre (BB-UVB) sur l'induction de la sénescence des kératinocytes

1.1 Effet d'une dose croissante de BB-UVB sur la morphologie et la mortalité des NHK

Nous nous sommes d'abord intéressés à la viabilité et à la morphologie des NHK soumis à des doses croissantes de BB-UVB, de 45 mJ/cm² à 85 mJ/cm². Des modifications morphologiques propres aux cellules sénescents ont été observées, comme l'apparition de bords irréguliers à partir de 55 mJ/cm². De la mortalité caractérisée par une présence de cellules flottant dans le milieu a également été observée à des plus hautes doses de BB-UVB de 75 et 85 mJ/cm² (Figure III.2A).

La mortalité des NHK suite à une exposition croissante de BB-UVB de 45 mJ/cm² à 85 mJ/cm² a été analysée 72 heures après le stress à l'aide d'un test MTT. La condition « Jour 0 » correspond à la viabilité de NHK arrêtés juste avant l'exposition aux BB-UVB et est considérée comme le 100 % de viabilité. Les résultats montrent que le pourcentage de viabilité cellulaire diminue graduellement au plus la dose de BB-UVB augmente. Les contrôles non exposés aux UV montrent une prolifération de 155 %. Aucune mortalité n'est observée après exposition à une dose de 45 mJ/cm² (111 %) et de 55 mJ/cm² (102 %). Par contre, une mortalité est détectée à partir de la dose de 65 mJ/cm² (77 %), et s'accroît aux doses de 75 mJ/cm² (70 %) et de 85 mJ/cm² (55 %). La dose maximale de BB-UVB n'induisant aucune mortalité est donc celle de 55 mJ/cm² (Figure III.2B).

Nous avons ensuite testé l'effet d'une exposition BB-UVB sur différents marqueurs de sénescence.

1.2 SA-βgal chez les NHK exposés aux BB-UVB

Le pourcentage de cellules positives pour l'activité SA-βgal augmente avec la dose de BB-UVB. Cette proportion est de 15 % pour les cellules contrôles qui sont non exposées aux UVB, de 25 % pour les cellules exposées à 45 mJ/cm², de 41 % pour les cellules exposées à 55 mJ/cm², de 45 % pour les cellules exposées à 65 mJ/cm², de 71 % pour les cellules exposées à 75 mJ/cm² et de 79 % pour les cellules exposées à 85 mJ/cm² (Figure III.2C).

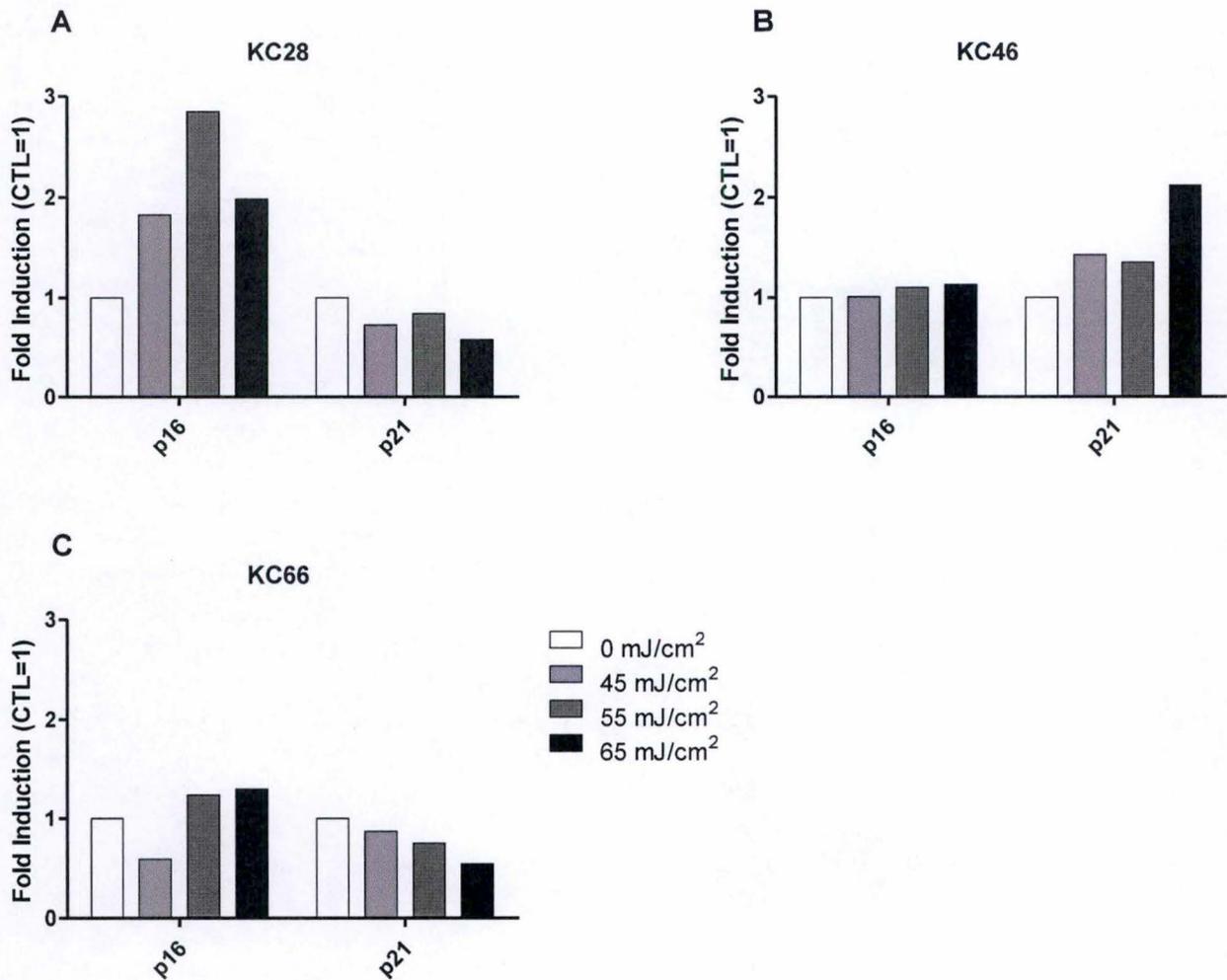


Figure III.3 Expression génique de *p16* et *p21* en fonction de la dose d'exposition aux BB-UVB. Les NHK ont été exposés à une exposition unique à 3 différentes doses de BB-UVB (45, 55, 65 mJ/cm²). Les contrôles ont été soumises aux mêmes conditions de culture sans exposition aux BB-UVB. L'ARN total a été extrait 72 h après le stress UVB. La transcription inverse et la qPCR ont été réalisées pour analyser l'expression de *p16* et *p21*. Les résultats sont exprimés en taux d'induction par rapport à leur expression dans les NHK contrôles et la GAPDH est utilisée comme gène de référence. Cette expérience a été réalisée sur 3 donneurs : **A** : KC28, **B** : KC46, **C** : KC66.

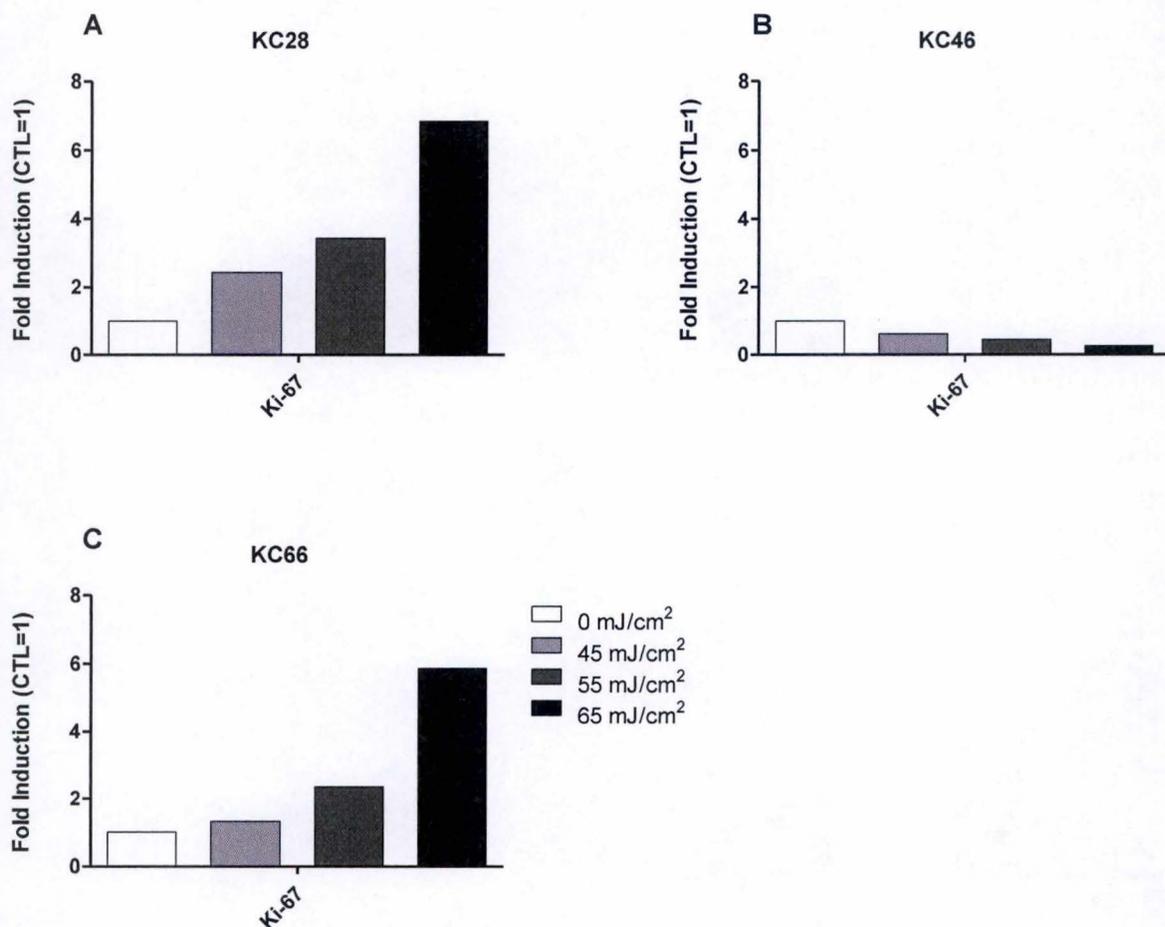


Figure III.4 Expression génique de Ki-67 en fonction de la dose d'exposition aux BB-UVB. Les NHK ont été exposés à une exposition unique à 3 différentes doses de BB-UVB (45, 55, 65 mJ/cm²). Les contrôles ont été soumis aux mêmes conditions de culture sans exposition aux BB-UVB. L'ARN total a été extrait 72 h après le stress UVB. La transcription inverse et la qPCR ont été réalisées pour analyser l'expression de *Ki-67*. Les résultats sont exprimés en taux d'induction par rapport à leur expression dans les NHK contrôles et la GAPDH est utilisée comme gène de référence. Cette expérience a été réalisée sur 3 donneurs : **A** : KC28, **B** : KC46 et **C** : KC66.

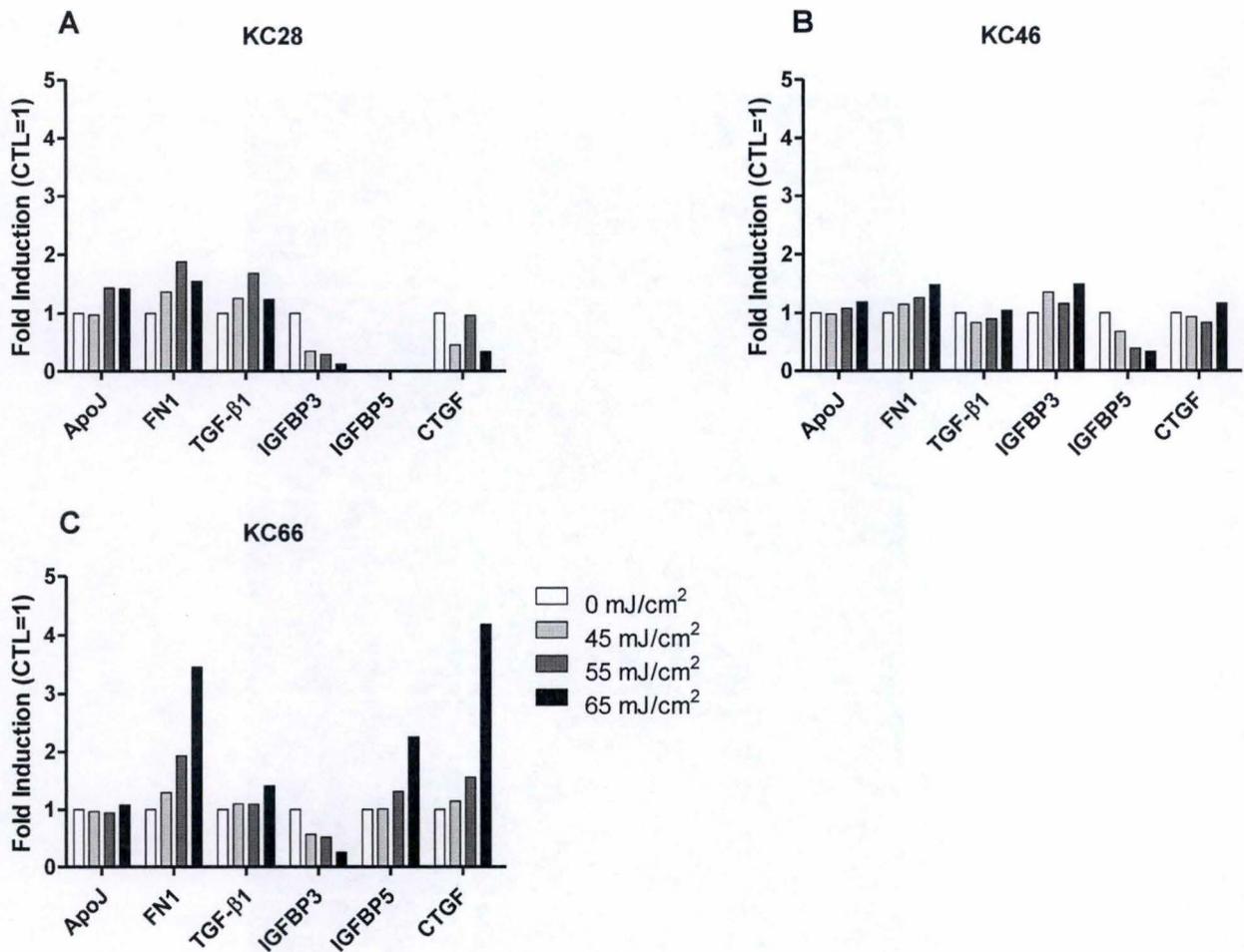
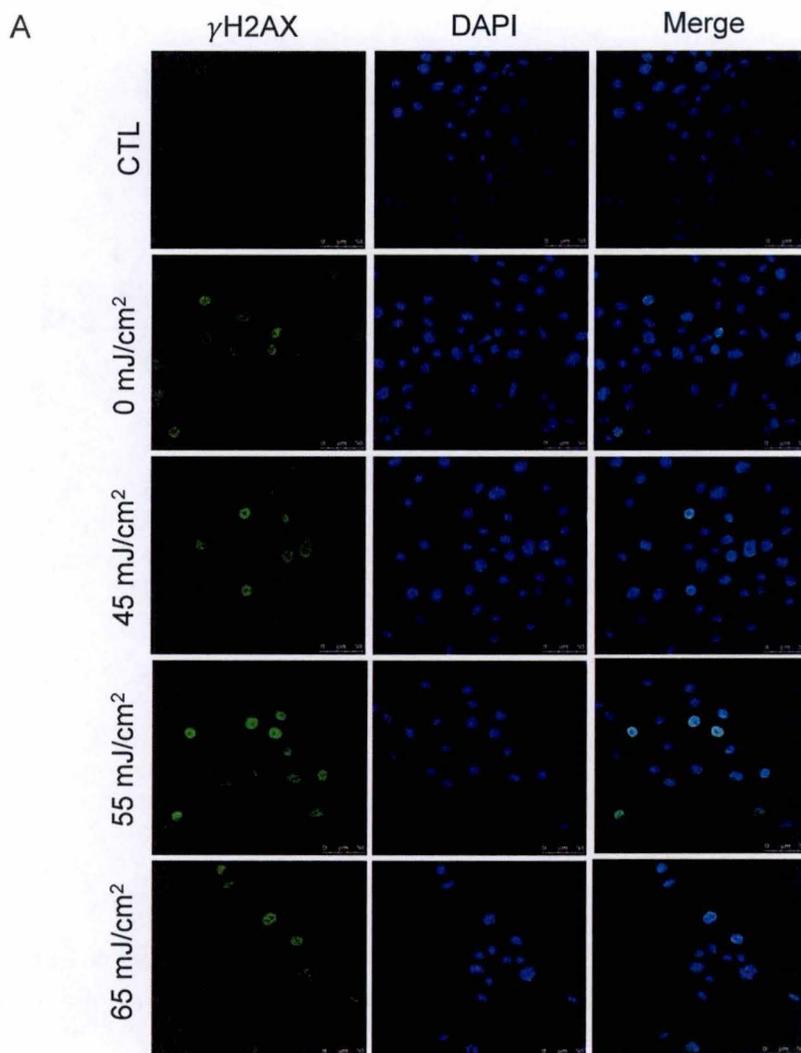


Figure III.5 Taux d'expression des gènes associés à la sénescence en fonction de la dose d'exposition aux BB-UVB. Les NHK ont été exposés à une exposition unique à 3 différentes doses de BB-UVB (45, 55, 65 mJ/cm²). Les contrôles ont été soumis aux mêmes conditions de culture sans exposition aux BB-UVB. L'ARN total a été extrait 72 h après le stress UVB. La transcription inverse et la qPCR ont été réalisées pour analyser l'expression de *ApoJ*, *FN1*, *TGF-β1*, *IGFBP3*, *IGFBP5* et *CTGF*. Les résultats sont exprimés en taux d'induction par rapport à leur expression dans les NHK contrôles et la GAPDH est utilisée comme gène de référence. Cette expérience a été réalisée sur 3 donneurs : **A** : KC28, **B** : KC46 et **C** : KC66.



B

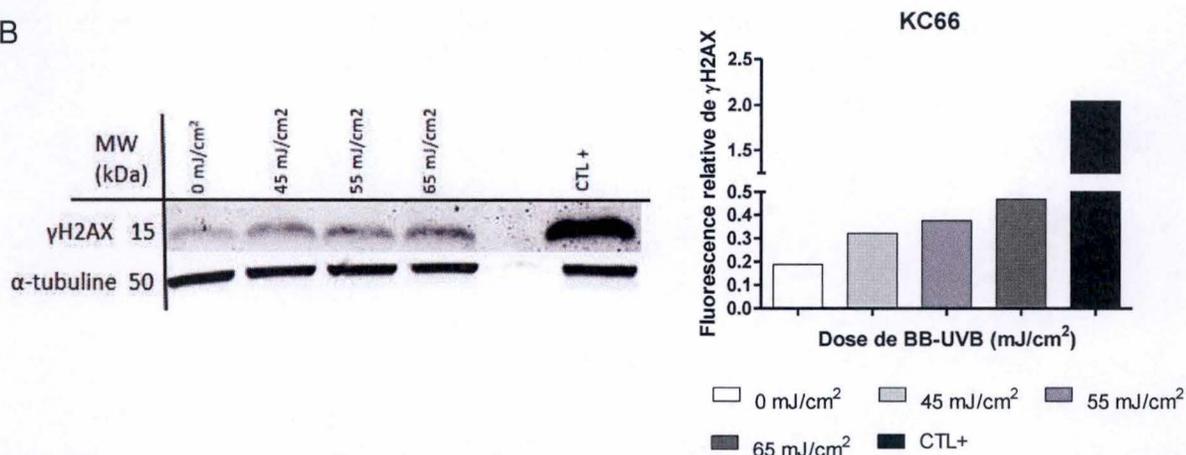


Figure III.6 Analyse des dommages à l'ADN en fonction de la dose d'exposition aux BB-UVB A :

Localisation et abondance de γ H2AX analysée par immunofluorescence. Les NHK sont exposés à 3 doses différentes (0, 45, 55, 65 mJ/cm²) de BB-UVB, fixées 72 h après le stress et incubées avec l'anticorps adéquat. γ H2AX a été révélé par un fluorochrome Alexa 488 (en vert). Les noyaux ont été marqué au DAPI (en bleu). Le contrôle constitue des NHK restés à l'incubateur pendant tout le temps de l'exposition, n'ayant pas subi d'incubation au PBS (CTL). La visualisation a été réalisée par un microscope confocal. **B** : Analyse par western blot de l'abondance de γ H2AX dans les NHK en fonction des doses de BB-UVB (0, 45, 55, 65 mJ/cm²). Les protéines totales ont été extraites 72 h après l'exposition aux UV. Les cellules contrôles ont été soumises aux mêmes conditions de culture, sans l'exposition aux BB-UVB (0 mJ/cm²). Le contrôle positif correspond à un extrait protéique total de cellules exposées à 675 mJ/cm² de NB-UVB. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. **C** : La quantification du western blot a été réalisée grâce au programme Odyssey (n=1).

