



HAL
open science

Modulation de la sénescence induite par les oncogènes par les glucocorticoïdes et rôle de EGR1

Cyril Carvalho

► **To cite this version:**

Cyril Carvalho. Modulation de la sénescence induite par les oncogènes par les glucocorticoïdes et rôle de EGR1. Cancer. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS183 . tel-01968059

HAL Id: tel-01968059

<https://theses.hal.science/tel-01968059>

Submitted on 2 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Modulation de la sénescence induite par les oncogènes par les glucocorticoïdes et rôle de EGR1

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°577 : structure et dynamique
des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 28/06/2018, par

Cyril Carvalho

Composition du Jury :

Simon Saule Professeur des Universités, Paris Saclay (– UMR3347 / U1021)	Président
Corine Bertolotto Directeur de Recherche, Université Nice (– Inserm U1065, C3M)	Rapporteur
Celio Pouponnot Directeur de Recherche, Institut Curie (– UMR3347 / U1021)	Rapporteur
Oliver Bischof Directeur de Recherche, Institut Pasteur (– Inserm U993)	Examineur
Jean-Yves Thuret Chargé de Recherche, CEA Saclay (– I2BC)	Examineur
Carl Mann Directeur de Recherche, CEA Saclay (– I2BC)	Directeur de thèse

C'est pas faux.

Franck Pitiot,
Kaamelott, Livre I, *La Botte secrète*, écrit par Alexandre Astier.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Carl Mann de m'avoir accueilli initialement en stage puis de m'avoir permis de prolonger cette aventure pour une thèse et d'avoir toujours été présent pour discuter des résultats obtenus et apporter sa connaissance sur la sénescence.

Je tiens ensuite à remercier Jean-Yves Thuret, qui a eu le courage et la patience (et l'honneur) de m'encadrer pendant ces longues années. Pendant ces presque 5 ans, nous avons eu le temps de partager plus que lors d'un rapport normal entre superviseur et doctorant, quelques désaccords parfois, mais j'ai grandement apprécié ces moments à tes côtés. Ta rigueur scientifique et ton soutien pour la qualité de mon travail ont été des points importants pour moi, et pour ça (et tous les à-côtés de la thèse), je t'en remercie.

Je souhaite remercier les rapporteurs de ma thèse, Celio Pouponnot et Corine Bertolotto pour leurs relectures précises et leurs remarques pertinentes aussi bien sur le manuscrit que lors de ma soutenance. Je tiens aussi à remercier le président de mon jury de soutenance, Simon Saule pour avoir dirigé ce moment de main de maître et l'avoir ainsi rendu solennel. Et enfin particulièrement Oliver Bischof, qui a été mon tuteur de thèse, puis examinateur lors de ma soutenance, en plus d'avoir toujours été disponible lors des congrès ICSA pour discuter science et un peu plus, et ainsi me rappeler que la recherche n'empêchait pas de se détendre.

Je ne peux pas écrire de remerciement sans avoir une énorme pensée pour Régis (c'est le plus fort, c'est le meilleur et on l'adore). Il a eu le malheur de devoir partager un bureau avec moi, et même si une porte aurait pu se trouver entre nous, elle est toujours restée ouverte. Il a ainsi pu profiter de ma culture musicale, de ma passion pour les années 80, Disney et le chant ! On a ainsi passé beaucoup de temps ensemble, aussi bien lors de nos courses du midi que lors des manips dans le labo, et c'était toujours avec plaisir que l'on parlait de tout et de rien, enfin c'était surtout moi qui parlait !

Je voudrais remercier toutes les personnes du bâtiment 142 d'avoir supporté ma musique (pas toujours), mes coups de gueule, ma maniaquerie et mes remarques ! Je remercie particulièrement Agnès, toujours présente pour une discussion tardive et des conseils sur mon avenir. Je n'oublie pas Gwen, qui aura été la seule à avoir râlé plus que moi, présente tous les jours en culture, à la pause-café, la pause déjeuner, la course à pied, et finalement tous les moments de ma thèse ! Je remercie JC de m'avoir permis de noyer mon chagrin dans le vin, d'avoir perdu tellement de temps à discuter avec moi de tout et de rien, de souvent m'ouvrir les yeux sur ma situation au final pas catastrophique et d'avoir été si souvent malade, j'ai pu bénéficier d'un super partenaire de course à pied pour les sorties tranquilles ! Sorties tranquilles qui étaient juste impossibles à faire avec Stéphane, en deux semaines de courses avec lui et son groupe et me voilà blessé ! Stéphane ce coureur qui volait les shorts de sa femme, cet ingénieur sécurité effrayé par la vue du sang,

mais aussi ce bureau toujours ouvert pour accueillir les étudiants en détresse ou juste souhaitant se changer les idées. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien incroyable lors de mon premier marathon, une vraie épreuve que je n'aurais jamais finie si tu n'avais pas été là ! Je n'ai pas oublié non plus que tu me devais toujours un apéro chez toi ! Merci à Jean, toujours présent pour les étudiants et pour apporter une vision toujours différente. Merci à Catherine, Manu, Olivier, Guillaume, Gueorgui, Cyril et toutes les personnes du 144 pour leurs soutiens aussi bien techniques, morales ou amicales, ces moments furtifs dans « l'autre bâtiment » se sont toujours prolongés avec un grand plaisir. Merci à Franck et Corinne d'avoir toujours partagé des moments au détour d'un couloir. Merci à tous ceux qui ont partagés un moment avec moi : Samia, Gilles, Gael et tous ceux qui ont partagés un bout de ma thèse.

Merci aussi d'avoir accueilli tant d'étudiants (d'enfants pour certaines équipes). Il y a toujours eu de la vie dans ce 142 et des étudiants avec qui passer un bon moment. Pour tous ceux qui sont encore en thèse (Xavier, Celia, Victoire, Sigrid, Marina, Adèle, ...) je vous souhaite beaucoup de courage. Accrochez-vous, c'est long mais ça en vaut la peine, si c'était à refaire, je n'hésiterai pas (au 142, ailleurs je sais pas). N'oubliez pas de prendre du temps pour vous, vous détendre et continuer de vivre, après tout « c'est qu'une thèse ». J'ai aussi une pensée pour tous les stagiaires qui sont passés parmi nous, plus ou moins longtemps, mais toujours avec bonne humeur et la fraîcheur de l'extérieur.

Je ne peux pas ne pas évoquer mes camarades d'infortune, Alise Ponsero, Théo Veaudor et Clément Coudereau. Ces moments avec vous étaient les plus importants, sans vous ma thèse n'aurait pas été la même, ni aussi bonne. Je vous en veux pas de m'avoir abandonné pour ma dernière année, vous êtes aujourd'hui plus que des collègues et j'attends avec impatience de vous revoir, pourquoi pas tous ensemble ?

Je remercie tous mes amis, qui ont toujours voulu de moi et m'ont supporté, malgré mes plaintes, mes retards et ma mauvaise humeur chronique ! Je n'ai pas eu assez de temps pour tous vous voir autant que je l'aurais voulu... Merci à tous les moants, ces moments tous plus intelligents les uns que les autres vont me manquer, sans doute plus que la moto... Merci Celia, merci Olivia, merci Sriram, merci Pilou, ça fait plus de 10 ans que vous êtes là... J'ai une pensée pour Yohann, Romain et Mathieu que j'ai toujours trop peu vu, mais toujours avec plaisir ! Merci à Nathan, Morgan, Louis, Flo, Vincent, Benoit, Joyce, Damien et tout ce joli petit groupe hétéroclite pour ces moments et ces expériences toujours nouvelles. Merci à Laura, une amie si fidèle et toujours bienveillante. Et enfin je n'oublie pas Pierre-Louis, mon meilleur ami depuis tant d'années et avec qui j'ai tant partagé, toujours là pour moi, à mon meilleur comme à mon pire, merci pioupiou.

Pour finir je remercie ma famille, toujours présente pour moi, et plus particulièrement mes parents et mon frère. J'ai toujours présenté mon meilleur visage et ma bonne humeur

au travail, et eux ont dû subir le reste et ont pourtant toujours tout fait pour moi. Merci pour tout, cette thèse c'est aussi un peu la vôtre, vous vous êtes tant sacrifié et avez tant donné pour moi. Merci.

Table des matières

Remerciements	1
<i>Table des matières</i>	5
<i>Table des illustrations</i>	9
Abréviations	13
Introduction.....	15
1. La sénescence	15
1.1 Les différents inducteurs de sénescence	15
1.1.1 <i>La sénescence répllicative</i>	15
1.1.2 <i>La sénescence prématurée</i>	17
1.1.2.1 Les dommages à l'ADN.....	17
1.1.2.2 Le stress de culture.....	18
1.1.2.3 La perte de suppresseurs de tumeurs.....	18
1.1.2.4 L'activation d'oncogènes.....	19
1.1.2.5 Les autres inducteurs.....	20
1.2 Caractéristiques	21
1.2.1 <i>L'arrêt du cycle cellulaire est le marqueur universel des cellules sénescents</i>	21
1.2.2 <i>Augmentation des CDKN du loci INK4 et de la voie p53/pRB</i>	21
1.2.3 <i>Modification de la chromatine : SAHF</i>	22
1.2.4 <i>DNA SCARS</i>	23
1.2.5 <i>Activité SA-β-Galactosidase</i>	23
1.2.6 <i>Modification morphologique</i>	24
1.2.7 <i>Modification transcriptomique</i>	25
1.2.8 <i>SASP</i>	25
1.2.8.1 Régulation du SASP.....	25
1.2.8.2 Rôle du SASP.....	26
1.2.9 <i>Résistance à l'apoptose</i>	27
1.2.10 <i>Histone H2A.J</i>	27
1.3 Rôle de la sénescence in vivo	28
1.3.1 <i>Rein</i>	28
1.3.2 <i>Diabète de type II</i>	28
1.3.3 <i>Fibrose pulmonaire idiopathique</i>	29

1.3.4	<i>Stéatose hépatique non alcoolique</i>	29
1.3.5	<i>Système cardiovasculaire</i>	30
1.3.6	<i>Système immunitaire</i>	30
1.3.7	<i>Cachexie liée à l'âge</i>	30
1.3.8	<i>Cancer</i>	31
2.	Glucocorticoïdes	32
2.1	Mécanismes d'actions	33
2.1.1	<i>Actions Génomiques</i>	33
2.1.2	<i>Action Non-Génomiques</i>	35
2.2	Effets <i>in vivo</i> et en médecine humaine	36
2.2.1	<i>Effets sur le métabolisme du glucose et le fonctionnement du foie</i>	36
2.2.2	<i>Effets respiratoires et cardiovasculaires</i>	36
2.2.3	<i>Effets musculosquelettiques</i>	37
2.2.4	<i>Effets immunitaires</i>	37
2.2.5	<i>Effets sur la peau et affections cutanées</i>	38
2.3	Glucocorticoïdes et sénescence	38
3.	MAPK	39
3.1	Rôle des voies MAPK	39
3.2	Différentes voies MAPK	41
3.2.1	<i>La voie p38</i>	41
3.2.2	<i>La voie JNK</i>	42
3.2.3	<i>La voie ERK</i>	43
4.	Névi et mélanome	46
4.1	Formation des névi	46
4.2	Du névi au mélanome	48
5.	EGR-1	50
5.1	Expression et régulation de EGR1	50
5.2	Fonction de EGR-1	52
5.3	EGR1 et sénescence	55
5.4	EGR1 et glucocorticoïdes	56
	Résultats	59
1.	Induction de sénescence par B-RAF^{V600E}	59

2.	Effet des glucocorticoïdes sur la sénescence.....	66
3.	Modulation de la voie MAPK	70
4.	Rôle de la voie NF-κB.....	74
5.	Effets du clobetasol sur les CKI	78
6.	Effets transcriptomiques du clobetasol et identification de cibles.....	81
7.	EGR-1 et CKI	83
8.	EGR-1 et échappement de sénescence	88
9.	Création de la lignée KO EGR1.....	89
10.	Effets du KO de EGR1 sur l'induction de sénescence.....	90
11.	Effet des glucocorticoïdes en l'absence de EGR1.....	93
12.	Cellules KO EGR1, glucocorticoïdes et induction de CKI.....	95
13.	Expériences préliminaires.....	97
13.1	Glucocorticoïdes et échappement de sénescence	97
13.2	Résultat préliminaire de CHIP contre EGR1	99
13.3	H2A.J dans la sénescence induite par B-RAF ^{V600E}	102
	Discussions et Conclusions	105
1.	B-RAF ^{V600E}	105
2.	Glucocorticoïdes.....	108
3.	EGR1	111
4.	Conclusion générale	114
	Perspectives	115
1.	Rôle de EGR1 dans l'induction de la sénescence	115
2.	Autres mécanismes d'action des glucocorticoïdes	116
3.	Se rapprocher du <i>in vivo</i>	118
4.	Les glucocorticoïdes en médecine humaine	119
	Matériels et méthodes	121

1. Cellules, expression d'oncogène et conditions de culture cellulaire	121
2. Traitements et drogues utilisées	122
3. Microscopie haut débit, inversé et immunofluorescence.....	122
4. ARN : extraction, RT, qPCR et séquençages hauts débits.....	123
5. Identification des gènes cibles de NF- κ B.....	124
6. SiRNA	125
7. Western Blot	126
8. CrispR cas9	126
9. Chromatin Immuno-Precipitation.....	127
Bibliographie	131

Table des illustrations

Figure 1 : Sénescence répliquative par érosion des télomères.....	16
Figure 2 : Les voies de réponses aux dommages à l'ADN.....	18
Figure 3 : Voie d'induction de la sénescence par la perte de suppresseur de tumeurs	19
Figure 4 : Modèle d'induction de sénescence après l'activation d'un oncogène	20
Figure 5 : Différents inducteurs et différentes caractéristiques	22
Figure 6 : Formation et composition des SAHF	23
Figure 7 : Cellules sénescents positives au test SA-β-Galactosidase	24
Figure 8 : Les différents effets du SASP au cours du temps	26
Figure 9 : Axe HHS et activation du cortisol	32
Figure 10 : Mécanismes d'actions des glucocorticoïdes	34
Figure 11 : Schéma de la voie d'activation des MAPK.....	40
Figure 12 : Différentes voies MAPK.....	41
Figure 13 : Modèle de formation linéaire des mélanomes	49
Figure 14 : Famille des protéines EGR et domaines	50
Figure 15 : Induction et régulation des EGR par NAB	51
Figure 16 : Expression de B-RAF ^{V600E} après ajout de doxycycline à différentes concentrations et après différents temps.....	60
Figure 17 : Prolifération des cellules après différents niveaux d'expression de B-RAF ^{V600E}	61
Figure 18 : Cinétique d'arrêt de prolifération après expression de B-RAF ^{V600E}	62
Figure 19 : Clonogénicité à différents niveaux d'expression de B-RAF ^{V600E}	63
Figure 20 : Caractérisation de la sénescence après expression de B-RAF ^{V600E}	64
Figure 21 : Effet de la déplétion de CDKN1A, CDKN2A et CDKN2B lors de l'induction de sénescence.	65
Figure 22 : Effet des glucocorticoïdes sur l'induction de sénescence et translocation du récepteur des glucocorticoïdes.....	67
Figure 23 : Cinétique d'arrêt de prolifération après traitement par le clobetasol.	68
Figure 24 : Contrôle du rôle du récepteur des glucocorticoïdes.....	69
Figure 25 : Quantité relative de DUSP1 DUSP5 et GILZ après traitement par les glucocorticoïdes et effet des glucocorticoïdes sur la phosphorylation de Erk.	71

Figure 26 : Validation et caractérisation des effets de la déplétion de DUSP1, DUSP5 et GILZ sur l'induction de sénescence.	72
Figure 27 : Effet des glucocorticoïdes sur des gènes cibles de la voie des MAPK.....	73
Figure 28 : Volcano plot présentant les gènes cibles de la voie NF-κB	74
Figure 29 : Absence de translocation de RelA dans la lignée exprimant IκB mutée comparé à la lignée contrôle	75
Figure 30 : Expression de B-RAF ^{V600E} et traitement clobetasol dans une lignée séquestrant RelA dans le cytoplasme.....	76
Figure 31 : Comparaison entre le CompoundA et le clobetasol et effet du CompoundA sur l'induction de sénescence.	77
Figure 32 : Effet de l'expression de B-RAF ^{V600E} et d'un traitement clobetasol sur l'expression de CDKN2B et CDKN1A.	79
Figure 33 : Effet de la déplétion de CDKN1A et CDKNB lors de l'induction de sénescence et traitement clobetasol.....	80
Figure 34 : Liste gènes identifiés par analyse transcriptomique en bead-array	82
Figure 35 : Identification de EGR1 par double approche transcriptomique et siRNA	83
Figure 36 : Site de fixation EGR-1 connu sur le promoteur de CDKN1A	84
Figure 37 : Hypothèse de régulation de l'expression de CDKN1A et CDKN2B par EGR-1..	84
Figure 38 : Effet de la déplétion de EGR1 sur CDKN2B p15 et CDKN2A p21.	85
Figure 39 : Déplétions combinées de EGR1, CDKN2B et CDKN1A sur l'induction de sénescence	87
Figure 40 : Cinétique d'arrêt de prolifération après expression de B-RAF ^{V600E} , avec et sans déplétion de EGR1.....	88
Figure 41 : Caractérisation de la déplétion de EGR1 via CRISPR	90
Figure 42 : Contrôle de l'expression de B-RAF ^{V600E} dans la lignée KO EGR1 et effet sur la prolifération	91
Figure 43 : Cinétique d'arrêt de prolifération des cellules KO EGR1 après expression de B-RAF ^{V600E}	92
Figure 44 : Comparaison des effets des faibles niveau d'expression de B-RAF ^{V600E} dans une lignée EGR1 WT et EGR1 KO.....	93
Figure 45 : Effet du clobetasol sur la prolifération de cellules KO EGR1 après expression de B-RAF ^{V600E}	94

Figure 46 : Comparaison du niveau d'expression de CDKN2B et CDKN1A dans la lignée WT et KO EGR1, après traitement doxycycline et clobetasol.....	96
Figure 47 : Effets des glucocorticoïdes sur l'échappement de sénescence lors des conditions de croissances « stimulantes ».....	98
Figure 48 : Fixation de EGR1 aux promoteurs de EGR1, EGR2, EGR3, NAB1 et NAB2.....	100
Figure 49 : Fixation de EGR1 aux promoteurs de CDKN1A et CDKN2B.....	101
Figure 50 : Niveau d'expression de H2AFJ et quantité de protéine H2A.J.....	102
Figure 51 : Effet du clobetasol sur l'expression de H2AFJ.....	103
Figure 52 : Induction de sénescence à l'aide de B-RAF ^{V600E} dans notre modèle et rôle de p15 et p21	106
Figure 53 : Modèle de régulation des CKI par les glucocorticoïdes et rôle d'une protéine encore inconnue.....	110
Figure 54 : Modèle d'induction de sénescence par B-RAF ^{V600E} , rôle de EGR1, des glucocorticoïdes et nouveaux mécanismes d'action	114
Figure 55 : Sites de fixation de facteurs de transcription connus pour interagir avec le récepteur des glucocorticoïdes	117

Abréviations

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdiens
ARE : AU-Rich Element
CKI : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
DDR : DNA-Damage Response
DUSP : DUal-Specificity Phosphatases
EdU : Ethynyl deoxy-Uridine
EGR : Early Growth Response
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases
GR : Récepteur des Glucocorticoïdes
GRE : Glucocorticoid-Response Element
HHS : axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien
I κ B : Inhibitor of Kappa B
JNK : c-Jun N-terminal Kinases
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
MEK : MAPK/ERK Kinase
MKP : MAPK phosphatases
MMP : MétalloProtéinase Matricielle
NAB : NGFI-A-binding
NF- κ B : Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NR3C1 : Nuclear Receptor subfamily 3, group C, member 1
RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS : RA t Sarcoma
RB : RetinoBlastoma
SAHF : Senescence Associated Heterochromatin Foci
SASP : Senescence Associated Secretory Phenotype
SA- β -Gal : Senescence Associated- β -galactosidase
SCARS : Segments with Chromatin Alteration Reinforcing Senescence
SEGRA : SElective Glucocorticoid Receptor Agonists
SHNA : Stéatose Hépatique Non Alcoolique
SMS : Senescence-Messaging Secretome
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

Introduction

Du passé faisons table en marbre.