1.3 Etude de l'arrêt du cycle cellulaire chez les NHK exposés aux BB-UVB

Afin d'observer si l'exposition des kératinocytes aux BB-UVB amène à un arrêt du cycle cellulaire à long terme, une étude de l'expression génique de deux CDKI impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire en sénescence, p16^{INK-4A} et p21^{WAF-1}, a été réalisée par RT-qPCR. Trois doses de BB-UVB ont été utilisées (45, 55 et 65 mJ/cm²) ainsi qu'un contrôle (0 mJ/cm², CTL). Les résultats obtenus montrent une variabilité importante en fonction du donneur (dénommés KC28, KC46, KC66). Une surexpression de p16^{INK-4A} a été observée chez le donneur KC28 (à partir de 45 mJ/cm², de 1,83, de 2,84 et de 1,99 fois) et plus faiblement chez le donneur KC66 (à partir de 55mJ/cm², de 1,24 à 1,30 fois), en comparaison aux contrôles. Le gène p21^{WAF-1} est quant à lui surexprimé chez le donneur KC46 à partir de 45 mJ/cm² (de 1,43 à 2,12 fois pour 65 mJ/cm²) et à l'inverse, son expression est diminuée chez les donneurs KC28 et KC66, par rapport aux contrôles (Figure III.3).

La prolifération a ensuite été étudiée chez les NHK exposés aux mêmes doses de BB-UVB. Pour cela, les modifications de l'expression génique de Ki-67, un marqueur de prolifération, ont été étudiées. Pour les donneurs KC28 et KC66, l'expression de Ki-67 augmente en fonction des doses, de 2,4 à 6,9 fois pour KC28 et de 1,3 à 6,9 fois pour KC66, en comparaison aux contrôles. Par contre, pour le KC46, nous observons une diminution de cette expression relative de 0,6 à 0,3 par rapport aux contrôles (Figure III.4).

Ces résultats ne nous permettent donc pas de mettre en évidence un arrêt de prolifération après le stress BB-UVB, excepté pour les NHK isolés du donneur KC46.

1.4 Etude de l'expression de gènes associés à la sénescence chez les NHK exposés aux BB-UVB

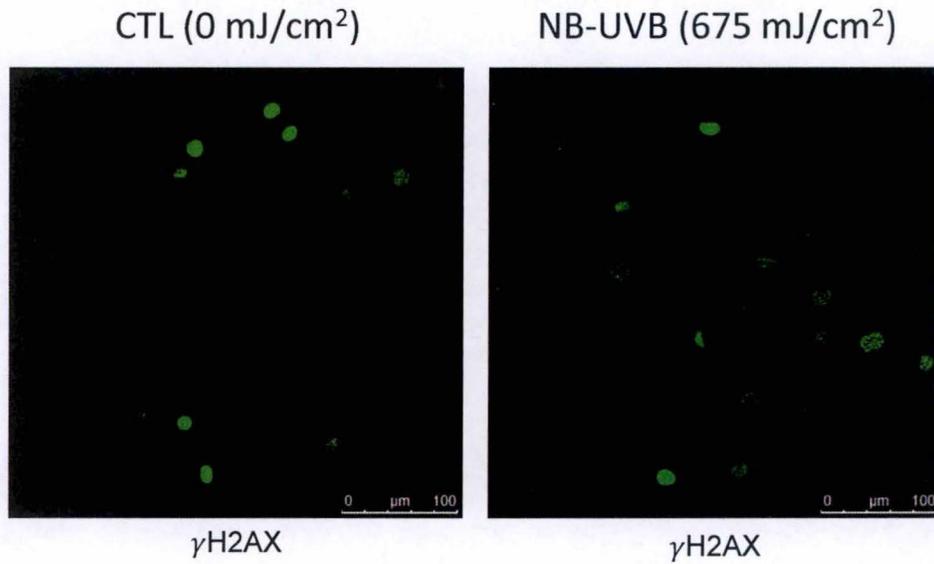
Nous avons ensuite étudié l'expression d'une série de gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence chez les fibroblastes comme *Apolipoprotéine J (ApoJ)*, *Fibronectine (FNI)*, *Transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1)*, *Insulin-like growth factor binding protein-3 et -5 (IGFBP-3 -5)*, et *connective tissue growth factor (CTGF)*. Les NHK ont été exposés aux mêmes doses de BB-UVB. L'ARN a été extrait et rétro-transcrit 72h après le stress afin d'analyser les modifications d'expression génique associées à la sénescence. A nouveau, nous observons une grande variabilité en fonction du donneur. Aucune différence importante n'a été observée pour les donneurs KC46. Pour le donneur KC28, nous observons une augmentation de l'expression d'*ApoJ* (1,4 fois), *FNI* (1,9 fois) et *TGF-β1* (1,7 fois) pour la dose de 55 mJ/cm², par rapport aux contrôles. Pour le donneur KC66, une augmentation de l'expression de *FNI* (3,5 fois), *IGFBP5* (2,3 fois) et *CTGF* (4,2 fois) a été observée pour la dose de 65 mJ/cm², en comparaison aux contrôles (Figure III.5).

1.5 Etude des dommages à l'ADN chez les NHK exposés aux BB-UVB

La présence de dommages persistants à l'ADN est également un biomarqueur de sénescence. Nous avons étudié la présence de dommages à l'ADN à long-terme, soit à 72h après le stress BB-UVB (0, 45, 55, 65 mJ/cm²) en analysant l'abondance et la localisation de γH2AX, un senseur de cassures double brins à l'ADN. Le marquage par immunofluorescence de γH2AX montre une forte abondance de γH2AX dans les cellules exposées aux UVB, mais également dans les cellules contrôles, non exposées aux UVB mais ayant subi les mêmes conditions de culture que les cellules stressées (0 mJ/cm²) (Figure III.6A).

Le nombre de foci de γH2AX semble augmenter légèrement en fonction des doses de BB-UVB. Afin de comprendre l'origine du marquage dans les cellules contrôles, nous avons analysé des

A



B

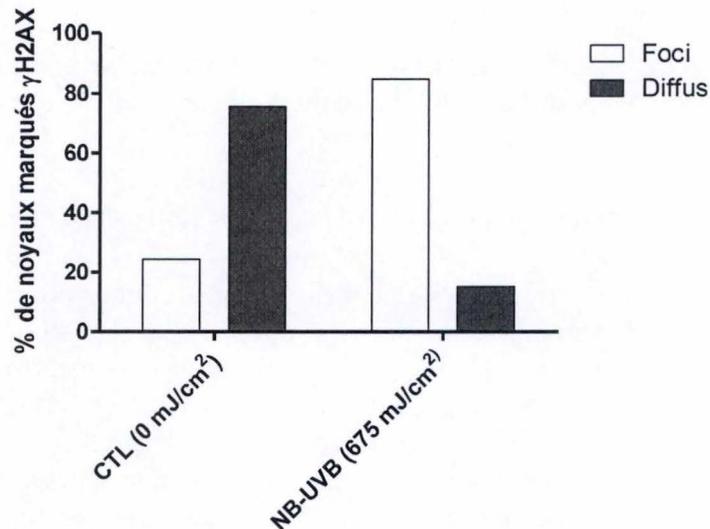


Figure III.7 Analyse du marquage de γ H2AX entre la condition contrôle (CTL, 0 mJ/cm²) et les cellules exposées aux NB-UVB (NB-UVB). **A** : les NHK ont été exposés à une dose de 675 mJ/cm² à 3 reprises et à 3 h d'intervalle, fixées après 72 h et incubés avec l'anticorps adéquat. γ H2AX a été révélé par un fluorochrome Alexa 488 (en vert). Les cellules contrôles ont été soumises aux mêmes conditions de culture, sans l'exposition aux NB-UVB. La visualisation a été réalisée par un microscope confocal. **B** : Quantification des noyaux comportant un marquage sous forme de foci et un marquage diffus. 300 cellules ont été comptées pour la condition contrôle et 200 cellules ont été comptées pour la condition UV. La quantification a été réalisée par ImageJ (n=1).

cellules contrôles restées dans l'incubateur et ne subissant donc pas le protocole de culture des cellules exposées, tels que notamment l'incubation dans le PBS durant le stress (CTL). Ces cellules ne montrent pas de marquage γ H2AX (Figure III.6A). Il semble donc que le protocole en lui-même, sans le stress, comprenant des changements de milieu et l'ajout de PBS, entraîne un marquage de γ H2AX.

Nous avons ensuite analysé l'abondance de γ H2AX à 72h après l'exposition aux BB-UVB par western blot à partir d'extraits protéiques totaux de NHK exposés aux différentes doses de BB-UVB. Nous remarquons que l'abondance de γ H2AX augmente légèrement en fonction des doses de 1,7 fois à 45 mJ/cm² à 2,5 fois à 65 mJ/cm² par rapport aux contrôles, avec une abondance présente mais plus faible dans cette condition. Le contrôle positif est un extrait protéique total obtenu 24 h après l'exposition répétée (3 fois) de NHK à 675 mJ/cm² de Narrow-Band UVB (NB-UVB) (Figure III.6B).

Nous nous sommes ensuite intéressés au marquage de γ H2AX suite à l'exposition répétée (3 fois) de NHK à 675 mJ/cm², conditions entraînant la sénescence des NHK. En effet, un marquage différent a été observé entre les cellules contrôles (0 mJ/cm²) et les cellules exposées aux UV (3 stress à 675 mJ/cm²). Le marquage des cellules contrôles est diffus, alors que le marquage des cellules exposées aux UVB est sous forme de foci dans le noyau. Cela a été montré dans la littérature, au niveau de cellules exposées aux rayons X (Löbrich *et al.*, 2010). La quantification a montré que, pour les cellules contrôles, 25 % des noyaux contiennent des foci alors que 75 % présentent un marquage diffus du noyau (300 noyaux comptés), alors que les NHK exposés aux NB-UVB présentent un marquage inverse, soit 85 % des noyaux contenant des foci contre 15 % présentant un marquage diffus (200 noyaux comptés) (Figure III.7).

Il semblerait donc qu'une dose croissante BB-UVB et une exposition à 675 mJ/cm² de NB-UVB induise un marquage plus important de γ H2AX par rapport au contrôle, lui aussi marqué. Ce marquage est cependant différent entre les cellules contrôles, présentant un marquage diffus, et les cellules exposées aux UVB, présentant un marquage sous forme de foci.

En conclusion, nous avons estimé que la dose de 55 mJ/cm² de BB-UVB était la dose subcytotoxique permettant l'augmentation de l'apparition de cellules positives pour la SA- β Gal ainsi que la phosphorylation de H2AX. Toutefois, la modification d'expression de gènes associés à la sénescence n'est pas concluante étant donné la variabilité inter-donneurs.

La 2^{ème} partie de ce travail se focalisera sur l'étude de la communication entre les NHK en sénescence et les cellules environnantes.

2 Etude de la sénescence répllicative des NHK

2.1 Evolution de la culture de NHK jusqu'à la sénescence répllicative

Plusieurs cultures indépendantes ont été réalisées sur des NHK provenant de différents donneurs. Nous avons cultivé les NHK jusqu'à l'arrêt de leur prolifération, afin d'atteindre la sénescence répllicative après plusieurs passages. Un arrêt de prolifération aux alentours du CPD 8 a été observé, correspondant au plateau de sénescence, pour les donneurs KC7, KC8, KC12 et KC27. Pour le donneur KC28, un premier arrêt de prolifération au CPD 5 a été observé, suivi d'une reprise de prolifération. Nous avons probablement eu l'occasion d'observer le phénomène d'émergence, déjà mentionné dans la littérature (Gosselin *et al.*, 2009). Une

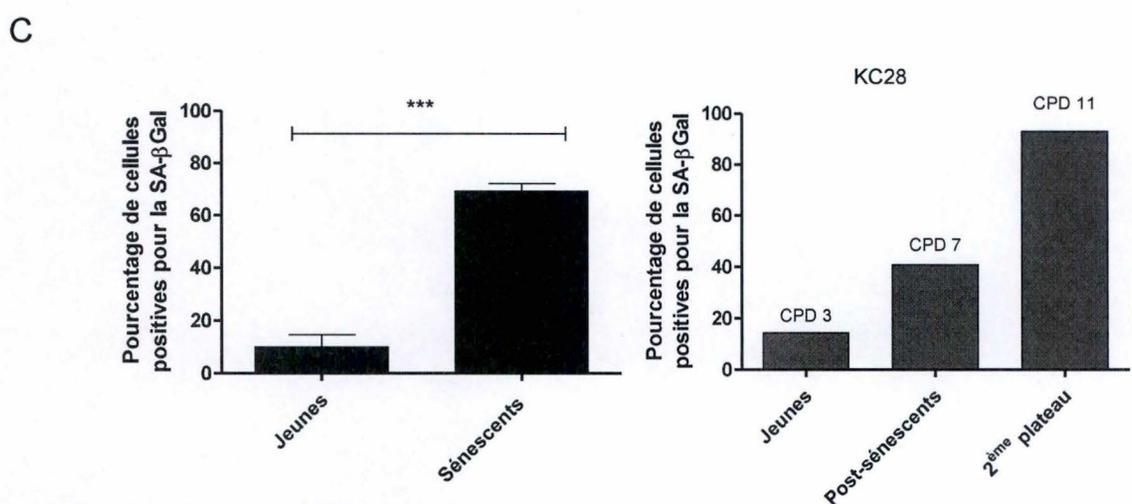
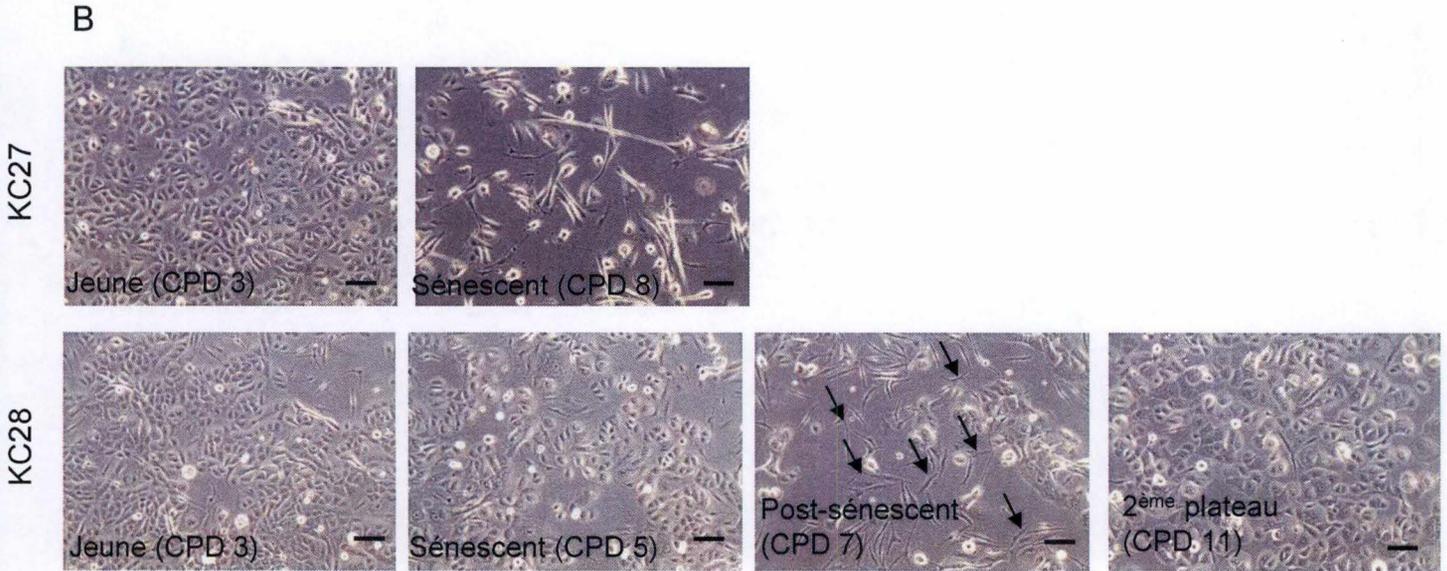
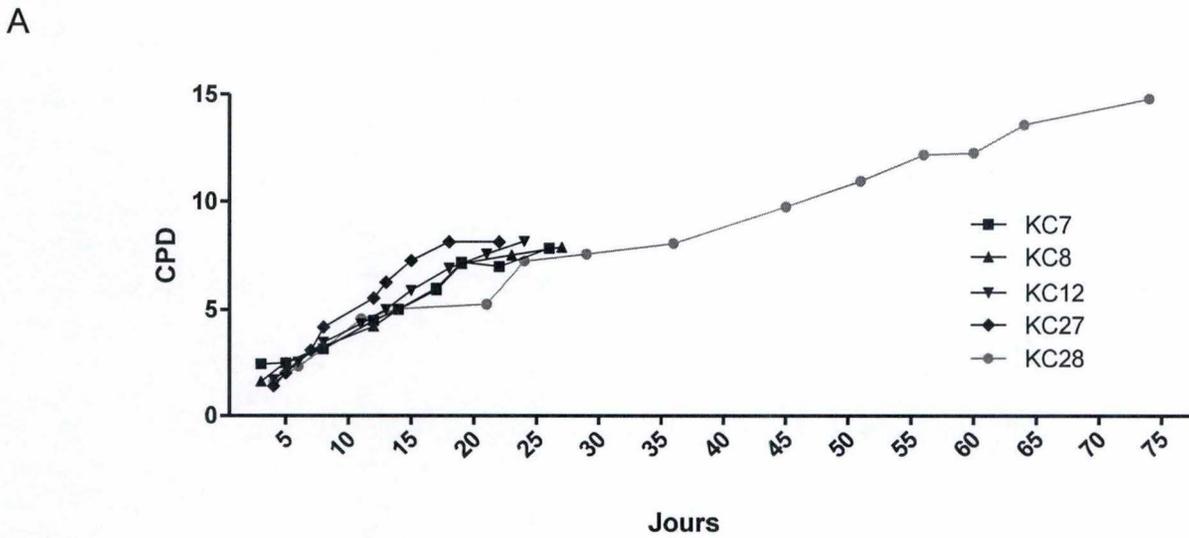


Figure III.8 Evolution de la culture, changements morphologiques et tests SA-βGal des NHK en sénescence répliative. A : Doublements de population cumulatifs des NHK isolés de 5 donneurs en fonction du temps. B : Micrographies par microscopie à contraste de phase (grossissement de 100x, barre d'échelle = 1 mm) de NHK jeunes, sénéscentés et post-sénéscentés issus des 2 donneurs (KC27 et KC28). C : Pourcentage de cellules positives pour l'activité SA-βGal chez les NHK jeunes, sénéscentés et post-sénéscentés issus des 4 donneurs présentant un profil de culture habituel, et pour le donneur KC28. La proportion de cellules positives pour la SA-βGal a été évaluée en comparaison aux cellules totales (300 cellules comptées par puits, 3 puits par condition)(*** < 0,0001).

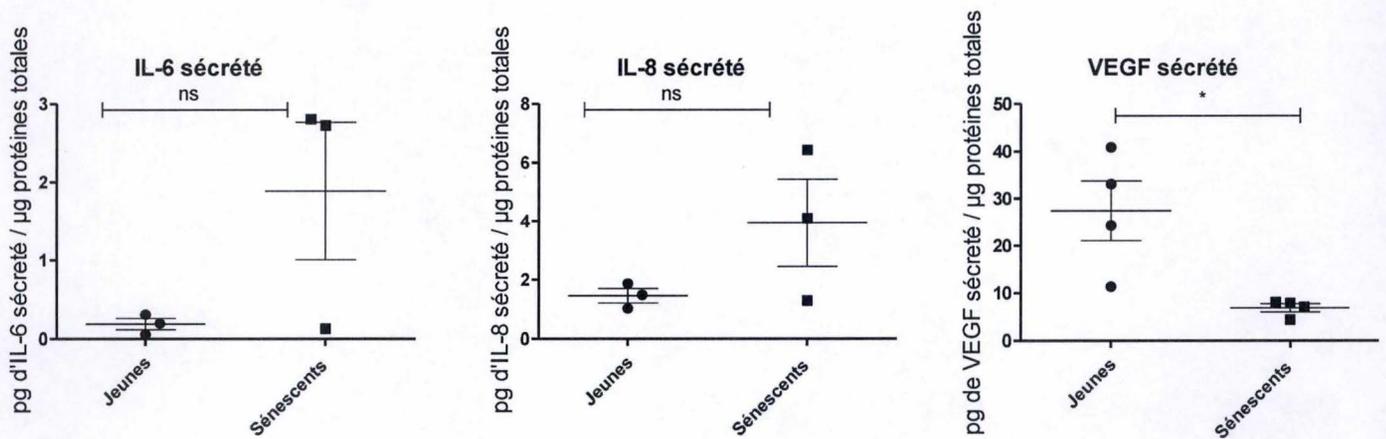


Figure III.9 Etude de la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF dans les NHK en sénescence répllicative. Le milieu conditionné a été récupéré chez les NHK jeunes et sénescents (3 donneurs indépendants). Le dosage des protéines sécrétées a été réalisé par ELISA. Les résultats sont exprimés en quantité de protéines sécrétées (IL-6, IL-8 et VEGF) par rapport à la quantité de protéines totales. Les tests statistiques ont été réalisés par le test de Mann-Whitney (ns : non-significatif ; * $\leq 0,01$).

seconde phase plateau a été observée au niveau du CPD 11, suivi d'une nouvelle phase de prolifération (Figure III.8A).

2.2 Modifications morphologiques et activité SA- β Gal des NHK en sénescence réplivative

Les kératinocytes sénescents obtenus sans apparition de l'émergence (ici, KC27) présentent une forme irrégulière et élargie, en comparaison aux kératinocytes jeunes (Figure III.8B).

Pour le donneur KC28, une partie des cellules présentent une morphologie allongée de type « fibroblastoïde » au niveau du CPD 7, ainsi qu'une taille plus petite, en comparaison au reste de la population cellulaire. Ces cellules correspondent probablement à des cellules émergentes. Nous avons ensuite observé que les cellules reprennent une forme arrondie, correspondant au 2^{ème} plateau de sénescence, au niveau du CPD 11. Nous avons ensuite pu maintenir la culture pendant quelques passages jusqu'à la mort cellulaire (Figure III.8B).

Nous avons également analysé la proportion de cellules positives pour la SA- β Gal. Les résultats montrent que la proportion de cellules sénescents augmente entre les kératinocytes jeunes et sénescents, de 10 % à 68 % pour les quatre donneurs présentant un profil de prolifération habituel, et de 15 % pour les jeunes (CPD 3) à 40 % pour les post-sénescents (CPD 7) pour atteindre à 95 % au second plateau de sénescence (CPD 11) pour les KC28 (Figure III.8C).

2.3 Sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de VEGF dans des NHK en sénescence réplivative

Nous avons réalisé des ELISA sur le milieu conditionné de NHK en sénescence réplivative afin d'étudier l'expression de certains composants du SASP : l'IL-6, l'IL-8 et le VEGF. Les résultats obtenus ont été normalisés par rapport à la quantité protéique totale. Les NHK en sénescence réplivative montrent une augmentation de la sécrétion de l'IL-6 et de l'IL-8 en comparaison avec les NHK jeunes, toutefois, étant donné la variabilité entre les donneurs, ces résultats ne sont pas significatifs. D'autre part, nous observons une diminution de la sécrétion du VEGF chez les NHK en sénescence réplivative par rapport aux NHK jeunes, cette fois, malgré la variabilité inter-donneurs, les résultats sont significatifs (Figure III.9).

En conclusion, divers phénomènes sont observés durant la sénescence réplivative. Tout d'abord, la sénescence réplivative est observée au niveau de l'évolution des doublements de population par l'apparition d'un plateau durant lequel les cellules ne prolifèrent plus. Ensuite, des modifications morphologiques sont observées, ainsi qu'une augmentation de l'activité SA- β Gal. Une modification de la sécrétion d'IL-6, IL-8 et VEGF est également observée.

3 Impact des NHK en sénescence réplivative et en NB-UVB-SIPS sur des NHK jeunes ou des cellules A431

La dernière partie de ce travail porte sur l'étude de la communication entre les NHK sénescents et les cellules environnantes, plus particulièrement des NHK jeunes et des cellules A431, issues d'un SCC (Squamous Cell Carcinoma) agressif.

Cette étude a été réalisée de façon indirecte en incubant les cellules environnantes avec le milieu conditionné de NHK jeunes et sénescents.

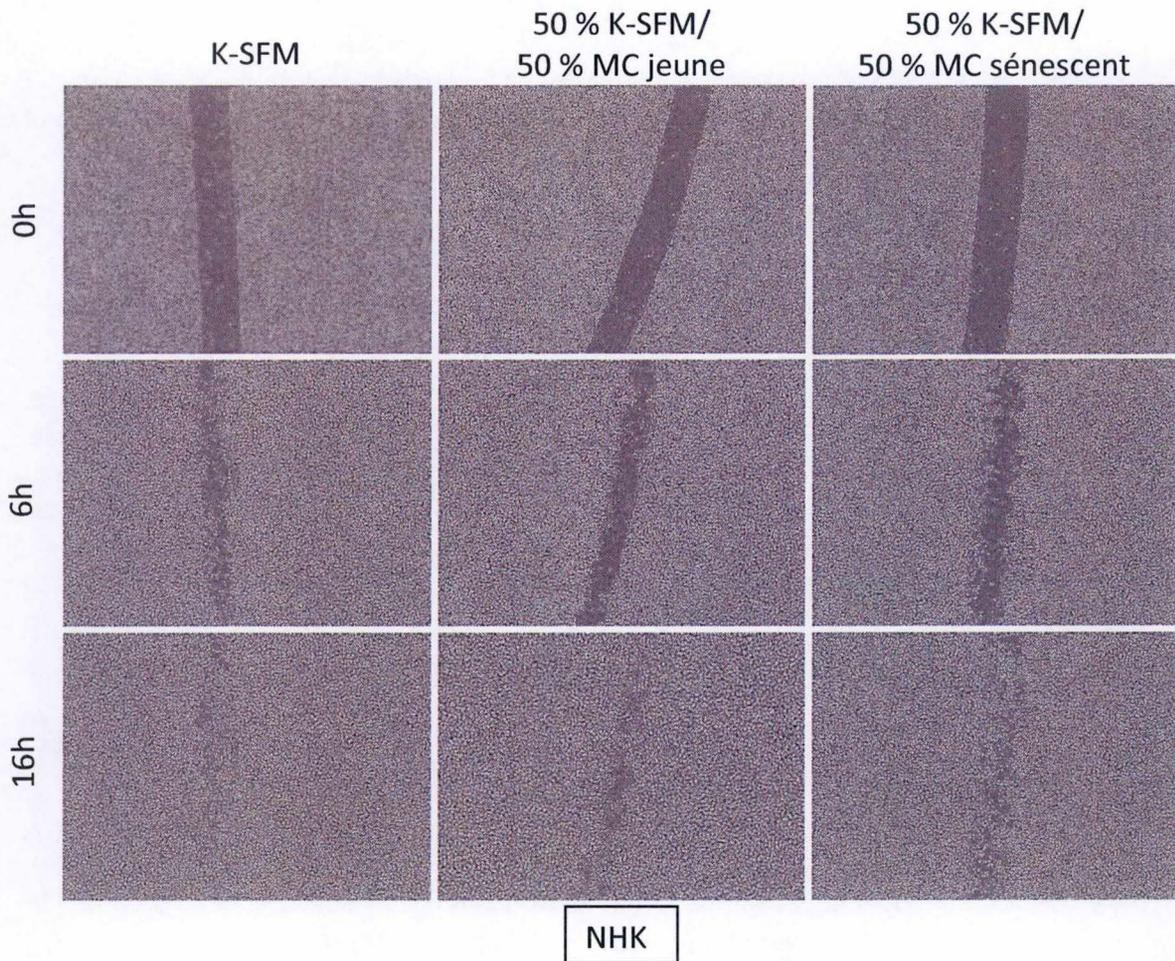
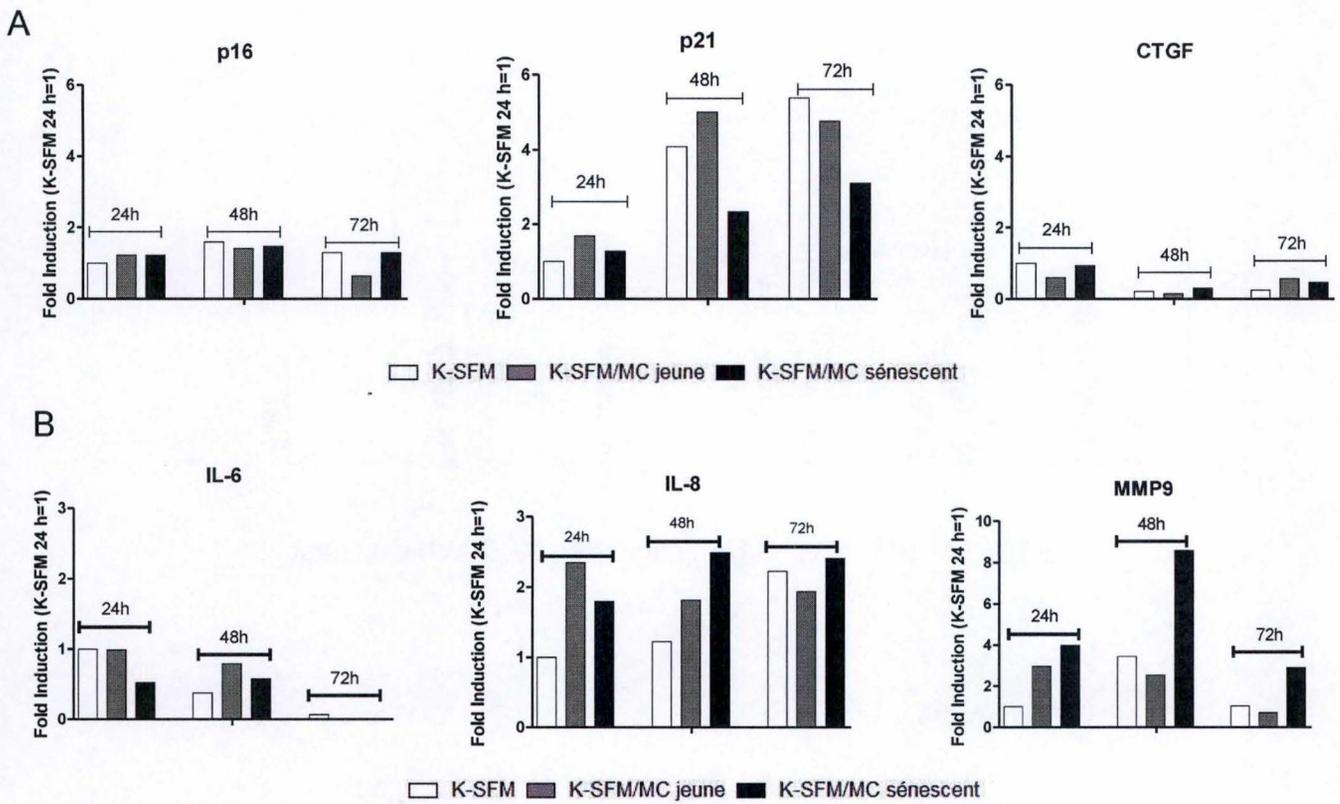
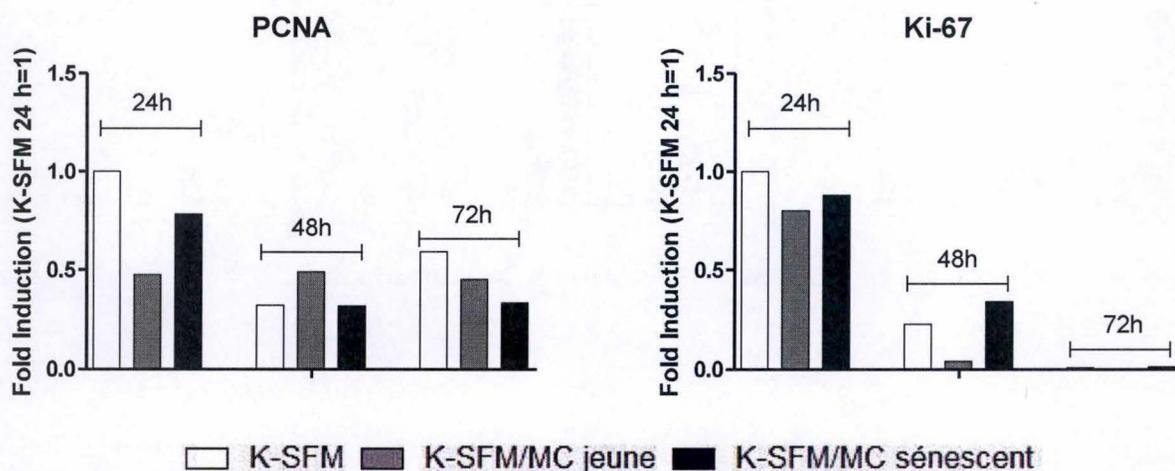


Figure III.10 Etude de la migration des NHK jeunes en présence de milieu conditionné de NHK jeunes et sénescents. Les NHK ont été repiqués la veille du test afin d'atteindre un tapis cellulaire confluent. Avant le scratch, la prolifération cellulaire a été stoppée par une incubation de 3 heures avec de la mitomycine C (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le scratch a été réalisé à l'aide d'un râteau cellulaire coupé en pointe. La migration des NHK a été capturée par un cytonote dans l'incubateur toutes les 30 minutes pendant 24 heures. Les cellules ont été incubées avec du milieu frais (K-SFM), avec 50 % de K-SFM et 50 % de milieu conditionné provenant de NHK jeunes (MC jeune) ou avec 50 % de K-SFM et 50 % de milieu conditionné provenant de NHK sénescents (MC sénéscent) (n=1).



A



B

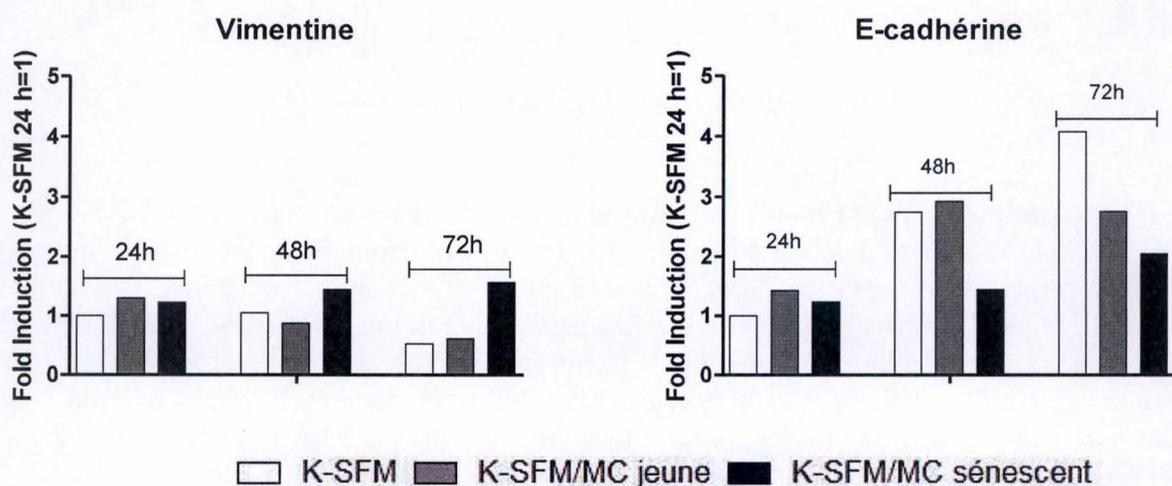


Figure III.12 Analyse de l'expression génique des gènes associés à la prolifération (A) ou à l'EMT (B). Les NHK ont été repiqués la veille de l'expérience. 24 h après, le milieu a été changé par du milieu frais (K-SFM), du milieu conditionné de NHK jeunes (K-SFM/MC jeune) ou du milieu conditionné de NHK sénéscent (K-SFM/MC sénéscent). L'ARN total a été extrait à 24 h, 48 h et 72 h après le changement de milieu. Une transcription inverse et une qPCR ont été réalisées pour analyser l'expression de *PCNA*, *Ki-67* (A) et *Vimentine*, *E-cadhérine* (B). Les résultats sont exprimés en fold induction de l'expression génique des gènes cibles par rapport à la condition K-SFM à 24 h. La GAPDH est utilisée comme gène de référence, (n=1).

3.1 Effet du milieu conditionné de kératinocytes jeunes et sénescents sur les kératinocytes jeunes

Afin d'étudier la communication et l'impact des NHK en sénescence répllicative sur le comportement migratoire de NHK jeunes, nous avons réalisé des tests de scratch. Les NHK jeunes sont traités à la mitomycine C afin de stopper leur prolifération, puis les tests scratch ont été réalisés en incubant les NHK dans du milieu K-SFM (condition contrôle), ou avec 50 % de K-SFM et 50 % de milieu conditionné (MC) provenant de NHK jeunes ou en sénescence répllicative. Après 16 h, le scratch est presque totalement refermé dans les 3 conditions, sans différence notable au cours du temps, ceci indiquant que le MC n'influence pas la vitesse de migration des NHK jeunes (Figure III.10). Notons toutefois que cette expérience a été réalisée une seconde fois, mais les résultats obtenus étaient différents. En effet, les résultats que nous avons obtenus montrent une augmentation de la migration des NHK jeunes incubés avec le milieu conditionné de NHK sénescents.

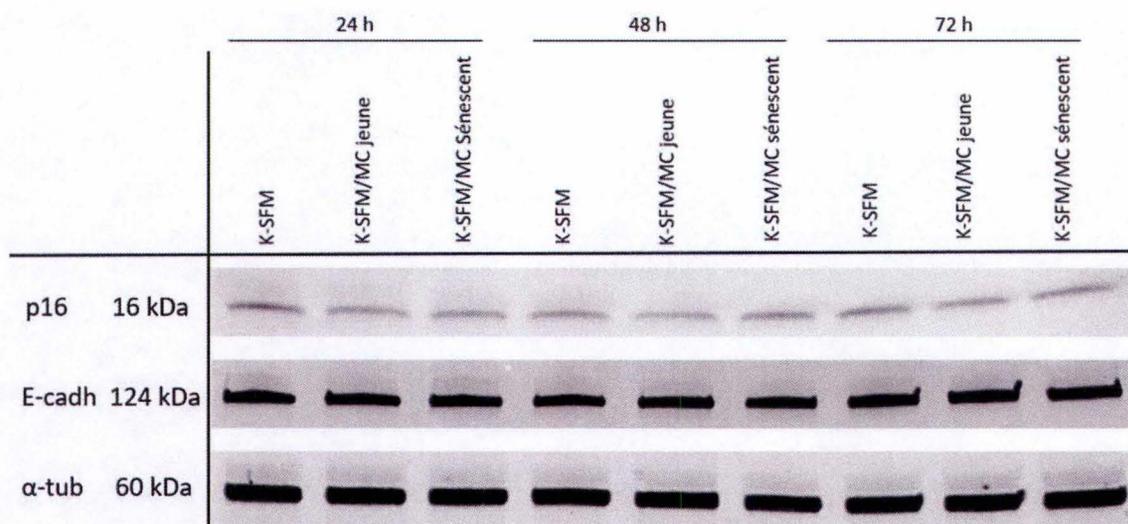
Nous avons ensuite réalisé une étude par RT-qPCR de l'expression de divers gènes, tels que des marqueurs de sénescence (*p16*, *p21*, *CTGF*), de prolifération cellulaire (*PCNA*, *Ki-67*), du SASP (*MMP-9*, *IL-6*, *IL-8*), ou encore de l'EMT (*E-cadhérine*, *Vimentine*).