Jean-Christophe Hembert,
Kaamelott, Livre IV, L'Échelle de Perceval, écrit par Alexandre
Astier.

Introduction

1. La sénescence

La sénescence cellulaire est caractérisée par des cellules ayant perdu la capacité de se diviser à la suite d'un stress. Cependant, malgré l'arrêt de la prolifération, ces cellules maintiennent une activité métabolique importante. Cela induit donc un changement par rapport au fonctionnement initial de la cellule, et donc de son rôle. La perte de la capacité de prolifération des cellules a initialement été associée avec un rôle de suppresseur de tumeurs ou au moins d'en limiter le développement. Dans le même temps, et pour les mêmes raisons, l'impact de la sénescence dans le vieillissement a été mis en avant.

Par la suite, la sénescence a pu être étudiée *in vivo*, on a alors pu s'apercevoir qu'en vieillissant on observait une accumulation des cellules sénescents (Childs, Durik, Baker, & Van Deursen, 2015; Dimri et al., 1995; Melk et al., 2003), mais que des cellules sénescents étaient aussi présentes et jouaient un rôle lors de l'embryogénèse (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013), venant ainsi montrer que ce processus de « vieillissement » était finalement bien plus complexe qu'imaginé.

1.1 Les différents inducteurs de sénescence

1.1.1 La sénescence réplivative

Longtemps, les cellules ont été décrites comme ayant une capacité de division infinie. Alexis Carrel a grandement contribué à cette vision par une expérience débutée le 12 janvier 1912 (Carrel, 1912), dans laquelle il a maintenu en culture du tissu embryonnaire cardiaque de poulet pendant plus de 20 ans, soit bien plus que la durée de vie normale d'un poulet. Cependant, personne n'a jamais réussi à reproduire cette expérience, malgré de nombreuses tentatives, les cellules pouvant être cultivées sur de longues périodes finissaient par développer des aberrations chromosomiques (Hsu & Moorhead, 1957).

Parmi les hypothèses évoquées, le changement de milieu quotidien de Carrel aurait pu permettre l'ajout de nouvelles cellules à la culture, permettant ainsi son renouvellement.

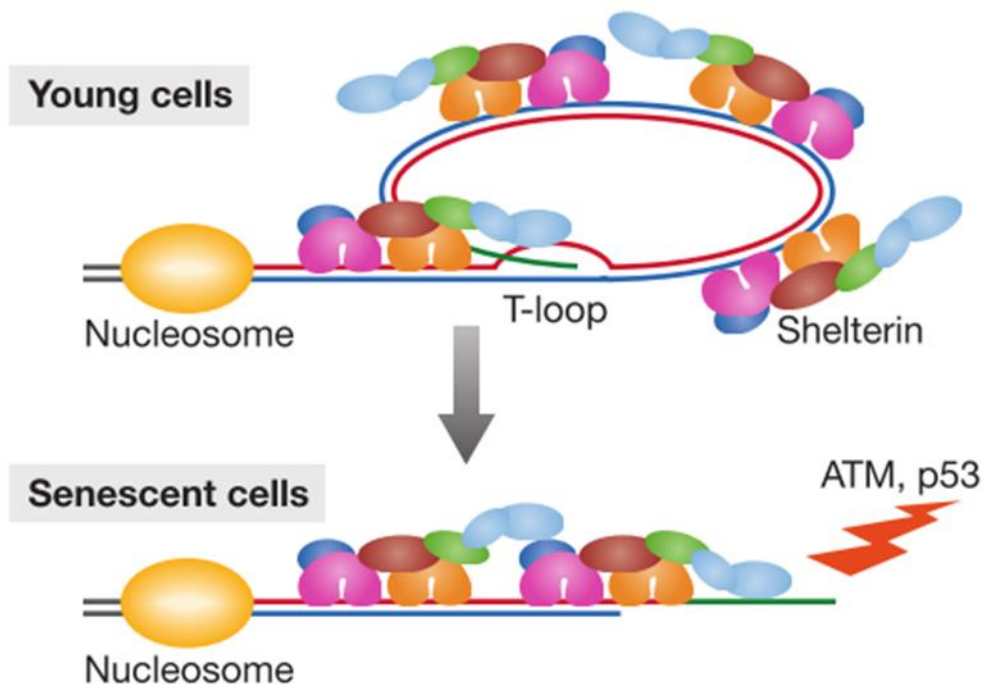


Figure 1 : Sénescence répllicative par érosion des télomères.

Schéma représentant le capping protéique des chromosomes dans des cellules jeunes et l'érosion des télomères lors des doublements de population, aboutissant à la détection d'ADN libre. Cet ADN libre sera détecté par le système DDR induisant la sénescence.
Adaptée de (Price, 2012).

En 1961, Hayflick et Moorhead ont mis en évidence une limite à la capacité de prolifération des cellules humaines normales en culture (Hayflick & Moorhead, 1961). Dans cette expérience, il a été montré que la capacité de division des cellules sans modifications de caryotypes était limitée. Le nombre de passages observé n'a pas dépassé 55, peu importe le tissu duquel les cellules provenaient. Il est intéressant de noter qu'après quelques passages, toutes les cellules étaient exclusivement des fibroblastes indépendamment du tissu d'origine. Ce nombre de passage limité a par la suite porté le nom de limite de Hayflick. Cette limite, à partir de laquelle les cellules ne se divisent plus marque le moment où les cellules deviennent sénescents. Une cellule sénescence est une cellule qui, à la suite d'un stress, a perdu sa capacité de prolifération de manière irréversible, malgré des conditions permettant la division : espace, nutriments, facteurs de croissance. Ces cellules, malgré leur sortie du cycle cellulaire, restent vivantes et maintiennent une activité métabolique sur de longues périodes.

On sait aujourd'hui que l'arrêt de la prolifération observé par Hayflick et Moorhead est lié à un nombre important de division des cellules, aboutissant à l'érosion des télomères laissant apparaître une extrémité libre qui sera ensuite reconnue par les mécanismes de détections des dommages à l'ADN (Figure 1). Initialement, les extrémités des télomères sont protégées de la fixation des senseurs des dommages à l'ADN par des complexes protéines shelterin (le capping) organisé en T-loop permettant ainsi le camouflage des extrémités libre.

Les télomères sont composés de séquences répétées (5'-TTAGGG-3' chez les vertébrées) à l'extrémité des chromosomes et associés avec des protéines qui protègent de la dégradation. À chaque division cellulaire, la cellule perd environ 200pb dû à l'incapacité de l'ADN polymérase de synthétiser totalement le brin antisens. La taille des télomères est au maximum d'une quinzaine de milliers de paires de bases chez l'Homme, ce qui permet un nombre de division important avant de laisser apparaître un bout franc d'ADN et de déclencher le signal classique de dommage à l'ADN (DNA-Damage Response, DDR). Les cassures doubles brins sont reconnus par le système DDR et induisent la sénescence via les protéines ATM, chk2, p53 (Herbig, Jobling, Chen, Chen, & Sedivy, 2004).

1.1.2 La sénescence prématurée

Cependant, la sénescence peut être aussi déclenchée par d'autres stress, dont la plupart aboutissent aussi à l'activation de la voie des dommages à l'ADN.

1.1.2.1 Les dommages à l'ADN

La présence d'extrémité libre d'ADN induit la cascade de réponses des dommages à l'ADN. L'activation des kinases ATM et ATR va phosphoryler le variant d'histone H2AX. La présence de ce variant d'histone phosphorylé va ensuite être responsable du recrutement de nombreuses protéines permettant d'ouvrir la chromatine, de propager et d'amplifier le signal de dommage à l'ADN. Les médiateurs vont ensuite interagir avec les protéines *checkpoint* du cycle cellulaire, les kinases CHK1 et CHK2. Cela aboutit à l'activation de p53 et des autres effecteurs (Figure 2).

Ces dommages peuvent être causés par des agents génotoxiques, tel l'étoposide (Leontieva & Blagosklonny, 2010), et être utilisé en chimiothérapie pour induire la sénescence dans des cellules cancéreuses (Roninson, 2003). L'exposition des cellules aux irradiations γ (Di Leonardo, Linke, Clarkin, & Wahl, 1994) ou aux UV (Lewis, Yi, Travers, &

Spandau, 2008) peuvent aussi déclencher l'apparition de réponse aux dommages à l'ADN et l'induction de sénescence.

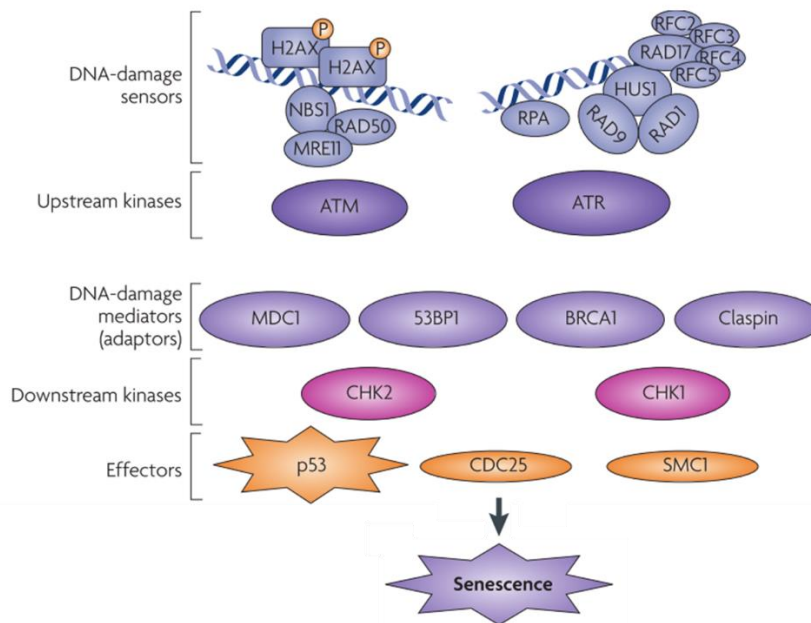


Figure 2 : Les voies de réponses aux dommages à l'ADN

Schéma présentant les mécanismes de détection des dommages à l'ADN et l'induction de sénescence associé. Adaptée de (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

1.1.2.2 Le stress de culture

Des conditions de culture inadéquates peuvent aboutir à une sénescence prématurée (Coppe, Desprez, Krtolica, & Campisi, 2010; Sherr & DePinho, 2000).

On peut citer par exemple des faibles doses de H₂O₂ (Q. Chen & Ames, 1994) comme inducteur de sénescence. Il a été démontré (Parrinello et al., 2003) que diminuer la concentration du dioxygène en culture à des niveaux physiologiques, proche de 5%, permettait d'augmenter le nombre de doublement possible d'une population de fibroblastes murins en diminuant le stress oxydant, aussi capable d'induire la sénescence.

1.1.2.3 La perte de suppresseurs de tumeurs

La perte ou l'inactivation de suppresseurs de tumeurs, tel PTEN (Zhenbang Chen et al., 2005) ou NF1 (Courtois-Cox et al., 2006), peut aussi induire une sénescence prématurée (Figure 3).

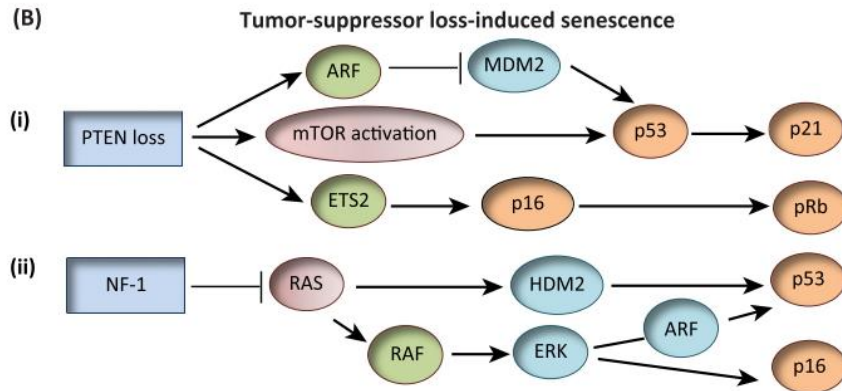


Figure 3 : Voie d'induction de la sénescence par la perte de suppresseur de tumeurs

Représentation des effets de la perte d'un gène suppresseur de tumeur et leurs mécanismes d'induction de sénescence. Adaptée de (Di Mitri & Alimonti, 2016)

1.1.2.4 L'activation d'oncogènes

La sénescence induite par les oncogènes est liée à l'expression d'un gène muté. Ce mécanisme a été mis en évidence pour la première fois après l'expression d'une forme oncogénique de RAS, contrôlant le transfert de signaux mitogènes dans la cellule (Serrano, Lin, McCurrach, Beach, & Lowe, 1997). Plus tard, il a été montré que d'autres membres de la cascade de signalisation des MAPK ont les mêmes propriétés d'induction de sénescence (Jeanblanc et al., 2012; Michaloglou et al., 2005). L'expression de ces gènes permettant normalement la stimulation des voies mitogéniques, la sénescence a été décrite comme un mécanisme de protection de ces cellules contre le risque de transformation oncogénique (Zhenbang Chen et al., 2005) (Figure 4).

Il existe des preuves *in vivo* de la réalité de la sénescence comme mécanisme de protection contre la tumorigénèse : les névi. Ces cellules expriment en majorité la mutation B-RAF^{V600E}, une mutation activant constitutivement la kinase B-RAF, et présentent les caractéristiques des cellules sénescents. Afin d'échapper à ces mécanismes de protections et permettre la transformation vers le mélanome, il est nécessaire que ces cellules acquièrent d'autres mutations (Dankort et al., 2009; McNeal et al., 2015; D. M. Miller & Flaherty, 2014).

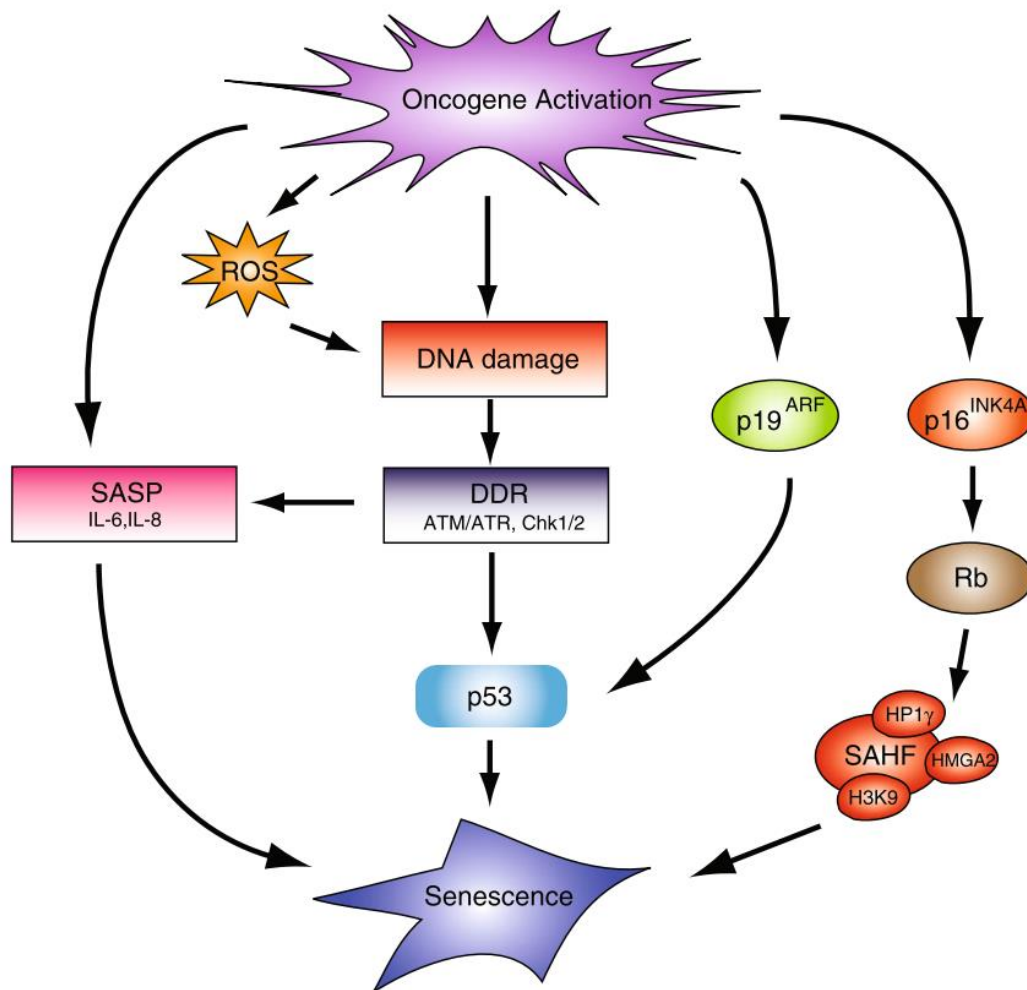


Figure 4 : Modèle d'induction de sénescence après l'activation d'un oncogène

Schéma présentant les différents mécanismes aboutissant à l'induction de sénescence après activation d'un oncogène. L'hyper-réplication induit une accumulation des dommages à l'ADN, aboutissant à la sénescence par les mécanismes classiques des dommages à l'ADN. L'accumulation des ROS active les mêmes mécanismes d'induction de sénescence. On note aussi l'activation de ARF, un régulateur de p53. On observe aussi l'activation de la voie p16-Rb, qui induit la formation de SAHF, pouvant induire la sénescence. Enfin, l'expression du SASP est capable d'induire et de renforcer la sénescence. Tirée de (Reddy & Li, 2011)

1.1.2.5 Les autres inducteurs

Il existe d'autres moyens d'induire la sénescence. Un changement dans l'épigénome, et plus particulièrement dans le niveau d'acétylation des histones, augmenté par l'utilisation de Butyrate de Sodium ou la trichostatine A, conduit à une hyperacétylation provoquant un stress chromatinien. Ce stress sera caractérisé par l'apparition d'un phénotype sénescence. De même, il a été montré qu'une diminution du niveau de HDAC-1 était corrélée avec le nombre de passage de fibroblastes. Il semblerait donc que l'intégrité de l'épigénome et plus spécifiquement les modifications de la chromatine soient impliquées dans l'induction de sénescence (Bandyopadhyay et al., 2002; Place, Noonan, & Giardina, 2005).

Plusieurs études ont montrées que la présence de composés inflammatoires comme IL6, IL8, IGFBP7, IFN- β ou TGF- β étaient capable d'induire la sénescence de façon paracrine (Acosta et al., 2013; Moiseeva, Mallette, Mukhopadhyay, Moores, & Ferbeyre, 2006; Reimann et al., 2010)

1.2 Caractéristiques

Il est très difficile de définir une liste de caractéristiques communes aux cellules sénescents. De la même façon, il est difficile de caractériser une cellule sénescence étant donné que les caractéristiques peuvent varier. Aujourd'hui, il n'existe pas une caractéristique unique permettant de qualifier une cellule l'arborant comme sénescence. Afin d'être capable d'identifier avec précision une cellule sénescence, on considère que des cellules présentant plusieurs combinaisons de caractéristiques présentées ci-après sont sénescents.

Comme nous l'avons vu précédemment, il existe un grand nombre d'inducteurs de sénescence, dépendant d'un grand nombre de voies. De la même façon, il existe un nombre important de caractéristiques, certaines étant liées au type d'inducteur de sénescence, tandis que d'autres sont plus universelles (Figure 5).

1.2.1 L'arrêt du cycle cellulaire est le marqueur universel des cellules sénescents.

Parmi les marqueurs de la sénescence, il faut dans un premier temps insister sur l'arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt est définitif et est considéré comme le seul marqueur universel de la sénescence. En effet, le nombre élevé d'inducteur de sénescence, associé aux nombreux types cellulaires pouvant devenir sénescents induit logiquement un grand nombre de réponses et de marqueurs différents.

1.2.2 Augmentation des CDKN du loci INK4 et de la voie p53/pRB

L'arrêt du cycle cellulaire est couplé avec l'activation des réseaux de signalisation suppresseurs de tumeurs, p53 et CDKN2A/p16 (Beauséjour et al., 2003). L'expression de p16, elle aussi dépendante du signal et du type cellulaire, est considérée comme un marqueur de sénescence. Dans des cellules normales, l'expression de p16 est faible ou nulle. L'activation de p16 aboutit à l'inhibition de la prolifération via l'activation de la protéine pRB.

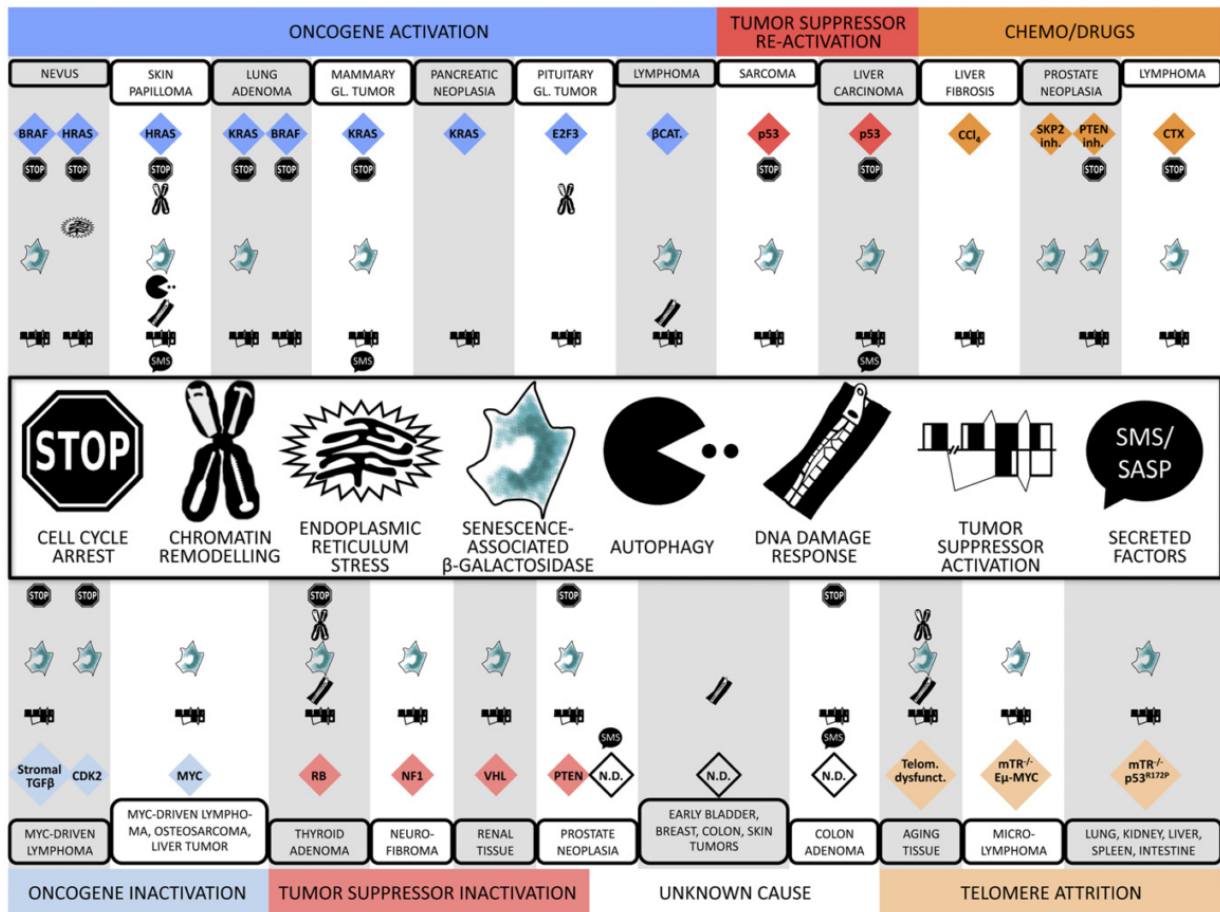


Figure 5 : Différents inducteurs et différentes caractéristiques

Les marqueurs de sénescence détectés *in vivo* dans des lésions néoplasiques humaines et murines. Les grandes familles de stress permettant l'induction de sénescences sont regroupées par couleur. Puis dans chaque famille on retrouvera les différences selon les tissus, les stress spécifiques et enfin les biomarqueurs, dont la légende est présente au milieu du schéma.

Adaptée de (Kuilman, Michaloglou, Mooi, & Peeper, 2010)

1.2.3 Modification de la chromatine : SAHF

L'induction de la sénescence peut aussi induire un remodelage de la chromatine, qui va permettre l'inhibition de gènes pro-prolifératifs (Narita et al., 2003) au sein de foyers ponctuels d'hétérochromatine, appelé SAHF (Senescence Associated Heterochromatine Foci). Les SAHF sont formés par un repositionnement tridimensionnel de la chromatine, qui se réorganise en couches concentriques avec au centre des histones H3-K9me3, puis H3-k27me3 puis H3-k36me3, sans qu'il soit observé de redistribution majeure de ces marques le long des chromosomes (Chandra et al., 2013) et (Figure 6)

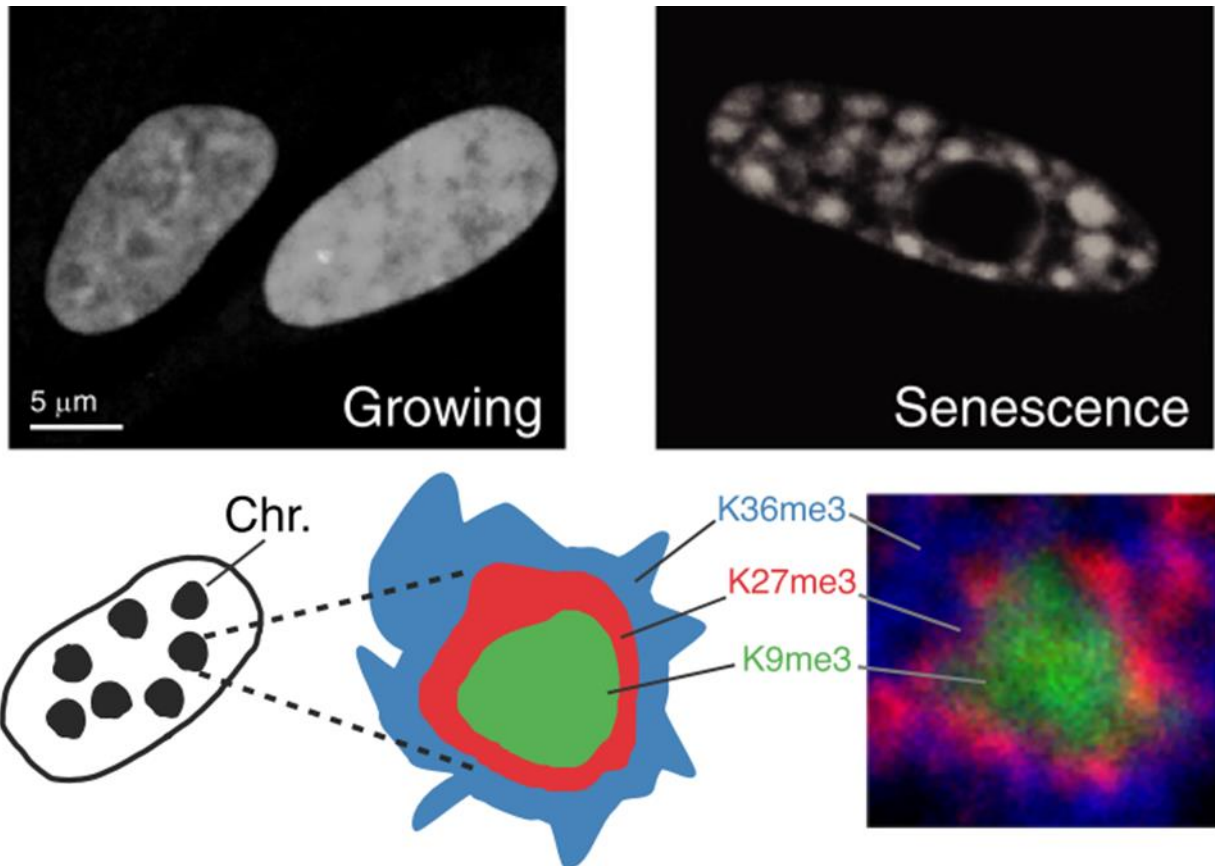


Figure 6 : Formation et composition des SAHF

En haut : Immunofluorescence présentant les foyers d'hétérochromatine induit en sénescence.

En bas : Composition des différentes marques d'histones dans les SAHF avec au centre H3K9me3, marque de l'hétérochromatine constitutive (en vert), puis des marques H3K27me3 correspondant à l'hétérochromatine facultative (en rouge) et enfin autour, des marques spécifiques de l'euchromatine, H3K36me3 (en bleu).

Tirée de (Chandra et al., 2015; Chandra & Kirschner, 2016)

1.2.4 DNA SCARS

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence de dommages à l'ADN persistants peut induire la sénescence. Les DNA-SCARS (DNA Segments with Chromatin Alteration Reinforcing Senescence) contiennent un grand nombre de marqueurs des foyers de dommages à l'ADN, tel que 53BP1, phospho-ATM ou phospho-CHK2, et des corps PML (Rodier et al., 2011). La composition de ces foyers est différente de ceux se formant juste après les dommages.

1.2.5 Activité SA-β-Galactosidase

Un des premiers marqueurs de sénescence à avoir été identifié est l'expression de Senescence Associated-β-galactosidase (Dimri et al., 1995). Cette augmentation d'activité est liée à l'augmentation de la masse lysosomale. Cette activité a permis de mettre en

évidence la présence de cellules sénescentes *in vivo*, et montrer une accumulation de cellules sénescents avec l'âge (Figure 7).

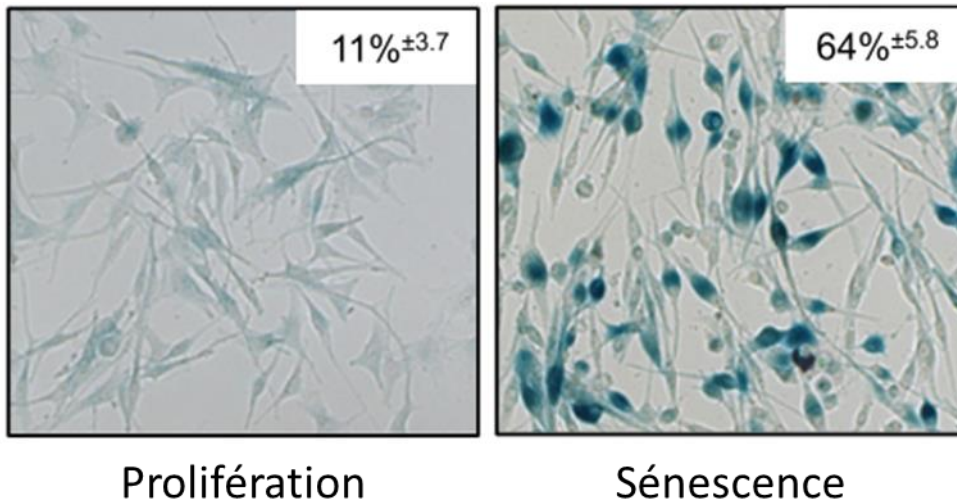


Figure 7 : Cellules sénescents positives au test SA- β -Galactosidase

Microscopie présentant la différence d'intensité de signal entre des cellules en prolifération et des cellules sénescents.
Adaptée de (Vredevelde et al., 2012)

Cependant ce marqueur est aussi identifié dans des cellules quiescentes, dans certaines conditions de culture liées par exemple à une confluence très élevée, mais aussi dans le processus de maturation des macrophages (Brusker, Rhodes, & Goldman, 1982; Hall et al., 2016; Holt & Grainger, 2012; Kurz, Decary, Hong, & Erusalimsky, 2000; Yegorov, Akimov, Hass, Zelenin, & Prudovsky, 1998). Ainsi, malgré le fait qu'il y a plus de 20 ans on pensait avoir découvert un marqueur spécifique de la sénescence, les expériences récentes ont montré qu'il n'était pas, seul, un marqueur fiable pour définir une cellule comme étant sénescence.

1.2.6 Modification morphologique

Parmi les changements visibles lié à la sénescence, on observe une modification de la morphologie des cellules, qui varie selon l'inducteur de sénescence. Les cellules peuvent présenter différents profils, avec par exemple des cellules étalées, plates et multinucléées pour des cellules induites en sénescences par H-Ras^{val12}, le stress oxydant ou des dommages à l'ADN (Q. Chen & Ames, 1994; Parrinello et al., 2003; Serrano et al., 1997) ou des cellules fusiforme après l'expression de B-RAF^{V600E} ou la répression de p400 (Chan, Narita, Lowe, & Livingston, 2005; Michaloglou et al., 2005).

1.2.7 Modification transcriptomique

L'arrêt du cycle cellulaire entraîne, de façon inéluctable, une modification du transcriptome. On note entre autre la répression de E2F1 et d'autres gènes permettant la progression des cellules dans le cycle cellulaire comme les cyclines, c-Fos, ... (Mason, Jackson, & Lin, 2004). On observe aussi la dérégulation des CKI CDKN2A et CDKN1A.

Cette modification ne touche cependant pas que des gènes liés au cycle cellulaire et à l'arrêt de prolifération. On trouve aussi un grand nombre de microARNs régulé lors de l'entrée en sénescence (Bischof & Martínez-Zamudio, 2015; Noren Hooten et al., 2010). Ces microARNs peuvent moduler un grand nombre de processus cellulaires, comme la répression du cycle cellulaire par miR-21 (Benhamed, Herbig, Ye, Dejean, & Bischof, 2012; Dellago et al., 2013) ou le contrôle des gènes de l'inflammation (Olivieri et al., 2013)

Un grand nombre de cellules sénescents surexpriment des gènes codants pour des protéines secrétées (Kuilman & Peeper, 2009; Trougakos, Saridaki, Panayotou, & Gonos, 2006), que l'on détaillera de façon plus complète dans le paragraphe suivant.

1.2.8 SASP

Les cellules sénescents secrètent des centaines de composés parmi lesquels on trouve des composés pro-inflammatoire tels les cytokines, chimiokines, des facteurs de croissance ou des protéases (Coppe et al., 2010; Kuilman & Peeper, 2009). L'ensemble de ces composés est appelé généralement SASP pour Senescence Associated Secretory Phenotype, mais on trouve aussi parfois l'appellation SMS (Senescence-Messaging Secretome).

1.2.8.1 Régulation du SASP

Le SASP est une combinaison de plusieurs composés, exprimés différemment selon le type cellulaire et l'inducteur de sénescence. Cependant, certains mécanismes par lesquels l'expression et la sécrétion de ces différents composés peuvent être partagés. NF- κ B est le régulateur majeur des éléments du SASP (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008). Plusieurs voies sont impliquées dans l'induction du SASP telles que les dommages à l'ADN (Rodier et al., 2009), l'activation de la voie mTOR (Laberge et al., 2015) ou de p38-MAPK (Freund, Patil, & Campisi, 2011). En 2017, deux équipes différentes ont identifié cGAS/STING comme pouvant être responsable de l'expression des gènes du SASP (Dou et al., 2017; Glück et al., 2017). Le complexe cGAS/STING est un composant du système

immunitaire inné permettant la détection d'ADN cytosolique et le déclenchement de la réponse inflammatoire via la stimulation des gènes interférons (Stimulation of INterferon Genes).

1.2.8.2 Rôle du SASP

Les protéines exprimées par le SASP vont, dans un premier temps, recruter des cellules du système immunitaire inné et adaptatif afin d'éliminer les cellules sénescentes et jouent ainsi un rôle suppresseur de tumeurs (T.-W. Kang et al., 2011; Xue et al., 2007). Le SASP recrute des macrophages permettant alors la cicatrisation (Krizhanovsky et al., 2008). Dans le même temps, des MMP (MétalloProtéinase Matricielle) sont secrétées et réalisent la dégradation des plaques fibrotiques, permettant un meilleur pronostic dans les fibroses hépatiques et la régénération (DeMaria et al., 2014; Krizhanovsky et al., 2008). Une publication récente fait état du rôle pléiotropique antagoniste du SASP (Ritschka et al., 2017). Une exposition aigüe au SASP déclenche une augmentation de l'expression des marqueurs de cellules souches et de régénération *in vivo*.

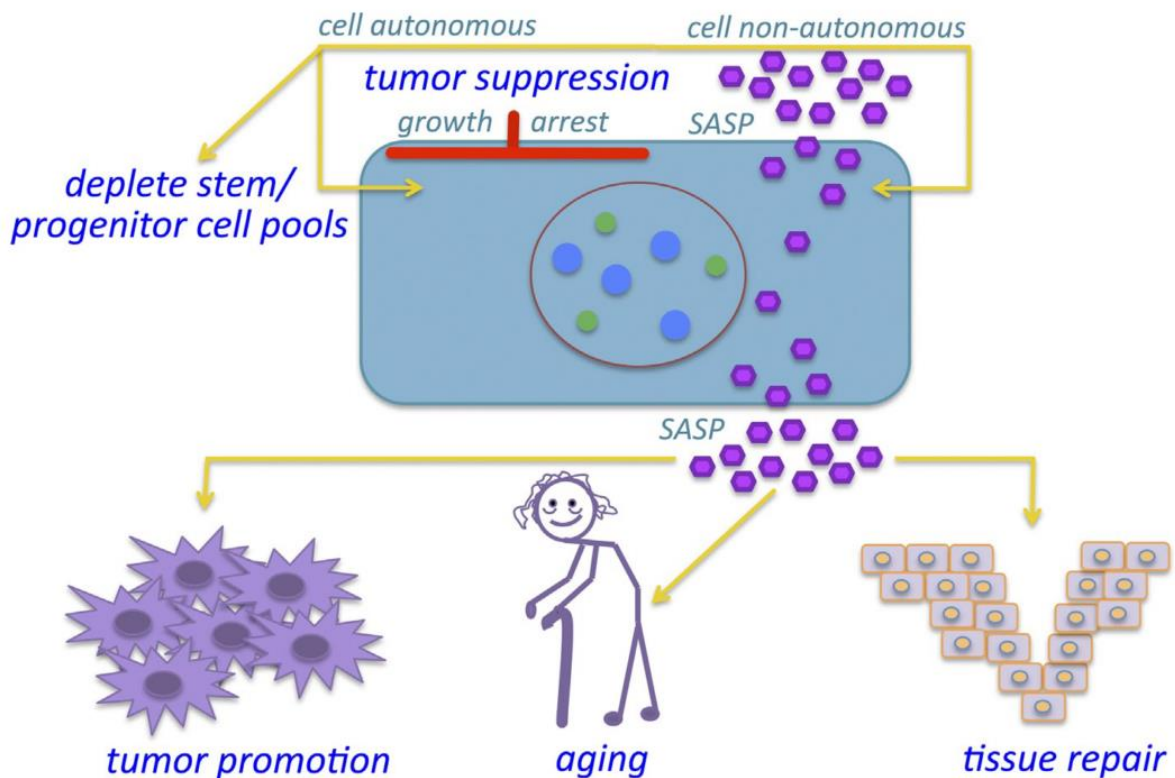


Figure 8 : Les différents effets du SASP au cours du temps

Présentation des effets du SASP sur l'arrêt de la prolifération et la déplétion du stock de cellules souches. Les composants du SASP peuvent aussi promouvoir la tumorigénèse, favoriser la cicatrisation et contribuer à l'apparition des signes du vieillissement.