Pour les marqueurs de sénescence, l'expression de *p16^{INK-4A}* reste relativement stable après 24 h et 48 h d'incubation dans les 2 milieux conditionnés différents. Après 72 h d'incubation dans le milieu conditionné de NHK jeunes, l'expression de *p16^{INK-4A}* diminue (0,62 fois). Après 24 h d'incubation, l'expression de *p21^{WAF-1}* augmente pour l'incubation dans le milieu conditionné de NHK jeunes (1,7 fois) par rapport au contrôle. Après 48 h d'incubation, l'expression de *p21^{WAF-1}* augmente dans les NHK incubés dans le milieu seul (4,1 fois), ainsi que dans les NHK incubés dans du MC de NHK jeunes (5 fois), et plus faiblement dans les NHK incubés dans le milieu conditionné de NHK sénescents (2,3 fois), par rapport aux contrôles. La même variation d'expression a été observée après 72 h d'incubation (5,4 fois pour K-SFM, 4,8 fois pour MC jeunes et 3,1 fois pour MC sénescents, en comparaison aux contrôles). L'expression de *CTGF* diminue de manière identique dans les 3 conditions après 24 h, 48 h et 72 h d'incubation (Figure III.11A).

Pour les gènes associés au SASP, nous observons que l'expression de l'*IL-6* diminue globalement au cours du temps, et que cette diminution est plus marquée pour les NHK incubés avec le milieu seul (K-SFM) (0,6 fois) à 48 h (Figure III.11B). L'expression de l'*IL-6* devient peu ou complètement indétectable à 72 h dans les 3 conditions. L'expression d'*IL-8* augmente dans les NHK incubées avec le MC provenant de cellules jeunes et de cellules sénescents, à 24 h (2,4 et 1,8) et à 48 h (1,8 et 2,5) en comparaison aux contrôles. Après 72 h d'incubation, l'expression d'*IL-8* des NHK incubés dans le milieu seul augmente également (2,2 fois), ainsi que chez les NHK incubés dans du milieu conditionné de NHK jeunes (1,9) et sénescents (2,4 fois) (Figure III.11B). Enfin, l'expression de *MMP9* augmente dans les NHK incubés avec le MC provenant de NHK jeunes et sénescents à 24 h (3 et 4 fois) en comparaison aux contrôles. *MMP9* est encore surexprimé dans les NHK incubés avec le MC provenant de NHK sénescents à 48 h (8,6 fois) et à 72 h (2,9 fois), comparativement au milieu seul (K-SFM).

Pour les marqueurs de prolifération cellulaire, nous observons une diminution de l'expression de *PCNA* au cours du temps, dans les 3 conditions, avec, à 24 h, une diminution plus importante de l'expression de *PCNA* dans les NHK incubés avec le milieu conditionné de NHK jeunes (0,5 fois) (Figure III.12A). Nous observons également une diminution de l'expression de *Ki-67* au cours du temps, dans les 3 conditions, avec de nouveau un effet plus marqué dans les NHK incubés avec le milieu conditionné de NHK jeunes à 24 h (0,8 fois) et à 48 h (0,04 fois). Tout comme *PCNA*, l'expression de *Ki-67* devient très faible à 72 h pour les 3 conditions (Figure III.12A).

A



B

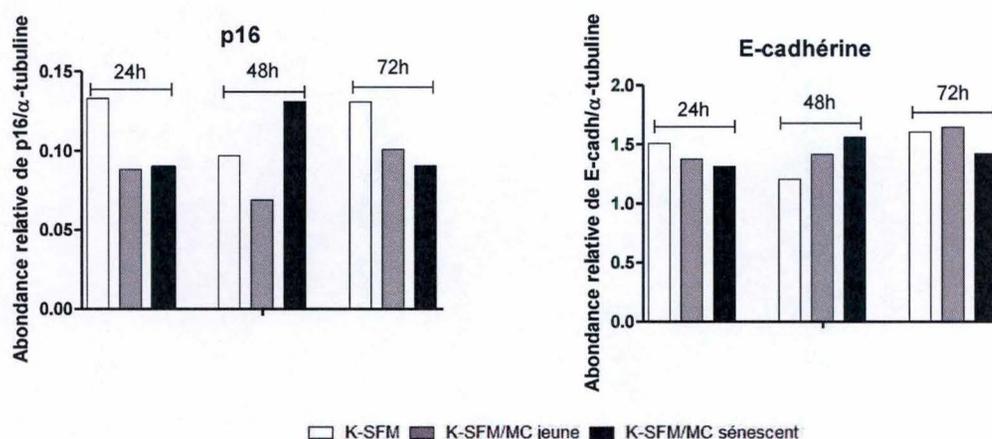
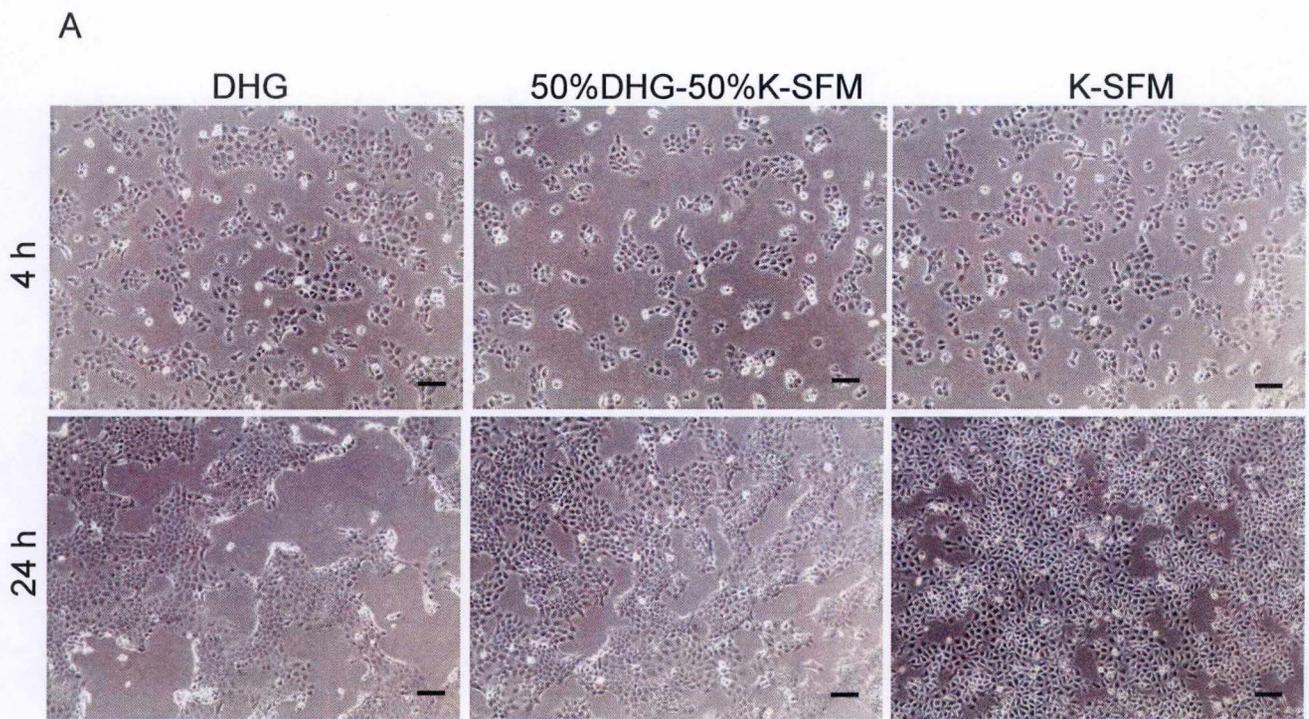


Figure III.13 Abondance protéique de p16 et E-cadhérine. A : Les NHK ont été repiqués la veille de l'expérience. Les kératinocytes ont été incubés pendant 24 h, 48 h et 72 h avec du milieu frais (K-SFM), du milieu conditionné de NHK jeunes ou du milieu conditionné de NHK sénescents. Les protéines totales ont ensuite été extraites afin de réaliser un western blot. B : Quantification des western blot. L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. La quantification a été réalisée grâce au logiciel Odyssey, (n=1).



A431

B

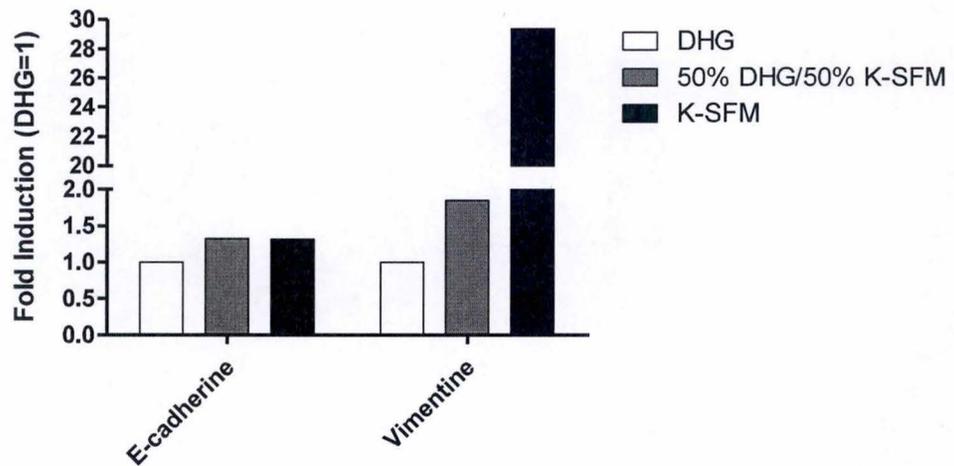


Figure III.14 Tests milieu sur les cultures de cellules A431. **A** : Les A431 ont été repiquées 24 h avant le test. Le milieu a été changé par du DHG, 50% DHG/50% K-SFM ou du K-SFM. Des micrographies ont été prises 4 h et 24 h après le changement de milieu par un microscope à contraste de phase (grossissement de 63 x, barre d'échelle = 1 mm). **B** : Analyse de l'expression des gènes associés à l'EMT. L'ARN total a été extrait 24 h après le changement de milieu. Une transcription inverse et une qPCR ont été réalisées pour analyser l'expression de l'*E-cadherine* et de la *vimentine*. Les résultats sont exprimés en fold induction par rapport à la condition DHG et la GAPDH a été utilisée comme gène de référence.

Pour les marqueurs de l'EMT, nous avons étudié l'expression de marqueurs caractérisant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) : la *vimentine*, marqueur mésenchymateux, et l'*E-cadhérine*, marqueur épithélial. Nous observons une diminution de l'expression de la *vimentine* après 72 h d'incubation, aussi bien dans les NHK incubés dans le milieu seul que dans le MC provenant de NHK jeunes. Par contre, nous observons une légère augmentation de l'expression de la *vimentine*, à 48 h (1,4 fois) et à 72 h (1,6 fois), dans les NHK incubés avec le MC provenant de NHK sénescents (Figure III.12B). Pour l'*E-cadhérine*, nous observons une augmentation de son expression à 48 h et à 72 h dans les NHK incubées avec le milieu seul. Cette augmentation est également présente dans les NHK incubés avec le MC provenant de NHK jeunes, bien que plus modérément à 72 h (2,9 et 2,8 fois). Par contre, cette augmentation est nettement moins importante dans les NHK incubés dans le MC provenant de NHK sénescents, aussi bien à 48 h (1,4 fois) qu'à 72 h (2 fois) (Figure III.12B).

Nous avons également réalisé des western blots afin de déterminer l'abondance protéique de p16 et de E-cadhérine dans les mêmes conditions. Nous n'observons pas de différence marquée de leur abondance dans ces différentes conditions (Figure III.13).

Il semblerait donc que le milieu conditionné de NHK jeunes et sénescents induisent une modification de l'expression génique propre à la sénescence, au SASP, à la prolifération et à l'EMT qu'il serait intéressant de confirmer par des expériences supplémentaires.

3.2 Effet du milieu conditionné de kératinocytes jeunes et sénescents sur les A431

3.2.1 Mises au point du milieu à utiliser pour les tests scratch

Les A431 ont été choisis pour cette étude car celles-ci sont dérivées d'un carcinome des cellules squameuses (SCC) agressif.

Puisque les NHK et les A431 sont cultivés dans des milieux différents, le K-SFM pour les NHK et le DMEM High Glucose (DHG) pour les A431, nous avons d'abord testé l'effet de chaque milieu sur le comportement des A431 pour la réalisation de futurs tests scratch. Ainsi, les cellules A431 ont été incubés soit dans du K-SFM, soit dans un mélange équivalent de K-SFM et de DHG, ou dans du DHG seul. Premièrement, des différences morphologiques ont été observées chez les A431 après 24 h d'incubation dans les différents milieux. Dans le milieu K-SFM, les cellules semblent plus confluentes et plus dispersées que dans les conditions de culture classique dans du DHG. En effet, dans leur milieu adéquat (DHG), les A431 poussent en grappes, ce qui est également observé après 4h d'incubation quel que soit le milieu, et après 24h dans le DHG et dans le mélange DHG/K-SFM (Figure III.14A).

Nous avons ensuite réalisé une RT-qPCR sur les extraits d'ARN totaux des A431 incubés pendant 24 h dans les 3 types de milieux (DHG, 50 % DHG/50 % K-SFM et K-SFM) afin d'étudier les modifications d'expression des marqueurs de l'EMT, la *vimentine* et l'*E-cadhérine*. L'expression de l'*E-cadhérine* reste relativement stable après 24 h d'incubation dans les différents milieux alors que l'expression de la *vimentine* montre une forte augmentation après 24 h d'incubation dans le K-SFM (Figure III.14B).

Nous avons donc décidé d'utiliser un mélange 50 % K-SFM (milieu de culture des NHK) / 50 % DHG (milieu de culture des A431) afin de réaliser nos co-cultures.

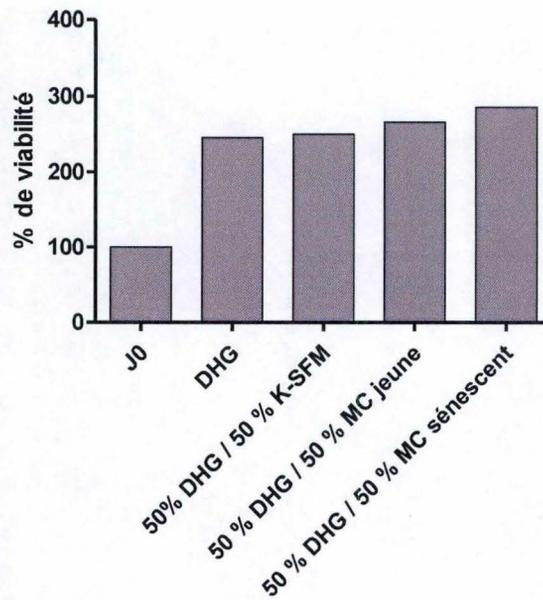


Figure III.15 Détermination de la prolifération des cellules A431 incubées avec différents milieux. Les A431 ont été repiqués la veille du test. Le milieu a été changé 24 h après le repiquage par du DHG, le mélange 50 % DHG/50 % K-SFM, du milieu conditionné de NHK jeune et du milieu conditionné de NHK sénescents. L'impact du milieu sur la prolifération des A431 a été étudié par un test MTT. La condition Jour 0 correspond à la densité cellulaire le jour du changement de milieu, (n=1).

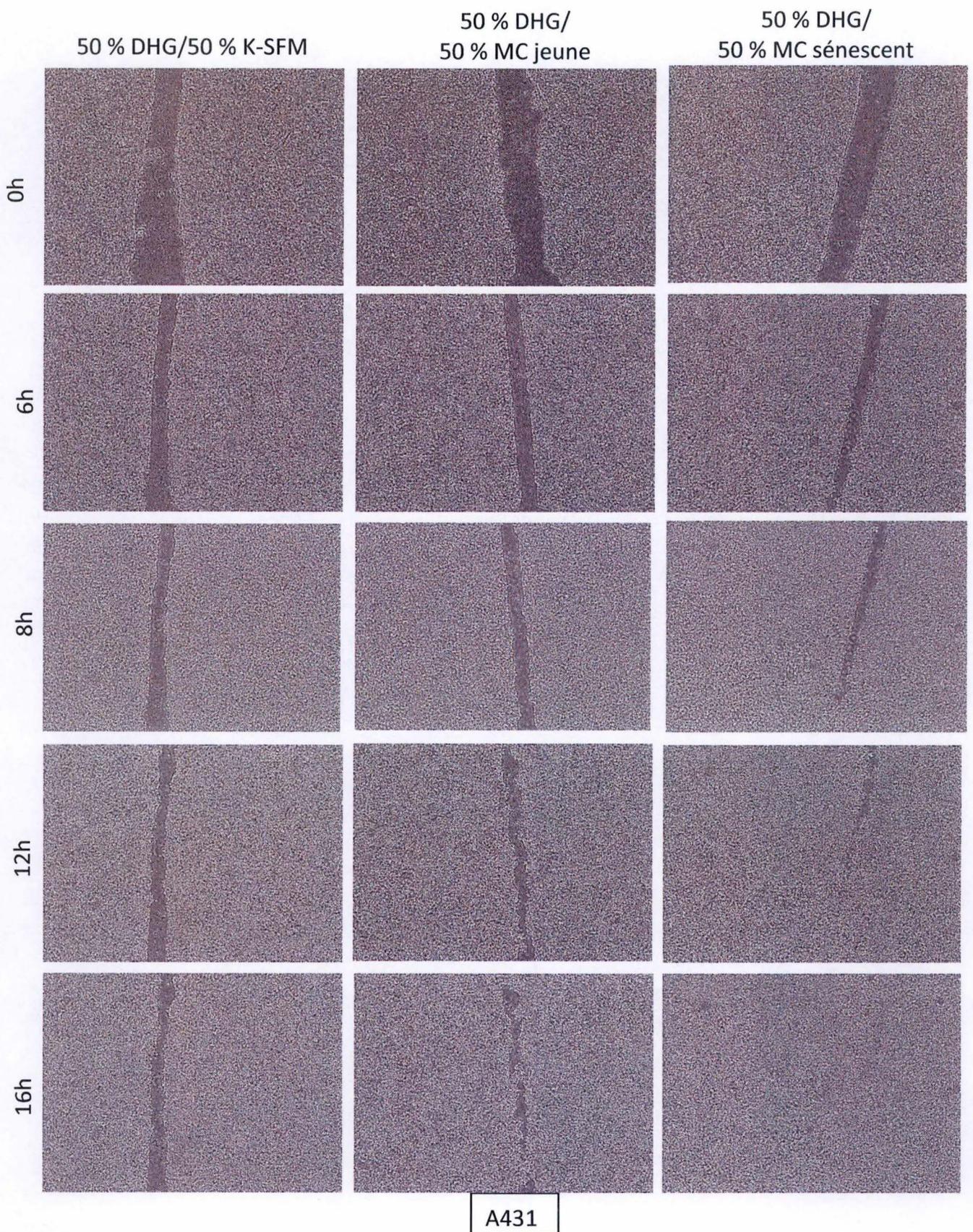


Figure III.16 Etude de la migration des A431 incubés avec du milieu conditionné de kératinocytes jeunes et sénescents. Les A431 ont été repiqués la veille du test afin d'atteindre un tapis cellulaire confluent. Avant le scratch, la prolifération cellulaire a été stoppée par une incubation de 3 heures avec de la mitomycine C (10 µg/ml). Le scratch a été réalisé à l'aide d'un râtelier cellulaire coupé en pointe. La migration des A431 a été capturée par un cytonote dans l'incubateur toutes les 30 minutes pendant 24 heures. Les A431 ont été incubées avec 50 % DHG/50 % de K-SFM, 50 % DHG/50 % de milieu conditionné de NHK jeunes ou avec 50 % DHG/50 % de milieu conditionné de cellules sénescents, (n=3).

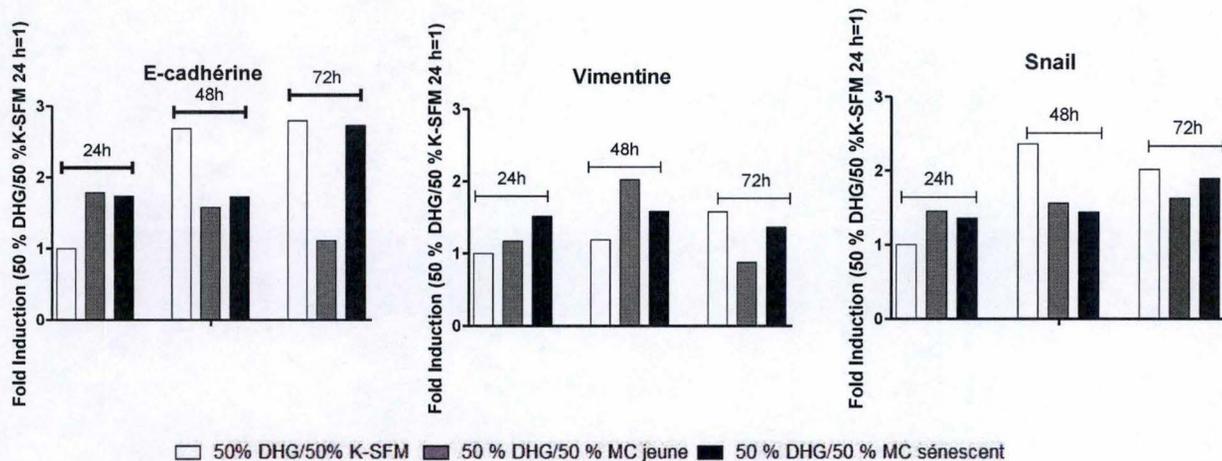


Figure III.17 Analyse de l'expression des gènes associés à l'EMT. Les A431 ont été repiquées la veille de l'expérience. 24 h après, le milieu a été changé par du milieu frais (50 % K-SFM/50 % DHG), du milieu conditionné de NHK jeunes ou du milieu conditionné de NHK sénescents (50 % MC/50 % DHG). L'ARN total a été extrait 24 h, 48 h et 72 h après le changement de milieu. Une transcription inverse et une qPCR ont été réalisées pour analyser l'expression de l'*E-cadhérine*, de la *vimentine* et de *SNAIL*. Les résultats sont exprimés en fold induction de l'expression génique par rapport à la condition milieu (50 % DHG/50 % K-SFM) à 24 h. La GAPDH est utilisée comme gène de référence, (n=1).

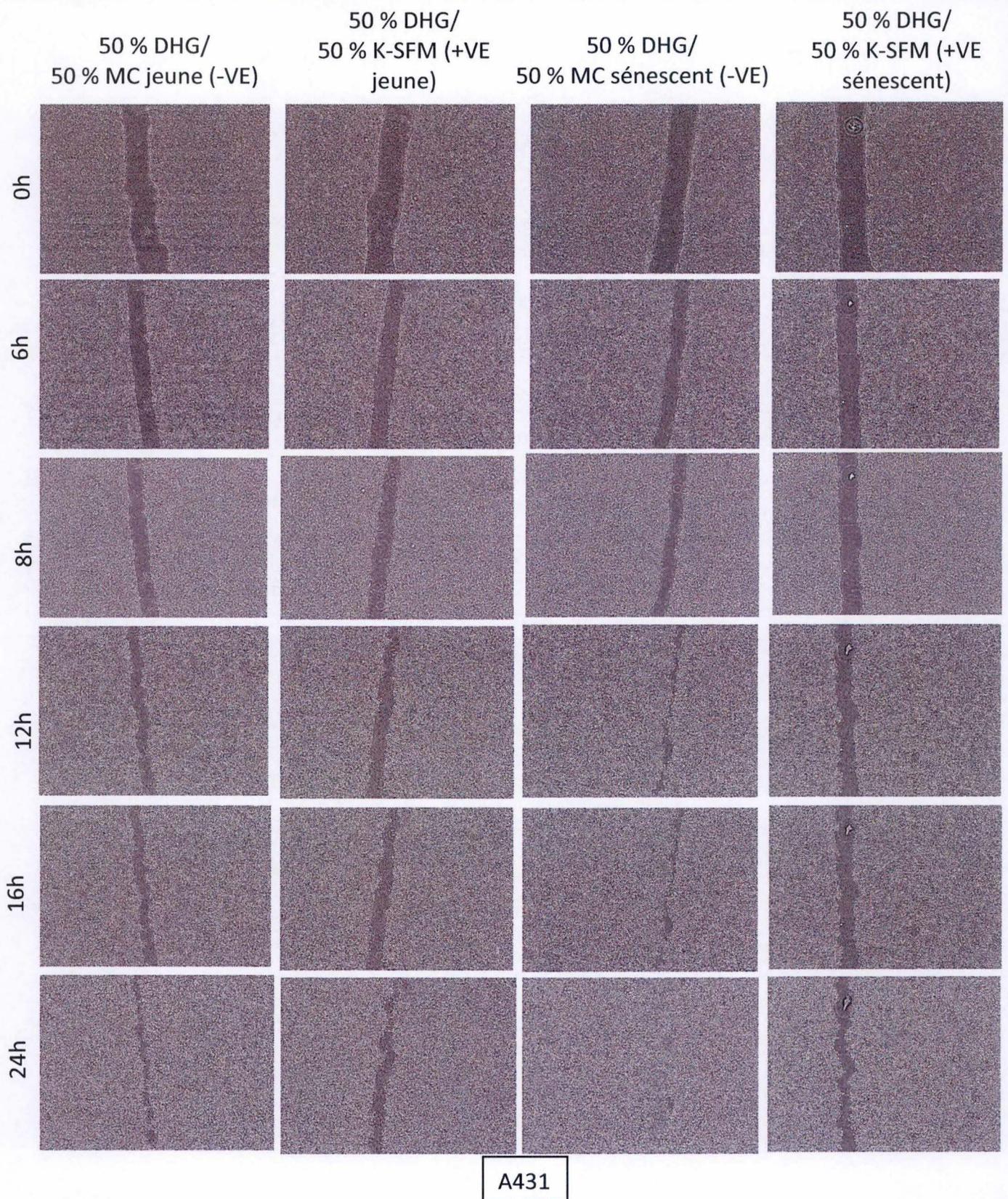


Figure III.18 Etude de la migration des A431. Les A431 ont été repiquées la veille du test afin d'atteindre un tapis cellulaire confluent. Avant le scratch, la prolifération cellulaire a été stoppée par une incubation de 3 heures avec de la Mitomycine C (10 $\mu\text{g/ml}$). Le scratch a été réalisé à l'aide d'un rateau cellulaire coupé en pointe. La migration des A431 a été capturée par un cytonote dans l'incubateur toutes les 30 minutes pendant 24 heures. Les cellules ont été incubées avec 50 % de DHG et 50 % de MC de NHK jeunes ou sénescents dont les vésicules extracellulaires (VE) ont été ôtées (MC-VE), ou avec du K-SFM dans lesquels sont resuspendues les vésicules extracellulaires de MC jeunes ou sénescentes (K-SFM+VE), (n=1).

3.2.2 Tests scratch sur les A431, incubés dans du milieu conditionné de NHK jeunes et en sénescence réplivative

Nous avons commencé par réaliser un test MTT afin d'analyser l'impact du milieu conditionné des NHK jeunes et en sénescence réplivative sur la prolifération des A431. Nous avons pu remarquer que le milieu conditionné des kératinocytes sénescents semble induire une très légère augmentation de prolifération par rapport au milieu conditionné de cellules jeunes (Figure III.15).

Nous avons réalisé des tests scratch afin d'étudier la migration des A431 incubés avec du milieu conditionné de NHK jeunes ou en sénescence réplivative, après un traitement à la mitomycine C, afin d'exclure toute prolifération cellulaire.

Nous avons observé que le scratch des A431 incubés avec le milieu conditionné de NHK sénescents se referme plus rapidement que dans le milieu seul ou avec le MC de NHK jeunes, et est complètement refermé dans cette condition à 16h. Il est également intéressant de noter que le scratch incubé dans le milieu seul se referme à une vitesse plus faible que le scratch incubé dans le milieu conditionné de NHK jeunes (Figure III.16). Cette expérience a été réalisée en triplicat, avec des milieux conditionnés de NHK issus de donneurs différents et a donné des résultats similaires, confirmant ainsi une migration plus importante des A431 incubés avec le MC des NHK sénescents.

Une RT-qPCR a ensuite été réalisée afin d'étudier 3 marqueurs de l'EMT : la *E-cadhérine* (marqueur épithélial), la *vimentine* et *SNAIL* (marqueurs mésenchymateux). Après 24 h d'incubation, l'expression de *E-cadhérine* pour les 2 types de milieux conditionnés est relativement identique avec une augmentation de 1,78 fois pour les A431 incubés dans le MC jeune et 1,73 fois pour les A431 incubés dans le MC sénescents. Cette tendance est observée également après 48 h d'incubation dans les 2 types de milieux conditionnés. Après 72 h d'incubation, une plus forte augmentation de l'expression de l'*E-cadhérine* est observée pour les A431 incubés dans le milieu conditionné de NHK sénescents (2,7 fois). Nous avons observé une augmentation de l'expression de la *vimentine* de 1,5 fois après 24 h d'incubation dans le milieu conditionné issu de NHK sénescents. La même tendance a été observée après 72 h d'incubation (1,4 fois). Après 48 h d'incubation, l'expression de la *vimentine* est la plus élevée dans les A431 incubés dans le milieu conditionné de NHK jeunes (1,6 fois). L'expression de *SNAIL* après 24 h d'incubation est presque identique pour les A431 incubés dans le milieu conditionné de NHK jeunes (1,5 fois) et sénescents (1,4 fois). Cette tendance est globalement identique après 48 h et 72 h d'incubation dans les 2 milieux conditionnés (Figure III.17).

3.2.3 Etude de l'effet des vésicules extracellulaires issues de milieu conditionné de NHK jeunes et en sénescence réplivative sur la migration des A431

Nous avons ensuite réalisé un scratch sur les A431 avec du milieu conditionné de NHK jeunes et sénescents dans lesquels les vésicules extracellulaires (VE) ont été éliminées afin d'analyser l'effet de celles-ci sur la migration des A431. Les A431 incubés avec le MC de NHK sénescents dans lequel les vésicules extracellulaires ont été enlevées (MC - VE) continuent à migrer plus rapidement que les A431 incubés dans le MC conditionné de NHK jeunes ayant subi le même traitement. En effet, après 24 h, le scratch incubé dans le MC de NHK sénescents sans vésicules extracellulaires est refermé alors que le scratch incubé dans le milieu conditionné de NHK jeunes sans vésicules extracellulaires ne l'est pas. Par contre, pour la condition dans laquelle les vésicules extracellulaires extraites du MC jeune et sénescents sont resuspendues dans du milieu frais (K-SFM + VE), nous n'observons pas de modification de la migration des cellules A431 entre les VE issues de MC de NHK jeunes et sénescents (Figure III.18).

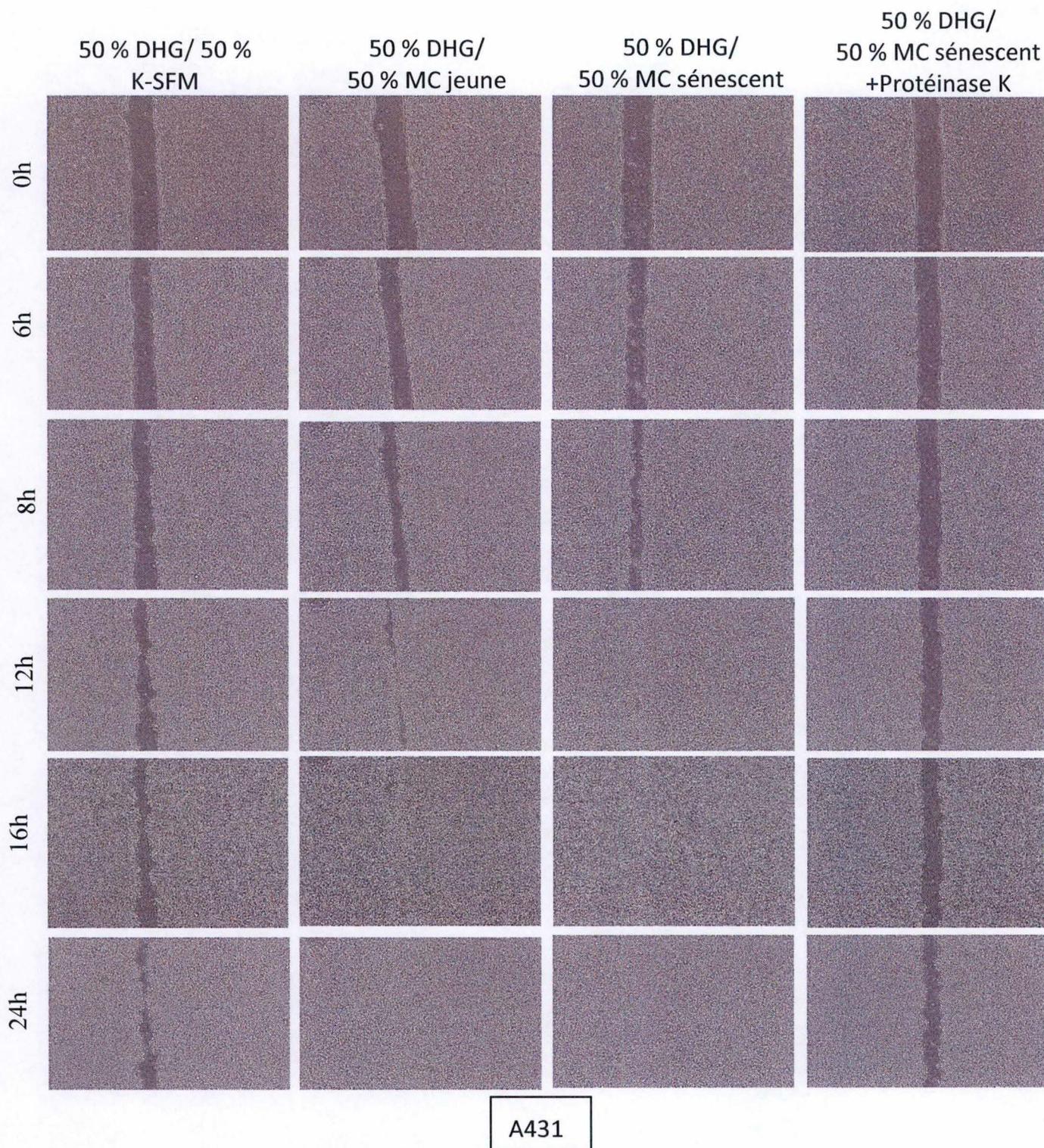


Figure III.19 Etude de la migration des A431 incubés avec du milieu conditionné de kératinocytes jeunes et sénescents. Les A431 ont été repiquées la veille du test afin d'atteindre un tapis cellulaire confluent. Avant le scratch, la prolifération cellulaire a été stoppée par une incubation de 3 heures avec de la Mitomycine C (10 µg/ml). Le scratch a été réalisé à l'aide d'un râtelier cellulaire coupé en pointe. La migration des A431 a été capturée par un cytonote dans l'incubateur toutes les 30 minutes pendant 24 heures. Les A431 ont été incubées dans 50 % de DHG et 50 % de K-SFM, ou avec 50 % de DHG et 50 % de milieu conditionné de NHK jeunes, ou avec 50 % de DHG et 50 % de milieu conditionné de NHK sénescentes, ou avec 50 % de DHG et 50 % de milieu conditionné de NHK sénescentes traité avec 100 µg/ml de protéinase K pendant 2 h, (n=1).

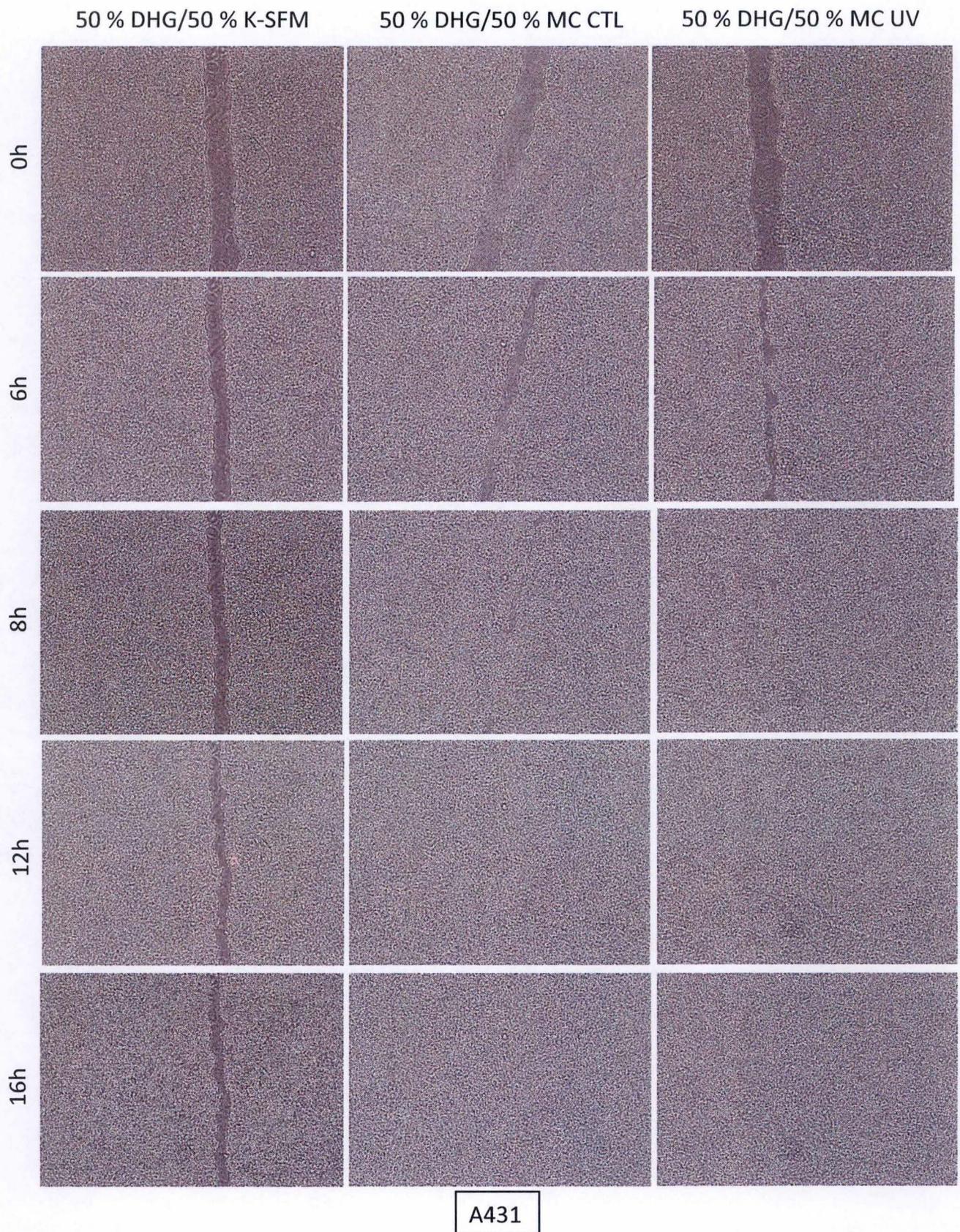


Figure III.20 Etude de la migration des A431 incubés avec du milieu conditionné de NHK contrôles (MC CTL) et du milieu conditionné de NHK exposés aux UV (MC UV). Les A431 ont été repiquées la veille du test afin d'atteindre un tapis cellulaire confluent. Avant le scratch, la prolifération cellulaire a été stoppée par une incubation de 3 heures avec de la mitomycine C (10 µg/ml). Le scratch a été réalisé à l'aide d'un râteau cellulaire coupé en pointe. La migration des A431 a été capturée par un cytonote dans l'incubateur toutes les 30 minutes pendant 24 heures. Les A431 ont été incubés avec 50% de DHG et 50 % de K-SFM, ou avec 50 % de DHG et 50 % de milieu conditionné de NHK CTL ou avec 50 % de DHG frais et 50 % de milieu conditionné de NHK exposées aux UV, (n=1).