Tirée de (Rodier & Campisi, 2011)

L'exposition prolongée des cellules à ce cocktail de composés inflammatoires est délétère. Il permet de renforcer la sénescence dans les cellules, en particulier à l'aide d'IL6, IL8, GRO α et IGBP7 (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008; Wajapeyee, Serra, Zhu, Mahalingam, & Green, 2008), dans un phénomène nommé la sénescence autocrine. Cependant ces composés sont aussi responsables de l'induction de sénescence dans les cellules environnantes, phénomène nommé sénescence paracrine (Acosta et al., 2013). De manière surprenante, le recrutement par le SASP de cellules myéloïdes immatures ne permet pas l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire dans le cas de cancer de la prostate et de cancer du foie (Di Mitri & Alimonti, 2016; Eggert et al., 2016). La présence continue de composés inflammatoires dans l'environnement tumorale favorise l'angiogenèse (Coppe, Kauser, Campisi, & Beauséjour, 2006; Eyman, Damodarasamy, Plymate, & Reed, 2009) et la croissance tumorale (Krtolica, Parrinello, Lockett, Desprez, & Campisi, 2001; Pazolli et al., 2009) (Figure 8).

De récentes publications ont montrées que l'élimination spécifique des cellules sénescents dans des organes âgés tel que le rein, le cœur, la rate, le foie ou les poumons permettait une diminution de deux marqueurs chroniques de l'inflammation IL6 et IL8 (Baar et al., 2017; Baker et al., 2016).

1.2.9 Résistance à l'apoptose

Les cellules sénescents présentent une résistance à l'apoptose (Gansauge et al., 1997; E. Wang, 1995). Les mécanismes de résistance des cellules sénescents à la mort cellulaire par apoptose dépendent de la caspase-3 ou de Bcl-2 (Crescenzi, Palumbo, & Brady, 2003; Marcotte, Lacelle, & Wang, 2004; Rebbaa, Zheng, Chou, & Mirkin, 2003; Ryu, Oh, & Park, 2007). L'apoptose est un mécanisme d'autodestruction cellulaire en réponse à un signal spécifique. Étant donné que l'on observe une accumulation de cellules sénescents avec l'âge et qu'elles sont, de plus, résistantes à l'apoptose, cela renforce l'idée que les cellules sénescents assurent une fonction essentielle *in vivo*.

1.2.10 Histone H2A.J

Une publication récente du laboratoire a mis en évidence l'accumulation d'un variant d'histone spécifique à l'induction de sénescence en présence de dommages persistants à l'ADN (Contrepois et al., 2017). L'accumulation de H2A.J a aussi été observée chez les souris âgées de manière tissu-dépendante, ainsi que dans la peau humaine. La présence

de ce variant d'histone semble être lié à l'expression des gènes d'inflammation du SASP, permettant ainsi le guidage vers les cellules sénescents pour le système immunitaire et pouvant aussi contribuer à l'inflammation chronique et au développement de pathologies associées à l'âge.

1.3 Rôle de la sénescence *in vivo*

La sénescence a certes été observée au départ *in vitro*, mais depuis maintenant de nombreuses années il existe des évidences de la présence de cellules sénescents *in vivo*, et des indications des rôles variés de ces cellules. Deux rôles positifs pour la sénescence cellulaire concerne le remodelage des tissus lors de l'embryogénèse (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013) et un rôle dans la cicatrisation des blessures (Jun & Lau, 2010b, 2010a; Krizhanovsky et al., 2008). La sénescence cellulaire est aussi impliquée dans le développement de nombreuses pathologies, souvent liées au vieillissement, que nous décrivons ci-dessous.

1.3.1 Rein

Avec l'âge, on observe une réduction du débit de filtration glomérulaire qui aboutit à une glomérulopathie et une atrophie des néphrons. Les reins sont alors incapables de soutenir leurs fonctions normales. Ces pathologies sont associées à une augmentation de l'expression de p16^{INK4A} et p53 (Melk et al., 2003, 2004). Des études ont montré que la sénescence avait des effets délétères sur un grand nombre de pathologie rénales (Sturmlechner, Durik, Sieben, Baker, & van Deursen, 2017). L'élimination des cellules sénescents induit un meilleur pronostic pour les glomérulopathie et améliore les fonctions rénales chez les souris âgées (Baker et al., 2016).

1.3.2 Diabète de type II

Le diabète de type II est une pathologie dont le développement est souvent tardif. Des études *genome wide* ont pu corrélés des variants du loci INK4 chez des patients atteints de diabète de type II, permettant de suggérer un effet de la sénescence (Jeck, Siebold, & Sharpless, 2012; Zeggini et al., 2007). On a observé une augmentation de différents marqueurs de sénescence mais aussi de IL1 β dans les ilots β chez les souris âgées (Dinarello, Donath, & Mandrup-Poulsen, 2010; Sone & Kagawa, 2005). Cependant, malgré le déclin observé de régénération et la prédisposition au diabète après surexpression de

p16^{INK4A} dans les îlots β , ils sécrètent plus d'insuline, ne fournissant pas d'explication évidente sur la façon dont les cellules sénescents contribuent au développement du diabète du type II (H. Chen et al., 2009; Helman et al., 2016; Krishnamurthy et al., 2006).

1.3.3 Fibrose pulmonaire idiopathique

La fibrose est une condition dans laquelle on observe une accumulation de protéines de la matrice extracellulaire, tel le collagène, aboutissant à une scarification et une dysfonction des tissus. Dans le cadre de cette pathologie, la sénescence peut avoir des effets bénéfiques, en effet, l'expression des protéines du SASP, et plus précisément certaines MMP vont réduire les plaques fibrotiques et restaurer la fonction normale des tissus dans le cas des fibroses du foie (Craig, Zhang, Hagood, & Owen, 2015; Krizhanovsky et al., 2008). Dans les cas de fibroses pulmonaires, la sénescence présente des effets profibrotiques (Hecker et al., 2014; Lehmann et al., 2017) avec par exemple dans un modèle murin, l'élimination des cellules sénescents qui a permis d'observer une diminution de l'expression des composés du SASP profibrotique et une amélioration des fonctions pulmonaires (Schafer et al., 2017). De manière surprenante, on observe une accumulation de cellules exprimant p21 et positives pour SA- β -Gal dans les tissus de patients atteint de fibrose pulmonaire idiopathique, liant cette pathologie avec la présence de cellules sénescents (Schafer et al., 2017; Yanai et al., 2015).

1.3.4 Stéatose hépatique non alcoolique

La stéatose hépatique non alcoolique (SHNA) et les fibroses hépatiques aboutissent à des cirrhoses ne permettant pas la fonction normale de l'organe, qui est alors caractérisée par l'accumulation de lipides dans les hépatocytes (Hardy, Oakley, Anstee, & Day, 2016; Pellicoro, Ramachandran, Iredale, & Fallowfield, 2014). Le lien entre sénescence et fibroses hépatiques ou cirrhoses a déjà été mis en évidence (K.-H. Kim, Chen, Monzon, & Lau, 2013; Wiemann et al., 2002). On observe une augmentation de la prévalence des SHNA avec l'âge (Hardy et al., 2016) et la pathologie peut même être prédite par la présence d'hépatocytes sénescents (Pellicoro et al., 2014). Cependant, le *knock-out* de p16 et p53, deux effecteurs principaux de la sénescence induit une augmentation de la fibrose hépatique, ce qui semble indiquer que le rôle de la sénescence dans le foie est complexe et que l'absence de cellules sénescents peut aussi être délétère (Krizhanovsky et al., 2008). De plus, comme nous venons de le voir au chapitre précédent, l'expression du SASP

induit une augmentation des MMP dans la matrice extracellulaire et donc l'inhibition des plaques fibrotiques (Krizhanovsky et al., 2008).

1.3.5 Système cardiovasculaire

Le risque de développer une pathologie cardiovasculaire augmente avec l'âge. Dans le cas de l'athérosclérose, on a observé qu'une élimination des cellules sénescentes conduisait à une diminution de la formation du nombre de plaques et leurs progressions (Childs et al., 2016). Cela montre donc l'effet délétère de la sénescence sur cette pathologie. De plus, des cellules sénescentes ont été identifiées initialement au niveau des plaques d'athérosclérose (Uryga & Bennett, 2016), renforçant l'hypothèse selon laquelle la sénescence renforce ou induit la formation d'athérosclérose.

1.3.6 Système immunitaire

Comme nous l'avons vu, les cellules sénescentes interagissent grandement avec le système immunitaire, en le stimulant ou en attirant ses représentants. Il est aussi à noter qu'on observe en vieillissant une diminution des capacités du système immunitaire. Cela est dû majoritairement au fonctionnement diminué des cellules souches hématopoïétiques (Chang et al., 2017) : l'accumulation de cellules souches hématopoïétiques sénescentes avec l'âge induit une diminution de la capacité de formation des cellules myéloïdes et des cellules lymphoïdes, essentiels au bon fonctionnement du système immunitaire. Des expériences d'échappement de sénescence des cellules souches hématopoïétique ont montré des capacités de rajeunissement de ces cellules, augmentant alors la capacité de division du pool de cellules souches (Chang et al., 2017). La suppression des cellules souches hématopoïétiques sénescentes a permis de restaurer une fonction normale de l'ensemble de cellules souches hématopoïétiques et a accru au final le nombre de myéloïdes, lymphocyte B et T, restaurant les fonctions du système immunitaire de souris âgées ou irradiées (Chang et al., 2017)

1.3.7 Cachexie liée à l'âge

La perte de masse musculaire et grasseuse est un problème fréquent chez les personnes âgées, aboutissant à la cachexie. L'élimination de cellules sénescentes chez la souris est accompagnée d'une augmentation de la masse de tissus adipeux ainsi que d'une perte de poids limitée chez les individus âgés (Baker et al., 2016). De même, l'échappement de sénescence ou l'élimination de cellules sénescentes permet de

restaurer le tissu adipeux beige et l'adipogénèse, et une amélioration des fonctions métaboliques chez les souris âgées (Berry et al., 2017; Xu et al., 2015). La sénescence semble donc prévenir la différenciation adipocytaire et induire un mauvais fonctionnement métabolique, ainsi qu'une perte de capacité d'adaptation au froid.

1.3.8 Cancer

Le rôle de la sénescence pour empêcher le développement d'un cancer est conceptuellement évident. L'arrêt définitif de la prolifération, suivant l'activation d'un oncogène ou à la suite de dommages à l'ADN, doit permettre d'empêcher la division de cellules exprimant un oncogène activé ou portant des mutations trop nombreuses. La sénescence agit donc comme mécanisme suppresseur de tumeurs limitant l'initiation de cancer aussi bien de façon directe ou indirecte (Collado & Serrano, 2010; T.-W. Kang et al., 2011).

Cependant, la sénescence peut aussi augmenter le potentiel de prolifération des cellules cancéreuses et contribuer à la transition épithélio-mésenchymateuse, ce qui rend les cellules invasives et favorise donc l'apparition de métastases (Coppe et al., 2008; Krtolica et al., 2001). Des effets délétères du SASP dans les tissus âgés ont aussi été observés, permettant alors une niche de croissance pour le développement des cancers (Coppe et al., 2010). Pour la plupart des cancers, la prévalence augmente avec l'âge, et on peut formuler l'hypothèse que l'accumulation de cellules sénescents avec le vieillissement crée un terreau fertile pour le développement des tumeurs. Il faut aussi souligner que l'augmentation de l'âge des patients semble corrélée avec une diminution du taux de survie des patients atteint de cancer (De Magalhães, 2013).

Dans le cas des cancers, une fois encore l'élimination de cellules sénescents permet d'observer des bénéfices importants. On peut alors observer un retard de formation des tumeurs chez la souris (Baker et al., 2016) mais aussi une réduction de la fréquence d'apparition des métastases (DeMaria et al., 2016).

Les cas des mélanomes et des névi seront traités séparément dans le chapitre 4.

2. Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes qui tirent leur nom de leur capacité à réguler le métabolisme du **glucose**, leur synthèse dans le **cortex** surrénal et leur structure stéroïdiennes (A. R. Clark & Belvisi, 2012).

La synthèse des glucocorticoïdes *in vivo* est sous le contrôle du cycle circadien et a pour origine le cholestérol. L'hormone ainsi produite est le cortisol, dont la stimulation est régulée par l'adrénocorticotrophine, sécrétée par l'hypophyse, nommé axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS ou HPA en anglais) (Biddie, Conway-campbell, & Lightman, 2012). L'activation du cortisol se fait à l'aide de 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD) (Figure 9)

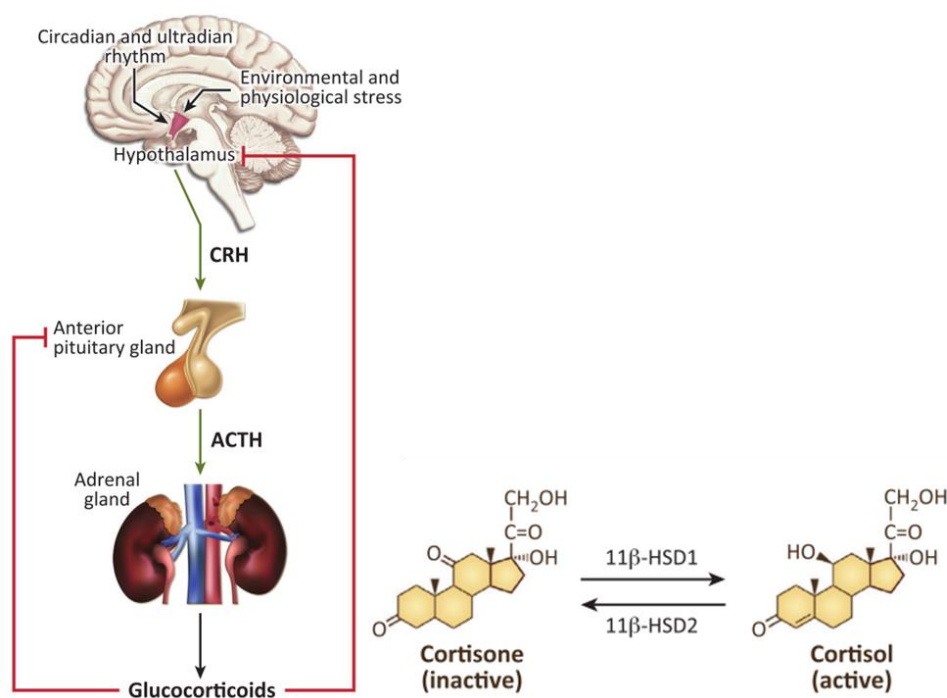


Figure 9 : Axe HHS et activation du cortisol

Schéma représentant l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) permettant la synthèse du cortisone, et l'enzyme permettant la réduction/oxydation afin de permettre l'activation/inactivation du glucocorticoïdes.

Tirée de (Kadmiel & Cidlowski, 2013)

La dérégulation du niveau de glucocorticoïdes aboutit à deux maladies, le syndrome de Cushing et la maladie d'Addison, respectivement liées à une élévation et à une diminution des niveaux de glucocorticoïdes.

L'usage des glucocorticoïdes en médecine remonte à la fin des années 40 quand Philip Hench a traité avec succès les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde à l'aide de

cortisone. Cette découverte lui a permis d'obtenir, avec Edward Calvin Kendall et Tadeusz Reichstein, le prix Nobel de physiologie ou médecine « pour leurs découvertes sur les hormones du cortex des glandes surrénales, leur structure et leurs effets biologiques » en 1950 (Baschant, Lane, & Tuckermann, 2012; Buttgereit, 2012). Aujourd'hui, l'usage des glucocorticoïdes est extrêmement répandu. Ils sont utilisés aussi bien pour leurs propriétés antiinflammatoires dans le cas d'asthme, d'infection cutanée, que pour leurs propriétés immunosuppressives nécessaire au traitement de patient greffés. Leur usage est aussi répandu dans le cas de traitement contre le cancer, grâce à leurs activités antiprolifératives et anti-angiogéniques (Vilasco et al., 2011).

2.1 Mécanismes d'actions

Les glucocorticoïdes exercent leurs fonctions par l'intermédiaire du récepteur des glucocorticoïdes (GR). Le gène NR3C1 est transcrit puis traduit en deux isoformes principaux : une forme GR β située exclusivement dans le noyau et jouant le rôle de d'inhibiteur dominant négatif de la forme GR α (de Castro et al., 1996) et une forme GR α qui est quant à elle séquestrée dans le cytoplasme en absence de ligand à l'aide de protéine chaperonnes. En présence de ligand, la forme GR α est transloquée dans le noyau afin d'y exercer ses mécanismes d'actions génomiques. Des mécanismes d'actions non génomiques ont aussi été décrits (Figure 10).

2.1.1 Actions Génomiques

Une fois la forme active du récepteur associée au ligand présente dans le noyau, on distingue alors 4 mécanismes impactant la transcription et la synthèse de protéines.

- Le premier mécanisme décrit est celui du « simple GRE ». Le récepteur des glucocorticoïdes (GR), s'homodimérise, puis se fixe sur une séquence palindromique imparfaite de deux séquences de 6 paires de bases reliées par une séquence linker de 3 paires de bases, la Glucocorticoid-Response Element (GRE). Il existe un grand nombre de variations de séquences GRE aboutissant à une variabilité dans la transcription (Meijsing et al., 2009). Ce mécanisme est connu pour réguler positivement l'expression des gènes. On retrouve parmi les gènes activés par le GR : GiLZ, SGK1 et DUSP1 (Barnes, 2011; Itani, Liu, Cornish, Campbell, & Thomas, 2002; J.-C. Wang et al., 2004). L'activation de l'expression des gènes se fait via le recrutement de coactivateur et de facteur de remodelage chromatinien (Lonard & O'Malley, 2007; Oakley & Cidlowski, 2011). La fixation

du récepteur activé des glucocorticoïdes sur un « half GRE », ne permettant la fixation que d'un récepteur monomérique, a été démontré dans le cas de l'expression de TTP. TTP est une protéine se fixant sur les régions 3'UTR (Untranslated Region) riche en ARE (AU-Rich Element) de l'ARNm de certaines cytokines afin d'en favoriser la dégradation (Smoak & Cidlowski, 2006).

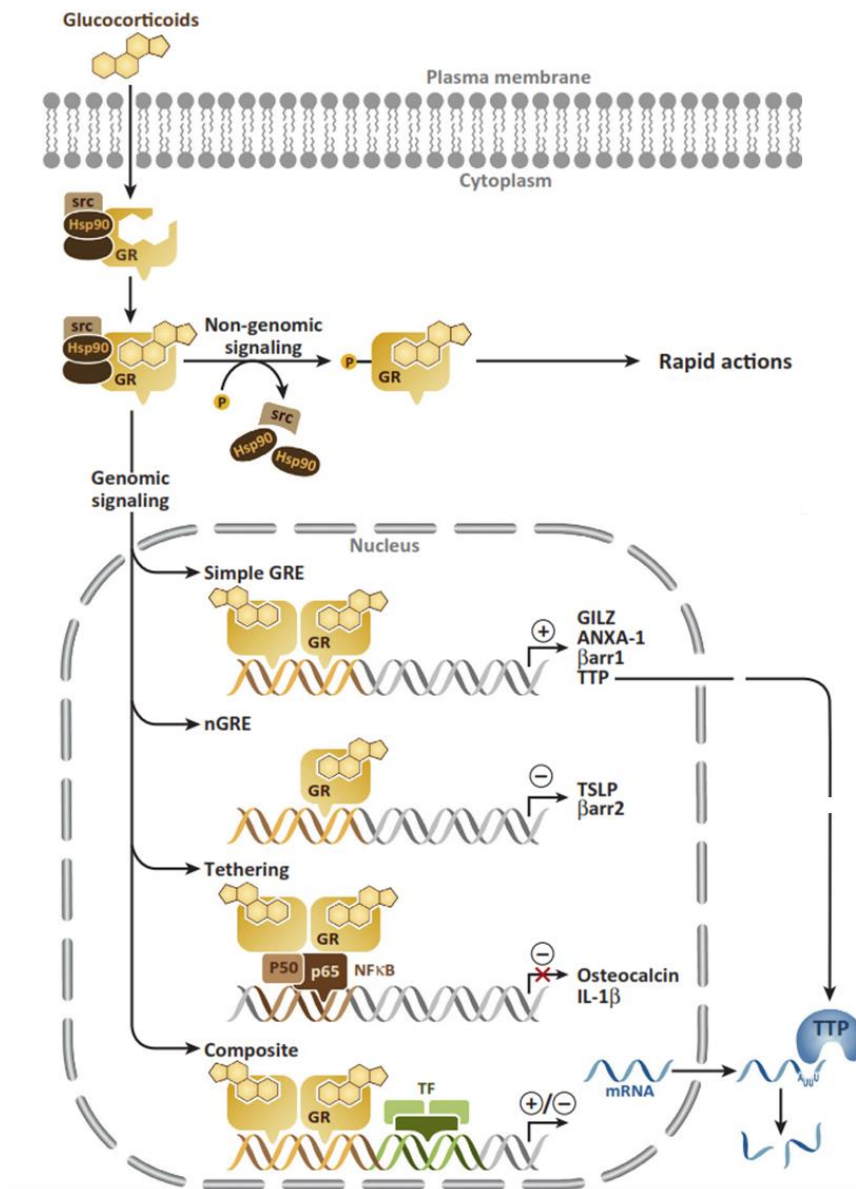


Figure 10 : Mécanismes d'actions des glucocorticoïdes

En présence de glucocorticoïdes, le récepteur cytoplasmique change de conformation, se dissocie de ses chaperonnes et transloque dans le noyau où il va exercer ses actions génomiques. Il est capable de se lier de façon directe au génome sur le simple ou negative GRE, en s'associant à d'autres facteurs de transcriptions, ou dans un mécanisme composite où il est présent sur un GRE et interagit dans le même temps avec d'autres facteurs de transcriptions.

Tirée de (Kadmiel & Cidlowski, 2013)

- Un autre mécanisme décrit est celui dit « nGRE » pour negative Glucocorticoid-Response Elements. Ici, on retrouvera une séquence unique permettant uniquement la

fixation d'un récepteur seul, la dimérisation étant défavorable à la fixation du récepteur (Hudson, Youn, & Ortlund, 2013; Surjit et al., 2011).

- Le mécanisme d'action « composite » du récepteur des glucocorticoïdes est décrit lorsque l'on trouve un domaine GRE à proximité d'une séquence de fixation spécifique d'un autre facteur de transcription. On peut ici citer en exemple la fixation de GR à proximité du facteur de transcription Oct1 sur le promoteur de MMTP aboutissant à un effet synergique ou la combinaison de GR et CREB sur le promoteur de la somatostatine (Olivier Kassel & Herrlich, 2007). La fixation de GR à proximité de AP1 sur le promoteur de Notch4 aboutit ici à une surexpression (J. Wu & Bresnick, 2007). Il faut néanmoins noter que dans le cas du mécanisme « composite », les gènes peuvent être up ou down régulés par la fixation du GR. On peut parler ici de la fixation de GR sur le promoteur du gène CRH qui induit une diminution de l'expression du gène. Cette répression est liée à la présence simultanée de AP1 et de GR sur le promoteur (Malkoski & Dorin, 1999).

- Le dernier mécanisme d'action des glucocorticoïdes présenté ici est décrit comme « tethering ». Dans ce mécanisme, on trouve une interaction entre le GR et un autre facteur de transcription, tel AP1, NF- κ B ou STAT3 (Olivier Kassel & Herrlich, 2007). Ce mécanisme aboutit à l'inhibition de l'expression des gènes cibles de ces facteurs de transcription, ces derniers se retrouvant alors incapable de recruter la machinerie d'initiation de la transcription. On retrouve ce mécanisme lors de la suppression de l'inflammation dans le cas d'asthme ou de maladie pulmonaire obstructive chronique (Rhen & Cidlowski, 2005). Une différence essentielle entre « tethering » et « composite » est que dans le cas du tethering, il n'est pas nécessaire que la séquence d'ADN comporte un GRE.

2.1.2 Action Non-Génomiques

Les effets de régulation non-génomiques du GR sont encore aujourd'hui assez mal décrits. Ces actions semblent être médiées par une forme de GR membranaire ou cytoplasmique aboutissant à l'activation de la voie MAPK (Ayroldi et al., 2012; Busillo & Cidlowski, 2013). Ces actions rapides et non-génomiques ont été décrites dans plusieurs types tissulaire, cardiovasculaire, immunitaire ou neuroendocrine (Ayroldi et al., 2012; Bellavance & Rivest, 2012; S. R. Lee et al., 2012).

2.2 Effets *in vivo* et en médecine humaine

L'expression du récepteur des glucocorticoïdes est quasi ubiquitaire (Oakley & Cidlowski, 2011). Les glucocorticoïdes présentent des actions anti-inflammatoire, antiproliférative, pro-apoptotique, anti-angiogénèse, ce qui explique leur efficacité importante dans le traitement de nombreuses pathologies mais aussi le rôle des glucocorticoïdes dans un grand nombre de mécanismes *in vivo* :

2.2.1 Effets sur le métabolisme du glucose et le fonctionnement du foie

Comme leur nom l'indique, les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans le métabolisme du glucose. En situation de faim ou d'exercice, différentes voies sont stimulées afin d'augmenter et de maintenir les concentrations de glucose dans le sang à un niveau normal. Les glucocorticoïdes permettent la stimulation de la néoglucogénèse et de la glycogénolyse dans le foie. En cas de concentration trop élevée de glucocorticoïdes, dans le cas de la maladie de Cushing par exemple, on observe alors de l'obésité, de l'hyperglycémie, de l'hypercholestérolémie et une stéatose hépatique. Dans le cas d'une concentration trop faible de glucocorticoïdes, observée dans la maladie d'Addison, les symptômes sont une perte d'appétit, une décoloration de la peau et une hypoglycémie (Rose, Vegiopoulos, & Herzig, 2010). Ces effets confirment donc les effets des glucocorticoïdes dans la synthèse du glucose.

2.2.2 Effets respiratoires et cardiovasculaires

En absence de récepteur des glucocorticoïdes, les souris meurent rapidement après la naissance, avec un déficit de développement pulmonaire (Cole et al., 1995; Harris & Seckl, 2011; Manwani et al., 2010; Tronche et al., 1999). L'utilisation de glucocorticoïdes est fréquente en cas de risque d'accouchement prématuré afin d'accélérer la maturation des poumons (Roberts, Brown, Medley, & Dalziel, 2017).

Dans les cas d'asthmes, les traitements par les glucocorticoïdes inhalés sont fréquents afin de réduire l'inflammation en inhibant les voies activées par les facteurs de transcription NF- κ B et AP1, limitant ainsi la production et sécrétion de cytokines, chimiokines et de molécules d'adhésion dans l'épithélium des voies respiratoires.

Les glucocorticoïdes semblent avoir une influence sur les risques de développement de maladies cardiovasculaires, des niveaux élevés semblant augmenter les risques (Pimenta, Wolley, & Stowasser, 2012). Les patients atteints de la maladie de Cushing à la

suite d'un traitement chronique par les glucocorticoïdes présentent des risques plus élevés de développer des maladies cardiovasculaires que la population non traitée par les glucocorticoïdes (Fardet, Petersen, & Nazareth, 2012).

2.2.3 Effets musculosquelettiques

Comme nous l'avons vu, les effets des glucocorticoïdes en médecine ont été initialement démontrés dans le cas de traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Cependant, les traitements prolongés chez les personnes âgées peuvent aboutir à des cas d'ostéoporose. Le GR est nécessaire à la résorption osseuse via RANKL/OPG et la voie Wnt (Bultink, Baden, & Lems, 2013; Henneicke et al., 2011). Des études ont aussi montré qu'une modulation de l'activation de la voie MAPK via l'expression de DUSP1 était responsable de l'arrêt de prolifération des ostéoblastes (Engelbrecht et al., 2003) et que l'activation de p53 par les glucocorticoïdes aboutissait à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose des ostéoblastes (H. Li et al., 2012). Les glucocorticoïdes sont aussi responsables de l'inhibition de l'expression de EGR2 dans les ostéoblastes (N. Leclerc et al., 2008; N. Leclerc, Noh, Khokhar, Smith, & Frenkel, 2005). EGR2 est nécessaire à la fonction normale des ostéoblastes.

Dans les muscles, les glucocorticoïdes modulent l'homéostasie via l'induction de protéolyse et l'inhibition de la régénération musculaire en inhibant la prolifération des cellules précurseurs et en empêchant leur différenciation (Hanaoka, Peterson, & Crofford, 2012). De plus, en dehors de leur rôle dans le catabolisme protéique, les glucocorticoïdes sont impliqués dans la répression de la synthèse protéique via mTOR, REDD1 et KLF15 (Hanaoka, Peterson, Horbinski, & Crofford, 2012).

2.2.4 Effets immunitaires

Les glucocorticoïdes sont aujourd'hui la référence absolue chez les patients greffés pour les traitements immunosuppresseur afin de limiter les rejets. Toutes les cellules du système immunitaire sont sensibles aux effets anti-inflammatoires (Zen et al., 2011).

Les glucocorticoïdes peuvent cependant avoir des effets différents sur le système immunitaire. Les glucocorticoïdes et TNF-alpha coopèrent afin d'exprimer TLR2, stimulant le système immunitaire inné (Hermoso, Matsuguchi, Smoak, & Cidlowski, 2004). Ils peuvent aussi induire NLRP3, un composé de l'inflammasome dans les macrophages afin d'augmenter la réponse inflammatoire (Busillo, Azzams, & Cidlowski, 2011). Les

lymphocytes T auxiliaires entrent en apoptose en présence de glucocorticoïdes, alors que dans les lymphocytes T régulateurs, les glucocorticoïdes ont des effets pro-survies (Baschant & Tuckermann, 2010; Zen et al., 2011). Nous avons vu que les glucocorticoïdes pouvaient inhiber la sécrétion des molécules d'adhésion cellulaire dans les voies respiratoires, ce mécanisme est aussi trouvé dans les neutrophiles, inhibant ainsi leurs migrations. Dans les lymphocytes B, les glucocorticoïdes peuvent supprimer la production d'anticorps dans plusieurs pathologies auto-immunes ou dans des lymphomes (Franchimont, 2004) et diminuer l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, favorisant alors l'apoptose dans les lymphocytes B (Zen et al., 2011).

2.2.5 Effets sur la peau et affections cutanées

L'usage des glucocorticoïdes dans les traitements d'affection cutanée inflammatoire telle que l'eczéma ou le psoriasis sont fréquents, les activités antiprolifératives et anti-inflammatoires étant ici recherchées (Coenraads, 2012; Goldminz, Au, Kim, Gottlieb, & Lizzul, 2013). Cependant l'usage répété de glucocorticoïdes favorise l'apparition d'effets secondaires comme une atrophie tégumentaire ou des retards de cicatrisation.

Dans un premier temps, les retards de cicatrisation n'ont pas pu être attribué à la répression ou à l'activation de gènes par les glucocorticoïdes. Le laboratoire de Paloma Perez a identifié le rôle typique des glucocorticoïdes dans les cellules de la peau (Sanchis, Bayo, Sevilla, & Pérez, 2010; Sevilla, Latorre, Sanchis, & Pérez, 2013). L'inhibition de la prolifération cellulaire a été associé à la répression de gènes dans des kératinocytes. Cependant les effets d'activation et de répression peuvent moduler la réponse de cicatrisation (Sanchis, Alba, Latorre, Sevilla, & Pérez, 2012).

2.3 Glucocorticoïdes et sénescence

Comme nous l'avons vu, les glucocorticoïdes peuvent, entre autres, favoriser la survie, réduire l'inflammation, induire l'apoptose, inhiber la prolifération. Ces fonctions peuvent toutes être reliés à la sénescence, et des études présentant la modulation de la sénescence par les glucocorticoïdes existent.

Dès les années 1970, le lien a été fait entre l'augmentation de la capacité de doublement d'une population de fibroblastes et la présence de glucocorticoïdes (Grove & Cristofalo, 1977). Plus tard, il a été démontré que ces effets étaient liés à la répression de l'expression de p21 et l'augmentation de l'expression de IGF1R, augmentant là aussi le

nombre de doublement possible avant l'entrée en sénescence répliquative (S. Li, Mawal-Dewan, Cristofalo, & Sell, 1998; Mawal-Dewan, Frisoni, Cristofalo, & Sell, 2003). En 2012, il a été montré que les glucocorticoïdes inhibaient l'expression de certains composés inflammatoires du SASP (Laberge et al., 2012).

Cependant des publications ont présenté des effets opposés sur la prolifération. En effet, une équipe a montré dans des fibroblastes murins une induction de sénescence par le GR via l'augmentation de l'expression de p21 (Ramalingam, Hirai, & Thompson, 1997). Dans une lignée de cellules mésenchymateuses, bloquer l'expression du récepteur des glucocorticoïdes via siRNA ou en utilisant un antagoniste chimique (RU486) aboutit à une augmentation de la capacité de doublement des cellules et une inhibition de la sénescence (N. Wei, Yu, Joshi, & Schmidt, 2013). Sur d'autres lignées, des ténocytes et des ostéoblastes, les glucocorticoïdes induisent la sénescence via l'inhibition de SIRT1 et l'activation de la voie p53/p21 (Poulsen et al., 2014). Une étude sur des lignées issues de cancer colorectal a montré que GiLZ (Glucocorticoïdes induced Leucine Zipper), un gène fortement et rapidement induit en présence de glucocorticoïdes, activait p53 par disruption du complexe p53-MDM2, ce qui aboutissait à l'induction de sénescence (Ayroldi et al., 2014).

Comme nous pouvons le voir, les effets des glucocorticoïdes sur la sénescence dépendent du type cellulaire, mais nous ne disposons pas des données moléculaires sur l'action du GR et ses partenaires rendant compte de ces différences.

3. MAPK

Les MAPK sont un ensemble de protéine kinase à sérine/thréonine retrouvées uniquement chez les eucaryotes. Elles font partie du groupe de kinase des CMGC (pour Cyclin Dependent Kinases/Mitogen-Activated Protein Kinases/Glycogen Synthase Kinase/Cell division cycle Like Kinase).

3.1 Rôle des voies MAPK

Les premières *Mitogen-Activated Protein Kinases* (appelées MAPK par la suite) ont été découvertes lors d'expériences visant à identifier des protéines rapidement phosphorylées après stimulation du récepteur de l'EGF par des facteurs de croissance. Les MAPK, sont un ensemble de protéines kinases ayant pour fonction la direction des

réponses cellulaires à différents stimuli. Au-delà du contrôle de la prolifération cellulaire, les MAPK jouent de nombreux autres rôles dans la cellule. En effet, elles sont aussi impliquées dans le contrôle de l'expression génique, la différenciation, la survie cellulaire et l'apoptose. L'activation normale de la voie MAPK dépend d'un signal externe, telle la présence d'un facteur de croissance, reconnu par les récepteurs adéquats, mais peuvent aussi avoir pour origine la liaison de ligand aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires, communément appelé RCPG (Récepteur Couplé à la Protéine G) ou les récepteurs de cytokines (Figure 11). La transformation d'un signal extracellulaire en intracellulaire se fait via l'activation des domaines tyrosine kinase des récepteurs impliqués. Une fois ces domaines activés via une autophosphorylation croisée, la première étape de la voie des MAPK sera l'activation par phosphorylation d'une protéine nommée MAP kinase kinase kinase (MAPKKK ou MAP3K) étape d'une cascade de phosphorylations, activant dans un second temps MAP kinase kinase (MAPKK ou MAP2K), qui active elle-même les protéines MAP kinase (MAPK).

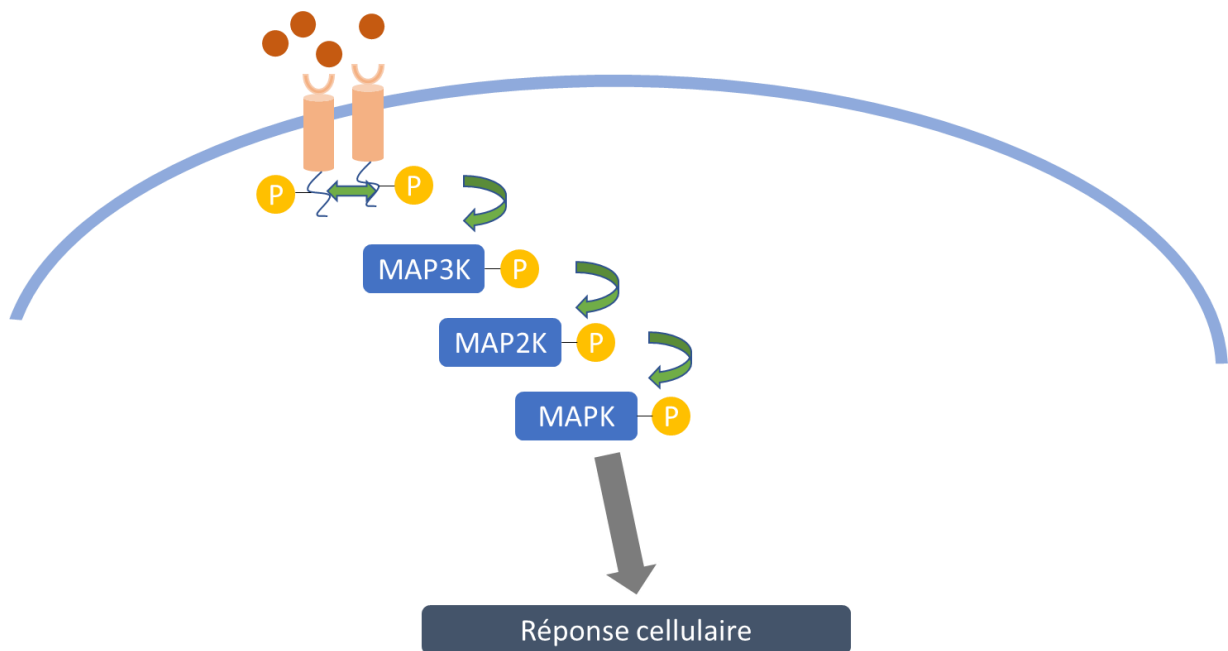


Figure 11 : Schéma de la voie d'activation des MAPK

Schéma représentant les activateurs de la voie MAPK, les différentes étapes de phosphorylation activatrice ainsi que le devenir de ce signal

Ces kinases auront ensuite la possibilité de phosphoryler d'autres substrats dans le cytoplasme et dans le noyau. Cette cascade aboutira donc à une réponse cellulaire, variable en fonction du stimulus initial.