3.2.4 *Etude de l'effet des protéines présentes dans le milieu conditionné de NHK jeunes et en sénescence répllicative sur la migration des A431*

Nous avons réalisé un scratch sur les A431 incubés dans du milieu conditionné de NHK jeunes ou sénescents traité, ou non, par de la protéinase K afin d'éliminer les protéines du milieu. Comme auparavant, les A431 incubés dans le milieu seul montrent une migration faible. Le scratch incubé dans le milieu n'est pas refermé après 24 h d'incubation. Les A431 incubées dans le MC de NHK sénescents migrent plus rapidement que les A431 incubés dans le MC de NHK jeunes. Le scratch incubé dans le milieu de NHK sénescents traité à la protéinase K montre une migration fortement ralentie, semblable à la migration des A431 incubés dans le milieu seul. Nous n'avons cependant pas eu l'occasion ici d'incuber des A431 avec du milieu conditionné de NHK jeunes traité à la protéinase K (Figure III.19).

3.3 *Communication entre les NHK en NB-UVB-SIPS et les cellules A431*

Nous avons finalement réalisé un scratch sur des A431 incubés avec du MC de NHK contrôles et stressés par les NB-UVB. Le scratch incubé dans le milieu conditionné de NHK contrôles et soumis aux NB-UVB se referme plus vite que quand les A431 sont incubés dans le milieu seul (50% DHG/50% K-SFM). Toutefois, nous n'observons pas de différence claire entre le MC issus de NHK CTL ou de NHK exposés aux NB-UVB (Figure III.20).

Cette expérience a été réalisée avec le milieu conditionné issu de 3 donneurs différents.

En conclusion, le milieu conditionné de NHK en sénescence répllicative a un effet positif sur la migration des A431. Le composant responsable de cette migration exacerbée se trouverait à l'état libre dans le milieu et serait de nature protéique.

IV. Discussion, Conclusion & Perspectives

Dans notre équipe, un modèle de sénescence induite prématurément par des stress UVB (UVB-SIPS) avec des UVB à spectre étroit (narrow-band, NB-UVB) a déjà été mis au point sur des kératinocytes épidermiques humains normaux. Afin d'analyser le comportement des kératinocytes après une exposition aux UVB à spectre large (broad-band, BB-UVB), nous avons exposé les kératinocytes à des doses croissantes de BB-UVB. Les BB-UVB présentent un spectre d'émission plus élargi que les NB-UVB, autour de la longueur d'onde 312 nm alors que les NB-UVB présentent un pic d'émission à une longueur d'onde de 312 nm (Kunisada *et al.*, 2007).

Kunisada, *et al.* se sont focalisés sur la différence de dommages à l'ADN induits par les NB-UVB ou les BB-UVB (Kunisada *et al.*, 2007). Ils ont découvert que la formation de CPD (cyclobutane pyrimidine dimer) était plus importante après une exposition aux NB-UVB qu'après une exposition à une dose équivalente de BB-UVB, alors que la formation de 8-oxoguanine et de (6-4) photoproduits était plus importante après une exposition aux BB-UVB qu'après une exposition aux NB-UVB, à une dose équivalente (Kunisada *et al.*, 2007).

Nous avons soumis les kératinocytes à une exposition unique à des doses croissantes de BB-UVB. Nous avons d'abord remarqué que la cytotoxicité était observée à une dose plus faible que lors de l'utilisation de NB-UVB. Dans le cas des BB-UVB, nous avons observé une cytotoxicité à partir de la dose de 55 mJ/cm² alors que lors de l'utilisation de NB-UVB, la dose subcytotoxique maximale est de 675 mJ/cm² en 3 stress successifs et à 3 h d'intervalle. Nous avons choisi cette dose de 55 mJ/cm² comme référence ainsi que la dose précédente et la dose suivante dans nos expérimentations.

72 h après l'exposition des NHK aux BB-UVB, nous avons analysé différents marqueurs de sénescence que sont les modifications morphologiques, l'induction de l'activité SA-βGal, l'arrêt permanent du cycle cellulaire, les modifications d'expression de gènes associés à la sénescence, ainsi que la formation de dommages à l'ADN.

Nous avons observé des changements morphologiques associés à la sénescence chez les kératinocytes soumis aux BB-UVB, mais de manière moins importante que pour les kératinocytes en sénescence répllicative.

De plus, le test SA-βGal, un biomarqueur de sénescence largement utilisé (Dimri *et al.*, 1995), a permis de montrer que l'exposition des kératinocytes aux BB-UVB induit la sénescence, mais de façon moins importante que lors de la sénescence répllicative (30 % *versus* 70 %) ou que lors de l'utilisation des NB-UVB (60 à 70 %). Les résultats que nous avons obtenus semblent montrer que la proportion de cellules positives pour la SA-βGal dépend de la dose.

Nous avons analysé l'expression de *p16^{INK-4A}* et *p21^{WAF-1}*, deux CDKI impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire. L'arrêt persistant du cycle cellulaire est un biomarqueur de sénescence important. Il est associé à la formation de dommages persistants à l'ADN (Childs *et al.*, 2017). Nous avons observé une légère surexpression de *p16^{INK-4A}*, mais pas de *p21^{WAF-1}*. Il n'est pas particulièrement surprenant de ne pas retrouver une surexpression de *p21^{WAF-1}* car il a été montré que celui-ci n'était pas impliqué dans la sénescence répllicative du kératinocyte, contrairement à ce qui est observé chez les fibroblastes (Kim *et al.*, 2015). Nous pouvons ici supposer que l'exposition des NHK aux BB-UVB induit des dommages permanents à l'ADN, ceci étant la cause de l'induction de la sénescence. Nous avons néanmoins obtenu des résultats

assez variables selon le donneur. Ces résultats devraient être répétés avec de nouveaux donneurs. De plus, l'étude de l'abondance protéique pourrait être analysée et d'autres tests permettant de suivre la prolifération pourraient être réalisés, comme par exemple l'incorporation de la thymidine tritiée.

Nous avons également étudié la prolifération cellulaire en fonction de la dose de BB-UVB via l'étude de l'expression génique de *Ki-67*. Une augmentation de l'expression de *Ki-67* a été observée pour les donneurs KC28 et KC66, et une diminution en fonction des doses pour le donneur KC46, faisant de ce donneur un donneur particulier. Selon El-Abaseri *et al.*, l'exposition de kératinocytes aux UV mène à l'activation rapide des récepteurs à l'EGF (epidermal growth factor), menant à l'activation d'une voie mitogénique et à la diminution du phénomène d'apoptose. Cette activation des récepteurs à l'EGF serait la cause de l'hyperplasie de l'épiderme observée au niveau des peaux photoâgées (El-Abaseri *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que le marqueur de prolifération *Ki-67* peut être surexprimé dans des cellules où le cycle cellulaire est arrêté (van Oijen *et al.*, 1998).

Nous avons ensuite étudié l'expression de gènes dont l'expression est connue pour être modulée lors de la sénescence du kératinocyte et du fibroblaste (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2008). Nous avons remarqué que l'expression de l'*APOJ*, la *fibronectine* et *TGF- β 1* augmente de manière dose-dépendante chez tous les donneurs que nous avons étudiés. D'autre part, l'expression d'*IGFBP-3*, *IGFBP-5* et de *CTGF* n'est pas concluante. La variabilité d'expression des autres gènes est trop importante suivant les donneurs pour pouvoir tirer des conclusions. Comme précédemment, il serait utile de refaire cette expérience avec des kératinocytes issus d'autres donneurs afin de les confirmer. Il serait également intéressant d'étudier l'expression d'autres gènes associés à la sénescence du kératinocyte comme par exemple *gpr1*, *apo-D*, *apo-E*, *MMP-1*, *MMP-3*, *cyb561*, *cyp1b1* ou encore *cyp4b1*, comme suggéré par Kang, *et al* (Kang *et al.*, 2003). Il est cependant important de remarquer que ces gènes sont associés à la sénescence des kératinocytes oraux, exprimant la télomerase, et non des kératinocytes épidermiques. Ce modèle est dès lors assez éloigné de celui utilisé lors de cette étude.

Pour finir, nous avons étudié les dommages à long terme à l'ADN induits par les BB-UVB en réalisant des western blot et des marquages en immunofluorescence contre γ H2AX, un marqueur des dommages à l'ADN. L'histone H2AX est phosphorylé (γ H2AX) au niveau de la sérine 139 lorsque des cassures double brin sont repérées par le système de réparation. Cette phosphorylation permet le recrutement et l'assemblage des facteurs permettant la réparation des dommages (Lawless *et al.*, 2010). Les dommages peuvent être persistants et sont alors considérés comme un biomarqueur de sénescence (Toutfaire *et al.*, 2017). Ces dommages causés à l'ADN par les UV sont permanents car ils sont présents de manière trop importante pour être réparés. Il s'agit de cassures double brin activant la voie DDR (DNA damage response), ce qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire, comme expliqué plus haut (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Les résultats de l'immunofluorescence ont montré que le marquage de γ H2AX était déjà important dans les cellules contrôles mais semblait être plus important dans les cellules exposées aux BB-UVB.

Nous nous sommes alors demandé ce qui pouvait causer ce marquage dans des cellules non-exposées au BB-UVB. Nous avons ajouté un contrôle supplémentaire consistant en des cellules ne subissant pas le rinçage ni l'incubation dans le PBS et restant dans l'incubateur. Nous n'avons pas observé de marquage dans ces cellules. Nous pouvons alors supposer que

l'incubation au PBS, le fait de rester à température ambiante ou le fait de rester sous hotte avec les rayons lumineux ont un impact sur le marquage de γ H2AX.

Néanmoins, Löbrich *et al.* ont montré en 2010 qu'un marquage de γ H2AX était présent chez les cellules en phase S, sous forme d'un marquage diffus au niveau du noyau, alors que les cellules ayant accumulés des cassures double brin à l'ADN montrent un marquage sous forme de foci. Ceci a été montré avec des cellules exposées aux rayons X (Löbrich *et al.*, 2010). Nous avons réalisé des tests afin de vérifier si l'exposition aux UVB causait ce même marquage sous forme de foci dans les NHK. Nous avons pour cela utilisé des NB-UVB car ceux-ci sont plus étudiés dans l'équipe et la dose à utiliser pour ne pas créer de cytotoxicité est bien déterminée. Nous avons observé un marquage diffus très important dans les cellules contrôles. 80 % des cellules contrôles comptées présentaient un marquage diffus et 85 % des cellules soumises aux NB-UVB comptées présentaient un marquage sous forme de foci. Il pourrait également être intéressant d'identifier à quelle étape du cycle cellulaire les NHK se trouvent. Différents marqueurs existent pour cela. Par exemple, un marqueur de la phase G2 est la phosphorylation de l'histone H3 au niveau de la sérine 10. La cycline A, ainsi que la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX sont des marqueurs de la phase S (Löbrich *et al.*, 2010).

Nous avons ensuite observé l'abondance protéique de γ H2AX par western blot et observé une augmentation de l'abondance en fonction de la dose de BB-UVB, suggérant qu'une augmentation de la dose de BB-UVB cause une augmentation de la quantité de cassures double brin dans les NHK.

Pour conclure cette première partie, nous avons estimé que la dose de 55 mJ/cm² de BB-UVB est la dose maximale non-cytotoxique capable d'induire la sénescence des NHK exposés. Cette dose induit une augmentation de la proportion de cellules positives pour la SA- β Gal, une augmentation de l'expression de 3 gènes associés à la sénescence et une augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX. Néanmoins, vu la variabilité observée entre les donneurs, il semble important de prévoir de nouvelles expériences avec des kératinocytes isolés de nouveaux donneurs.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié la communication entre les kératinocytes sénescents et les kératinocytes jeunes ou les cellules A431. Afin de collecter des milieux conditionnés pour réaliser des tests scratch, nous avons dans un premier temps amené plusieurs cultures indépendantes de kératinocytes jusqu'en sénescence répliquative. Nous avons également réalisé plusieurs NB-UVB-SIPS afin de tester le milieu conditionné des NHK exposés aux UV sur les A431. Soulignons que, dans le cas d'une culture, les kératinocytes isolés du donneur KC28, nous avons observé un phénomène d'émergence. Ce phénomène d'émergence est dû à des cellules sénescents qui ré-entrent en prolifération après avoir atteint le premier plateau de sénescence. Ce phénomène a été plus amplement décrit par l'équipe du Professeur Abbadie (Gosselin *et al.*, 2009). Ils ont été les premiers à décrire cette émergence spontanée des kératinocytes, présentant des caractéristiques de cellules transformées et tumorigéniques. Ces caractéristiques montrent que l'état de sénescence cellulaire pourrait précéder un état tumoral dans les cultures de kératinocytes (Abbadie *et al.*, 2017). Le phénomène d'émergence serait dû à un défaut de la machinerie de réparation des cassures simple brin, causant une accumulation de ces cassures au sein des kératinocytes (Nassour *et al.*, 2016).

En poursuivant la culture, nous avons également observé la reprise d'une morphologie normale des NHK, après un second plateau de sénescence. Cela a également été observé par l'équipe d'Abbadie (Gosselin *et al.*, 2009).

L'état de sénescence de ces cultures a été validé au niveau morphologique et au niveau de l'augmentation de l'activité SA- β Gal. Les cellules sénescents présentent une morphologie élargie avec l'apparition de bords irréguliers, en comparaison aux kératinocytes jeunes. En effet, les kératinocytes jeunes présentent un diamètre entre 10 et 20 μ m alors que les cellules sénescents présentent un diamètre d'environ 50 μ m (Soroka *et al.*, 2008). Nous avons observé une augmentation de l'activité SA- β Gal entre les NHK jeunes et en sénescence réplivative. Cette différence a également été observée entre les NHK jeunes et en post-sénescence chez KC28, le donneur particulier mais de manière moins importante. L'équipe d'Abbadie a montré que la proportion de cellules positives pour l'activité SA- β Gal est réduite entre les cellules sénescents et les cellules post-sénescents. Cela pourrait être expliqué par le fait que, en phase de post-sénescence, une nouvelle population prolifère, augmentant la proportion de cellules non sénescents (Gosselin *et al.*, 2009).

Nous avons ensuite étudié le SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) des NHK en sénescence réplivative, un autre biomarqueur de la sénescence (Malaquin *et al.*, 2016). Le SASP est composé de divers facteurs inflammatoires, de croissance ou modulant le microenvironnement (Coppé *et al.*, 2010). Le SASP peut avoir des effets positifs anti-tumoraux, mais également des effets négatifs pro-tumoraux (Freund *et al.*, 2010).

Nous avons étudié le taux de sécrétion de protéines du SASP que sont l'IL-6, l'IL-8 et le VEGF dans le milieu par les kératinocytes jeunes et en sénescence réplivative par l'utilisation de tests ELISA. L'IL-6 et l'IL-8 sont des cytokines pro-inflammatoires, responsables du phénomène d'EMT dans plusieurs types cellulaires comme le fibroblaste. Ils sont également responsables du renforcement de la sénescence autocrine et paracrine (Ortiz-Montero *et al.*, 2017). De plus, ils sont tous les deux requis pour la maintenance de l'arrêt du cycle cellulaire caractérisant la sénescence (Kuilman *et al.*, 2008). Nous avons observé ici une augmentation de la sécrétion de l'IL-6 et de l'IL-8 dans le milieu des kératinocytes en sénescence réplivative par rapport aux kératinocytes jeunes. Cependant, la tendance observée est non-significative. Cela est dû à la variabilité existant entre les donneurs. Cette tendance a également été observée pour le milieu conditionné de NHK contrôles et exposés aux NB-UVB (données d'E. Bauwens).

Nous avons ensuite analysé la sécrétion du VEGF dans le milieu des kératinocytes jeunes et en sénescence réplivative. VEGF a un rôle pro-angiogénique physiologique, et joue un rôle important dans le développement normal. Il permet la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Guo *et al.*, 2017). De part cette capacité d'induire la prolifération des cellules endothéliales, VEGF favorise la croissance tumorale, la formation de métastases mais également la réparation de blessures (Bao *et al.*, 2009 ; Verheul and Pinedo, 2000). Nous avons observé que la quantité de VEGF sécrété diminue drastiquement au niveau des milieux conditionnés des NHK sénescents, en comparaison avec le milieu conditionné des kératinocytes jeunes. La même diminution est également observée en condition SIPS-UVB (données d'E. Bauwens). Ce résultat est en opposition avec ce qui est observé chez les fibroblastes. En effet, les fibroblastes en sénescence réplivative et exposés aux UVB surexpriment VEGF, rendant le derme plus susceptible à la formation de tumeurs (Coppé *et al.*, 2006 ; Trompezinski *et al.*, 2001).

Pour les cellules isolées du donneur chez qui nous avons observé de l'émergence, nous avons observé que le contenu du SASP pouvait être modifié suivant le passage des kératinocytes en culture. En effet, nous avons amené ce donneur jusqu'au 18^{ème} passage et analysé par test ELISA le milieu conditionné de cette culture au 6^{ème}, 16^{ème} et 18^{ème} passage. Nous avons observé une augmentation de la sécrétion d'IL-6 dans le milieu au 16^{ème} passage par rapport au passage 6. Nous avons ensuite observé une diminution de la sécrétion d'IL-6 entre le passage 16 et le passage 18 (données non montrées).

Ces différentes analyses nous ont permis de confirmer l'établissement de la sénescence dans nos cultures. Afin d'étudier l'impact des facteurs sécrétés sur les cellules environnantes, nous avons récolté les milieux conditionnés. Ceux des NHK jeunes et en sénescence répliquative ont été collectés 72 h après le dernier repiquage et ceux des NHK contrôles et exposés aux NB-UVB ont été récoltés 72 h après le stress.

Nous avons ensuite testé l'impact du milieu conditionné de cellules jeunes et en sénescence répliquative sur la migration des kératinocytes jeunes ou des cellules A431, des cellules dérivées de carcinome des cellules squameuses.

Nous avons pour cela réalisé divers tests scratch afin de tester l'effet du milieu conditionné sur la migration des kératinocytes jeunes ou des cellules A431. Pour pouvoir réaliser un test scratch, nous devons obtenir un tapis confluent composé des cellules dont la migration sera testée. Nous avons ensuite réalisé le scratch à proprement parlé avec un râteau cellulaire coupé en pointe à l'aide d'une lame de scalpel. Les cellules sont ensuite incubées avec le milieu conditionné adéquat.

Nous avons tout d'abord réalisé un test scratch sur les kératinocytes jeunes afin de déterminer si le milieu conditionné de kératinocytes jeunes ou sénescents a un effet sur ceux-ci. Nous n'avons observé aucune différence entre le milieu frais, le milieu conditionné de kératinocytes jeunes et le milieu conditionné de kératinocytes sénescents. Ce résultat indiquerait donc que le milieu conditionné, qu'il soit de NHK jeune ou sénescents, n'a pas d'effet sur le comportement migratoire des NHK jeunes. De plus, aucune différence n'est observée entre la migration induite par les milieux conditionnés et la migration induite par le milieu frais seul. Nous n'avons cependant pas observé cela lors d'un deuxième test scratch sur des kératinocytes jeunes issus d'un donneur différent. Il est donc important de répéter cette expérience.

Une étude de l'expression génique par RT-qPCR de *p16^{INK-4A}*, *p21^{WAF-1}* et *CTGF*, des marqueurs de sénescence, *IL-6*, *IL-8* et *MMP9*, des marqueurs du SASP, *Ki-67* et *PCNA*, des marqueurs de prolifération, et *E-cadhérine* et *vimentine*, des marqueurs de l'EMT a été réalisée afin de vérifier si leur expression est modifiée après une incubation de 24 h, 48 h, et 72 h avec le milieu conditionné de NHK jeunes et sénescents. Aucune différence importante n'a été observée pour les différents gènes testés, sauf pour *MMP9*, une métalloprotéinase matricielle, faisant partie du SASP des kératinocytes. Son expression augmente graduellement au cours du temps.