3.2 Différentes voies MAPK

En effet, il existe plusieurs voies des MAPK, nous décrivons ici les 3 voies principales que l'on peut nommer sommairement voie p38, JNK et ERK1/2 (Figure 12). Il faut cependant noter qu'il existe d'autres voies moins bien étudiées qui ne seront pas abordées ici, comme la voie ERK5 et les voies atypiques tel ERK 3/4, ERK 7/8 et NLK.

3.2.1 La voie p38

La voie p38 a été identifiée comme étant activée dans les macrophages stimulés par les lipopolysaccharides, qui ont ici servi de stimuli externes nécessaires à l'activation de la voie p38. La voie p38 peut aussi être activé par irradiation UV, choc osmotique ou thermique (Zhu Chen et al., 2001; Raman, Chen, & Cobb, 2007).

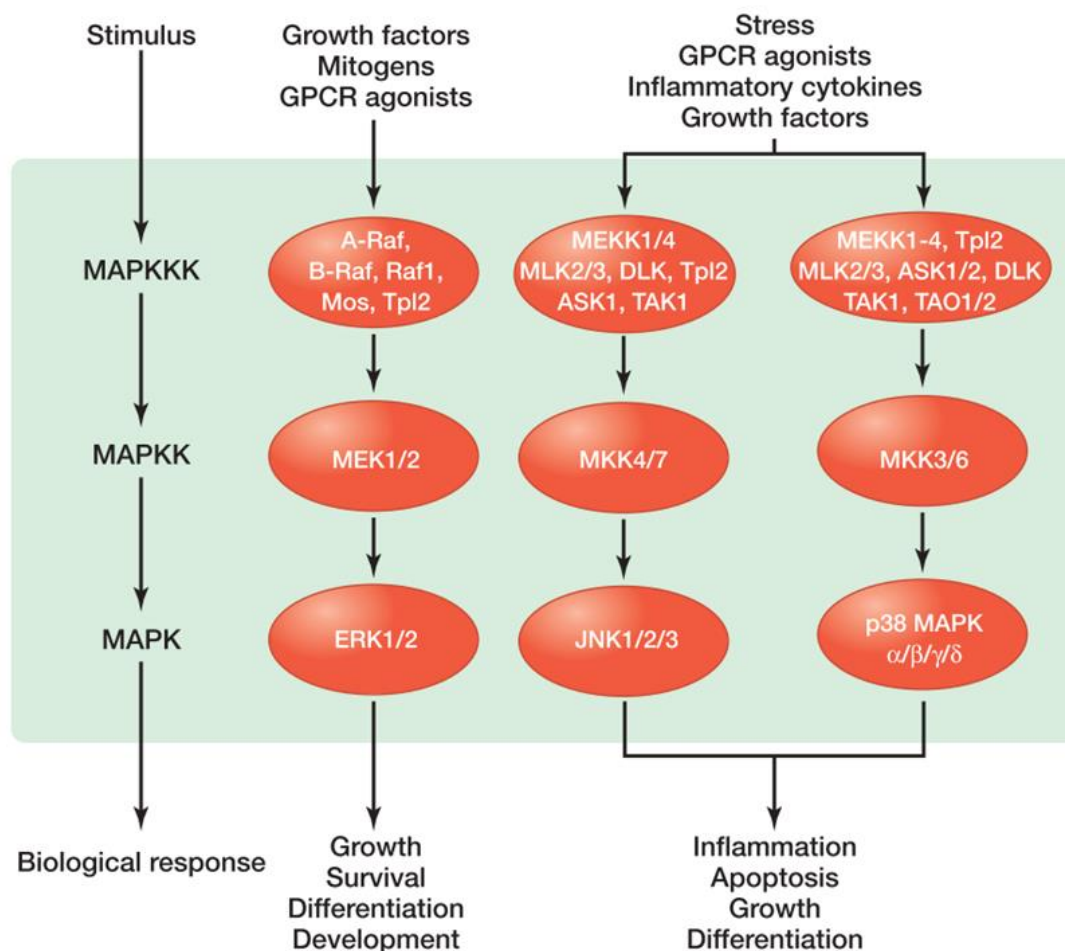


Figure 12 : Différentes voies MAPK

Principales voies MAPK : MAPKKK, MAPKK, MAPK ainsi que leurs inducteurs et leurs différentes réponses pour les voies p38, JNK et ERK1/2.

Tirée de (Morrison, 2012)

La voie p38 est impliquée dans la sénescence répllicative où l'on retrouve une activation de p38 après attrition télomérique (Iwasa, Han, & Ishikawa, 2003) et dans le même temps, d'autres études ont mis en évidence que l'inhibition de p38 par traitement chimique ou par expression d'un mutant dominant négatif MKK6 permettait un délai de l'apparition de la sénescence répllicative dans un modèle de chondrocyte (S. Kang, Jung, Kim, & Shin, 2005).

Le rôle de p38 a aussi été mis en évidence à de nombreuses reprises pour la sénescence prématurée, aussi bien lié au stress oxydant, de culture ou à l'activation de RAS (Q. Chen & Ames, 1994; Han & Sun, 2007; Ishikawa, 2006). Dans le cas de l'activation de RAS, des études ont remarqué que l'inhibition de la voie p38 permettait d'inhiber l'entrée en sénescence et que l'expression d'un mutant actif MKK3 ou MKK6, aboutissant à l'activation constitutive de p38, induisait la sénescence prématurée (Iwasa et al., 2003; A. W. Lin et al., 1998; W. Wang et al., 2002).

Le contrôle de la sénescence par p38 a été proposé comme dépendant de p16 et de p53 (Bulavin et al., 2004; Han & Sun, 2007; Takekawa et al., 2000; W. Wang et al., 2002). L'activation de p38 induit l'expression de p16 et aboutissant à l'induction de sénescence, et phosphoryle p53, ce qui permettait alors l'expression de p21 (Han & Sun, 2007; G. S. Wu, 2004). Cependant l'activation de p38 n'est pas nécessaire à l'induction de la sénescence par l'oncogène RAF (Jeanblanc et al., 2012), les rôles de p38 dans l'induction de sénescence peuvent dépendre du contexte cellulaire et du mécanisme d'induction.

3.2.2 La voie JNK

La voie JNK est activée par différents stimuli, parmi lesquels on peut trouver les cytokines, l'irradiation aux UV, le stress oxydant, les dommages à l'ADN ou les chocs osmotiques et joue un rôle dans la réponse cellulaire à ces stressés comme l'apoptose, la prolifération, la différenciation mais aussi la sénescence (Zhu Chen et al., 2001; Raman et al., 2007). La délétion de MKK7 (MAP2K dans la voie JNK), qui inhibe l'activation de la voie JNK, induit l'apparition de la sénescence prématurée dans les MEFs par l'inactivation de CDK1/CDC2. Il est intéressant de noter que l'activité de CDK1 est normalement réprimée par l'activation de la voie p38. Les 2 voies p38 et JNK jouent ici un rôle opposé dans la régulation de la sénescence (Wada et al., 2004, 2008; Wada & Penninger, 2004).

L'activation de la voie JNK aboutit à l'inhibition de l'expression de p53, aboutissant à une augmentation de la capacité de prolifération des cellules. Il a été montré dans les souris que la délétion de JNK1 ou JNK2 induit l'accumulation de p53, aboutissant à l'apparition de sénescence dans ces cellules (M. Das et al., 2007; L. Hui et al., 2007; Schreiber et al., 1999).

On observe ici que la voie JNK a un effet antagoniste à celui de p38. L'activation de la voie JNK étant responsable d'une augmentation de la capacité de prolifération des cellules dans des contextes de tumorigénèse (Bode & Dong, 2007; Heasley & Han, 2006). Dans des myélomes et des cellules de cancer du sein, l'inhibition de JNK est capable de supprimer la prolifération des cellules cancéreuses (Heasley & Han, 2006). L'activation de la voie JNK contribue donc à la prolifération des cellules cancéreuses par la suppression de la sénescence cellulaire.

Cependant, une étude a montré que JNK pouvait phosphoryler p53, ce qui contribue à la stabilité de la protéine et son activité transcriptionnelle. Ce comportement différent de celui observé précédemment a été décrit comme pouvant dépendre du niveau et de la durée d'activation de la voie JNK, ainsi que du type et du contexte cellulaire (Buschmann et al., 2001).

3.2.3 La voie ERK

La voie ERK est majoritairement stimulée via le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFR), mais aussi par d'autres facteurs de croissance, des cytokines, des infections virales ou via l'activation des RCPG. Cette voie a été impliquée dans le contrôle de la prolifération, de la progression du cycle cellulaire, de la différenciation et dans le développement (Peyssonnaud & Eychène, 2001). Comme décrit à la Figure 12, les protéines MAP3K de la voie ERK ne sont pas partagées avec les autres voies. L'activation de MAP3K via phosphorylation est dépendante d'un intermédiaire de la famille des Ras. Les Ras, au nombre de 3 (à savoir H-Ras, K-Ras et N-Ras) sont des petites GTPases permettant la transmission du signal des récepteurs à domaine tyrosine kinase aux protéines MAP3K. Les protéines RAF, elles aussi au nombre de 3 (A-RAF, B-RAF et C-RAF ou Raf-1) (M. J. Robinson & Cobb, 1997) vont être activées par les Ras (Marais, Light, Fpaterson, & Marshall, 1995) puis activent par phosphorylation les protéines MAP2K, MEK1 et MEK2 (Marshall, 1994). On note qu'il existe d'autres MAP3K appartenant à cette

voie, Mos et Tpl2 (Raman et al., 2007), mais elles ne seront pas plus explorées par la suite. MEK1 et MEK2 comportent un motif riche en proline unique parmi les MAP2K et leur délétion induit une perte d'activation de la voie (Catling, Schaeffer, Reuter, Reddy, & Weber, 1995; M. J. Robinson & Cobb, 1997). MEK1 et MEK2 vont ensuite phosphoryler ERK1 et ERK2, qui vont ensuite phosphoryler des substrats nombreux dont les facteurs de transcription tel Elk, c-Fos ou Jun (Joel et al., 1998; Pende et al., 1997; Treisman, 1996) et d'autres protéines telles que Rsk1, Rsk2, Rsk3, MAPKAP2, MAPKAP3, Msk1 ou Msk2 (Fukunaga & Hunter, 1997; Gavin & Nebreda, 1999; Sturgill, Ray, Erikson, & Maller, 1988) contrôlant la prolifération, la différenciation, la progression dans le cycle cellulaire et aussi la sénescence ou le cancer.

En effet, 30% des cancers comportent une mutation sur l'axe RAS-ERK (Garnett & Marais, 2004), certaines de ces mutations pouvant aussi parfois aboutir à la sénescence cellulaire.

La mutation activatrice de H-Ras, H-Ras^{G12V}, est responsable de l'induction de sénescence dans des fibroblastes humains avec une augmentation des niveaux de p16, p53 et p21 (A. W. Lin et al., 1998; Serrano et al., 1997). L'activation de Ras est associée à une augmentation de la production de ROS qui ont été décrits comme participant à l'activation de la voie p38 (Dolado et al., 2007; Han & Sun, 2007). H-Ras^{G12V} est aussi responsable d'un stress de réplication induisant la sénescence par activation des systèmes de reconnaissance des dommages à l'ADN (Di Micco et al., 2006; Mallette, Gaumont-Leclerc, & Ferbeyre, 2007). La présence de ROS et de dommage à l'ADN est suffisante pour l'induction de sénescence par une augmentation de l'expression de p21 via p53 (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Han & Sun, 2007). L'activation de Ras est aussi responsable de l'activation de la dégradation spécifique de protéines nécessaires à la croissance et à la progression du cycle cellulaire (Deschênes-Simard et al., 2013; Deschênes-Simard, Kottakis, Meloche, & Ferbeyre, 2014).

La sénescence induite par H-Ras^{G12V} dépend de l'augmentation de l'activation de ERK (Deschênes-Simard et al., 2013; Meloche & Pouyssegur, 2007).

Des mutations des MAP3K sont aussi responsables de l'apparition de cancer, les mutations de B-RAF représentant à elles seules 7% des cancers (Davies et al., 2002). Il y a 20 ans, une équipe a montré que l'activation de la voie MAPK via Raf1 (C-RAF) pouvait induire la sénescence (Zhu, Woods, McMahon, & Bishop, 1998). Cependant, aujourd'hui

B-RAF est la protéine la plus étudiée des MAP2K, étant mutée dans 40 à 70% des mélanomes, 10% des cancers colorectaux, 45% des cancers thyroïdien papillaire mais aussi dans des cancers du sein, des ovaires ou des poumons (Davies et al., 2002; Dhomen & Marais, 2009; Xing, 2005). Il a été montré que lors de la perte d'une des protéines RAF, une autre pouvait assurer ses fonctions, et qu'en cas de double délétion, la troisième était capable d'assurer l'activation de la voie (Dorard et al., 2017). Une des mutations, B-RAF^{V600E} présente un pouvoir d'activation 500 fois supérieur à la protéine sauvage (Garnett & Marais, 2004) et a été associée à l'inhibition de la prolifération (Bennett, 2003; Kuwata, Kitagawa, & Kasuga, 1993; Mooi & Krausz, 1992). Cette mutation est capable d'inhiber la prolifération dans différents modèles de névi, aussi bien cutanées que choroïdiens (Calipel et al., 2003). Près de 80% des névi cutanés possèdent cette mutation (Mooi & Peeper, 2002; Patton et al., 2005) et le lien entre l'expression d'un oncogène et les névi, composés de mélanocytes sénescents, a déjà été bien établi (Dhomen et al., 2009; Joselow, Lynn, Terzian, & Box, 2017; Kuilman et al., 2010; McNeal et al., 2015; Vredeveld et al., 2012). La première description de sénescence après expression de B-RAF^{V600E} date de 2005 (Michaloglou et al., 2005).

Il existe 2 formes de MAPK appelées ERK1 et ERK2 (p44 et p42), qui sont parfois décrites comme présentant des activités redondantes (Frémin, Saba-El-Leil, Lévesque, Ang, & Meloche, 2015; Lefloch, Pouysségur, & Lenormand, 2008; Voisin, Saba-El-Leil, Julien, Frémin, & Meloche, 2010), alors que d'autres équipes différencient les deux. ERK2 a été impliqué dans la progression cancéreuse (Bonito et al., 2014; S. Shin, Dimitri, Yoon, Dowdle, & Blenis, 2010). Une étude a montré l'importance de ERK2 dans l'induction de la sénescence par Ras (J. Shin, Yang, Lee, & Baek, 2013) alors qu'une autre équipe a montré que les deux ERK étaient nécessaires à l'induction de la sénescence (Deschênes-Simard et al., 2013). La sénescence induite par l'activation de la voie MAPK/ERK paraît dépendre du niveau global d'activation des ERK.

Les mécanismes d'activation de la voie ERK aboutissent à une dérégulation des gènes CDKN2A et CDKN2B responsable de l'expression de p14^{Arf}, p16^{INK4A} et p15 (Popov & Gil, 2010). La modification de l'expression de ces inhibiteurs de kinase dépendante des cyclines aboutit à une inhibition de phosphorylation de la protéine du rétinoblastome, bloquant alors le cycle cellulaire en G1/S (Chicas et al., 2010; Sage et al., 2000). Cependant,

on peut aussi observer un arrêt du cycle en G2/M lié à un rôle méconnu de CDK4 dans le passage de ce *checkpoint* (Sheppard, Pearson, & Hannan, 2015)

Il existe cependant des cas de sénescence dans lesquelles une diminution de phosphorylation de ERK1/2 a été observée après activation d'une boucle de rétroaction induisant une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 en sénescence (Courtois-Cox et al., 2006; Wajapeyee et al., 2008), laissant ici découvrir la complexité de la régulation de ces mécanismes.

La régulation de ERK1 et ERK2 se fait via des protéines DUSP (DUal-Specificity Phosphatases) ou MKP (MAPK phosphatases). Ces phosphatases vont réguler le niveau d'activation de la voie ERK et plusieurs d'entre elles ont déjà été impliquées dans la sénescence. La déplétion de ces protéines régulatrices aboutit à une hyperactivation de la voie ERK et à la senescence (Kidger et al., 2017; H. Zhang et al., 2015).

4. Névi et mélanome

Les névi sont des lésions bénignes de la peau, formées après acquisition d'une mutation oncogénique dans un mélanocyte (Bastian, 2014). Les névi sont généralement de forme symétrique, de couleur uniforme et sont de taille comprise entre 2 et 6mm. La formation des névi n'est pas uniformément répartie au cours de la vie : la majorité se forment pendant les vingt premières années de la vie (Schaffer, 2015). Ils peuvent régresser. Avec l'âge, le rythme d'apparition des névi diminue (Bataille et al., 2007) alors que leur régression augmente (Mackie, English, Aitchison, Fitzsimons, & Wilson, 1985; Stegmaier, 1959). Ainsi, le nombre le plus important de névi est observé entre 20 et 30 ans.

4.1 Formation des névi

La formation des névi est dépendante d'une mutation oncogénique. Les mutations touchant la voie MAPK, qui contrôle la prolifération, sont associées avec la sénescence mais aussi la formation de névi. Les mutations sur la protéine B-RAF rendant la protéine constitutivement active sont fréquentes dans les cancers (Davies et al., 2002) et particulièrement les mélanomes, dont la mutation de B-RAF (en majorité une transversion V600E) est présente dans 50% des cas (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Les mutations activatrice de B-RAF sont fréquentes dans un grand nombre de névi, environ

80% (Piris, Mihm, & Hoang, 2015; Pollock et al., 2002; Poynter et al., 2006; Roh, Eliades, Gupta, & Tsao, 2015). Les mutations activatrices de la voie MAPK font partie des caractéristiques communes des névi. Ces mutations peuvent toucher différents composants de la voie MAPK, comme NF1 ou N-RAS, dans 5 à 20% des névi (Bastian, 2014; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Roh et al., 2015).

La formation d'un névi découle de l'apparition d'une mutation activatrice de la voie MAPK dans un mélanocyte unique. Cela signifie donc qu'un névi est clonal, formé à partir d'une seule cellule (Harada et al., 1997; P. Hui, Perkins, & Glusac, 2001; W. A. Robinson et al., 1998; Yeh, von Deimling, & Bastian, 2013).

Michaloglou a démontré en 2005 que l'expression de l'oncogène B-RAF^{V600E} induisait un arrêt rapide de la prolifération dans une culture de mélanocyte (Michaloglou et al., 2005). Les cellules présentaient des caractéristiques spécifiques des cellules sénescentes avec, en plus de l'arrêt prolifératif, une augmentation de l'activité SA-β-Galactosidase et du niveau de p16. Des caractéristiques semblables ont aussi été identifiées dans les névi (Gray-Schopfer et al., 2006), permettant alors de faire le lien entre la sénescence induite par les oncogènes *in vitro* et *in vivo*. L'expression d'une mutation activatrice de B-RAF dans le poisson zèbre permet l'apparition de « névi » (Patton et al., 2005). Des expériences identiques ont été réalisées chez la souris, avec à chaque fois un résultat identique, à savoir l'apparition d'un phénotype identique à celui des névi humains et l'apparition de marqueurs caractéristiques des cellules sénescentes (Dankort et al., 2009; Dhomen et al., 2009; Goel et al., 2009).

Il existe une différence notable entre la sénescence induite par les oncogènes *in vitro* et *in vivo* : la cinétique d'arrêt des cellules. Comme nous l'avons dit précédemment, les névi font entre 2 et 6mm, ce qui est incompatible avec l'arrêt prolifératif rapide observé *in vitro* (Jeanblanc et al., 2012; Michaloglou et al., 2005; Serrano et al., 1997). Les mutations RAS et B-RAF observées *in vivo* induisent *in vitro* une augmentation remarquable de la prolifération (burst prolifératif), suivi d'un arrêt complet du cycle cellulaire (Damsky et al., 2015; Dankort et al., 2009; Pedersen, Viros, Cook, & Marais, 2014). Or la période de formation des névi peut durer de plusieurs mois à un an avant d'observer un arrêt total de la prolifération (Kittler et al., 2000; Menzies, Stevenson, Altamura, & Byth, 2011). De plus, afin qu'à partir d'une mutation unique, un mélanocyte puisse se diviser jusqu'à former un névus d'une taille de 2 à 6mm (composé de plusieurs

centaines de milliers de cellules), les capacités de divisions des cellules doivent être maintenues longtemps après apparition de la mutation : on estime qu'après la mutation initiale, 13 à 16 cycles de division sont nécessaires à partir d'un mélanocyte précurseur unique.

Chez la souris, la taille moyenne d'un névi est plus faible que chez l'homme, mais on estime qu'il est composé d'environ 3000 cellules. Il a été montré que les mélanocytes étaient capable de proliférer entre 2 et 3 semaines après l'apparition de la mutation, ce qui correspond à 10 ou 11 cycles de division (Damsky et al., 2015), légèrement moins que chez l'Homme. Cette différence correspond à un nombre de mélanocyte composant les névi plus faible chez la souris que chez l'Homme

Les mélanocytes composant les névi ainsi observés chez la souris ne sont, en majorité, plus capable de proliférer, et ce, de manière définitive, cependant, une fraction très faible de mélanocyte composant les névi est capable de sortir de cet arrêt du cycle et donne naissance à des mélanomes.

4.2 Du névi au mélanome

Le modèle de représentation linéaire de la pathogénèse du mélanome proposé par Clark est composé d'une série d'étape selon laquelle les modifications génétique ou épigénétique s'accumulent (W. H. Clark et al., 1984; A. J. Miller & Mihm, 2006) (Figure 13). Néanmoins ce modèle linéaire d'acquisition, dans lequel le mélanome dérive d'un névus ne s'applique qu'à environ un tiers des cas, chiffre pouvant augmenter à 50% des cas dans le cas de patients à risques comportant un grand nombre de névi (Bevona, Goggins, Quinn, Fullerton, & Tsao, 2003; Haenssle et al., 2016; W. M. Lin et al., 2015).

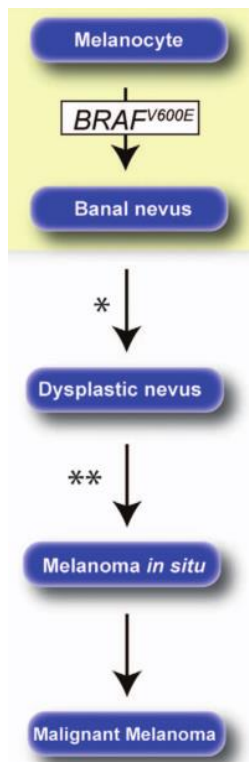


Figure 13 : Modèle de formation linéaire des mélanomes

Modèle de Clark de progression linéaire du mélanocyte au mélanome malin
Adaptée de (Damsky & Bosenberg, 2017)

La transformation de névi à mélanome est plus fréquente sur les parties du corps non exposés au soleil comme le tronc et les extrémités proximales des membres au contraire des mélanomes se développant sur les parties du corps exposés au soleil, comme le visage ou le cou qui ne dérivent eux pas des névi (Shain & Bastian, 2016; Shitara et al., 2014).

Les mélanomes dérivants des névi présentent majoritairement des mutations B-RAF^{V600E} et des pertes de PTEN, CDKN2B ou MITF alors que ceux présents sur des parties exposées au soleil contiennent des mutations de NF1 et TP53 (J. Leclerc, Ballotti, & Bertolotto, 2017; McNeal et al., 2015; Shain & Bastian, 2016). Cela indique donc qu'il existe des mécanismes de transformation différents entre les différents types de mélanome, dérivant de névi ou non.

Dans les mélanomes qui dérivent de névi, on peut identifier des traces des névi initiaux : des analyses de tissus où les deux lésions cohabitent ont des concordances génétiques confirmant l'hypothèse selon laquelle ces mélanomes étaient dérivés de névi (Bogdan, Smolle, Kerl, Burg, & Böni, 2003; Dadzie et al., 2009; Demunter, Stas, Degreef, De Wolf-Peeters, & van den Oord, 2001; Kakavand et al., 2014; Shitara et al., 2015; Tschandl et al., 2013). La proportion de névi évoluant vers le mélanome est extrêmement

faible. On considère que sur une vie, le risque d'évolution d'un névus en mélanome est de 1:3000 pour les hommes et 1:11000 pour les femmes.

5. EGR-1

Le facteur de transcription EGR-1 (Early Growth Response protein 1) aussi appelé Zif268 (zinc finger protein 225) ou NGFI-A (nerve growth factor-induced protein A) est une protéine codée chez l'humain par le gène EGR1. La protéine fait partie de la famille des Early Growth Response factors contenant aussi EGR-2, EGR-3 et EGR-4.

5.1 Expression et régulation de EGR1

Toutes les protéines EGR sont des protéines nucléaires, composées de 3 domaines de fixation à l'ADN en doigt de zinc se fixant sur des régions riches en GC du génome, sur les promoteurs des gènes cibles (Gashler & Sukhatme, 1995; Kharbanda et al., 1991; Sukhatme et al., 1988). Elles comportent aussi différents domaines permettant leur activation et un domaine d'interaction avec des protéines inhibitrices de EGR, NAB1 et NAB2 (Russo, Severson, & Milbrandt, 1995; Svaren et al., 1996) (Figure 14).

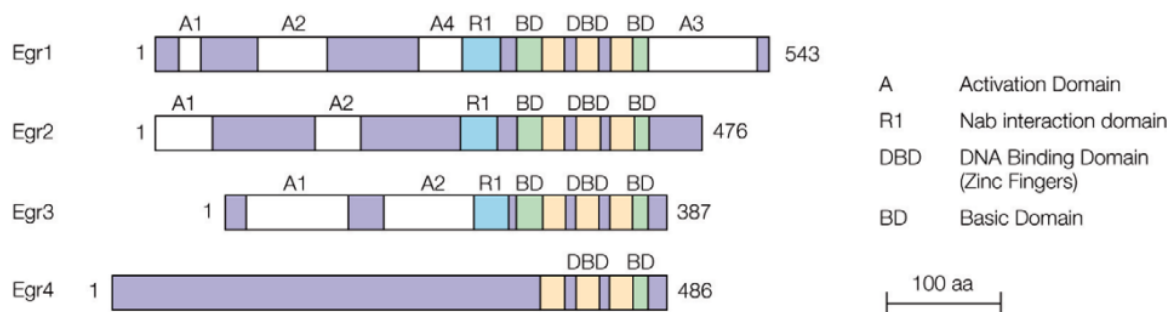


Figure 14 : Famille des protéines EGR et domaines

EGR4 est un parent éloigné de la famille des EGR, alors qu'on observe une très grande homologie entre EGR2 et EGR3, ainsi qu'avec EGR1. On observe la présence de domaine R1 d'interaction avec NAB ainsi que la présence du domaine d'activation A dans EGR1, EGR2 et EGR3.

Tirée de (Poirier et al., 2008)

L'activité de la protéine EGR-1 est majoritairement régulée via le contrôle de sa transcription. La demi-vie de l'ARN messenger est très courte, moins de 30 minutes (Gashler & Sukhatme, 1995; Grotegut, von Schweinitz, Christofori, & Lehembre, 2006; Kharbanda et al., 1991; Sauer, Gitenay, Vo, & Baron, 2010; Sukhatme, 1990; Svaren et al., 1996). L'expression de EGR1 est induite par des stimuli extérieurs dont certains sont associés aux stress. EGR1 peut être induit par un grand nombre de stimuli parmi lesquels on retrouve

les facteurs de croissance, la présence de cytokines, l'activation du récepteur des lymphocytes T, la présence d'hormones, de thrombines, le stress mécanique (par contrainte de cisaillement par exemple), l'exposition aux neurotransmetteurs, l'exposition aux U.V., la présence de ROS, l'hypoxie, ou encore l'ischémie (Gaggioli et al., 2005; Guha et al., 2001; Hjoberg et al., 2004; Kaufmann & Thiel, 2002; C.-J. Li, Ning, Matthay, Feghali-Bostwick, & Choi, 2007; Lohoff et al., 2010; Rössler & Thiel, 2009; Seyfert, Sukhatme, & Monroe, 1989; Yan et al., 2000).

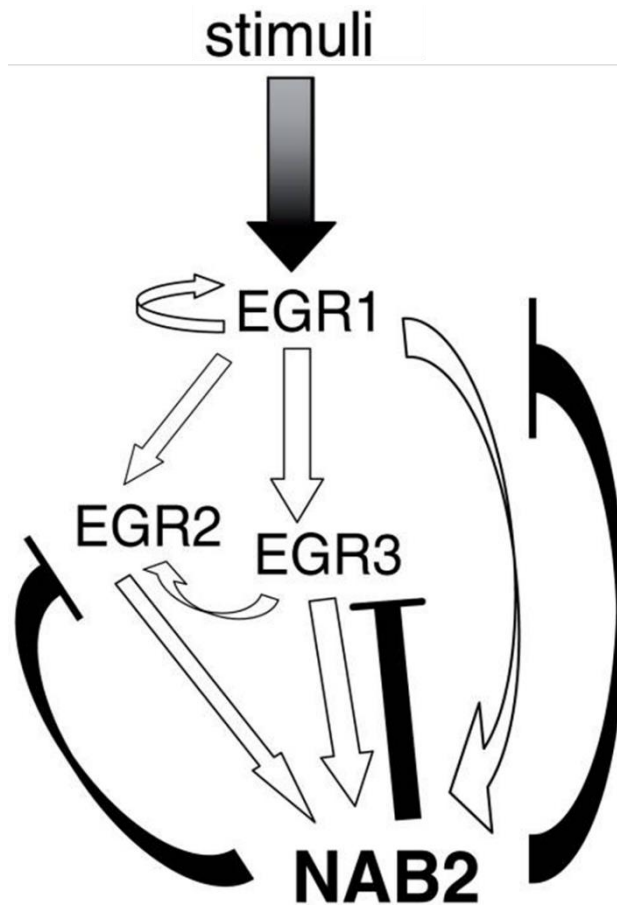


Figure 15 : Induction et régulation des EGR par NAB

Les flèches représentent l'activation de la transcription alors que les lignes barrées représentent la répression de la transcription mais aussi de l'activité.

Adaptée de (Kumbrink, Kirsch, & Johnson, 2010)

L'induction de EGR1 fait intervenir de façon quasi systématique l'activation de la voie MAPK-ERK-Elk1 (Hasan & Schafer, 2008; Hjoberg et al., 2004; Khachigian, 2006; Midgley & Khachigian, 2004). Le gène EGR1 humain se trouve sur le chromosome 5q31 et contient dans sa région promotrice 5 séquences consensus SRE (Serum Response Element) qui sont reconnues par les facteurs de réponse au sérum (SRF) et par les TCF (Ternary Complex Factors) parmi lesquels on compte les facteurs de transcriptions Ets dont fait partie Elk1

(Buchwalter, Gross, & Wasylyk, 2004; Pagel & Deindl, 2011). La phosphorylation de Elk1 augmente son affinité pour l'ADN, entraînant l'augmentation de la transcription de EGR1.

La régulation de la transcription EGR1 est rapide et complexe, et passe en partie par une rétroaction de la protéine EGR-1 sur sa propre expression. En effet, on trouve un site de fixation de EGR-1 sur le promoteur de EGR1 (Cao, Mahendran, Guy, & Tan, 1993; Kumbrink et al., 2010). La transcription de NAB2 est régulée par EGR-1. De plus, le contrôle de l'expression de EGR2 et EGR3 dépend du niveau d'expression de EGR1 (Figure 15). De même, on observe que EGR3 peut contrôler l'expression de EGR2. Ces deux EGRs sont aussi capable d'augmenter l'expression de NAB2, ce qui aura pour effet de réguler les niveaux d'expression des 3 EGRs de façon concomitante.

La répression de l'activité de EGR-1 se fait via l'action de deux protéines, NAB1 et NAB2 via une fixation sur le domaine Nab Interaction Domain (Figure 14) (Russo et al., 1995; Sevetson, Svaren, & Milbrandt, 2000; Svaren et al., 1996, 1998). L'activité transcriptionnelle est alors inhibée via le recrutement du complexe NuRD, permettant alors le remodelage de la chromatine et sa désacétylation au niveau du site de fixation de EGR-1 sur le génome (Srinivasan, Mager, Ward, Mayer, & Svaren, 2006). La protéine NAB1 est exprimée de façon constitutive alors que l'expression de NAB2 est contrôlée par les mêmes stimuli que ceux permettant l'expression de EGR1 (Kumbrink et al., 2010), indiquant donc un rôle de régulateur lors des stress pour NAB2 alors que NAB1 sera elle responsable de la régulation homéostatique. NAB2, aussi appelé MADER (Melanoma Associated Delayed Early Response gene), a été identifié comme une protéine nucléaire surexprimée dans les mélanomes malins (Kirsch, Korradi, & Johnson, 1996). La relation de régulation entre EGR1 et NAB2 est complexe, en effet on trouve sur le promoteur de NAB2 un site de fixation de EGR-1 permettant ainsi à EGR-1 d'induire l'expression de NAB2 et ainsi diminuer son activité via une régulation négative (Ehrengruber et al., 2000).

5.2 Fonction de EGR-1

Les rôles de EGR-1 sont très variés en fonction du type cellulaire, du contexte mais aussi du stimuli ayant permis l'induction de EGR (Collins et al., 2008; Honkaniemi, Zhang, Longo, & Sharp, 2000; von der Kammer et al., 1998). La protéine EGR-1 est impliquée dans un grand nombre de processus de maturation ou de différenciation (Carter, Lefebvre, Wiest, & Tourtellotte, 2007). On peut citer leur rôle dans la différenciation cardiaques et

neuronales (Cao et al., 1990; Hass, Brach, Gunji, Kharbanda, & Kufe, 1992; Sukhatme et al., 1988) comme par exemple la différenciation neuronales des cellules PC12 après traitement au NGF (Nerve Growth Factor) (Cao et al., 1990; Changelian, Feng, King, & Milbrandt, 1989; Milbrandt, 1987), dans la différenciation des préostéoblastes (Suva, Ernst, & Rodan, 1991), dans la différenciation des macrophages (Krishnaraju, Nguyen, Liebermann, & Hoffman, 1995) mais aussi des monocytes (Kharbanda et al., 1991). Le rôle de EGR-1 dans la maturation des lymphocytes B a aussi pu être mis en évidence à la fin des années 80 (Seyfert et al., 1990, 1989; Varnum et al., 1989).

EGR-1 a aussi une fonction importante dans le contrôle de prolifération (Thiel & Cibelli, 2002). Selon le contexte cellulaires, les fonctions de EGR-1 peuvent être pro ou antiprolifératives (C Liu, Rangnekar, Adamson, & Mercola, 1998; Sukhatme et al., 1988; Thiel & Cibelli, 2002). Des études ont montré qu'il existait une association entre EGR-1 et p53 dans le contrôle du cycle cellulaire en présence de signaux de croissance (Zwang, Oren, & Yarden, 2012), régulant le passage de G1 en S.

De manière surprenante, les souris KO EGR1 sont viables. Elles présentent cependant quelques caractéristiques différentes des souris sauvages. Elles possèdent une modification du système endocrine, aboutissant à une perte du récepteur de l'hormone lutéinisante, rendant alors les souris femelles infertiles (S. L. Lee et al., 1996; Topilko et al., 1998). Ces souris présentent aussi une diminution de la masse osseuse et un remplacement osseux plus rapide que les souris sauvages (Cenci, Weitzmann, Gentile, Aisa, & Pacifici, 2000). Ces souris développent aussi une résistance à la fibrose pulmonaire ou tégumentaire après exposition à la bléomycine (M. Wu et al., 2009).

Le rôle de EGR-1 dans les fibroses a été expliqué en 2011 (Bhattacharyya et al., 2011) et semble en partie dépendre de la présence de TGF- β , C-Abl et p300. Là encore la relation EGR-1/NAB2 semble jouer un rôle important. Le niveau d'expression de EGR1 permet de prédire la vitesse de progression des fibroses (Boon et al., 2009). EGR-1 est connu pour réguler positivement un grand nombre de composés de la matrice intracellulaire, comme le collagène ou la fibronectine. L'accumulation de collagène a été liée à l'augmentation de l'expression de EGR-1 et présente une augmentation des risques d'athérosclérose (Bot et al., 2009) tandis que l'élévation du niveau d'expression de la fibronectine, sous le contrôle de EGR-1, a été observé dans les mélanomes (Gaggioli et al., 2005). La surexpression de la fibronectine est associée au développement de plusieurs malignités comme le cancer

colorectal, le cancer du sein ou le mélanome métastatique (Bittner et al., 2000; C.-L. Li et al., 2017; L. Zhang et al., 1997).

EGR1 est associé à des fonctions antagonistes dans les cancers. Ses effets dépendent ici du type de cancer avec d'un côté une fonction suppresseur de tumeurs dans les fibrosarcomes et les glioblastomes (Calogero et al., 1996; Huang et al., 1997; Chaoting Liu, Yao, Mercola, & Adamson, 2000) alors que EGR1 semble accélérer le développement des cancers de la prostate (Baron, Duss, Rhim, & Mercola, 2003; Eid, Kumar, Iczkowski, Bostwick, & Tindall, 1998; Mora et al., 2004; Salah, Maoz, Pizov, & Bar-Shavit, 2007; Sevetson et al., 2000; Thigpen et al., 1996). Un lien a été fait entre la quantité de EGR-1 et le grade Gleason de la tumeur (Ahmed et al., 2001).

Le rôle de EGR1 dans les cancers du sein est complexe. En effet comme nous venons de le voir, EGR1 favorise l'expression de la fibronectine, qui est associée avec les évènements métastatiques dans les cancers du seins (C.-L. Li et al., 2017). La déplétion de EGR1 aboutit à une inhibition de la prolifération, de l'invasion, de la formation de tumeur solide et de la migration des cellules de carcinome mammaire (Mitchell, Dass, Sun, & Khachigian, 2004). Ces effets laissent dans un premier temps penser que EGR1 est nécessaire ou au moins favorise la transformation cellulaire. Cependant la surexpression de EGR1 dans des cellules cancéreuses induit une répression des cyclinesD aboutissant à un arrêt de la prolifération cellulaire (L. L. Wei, Wu, Gong, & Pei, 2017).

EGR-1 est responsable de la régulation de l'arrêt de prolifération et d'évènements apoptotiques dans le mélanome (Muthukkumar et al., 1995; Sells, Muthukkumar, Sukhatme, Crist, & Rangnekar, 1995). Il permet aussi la régulation de l'angiogenèse par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (K. H. Lee & Kim, 2009).

Enfin, des études ont montré une association entre EGR1 et la régulation de nombreuses cytokines pro inflammatoires (Decker et al., 2003; Decker, Skerka, & Zipfel, 1998). Un des mécanismes permettant la régulation de ces cytokines est dépendant de l'association entre EGR-1 et NF- κ B et la stimulation de l'expression de ce dernier par ce complexe (Cogswell, Mayo, & Baldwin, 1997). Une étude récente de 2009 a mis en évidence un lien entre la diminution de l'expression de EGR1 et la diminution de l'expression de IL8, aboutissant à une diminution de l'invasion dans le cas de tumeurs de la prostate (Ma et al., 2009).