Goto *et al.* ont étudié en 2016 la surexpression de MMP9 comme un marqueur de l'« inflammaging », cette inflammation de bas grade retrouvée chez les sujets âgés (Goto *et al.*, 2016). Ils ont découvert que l'expression de MMP9 augmente dans le sérum de manière significative avec l'âge aussi bien chez les hommes que chez les femmes. MMP9 induit cette inflammation de bas grade en dégradant les fibres d'élastine, causant la libération de cytokines

pro-inflammatoires (Goto *et al.*, 2016). Il se pourrait donc que le l'incubation des NHK dans du milieu conditionné de NHK sénescents induise la sénescence de ceux-ci. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, il faudrait donc la réitérer afin de confirmer le résultat obtenu.

Au niveau protéique, l'induction de la sénescence ou de l'EMT des NHK jeunes par le milieu conditionné de NHK jeunes et sénescents ne semble pas flagrante. L'analyse par western blot de l'abondance protéique de p16^{INK-4A}, un inhibiteur des CDK, et l'E-cadhérine, un marqueur épithélial de l'EMT ne montrent pas de variations importantes entre les NHK incubés avec le milieu conditionné de NHK jeunes ou sénescents, après 24, 48 ou 72 h d'incubation.

Nous avons ensuite utilisé les milieux conditionnés que nous avons récolté pour étudier leur effet sur la migration des A431. Nous avons observé que le milieu conditionné de kératinocytes sénescents influence positivement la migration des A431, en comparaison avec les A431 incubés avec le milieu conditionné de kératinocytes jeunes. Par contre, les A431 incubés dans du milieu frais ne montrent qu'une migration très faible, beaucoup plus lente que les cellules incubées dans le milieu conditionné de NHK jeunes. Cela semble indiquer que les facteurs sécrétés par les kératinocytes jeunes et sénescents auraient un effet sur la migration des cellules dérivées de SCC. Ces résultats ont été obtenus à 3 reprises. L'effet du milieu conditionné de cellules jeunes et sénescents sur la migration et l'invasion des A431 a récemment été montré via l'utilisation de chambres de Boyden (Farsam *et al.*, 2016). Toutefois, cette étude a été réalisée à partir de milieu conditionné de fibroblastes jeunes et sénescents.

Nous avons ensuite voulu vérifier si les composants permettant la migration accrue des A431 incubés dans le milieu conditionné de NHK sénescents se trouvaient sous forme soluble dans le milieu ou étaient séquestrés dans les vésicules extracellulaires. En effet, les vésicules extracellulaires semblent prendre une place de plus en plus importante dans la communication inter-cellulaire et ce, notamment dans le processus de sénescence cellulaire. De plus en plus de données tendent à montrer que des effets du SASP peuvent également passer par les vésicules extracellulaires (Kadota *et al.*, 2017 ; Urbanelli *et al.*, 2016) . De plus, Buratta *et al.* ont récemment montré que les vésicules extracellulaires relarguées par les fibroblastes sénescents présentent des modifications de leur contenu lipidique (Buratta *et al.*, 2017). Il est maintenant également connu que le contenu des vésicules extracellulaires a un rôle primordial dans la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire ainsi que dans le remodelage de la matrice extracellulaire dans le processus tumoral (O'Loughlen, 2018). Afin d'étudier l'implication des vésicules extracellulaires sur la migration des cellules A431 incubés avec du milieu conditionné de NHK jeunes ou en sénescence répllicative, nous avons tenté d'ôter les vésicules extracellulaires du milieu conditionné. Nous avons observé que le milieu conditionné de NHK sénescents sans vésicules extracellulaires continue à avoir un effet positif sur la migration des A431 alors que le milieu contenant les vésicules extracellulaires issues de milieu conditionné de NHK sénescents n'a plus d'effet sur la migration des A431. Il semblerait donc que l'agent responsable de l'augmentation de la vitesse de migration des A431 se trouve dans le surnageant et pas dans les vésicules extracellulaires.

Néanmoins, étant donné que, lors de nos manipulations, nous n'avons pas observé de culot après l'ultracentrifugation des milieux conditionnés, nous ne pouvons être certains que nous l'avons bien resuspendu dans le milieu frais afin de le placer sur le scratch. D'autres tests

devraient donc être réalisés afin de s'assurer que les vésicules extracellulaires ont bien été resuspendues dans le milieu. Nous pourrions tester des marqueurs de vésicules extracellulaires afin de vérifier que celles-ci sont bien présentes dans le milieu. Une technique utilisée pour cela est le marquage des vésicules extracellulaires par des sondes fluorescentes marquant leur membrane lipophile (Takov *et al.*, 2017).

Nous avons par après voulu connaître la nature du ou des facteurs responsables de la migration des A431 incubés dans le milieu conditionné de NHK sénescents. Nous nous sommes intéressés aux protéines en traitant le milieu conditionné par un traitement à la protéinase K. Nous avons observé que le milieu conditionné de NHK sénescents traités par la protéinase K n'a plus d'effet sur la migration des A431. Cela montre que la migration des A431 serait due à une ou plusieurs protéines présentes dans le milieu, et non pas à d'autres composants du milieu. Il est important ici de faire contrôler que toutes les protéines ont bien été éliminées par le traitement à la protéinase K en faisant migrer le milieu sur un gel d'électrophorèse et de colorer les protéines au rouge ponceau ou au bleu de Coomassie.

Nous avons ensuite testé l'effet du milieu conditionné des cellules contrôles et soumises aux NB-UVB sur les A431. Les premiers résultats que nous avons obtenus montrent que le milieu conditionné des cellules exposées aux UVB semble avoir un très léger impact sur la migration des A431. Cette expérience a été réalisée 2 fois, avec du milieu conditionné issu de donneurs différents, et le même résultat a été obtenu. Soulignons tout de même que la différence de temps de migration entre les A431 incubés avec le milieu conditionné de NHK contrôles et les A431 incubés avec le milieu conditionné de NHK soumis aux UVB est moins important que celle observée avec le milieu conditionné issu des cultures de NHK en sénescence répliquative. De plus, la 3^{ème} fois que nous avons réalisé cette expérience, nous n'avons pas observé de différence entre le milieu conditionné des cellules contrôles en comparaison avec le milieu conditionné de cellules exposées aux UVB. Cela pourrait être dû à une variabilité selon le donneur.

Nous avons tout de même noté que le milieu conditionné, qu'il soit issu de cellules contrôles ou soumises aux UVB, a un effet sur la migration car nous avons pu remarquer que les A431 incubés dans du milieu frais migrent moins vite que les cellules incubées dans du milieu conditionné des cellules contrôles ou soumises aux UVB. Afin d'observer un effet plus important du milieu conditionné des cellules soumises aux UVB, nous pourrions imaginer changer le milieu 72 h après le stress UVB par du milieu frais, et récupérer le milieu conditionné 72 h après le changement de milieu. Cela permettrait de s'assurer que les cellules sénescents sont bien établies dans la culture. De plus, comme mentionné précédemment, le SASP est mature environ 10 jours après son induction (Coppé *et al.*, 2008). Il serait donc intéressant de récolter le milieu conditionné plus tardivement.

Afin d'observer ce phénomène de migration des A431 par une deuxième méthode, nous pourrions réaliser des tests de migration à l'aide de chambres de Boyden. Ce système ne passe plus par l'utilisation de milieux conditionnés mais permet de maintenir les cellules en communication directe via les éléments sécrétés dans le milieu. Les chambres de Boyden sont un système permettant l'analyse de la communication entre deux types cellulaires différents. Elles consistent en un insert placé dans un puits, permettant de créer deux compartiments de

culture séparés par une membrane semi-perméable. La migration des cellules placées dans le compartiment supérieur peut ensuite être suivie, suivant le gradient chimotactique. Dans notre cas, le gradient chimotactique serait créé par les NHK jeunes ou sénescents placés sous l'insert dans lequel seraient incubées les cellules dont la migration est suivie (kératinocytes jeunes ou cellules A431). Dans un second temps, l'utilisation des chambres de Boyden pourra nous aider à déterminer l'effet du milieu conditionné des NHK jeunes et sénescents sur l'invasion des A431 via la pose d'une couche de matrigel sur la partie inférieure de la membrane. Le matrigel est composé principalement de collagène IV, de laminine et d'énactine (Kleinman *et al.*, 2001 ; Hughes *et al.*, 2010).

De plus, il se pourrait que la mitomycine C que nous avons utilisé afin d'arrêter la prolifération des cellules induise un effet inattendu, influençant le résultat obtenu. En effet, McKenna *et al.*, en 2012 ont montré qu'une concentration faible de mitomycine induisait des dommages persistants à l'ADN, causant l'apparition de la sénescence cellulaire chez les A549 (McKenna *et al.*, 2012). Cela pourrait avoir un impact sur le résultat obtenu. L'utilisation des chambres de Boyden pourrait aider à contrecarrer ce désagrément car elles ne nécessitent pas ce traitement préalable.

Dans la perspective de l'utilisation des chambres de Boyden avec des A431 et des NHK, nous avons démarré des tests de milieux afin de trouver un milieu ou un mélange de milieux qui convienne aux A431 et aux kératinocytes. Nous avons noté que le sérum, même à 1 %, et/ou un composant du DMEM High Glucose (DHG) ne convient pas aux kératinocytes, qui montrent des modifications morphologiques. Il a été montré que les composants du sérum induisent la différenciation des kératinocytes (Alfandari *et al.*, 1999). Le glucose présent dans le milieu a également un effet sur la différenciation et la morphologie des kératinocytes (Spravchikov *et al.*, 2001). Nous avons alors choisi d'utiliser du DMEM Low Glucose et sans sérum, dilué à 50 % avec du K-SFM. Après 24 h, nous avons également observé une modification de la morphologie des kératinocytes. Cette modification de morphologie peut également être due à la concentration de calcium plus élevée dans le DMEM High et Low glucose que dans le K-SFM. Le calcium est également responsable de la différenciation des kératinocytes (Hennings *et al.*, 1980).

Il serait alors envisageable de tester l'effet d'un DMEM sans glucose et sans calcium sur la morphologie des NHK, après 24 h d'incubation (temps pendant lequel les deux types cellulaires resteront dans les chambres de Boyden). Il faudrait également s'assurer que ce mélange de milieu ne pose pas de problème d'adaptation aux A431.

Afin de compléter tous les résultats obtenus, il pourrait également être intéressant d'utiliser d'autres lignées cellulaires dérivées de carcinomes des cellules squameuses, comme par exemple les cellules de la lignée du Prof. Proby. Ces cellules sont dérivées d'un SCC à différents stades, de la tumeur primaire aux métastases, et ont la particularité d'être toutes dérivées du même patient (Proby *et al.*, 2000).

A long terme, il pourrait être intéressant d'identifier la/les protéine(s) responsable(s) de la migration des A431 dans le milieu conditionné de NHK sénescents. Lors de l'étude réalisée par Farsam *et al.*, sur l'effet du milieu conditionné de fibroblastes jeunes et sénescents sur la migration des A431, la protéine identifiée était la chémerine (Farsam *et al.*, 2016). La chémerine

est un ligand des récepteurs CCRL2 et GPR1. Son expression génique est augmentée au niveau des kératinocytes et des fibroblastes âgés sains (Banas *et al.*, 2015). Cependant, il a été montré que les kératinocytes sains présentent une quantité beaucoup moins importante de récepteurs à la chémerine que des cellules dérivées de SCC (Farsam *et al.*, 2016). De plus, l'expression de la chémerine a été associée à la stimulation de l'angiogenèse tumorale au niveau de SCC oraux (Farsam *et al.*, 2016). Il pourrait être intéressant de déterminer quelle(s) protéine(s) est/sont responsable(s) de ce phénomène que nous avons observé au niveau des kératinocytes.

Nous pourrions d'abord vérifier si la chémerine est une protéine sécrétée dans le SASP des kératinocytes sénescents par la réalisation de tests ELISA. Si celle-ci se retrouve en plus grande quantité dans le milieu conditionné de NHK sénescents, il faudrait alors s'assurer qu'elle est responsable de la migration des A431. Nous pourrions alors utiliser un anticorps neutralisant afin d'empêcher son effet, et ensuite réaliser les mêmes tests scratch que précédemment afin de vérifier si l'effet est bien inhibé. Si cet effet sur la migration des A431 est conservé, nous pourrions réaliser un screening plus large permettant d'identifier les modifications du sécrétome entre les NHK jeunes et sénescents et déterminer un/des acteur(s) intéressant agissant sur la migration des cellules dérivées de SCC.

V. Références

- Abbadie, C., Pluquet, O., and Pourtier, A. (2017). Epithelial cell senescence: an adaptive response to pre-carcinogenic stresses? *Cell. Mol. Life Sci.* 1–39.
- Ahmed, M.S., Ikram, S., Bibi, N., and Mir, A. (2017). Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease. *Mol. Neurobiol.*
- Alfandari, J., Shnitman Magal, S., Jackman, A., Schlegel, R., Gonen, P., and Sherman, L. (1999). HPV16 E6 Oncoprotein Inhibits Apoptosis Induced during Serum–Calcium Differentiation of Foreskin Human Keratinocytes. *Virology* 257, 383–396.
- Amaral, T., and Garbe, C. (2017). Non-melanoma skin cancer: new and future synthetic drug treatments. *Expert Opin. Pharmacother.* 18, 689–699.
- Badache, A., and Hynes, N.E. (2001). Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells. *Cancer Res.* 61, 383–391.
- Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236.
- Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., et al. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184–189.
- Banas, M., Zegar, A., Kwitniewski, M., Zabieglo, K., Marczyńska, J., Kapinska-Mrowiecka, M., LaJevic, M., Zabel, B.A., and Cichy, J. (2015). The Expression and Regulation of Chemerin in the Epidermis. *PLoS One* 10, e0117830.
- Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M.S., Ehrlich, H.P., and Brem, H. (2009). The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J. Surg. Res.* 153, 347–358.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 238–245.
- Barzilai, N., Huffman, D.M., Muzumdar, R.H., and Bartke, A. (2012). The Critical Role of Metabolic Pathways in Aging. *Diabetes* 61, 1315–1322.
- Bayraktar, R., Van Roosbroeck, K., and Calin, G.A. (2017). Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Mol. Oncol.*
- Beard, J.R., Officer, A., de Carvalho, I.A., Sadana, R., Pot, A.M., Michel, J.-P., Lloyd-Sherlock, P., Epping-Jordan, J.E., Peeters, G.M.E.E. (Geeske), Mahanani, W.R., et al. (2016). The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing. *Lancet* 387, 2145–2154.
- Bielak-Zmijewska, Mosieniak, S. (2017). Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence? *Mech. Ageing Dev.*
- Bircan, A., Bircan, S., Kapucuoglu, N., Songur, N., Ozturk, O., and Akkaya, A. (2010). Maspin, VEGF and p53 Expression in Small Biopsies of Primary Advanced Lung Cancer and Relationship with Clinicopathologic Parameters. *Pathol. Oncol. Res.* 16, 553–561.
- Blume-Peytavi, U., Kottner, J., Sterry, W., Hodin, M.W., Griffiths, T.W., Watson, R.E.B., Hay, R.J., and Griffiths, C.E.M. (2016). Age-Associated Skin Conditions and Diseases:

Current Perspectives and Future Options. *Gerontologist* 56, S230–S242.

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–352.

Buquicchio, R., Foti, C., Loconsole, F., Polimeno, L., and Ventura, M.T. (2017). Clusterin serum level: how does it affect psoriatic patients? *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 31, 785–789.

Buratta, S., Urbanelli, L., Sagini, K., Giovagnoli, S., Caponi, S., Fioretto, D., Mitro, N., Caruso, D., and Emiliani, C. (2017). Extracellular vesicles released by fibroblasts undergoing H-Ras induced senescence show changes in lipid profile. *PLoS One* 12, e0188840.

Burtner, C.R., and Kennedy, B.K. (2010). Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 567–578.

Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11, S27-31.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.

Cavinato, M., and Jansen-Dürr, P. (2017). Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp. Gerontol.*

Chainiaux, F., Magalhaes, J.-P., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2002). UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1331–1339.

Childs, B.G., Gluscevic, M., Baker, D.J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., and van Deursen, J.M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 718–735.

Cho, K.A., Ryu, S.J., Oh, Y.S., Park, J.H., Lee, J.W., Kim, H.-P., Kim, K.T., Jang, I.S., and Park, S.C. (2004). Morphological Adjustment of Senescent Cells by Modulating Caveolin-1 Status. *J. Biol. Chem.* 279, 42270–42278.

Cho, S., Shin, M.H., Kim, Y.K., Seo, J.-E., Lee, Y.M., Park, C.-H., and Chung, J.H. (2009). Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *J. Investig. Dermatology. Symp. Proc.* 14, 15–19.

Chu, D.H. (2011). Development and Structure of Skin. *Fitzpatrick's Dermatology Gen. Med.* 8e chapter 7.

Collins, K., and Mitchell, J.R. (2002). Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21, 564–579.

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., et al. (2009). Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. *Science* (80-). 325, 201–204.

Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C.M. (2006). Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence. *J. Biol. Chem.* 281, 29568–29574.

- Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol.* 6, e301.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5, 99–118.
- Cosgrove, M.C., Franco, O.H., Granger, S.P., Murray, P.G., and Mayes, A.E. (2007). Dietary nutrient intakes and skin-aging appearance among middle-aged American women. *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1225–1231.
- Cummins, D.L., Cummins, J.M., Pantle, H., Silverman, M.A., Leonard, A.L., and Chanmugam, A. (2006). Cutaneous Malignant Melanoma. *Mayo Clin. Proc.* 81, 500–507.
- d'Adda di Fagagna, F., Teo, S.-H., and Jackson, S.P. (2004). Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev.* 18, 1781–1799.
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., et al. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-1 signaling pathway. *J. Cell Sci.* 118, 743–758.
- Debacq-Chainiaux, F., Pascal, T., Boilan, E., Bastin, C., Bauwens, E., and Toussaint, O. (2008). Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1817–1832.
- Debacq-Chainiaux, F., Leduc, C., Verbeke, A., and Toussaint, O. (2012). UV, stress and aging. *Dermatoendocrinol.* 4, 236–240.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 425, 577–584.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363–9367.
- Doshi, D.N., Hanneman, K.K., and Cooper, K.D. (2007). Smoking and Skin Aging in Identical Twins. *Arch. Dermatol.* 143.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11–22.
- Druelle, C., Drullion, C., Deslé, J., Martin, N., Saas, L., Cormenier, J., Malaquin, N., Huot, L., Slomianny, C., Bouali, F., et al. (2016). ATF6 α regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget* 7, 67699–67715.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Fripiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2000). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 361–373.
- Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E.S., and Toussaint, O. (2002). Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts

- protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones* 7, 23–35.
- Dupont, E., Gomez, J., and Bilodeau, D. (2013). Beyond UV radiation: A skin under challenge. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 224–232.
- Durocher, D., and Jackson, S.P. (2001). DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 225–231.
- El-Abaseri, T.B., Putta, S., and Hansen, L.A. (2006). Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis* 27, 225–231.
- Erusalimsky, J.D., and Kurz, D.J. (2005). Cellular senescence in vivo: Its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp. Gerontol.* 40, 634–642.
- Farsam, V., Basu, A., Gatzka, M., Treiber, N., Schneider, L.A., Mulaw, M.A., Lucas, T., Kochanek, S., Dummer, R., Levesque, M.P., et al. (2016). Senescent fibroblast-derived Chemerin promotes squamous cell carcinoma migration. *Oncotarget* 7, 83554–83569.
- Fitzpatrick, T.B. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch. Dermatol.* 124, 869–871.
- Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V.D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 328, 321–326.
- Freitas-Rodríguez, S., Folgueras, A.R., and López-Otín, C. (2017). The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 2015–2025.
- Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol. Med.* 16, 238–246.
- Frippiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.-P., Remacle, J., and Toussaint, O. (2001). Subcytotoxic H₂O₂ Stress Triggers a Release of Transforming Growth Factor-β1, Which Induces Biomarkers of Cellular Senescence of Human Diploid Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 276, 2531–2537.
- Fukuda, S., Baba, S., and Akasaka, T. (2015). Psychological stress has the potential to cause a decline in the epidermal permeability barrier function of the horny layer. *Int. J. Cosmet. Sci.* 37, 63–69.
- Gadaleta, M.N., Rainaldi, G., Lezza, A.M., Milella, F., Fracasso, F., and Cantatore, P. (1992). Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats. *Mutat. Res.* 275, 181–193.
- de Galarreta, M.R., and Lujambio, A. (2017). DNA sensing in senescence. *Nat. Cell Biol.* 19, 1008–1009.
- Geller, A.C., Colditz, G., Oliveria, S., Emmons, K., Jorgensen, C., Aweh, G.N., and Frazier, A.L. (2002). Use of sunscreen, sunburning rates, and tanning bed use among more than 10 000 US children and adolescents. *Pediatrics* 109, 1009–1014.
- Glück, S., Guey, B., Gulen, M.F., Wolter, K., Kang, T.-W., Schmacke, N.A., Bridgeman, A., Rehwinkel, J., Zender, L., and Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat. Cell Biol.* 19, 1061–1070.

- Gordon, R. (2013). Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. *Semin. Oncol. Nurs.* 29, 160–169.
- Gosselin, K., Martien, S., Pourtier, A., Vercamer, C., Ostoich, P., Morat, L., Sabatier, L., Duprez, L., T'Kint de Roodenbeke, C., Gilson, E., et al. (2009). Senescence-Associated Oxidative DNA Damage Promotes the Generation of Neoplastic Cells. *Cancer Res.* 69, 7917–7925.
- Goto, M., Chiba, J., Matsuura, M., Iwaki-Egawa, S., and Watanabe, Y. (2016). Inflammageing assessed by MMP9 in normal Japanese individuals and the patients with Werner syndrome. *Intractable Rare Dis. Res.* 5, 103–108.
- Guillaumet-Adkins, A., Yañez, Y., Peris-Diaz, M.D., Calabria, I., Palanca-Ballester, C., and Sandoval, J. (2017). Epigenetics and Oxidative Stress in Aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017, 9175806.
- Guo, D., Wang, Q., Li, C., Wang, Y., and Chen, X. (2017). VEGF stimulated the angiogenesis by promoting the mitochondrial functions. *Oncotarget* 8, 77020–77027.
- Hamzavi, I., Syed, Z., and Lim, H. (2012). Ultraviolet-based therapy for vitiligo: What's new? *Indian J. Dermatology, Venereol. Leprol.* 78, 42.
- Han, C., Srivastava, A.K., Cui, T., Wang, Q.-E., and Wani, A.A. (2016). Differential DNA lesion formation and repair in heterochromatin and euchromatin. *Carcinogenesis* 37, 129–138.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324–332.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S.H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19, 245–254.
- Hiraku, Y., Ito, K., Hirakawa, K., and Kawanishi, S. (2007). Photosensitized DNA Damage and its Protection via a Novel Mechanism†. *Photochem. Photobiol.* 83, 205–212.
- Holick, M.F. (2007). Vitamin D Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 357, 266–281.
- Hughes, C.S., Postovit, L.M., and Lajoie, G.A. (2010). Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10, 1886–1890.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., and Horikawa, T. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology* 189, 21–39.
- Johnson, J., Thijssen, B., McDermott, U., Garnett, M., Wessels, L.F.A., and Bernards, R. (2016). Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene* 35, 4829–4835.
- Kadota, T., Fujita, Y., Yoshioka, Y., Araya, J., Kuwano, K., and Ochiya, T. (2017). Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases. *Mol. Aspects Med.*
- Kang, M.K., Kameta, A., Shin, K.-H., Baluda, M.A., Kim, H.-R., and Park, N.-H. (2003).

Senescence-associated genes in normal human oral keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 287, 272–281.

Kim, K.-H., Park, G.-T., Lim, Y.-B., Rue, S.-W., Jung, J.-C., Sonn, J.-K., Bae, Y.-S., Park, J.-W., and 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- β -mediated signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 819–825.

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

Kim, K.S., Seu, Y.B., Baek, S.-H., Kim, M.J., Kim, K.J., Kim, J.H., and Kim, J.-R. (2007b). Induction of Cellular Senescence by Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5 through a p53-dependent Mechanism. *Mol. Biol. Cell* 18, 4543–4552.

Kim, R.H., Kang, M.K., Kim, T., Yang, P., Bae, S., Williams, D.W., Phung, S., Shin, K.-H., Hong, C., and Park, N.-H. (2015). Regulation of p53 during senescence in normal human keratinocytes. *Aging Cell* 14, 838–846.

Kleinman, H.K., Jacob, K., Kleinman, H.K., and Jacob, K. (2001). Invasion Assays. In *Current Protocols in Cell Biology*, (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p. 12.2.1-12.2.5.

Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res. Rev.* 10, 205–215.

Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., and Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *J. Dermatol. Nurses. Assoc.* 3, 203–213.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12072–12077.

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

Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer* 9, 81–94.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* 133, 1019–1031.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* 24, 2463–2479.

Kujoth, G.C. (2005). Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. *Science* (80-.). 309, 481–484.

Kumazaki, T., Robetorye, R.S., Robetorye, S.C., and Smith, J.R. (1991). Fibronectin expression increases during in vitro cellular senescence: correlation with increased cell area. *Exp. Cell Res.* 195, 13–19.

Kuningas, M., Estrada, K., Hsu, Y.-H., Nandakumar, K., Uitterlinden, A.G., Lunetta, K.L., van Duijn, C.M., Karasik, D., Hofman, A., Murabito, J., et al. (2011). Large common deletions associate with mortality at old age. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4290–4296.

- Kunisada, M., Kumimoto, H., Ishizaki, K., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., and Nishigori, C. (2007). Narrow-Band UVB Induces More Carcinogenic Skin Tumors than Broad-Band UVB through the Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimer. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 2865–2871.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 3613–3622.
- Laberge, R.-M., Awad, P., Campisi, J., and Desprez, P.-Y. (2012). Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts. *Cancer Microenviron.* *5*, 39–44.
- Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. von, and Passos, J.F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp. Gerontol.* *45*, 772–778.
- Lehmann, B.D., Paine, M.S., Brooks, A.M., McCubrey, J.A., Renegar, R.H., Wang, R., and Terrian, D.M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res.* *68*, 7864–7871.
- Liakos, A., Lavigne, M.D., and Foustieri, M. (2017). Nucleotide Excision Repair: From Neurodegeneration to Cancer. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 17–39.
- Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., and Jeggo, P.A. (2010). γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* *9*, 662–669.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* *153*, 1194–1217.
- Losquadro, W.D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast. Surg. Clin. North Am.* *25*, 283–289.
- Lucas, R., McMichael, T., Smith, W., Editors, B.A., Prüss-Üstün, A., Zeeb, H., Mathers, C., and Repacholi, M. (2006). Solar Ultraviolet Radiation Global burden of disease from solar ultraviolet radiation WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Madan, V., Lear, J.T., and Szeimies, R.-M. (2010). Non-melanoma skin cancer. *Lancet* *375*, 673–685.
- Maegawa, S., Hinkal, G., Kim, H.S., Shen, L., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, N., Liang, S., Donehower, L.A., and Issa, J.-P.J. (2010). Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.* *20*, 332–340.
- de Magalhães, J.P., and Passos, J.F. (2017). Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech. Ageing Dev.*
- Malaquin, N., Carrier-Leclerc, A., Dessureault, M., and Rodier, F. (2015). DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front. Genet.* *6*, 94.
- Malaquin, N., Martinez, A., and Rodier, F. (2016). Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Exp. Gerontol.* *82*, 39–49.
- Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H.J. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 465–481.

- Marzuka, A.G., and Book, S.E. (2015). Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. *Yale J. Biol. Med.* 88, 167–179.
- Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., et al. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114, 241–253.
- Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, 1907–1920.
- Matsumura, Y., and Ananthaswamy, H.N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 298–308.
- McKenna, E., Traganos, F., Zhao, H., and Darzynkiewicz, Z. (2012). Persistent DNA damage caused by low levels of mitomycin C induces irreversible cell senescence. *Cell Cycle* 11, 3132–3140.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 117–134.
- Montagna, E., and Lopes, O.S. (2017). Molecular basis of basal cell carcinoma. *An. Bras. Dermatol.* 92, 517–520.
- Moskalev, A.A., Shaposhnikov, M. V, Plyusnina, E.N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., and Fraifeld, V.E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res. Rev.* 12, 661–684.
- Murtas, D., Maxia, C., Diana, A., Piloni, L., Corda, C., Minerba, L., Tomei, S., Piras, F., Ferreli, C., and Perra, M.T. (2017). Role of epithelial–mesenchymal transition involved molecules in the progression of cutaneous melanoma. *Histochem. Cell Biol.* 1–11.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703–716.
- Nassour, J., and Abbadie, C. (2016). A novel role for DNA single-strand breaks in senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Mol. Cell. Oncol.* 3.
- Nassour, J., Martien, S., Martin, N., Deruy, E., Tomellini, E., Malaquin, N., Bouali, F., Sabatier, L., Wernert, N., Pinte, S., et al. (2016). Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat. Commun.* 7, 10399.
- Naylor, R.M., and van Deursen, J.M. (2016). Aneuploidy in Cancer and Aging. *Annu. Rev. Genet.* 50, 45–66.
- Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Ageing Cell* 11, 345–349.
- Nickoloff, B.J., Lingen, M.W., Chang, B.-D., Shen, M., Swift, M., Curry, J., Bacon, P., Bodner, B., and Roninson, I.B. (2004). Tumor suppressor maspin is up-regulated during keratinocyte senescence, exerting a paracrine antiangiogenic activity. *Cancer Res.* 64, 2956–2961.
- Nissenkorn, A., and Ben-Zeev, B. (2015). Ataxia telangiectasia. In *Handbook of Clinical Neurology*, pp. 199–214.

- O'Loghlen, A. (2018). Role for extracellular vesicles in the tumour microenvironment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 373, 20160488.
- Oeseburg, H., de Boer, R.A., van Gilst, W.H., and van der Harst, P. (2010). Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 459, 259–268.
- Oh, J., Lee, Y.D., and Wagers, A.J. (2014). Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat. Med.* 20, 870–880.
- van Oijen, M.G., Medema, R.H., Slootweg, P.J., and Rijksen, G. (1998). Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am. J. Clin. Pathol.* 110, 24–31.
- Orr, F.W., and Wang, H.H. (2001). Tumor cell interactions with the microvasculature: a rate-limiting step in metastasis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 10, 357–81, ix–x.
- Ortiz-Montero, P., Londoño-Vallejo, A., and Vernet, J.-P. (2017). Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun. Signal.* 15, 17.
- Oyetakin-White, P., Suggs, A., Koo, B., Matsui, M.S., Yarosh, D., Cooper, K.D., and Baron, E.D. (2015). Does poor sleep quality affect skin ageing? *Clin. Exp. Dermatol.* 40, 17–22.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 18, 6853–6866.
- Park, C.B., and Larsson, N.-G. (2011). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J. Cell Biol.* 193, 809–818.
- Park, J.H., Yoo, Y., and Park, Y.J. (2017). Epigenetics: Linking Nutrition to Molecular Mechanisms in Aging. *Prev. Nutr. Food Sci* 22, 81–89.
- Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chrétien, A., Bastin, C., Dabée, A.-F., Bertholet, V., Remacle, J., and Toussaint, O. (2005). Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett.* 579, 3651–3659.
- Pattison, D.I., and Davies, M.J. (2006). Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS* 131–157.
- Pawelec, G. (2017). Does the human immune system ever really become “senescent”? *F1000Research* 6, 1323.
- Petropoulou, C., Trougakos, I.P., Kolettas, E., Toussaint, O., and Gonos, E.S. (2001). Clusterin/apolipoprotein J is a novel biomarker of cellular senescence that does not affect the proliferative capacity of human diploid fibroblasts. *FEBS Lett.* 509, 287–297.
- Popli, D., Sircar, K., and Chowdhry, A. (2017). Telomerase: An exploration toward the end of cancer. *Indian J. Dent. Res.* 28, 574.
- Prasad, K.N., Wu, M., and Bondy, S.C. (2017). Telomere shortening during aging: Attenuation by antioxidants and anti-inflammatory agents. *Mech. Ageing Dev.* 164, 61–66.
- Proby, C.M., Purdie, K.J., Sexton, C.J., Purkis, P., Navsaria, H.A., Stables, J.N., and Leigh, I.M. (2000). Spontaneous keratinocyte cell lines representing early and advanced stages of malignant transformation of the epidermis. *Exp. Dermatol.* 9, 104–117.

- Proksch, E., Brandner, J.M., and Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* *17*, 1063–1072.
- Quan, T., and Fisher, G.J. (2015). Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology* *61*, 427–434.
- Quan, C., Cho, M.K., Perry, D., and Quan, T. (2015). Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. *J. Biomed. Sci.* *22*, 62.
- Rastogi, R.P., Kumar, A., Tyagi, M.B., and Sinha, R.P. (2010). Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *SAGE-Hindawi Access to Res. J. Nucleic Acids* *32*.
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Durr, P., and Wlaschek, M. (2006). p16^{INK4A} is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* *5*, 379–389.
- Rizvi, S., Raza, S.T., and Mahdi, F. (2015). Telomere Length Variations in Aging and Age-Related Diseases. *Curr. Aging Sci.* *7*, 161–167.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* *11*, 973–979.
- Rubinsztein, D.C., Mariño, G., and Kroemer, G. (2011). Autophagy and Aging. *Cell* *146*, 682–695.
- Sagiv, A., and Krizhanovsky, V. (2013). Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology* *14*, 617–628.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2012). Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany, NY)*. *4*, 166–175.
- Schuch, A.P., Moreno, N.C., Schuch, N.J., Menck, C.F.M., and Garcia, C.C.M. (2017). Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic. Biol. Med.*
- Schultz, M.B., and Sinclair, D.A. (2016). When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development* *143*, 3–14.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593–602.
- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* *2*, 103–112.
- Skinner, A.M., and Turker, M.S. (2005). Oxidative mutagenesis, mismatch repair, and aging. *Sci. Aging Knowledge Environ.* *2005*, re3.
- Soon Won, Choi, Jin Young, Lee, Kyung-Sun, K. (2017). miRNAs in stem cell aging and age-related disease. *Mech. Ageing Dev.*
- Soroka, Y., Ma'or, Z., Leshem, Y., Verochovsky, L., Neuman, R., Brégégère, F.M., and

- Milner, Y. (2008). Aged keratinocyte phenotyping: Morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals. *Exp. Gerontol.* *43*, 947–957.
- Spravchikov, N., Sizyakov, G., Gartsbein, M., Accili, D., Tennenbaum, T., and Wertheimer, E. (2001). Glucose effects on skin keratinocytes: implications for diabetes skin complications. *Diabetes* *50*, 1627–1635.
- Stern, R.S. (2007). Psoralen and Ultraviolet A Light Therapy for Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* *357*, 682–690.
- Strieter, R.M., Burdick, M.D., Mestas, J., Gomperts, B., Keane, M.P., and Belperio, J.A. (2006). Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur. J. Cancer* *42*, 768–778.
- Sulli, G., Di Micco, R., and di Fagagna, F. d'Adda (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 709–720.
- Takov, K., Yellon, D.M., and Davidson, S.M. (2017). Confounding factors in vesicle uptake studies using fluorescent lipophilic membrane dyes. *J. Extracell. Vesicles* *6*, 1388731.
- Tigges, J., Krutmann, J., Fritsche, E., Haendeler, J., Schaal, H., Fischer, J.W., Kalfalah, F., Reinke, H., Reifenberger, G., Stühler, K., et al. (2014). The hallmarks of fibroblast ageing. *Mech. Ageing Dev.* *138*, 26–44.
- Toussaint, O., Medrano, E.E., and von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* *35*, 927–945.
- Toutfaire, M., Bauwens, E., and Debacq-Chainiaux, F. (2017). The impact of cellular senescence in skin ageing: A notion of mosaic and therapeutic strategies. *Biochem. Pharmacol.*
- Trompezinski, S., Pernet, I., Schmitt, D., and Viac, J. (2001). UV radiation and prostaglandin E2 up-regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) in cultured human fibroblasts. *Inflamm. Res.* *50*, 422–427.
- Tsakiri, E.N., Sykiotis, G.P., Papassideri, I.S., Gorgoulis, V.G., Bohmann, D., and Trougakos, I.P. (2013). Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs. somatic tissues of *Drosophila* during aging or oxidative stress. *FASEB J.* *27*, 2407–2420.
- Ulrich, C., Schmook, T., Sachse, M.M., Sterry, W., and Stockfleth, E. (2004). Comparative Epidemiology and Pathogenic Factors for Nonmelanoma Skin Cancer in Organ Transplant Patients. *Dermatologic Surg.* *30*, 622–627.
- Ungvari, Z., Valcarcel-Ares, M.N., Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., Fülöp, G.A., Kiss, T., and Csiszar, A. (2017). Connective tissue growth factor (CTGF) in age-related vascular pathologies. *GeroScience*.
- Urbanelli, L., Buratta, S., Sagini, K., Tancini, B., and Emiliani, C. (2016). Extracellular Vesicles as New Players in Cellular Senescence. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Verheul, H.M., and Pinedo, H.M. (2000). The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor angiogenesis and early clinical development of VEGF-receptor kinase inhibitors. *Clin. Breast Cancer* *1 Suppl 1*, S80-4.
- Vierkö Tter, A., Schikowski, T., Ranft, U., Sugiri, D., Matsui, M., Krämer, U., and Krutmann, J. (2010). Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging. *J. Invest. Dermatol.* *130*,

2719–2726.

Voiculescu, V., Calenic, B., Ghita, M., Lupu, M., Caruntu, A., Moraru, L., Voiculescu, S., Ion, A., Greabu, M., Ishkitiev, N., et al. (2016). From Normal Skin to Squamous Cell Carcinoma: A Quest for Novel Biomarkers. *Dis. Markers* 2016, 4517492.

Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M.R. (2008). Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 132, 363–374.

Waldera Lupa, D.M., Kalfalah, F., Safferling, K., Boukamp, P., Poschmann, G., Volpi, E., Götz-Rösch, C., Bernerd, F., Haag, L., Huebenthal, U., et al. (2015). Characterization of Skin Aging–Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1954–1968.

Wei, S., Wei, S., and Sedivy, J.M. (1999). Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Res.* 59, 1539–1543.

WHO (2017). WHO | World report on ageing and health 2015.

Wickens, A.P. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respir. Physiol.* 128, 379–391.

Wlaschek, M., Tantcheva-Poór, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L.A., Razi-Wolf, Z., Schüller, J., and Scharffetter-Kochanek, K. (2001). Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B.* 63, 41–51.

Wu, C., Liu, X., Wang, Y., Tian, H., Xie, Y., Li, Q., Zhang, X., and Liu, F. (2013). Insulin-like factor binding protein-3 promotes the G1 cell cycle arrest in several cancer cell lines. *Gene* 512, 127–133.

Wu, J., Niu, J., Li, X., Wang, X., Guo, Z., and Zhang, F. (2014). TGF- β 1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC Dev. Biol.* 14, 21.

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

Yang, G., Rosen, D.G., Zhang, Z., Bast, R.C., Mills, G.B., Colacino, J.A., Mercado-Uribe, I., and Liu, J. (2006). The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 16472–16477.

Yuan, A., Chen, J.J.W., Yao, P.-L., and Yang, P.-C. (2005). The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front. Biosci.* 10, 853–865.

Zbytek, B., Carlson, J.A., Granese, J., Ross, J., Mihm, M.C., Slominski, A., and Slominski, A. (2008). Current concepts of metastasis in melanoma. *Expert Rev. Dermatol.* 3, 569–585.

Zhang, G., Li, J., Purkayastha, S., Tang, Y., Zhang, H., Yin, Y., Li, B., Liu, G., and Cai, D. (2013). Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-b, NF-kB and GnRH.

Zhu, X., Thinakaran, G., Yan, R., Wang, X., Zheng, Q., Huang, T., Zhang, L., Zhou, Y., Luo, H., and Xu, H. (2016). Dysregulation of Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Diseases ABNORMAL PROTEIN AGGREGATION IN NEURODEGENERATIVE DISEASES.