La délétion du loci 5q31, contenant le gène EGR1, ou la perte totale du bras long du chromosome 5 est fréquente dans les cas de myélodysplasie ou de leucémie aigüe dans lesquelles EGR1 est impliqué (Le Beau et al., 1986; Nakhoul et al., 2014; Voutsadakis & Cairoli, 2012).

5.3 EGR1 et sénescence

Il existe aujourd'hui 3 articles décrivant un rôle de EGR-1 dans la sénescence.

La première publication étudie l'effet de la sénescence réplivative sur des fibroblastes humains (Meyyappan, Wheaton, & Riabowol, 1999). Leurs expériences ont mis en évidence une diminution de l'expression de EGR1 aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine dans les fibroblastes âgés. De plus, une diminution des capacités de fixation à l'ADN et d'activation transcriptionnelle ont aussi été observées avec l'âge. Dans le même article, les chocs sérum n'ont plus d'effet sur l'augmentation de la transcription de EGR1. Cette absence de réponse est liée à l'absence de fixation des SRF sur les éléments SRE présent dans le promoteur de EGR1. Cette observation a aussi été effectuée sur le promoteur du gène c-Fos (Atadja, Stringer, & Riabowol, 1994), permettant alors à l'auteur de conclure que la perte d'expression de ces deux IEG en sénescence est hautement corrélée à la perte d'induction des gènes associées à la prolifération dépendant de EGR1 et de c-Fos.

Le deuxième article présente lui aussi le rôle de EGR1 dans la sénescence réplivative mais dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) (Krones-Herzig, Adamson, & Mercola, 2003). Dans les MEFs, l'absence de EGR1 permet un échappement complet de la sénescence et une croissance infinie. En l'absence de EGR1 il a été noté une diminution du transcrit de p53 ainsi que des protéines dépendant de p53 tel p21 par exemple. L'absence de sénescence observée dans les MEFs n'exprimant pas EGR1 est expliquée par une diminution de l'expression de p53 et de ses gènes cibles, responsable de l'induction de sénescence. Ces résultats présentent EGR1 comme un régulateur jamais encore décrit de l'axe p53-MDM2-Arf et ayant donc un impact important sur la sénescence cellulaire mais aussi la croissance cellulaire et le passage de *checkpoint* du cycle cellulaire. L'activation du promoteur de p53 par EGR1 avait-elle par contre déjà été décrite (A. Das et al., 2001; Nair et al., 1997) tout comme l'interaction directe entre les protéines EGR1 et p53 (J. Liu et al., 2001).

Une dernière publication, plus récente, étudie EGR1 lors de la sénescence induite par Ras dans des 3T3 (Salotti, Sakchaisri, Tourtellotte, & Johnson, 2015). L'expression de Ras dans les 3T3, 3T3^{Ras}, permet leur transformation et n'induit pas la sénescence dans ces cellules. Les cellules exprimant Ras présentent une diminution de l'expression de EGR1, qui découle de l'activation de la voie PI3K menant à la diminution de la quantité totale des SRF (S. Y. Shin et al., 2006). Dans le même temps, l'équipe a montré que l'absence de EGR1 induisait une diminution de l'expression de C/EBPB et que la réexpression de EGR1 permettait de réexprimer C/EBPB et d'inhiber la prolifération des 3T3^{Ras}. De plus, la surexpression de EGR1 induit dans les 3T3^{Ras} l'aplatissement des cellules, l'augmentation du signal SA- β -Galactosidase et la dérégulation des gènes du SASP. Une partie de ces effets semble dépendre de la présence de C/EBPB. Les effets observés sur ces cellules dépendent de leur transformation, impliquant la perte du loci CDKN2A et CDKN2B, et plus particulièrement Arf. Arf est capable de moduler l'activité des EGR via des modifications post traductionnelles de EGR-1 favorisant alors l'activité de EGR-1 (Yu et al., 2009).

On peut constater que le rôle de EGR1 dans la sénescence n'est pas clair. En effet on observe une diminution de EGR-1 lors du vieillissement des fibroblastes humains (Meyyappan et al., 1999) alors que dans des fibroblastes murins, l'absence d'EGR1 permet un échappement de sénescence (Krones-Herzig et al., 2003). Les effets présentés sont ici antagonistes et ne permettent pas de conclure sur le rôle pro ou anti sénescence que pourrait jouer la protéine EGR1. La dernière publication, portant sur la sénescence induite par RasV12, indique une diminution de EGR1 lors de l'induction de sénescence (Salotti et al., 2015).

5.4 EGR1 et glucocorticoïdes

Dans la littérature on trouve aujourd'hui des études décrivant une régulation de la transcription et de la traduction de EGR-1 par les glucocorticoïdes, la régulation de NR3C1 par EGR-1, ainsi que le rôle d'interactions entre le récepteur des glucocorticoïdes et EGR-1.

Dans les ostéoblastes, il a été montré que la présence de glucocorticoïdes inhibait l'expression de EGR1 ainsi que de EGR2, EGR3 et EGR4 (N. Leclerc et al., 2004, 2008, 2005), pouvant ainsi donner une piste d'explication mécanistique à l'augmentation des cas d'ostéoporose chez les patients traités à l'aide de glucocorticoïdes (Buehring,

Viswanathan, Binkley, & Busse, 2013; Hansen, Kleker, Safdar, & Bartels, 2014; Mazzantini & Di Munno, 2014; Rizzoli & Biver, 2015; Seibel, Cooper, & Zhou, 2013; Von Scheven, Corbin, Stefano, & Cimaz, 2014). Ces effets d'inhibition de EGR1 par les glucocorticoïdes ont aussi été retrouvés dans des cellules du système immunitaire (Hass et al., 1992; Kharbanda et al., 1991; Mittelstadt & Ashwell, 2001). Ces effets ont été observés lors de la différenciation monocyttaire, avec une modulation au niveau post transcriptionnel et une réduction de la demi-vie de l'ARNm (Hass et al., 1992; Kharbanda et al., 1991). Une autre étude a été réalisée chez la souris afin d'observer les effets de la privation calorique et de la réduction de la quantité de glucose sur les réponses aux traitements de chimiothérapie. Cela a permis de montrer que les traitements glucocorticoïdes pouvaient diminuer la quantité de EGR1 (Di Biase et al., 2017). L'action hyperglycémique des glucocorticoïdes active la voie PKA qui aboutit à une diminution de la quantité de EGR1.

Dans le même temps, d'autres publications ont décrit une augmentation de l'expression de EGR1 en présence de glucocorticoïdes. Ces effets ont été observés dans des neurones. L'expression de SGK1 (Serum and Glucocorticoid Kinase 1) induit l'expression de EGR1 via l'activation des SRF et CREB1 lors du développement de la mémoire spatiale (Tyan, Tsai, Lin, Ma, & Lee, 2008). Des effets similaires ont été observés dans des neurones de l'hippocampe où l'activation de GR induit l'augmentation de EGR-1 dans un mécanisme dépendant de l'activation de la voie MAPK. Cette étude a été réalisée sur des souris afin de déterminer les mécanismes moléculaires liés à la mémoire de la peur médiée par les effets de stress des glucocorticoïdes (Revest et al., 2005, 2010).

Des études existent aussi montrant la régulation inverse, où EGR-1 est capable de moduler l'expression de NR3C1 dans les neurones de l'hippocampe des souris (Hellstrom, Dhir, Diorio, & Meaney, 2012; Weaver et al., 2014). Il existe un site de fixation pour EGR-1 dans un des exons 1 alternatifs du gène NR3C1 (exon 1₇), exprimé dans l'hippocampe. La présence de EGR-1 sur ce site de fixation augmente l'expression d'un isoforme de GR.

Différentes études portant sur des cellules chromaffines de rat ou de bovins ont montré qu'il existait une interaction directe entre les protéines EGR-1 et GR (Carrasco-Serrano & Criado, 2004; Ebert et al., 1994). Ces études ont aussi montré qu'un traitement glucocorticoïdes augmentait la transcription des gènes activés par EGR-1, et que cette réponse était dépendante de la présence d'un site de fixation pour EGR-1 sur le promoteur des gènes cibles.

Les effets et interactions entre glucocorticoïdes et EGR-1 dépendent donc aussi bien du contexte que du type cellulaire étudié.

Résultats

*Sans vouloir la ramener, la seule différence concrète avec des briques,
c'est que vous appelez ça des tartes !*

Lionnel Astier,
Kamelott, Livre I, *Les Tartes aux myrtilles*, écrit par Alexandre Astier.

Résultats

1. Induction de sénescence par B-RAF^{V600E}

Les précédents travaux sur la sénescence induite par les oncogènes effectués au laboratoire ont été effectués sur une lignée de fibroblastes humain WI-38, issus de poumon de fœtus, dans lesquels la sénescence était induite via l'activation d'une protéine C-RAF tronquée (Jeanblanc et al., 2012). Pour ma thèse nous avons changé de lignée cellulaire ainsi que d'inducteurs de sénescence pour travailler sur des fibroblastes humain BJ, issus de peau de prépuce, dans lequel on souhaite induire la sénescence avec un oncogène dont l'expression a un intérêt pour l'étude de la sénescence *in vivo*. L'oncogène avec lequel nous avons travaillé est B-RAF, avec la mutation V600E dont le rôle dans l'induction de sénescence a été montré aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Michaloglou et al., 2005). Nous avons transduit des cellules BJ, immortalisées par l'expression de la télomérase holoenzyme humaine hTert, à l'aide d'un lentivirus contenant le vecteur pTripZ HA-B-RAF^{V600E} (voir matériels et méthodes). La population de cellules a ensuite été sélectionnée à l'aide de puromycine. Nous avons choisi les fibroblastes BJ parce que ces cellules prolifèrent bien en oxygène ambiant ($\approx 20\%$), alors que les fibroblastes WI-38 sont plus sensibles au stress oxydant et poussent mieux en 5% d'oxygène. La plupart des laboratoires ne sont pas équipés en incubateur réglable en oxygène. Le choix des cellules visait à faciliter la culture des cellules et leur distribution à d'autres laboratoires. Nous avons utilisé des cellules BJ immortalisées par l'expression ectopique d'hTert afin d'éviter de l'hétérogénéité cellulaire due aux pertes variables de séquences télomériques. De cette manière, nous étudions la sénescence uniquement due à l'expression de B-RAF^{V600E}, en nous affranchissant de la sénescence induite par l'érosion des télomères. Nous sommes conscients que l'expression de hTert peut potentiellement modifier certains aspects de la réponse cellulaire à l'expression de la kinase RAF activée. Cependant, dans l'article publié

dans Oncogene en 2012, le laboratoire a montré qu'il n'y avait pas de différence évidente dans la sénescence induite par la kinase C-RAF activée dans des fibroblastes non-immortalisés versus des fibroblastes immortalisés. L'utilisation des fibroblastes immortalisés nous semble la meilleure manière d'obtenir des conditions reproductibles d'induction de la sénescence par B-RAF^{V600E}.

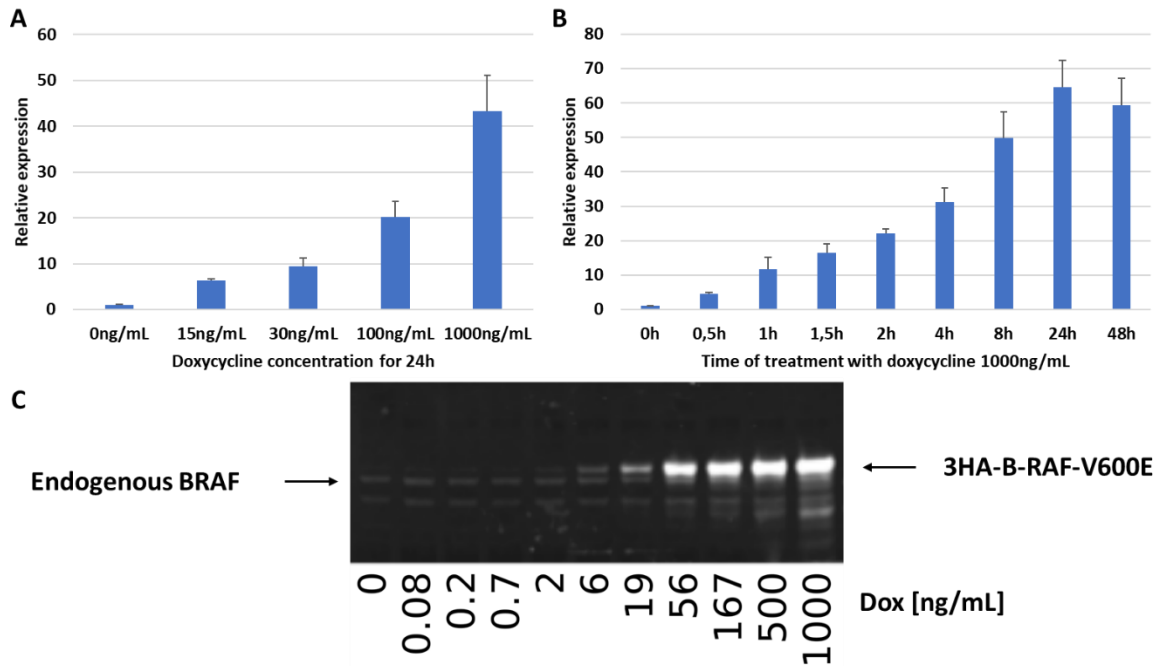


Figure 16 : Expression de B-RAF^{V600E} après ajout de doxycycline à différentes concentrations et après différents temps

A) RT qPCR présentant le niveau d'expression du transcrit 3HA-B-RAF^{V600E} à différentes concentrations de doxycycline pendant 24 heures. Normalisation par GAPDH. B) RT qPCR présentant le niveau d'expression du transcrit 3HA-B-RAF^{V600E} au cours du temps, à 1000ng/mL de doxycycline. Normalisation par GAPDH. C) Western blot présentant les quantités de B-RAF endogènes et de B-RAF mutés (= 3HA-B-RAF^{V600E}) après 48h en présence de différentes concentrations de doxycycline. Normalisation sur la quantité totale de protéine chargée.

L'expression de la protéine B-RAF^{V600E} étant sous le contrôle d'un promoteur TET-on, nous avons dans un premier temps contrôlé le niveau d'expression de B-RAF^{V600E} en fonction de la concentration de doxycycline. On peut voir que la concentration de doxycycline est liée au niveau d'expression de l'oncogène aussi bien au niveau de la transcription (Figure 16A) que de la traduction (Figure 16C). Le niveau d'expression de l'oncogène est équivalent à l'expression de B-RAF endogène à une concentration d'environ 6ng/mL, permettant ainsi de mimer l'apparition d'une mutation *de novo*. On remarque qu'à une forte concentration de doxycycline (1000ng/ml), le niveau d'expression atteint un plateau après 8h (Figure 16B).

Nous avons ainsi créé une lignée cellulaire dans laquelle nous pouvons contrôler finement le niveau d'expression de l'oncogène B-RAF^{V600E} et dont la régulation de

l'expression après traitement par doxycycline intervient en 8h. Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets du niveau d'expression de B-RAF^{V600E} sur la prolifération des cellules. Pour cela, nous avons analysé la capacité de prolifération des cellules à différents niveaux d'expression de B-RAF^{V600E}.

Nous avons réalisé une expérience dans laquelle nous avons planté des cellules, le lendemain nous avons ajouté différentes doses de doxycycline, nous avons attendu 4 jours, puis nous avons compté le nombre de cellules après coloration de l'ADN à l'aide d'un intercalant de l'ADN, Hoechst 33342 ou DAPI. L'étoposide induit un arrêt très rapide de la prolifération via la capture du complexe de clivage de la topoisomérase II sur l'ADN génomique et l'apparition de cassures double-brin (Pommier, Leo, Zhang, & Marchand, 2010). Il nous permet d'obtenir l'information du nombre de cellules au moment de l'ajout des différentes drogues.

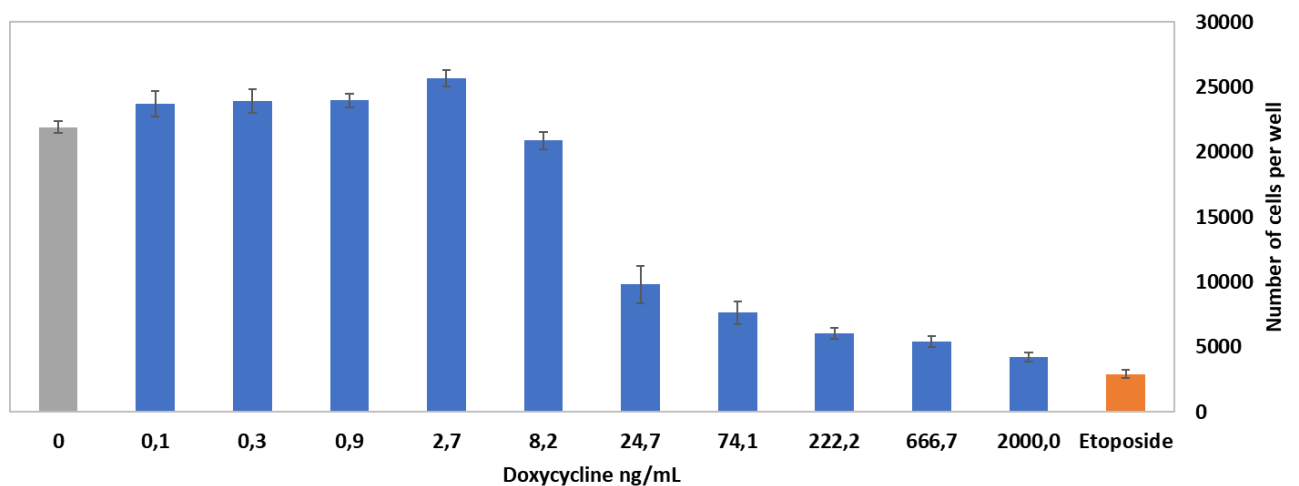


Figure 17 : Prolifération des cellules après différents niveaux d'expression de B-RAF^{V600E}

Nombre de cellules après 4 jours en présence de différentes concentrations de doxycycline, étoposide ou solvant. 4000 cellules plantées, le lendemain traitement avec les différentes drogues. En gris, les cellules traitées avec le solvant donnant l'information du nombre de cellules en prolifération libre. En orange, les cellules en présence d'étoposide, induisant un arrêt du cycle rapide, permettant de connaître le nombre de cellules au moment du plantage. En bleu les différentes concentrations de doxycycline. Nombre de noyau par puits compté à l'aide d'un microscope de criblage haut débit. 6 puits par conditions.

On observe qu'à des doses supérieures à 200ng/ml de doxycycline, les cellules n'ont pas la capacité d'effectuer un doublement en 4 jours (Figure 17). Cependant, cette expérience ne nous fournit pas la raison de cette prolifération limitée. En effet, les cellules peuvent ne plus avoir la capacité de proliférer ou juste avoir une prolifération ralentie.

Nous avons ensuite déterminé la vitesse d'arrêt du cycle cellulaire. À cet effet, nous avons utilisé un analogue de nucléotide, l'Ethynyl deoxy-Uridine (EdU) afin de mesurer la

synthèse d'ADN dans nos cellules. L'EdU incorporé dans l'ADN lors de la réplication de l'ADN peut être détecté par « click-chemistry » avec des marqueurs fluorescents (Chehrehasa, Meedeniya, Dwyer, Abrahamsen, & Mackay-Sim, 2009). Nous avons exprimé différents niveaux de B-RAF^{V600E} dans les cellules, et nous avons ensuite ajouté de l'EdU. L'EdU a été rajouté à différents moments après l'ajout de doxycycline (respectivement 0 jour, 1 jour, 2 jours, 3 jours et 4 jours après) pour une période de 2 jours. Cette durée nous permet ainsi d'être capable de mesurer un cycle cellulaire complet, le temps de doublement étant d'environ 36h.

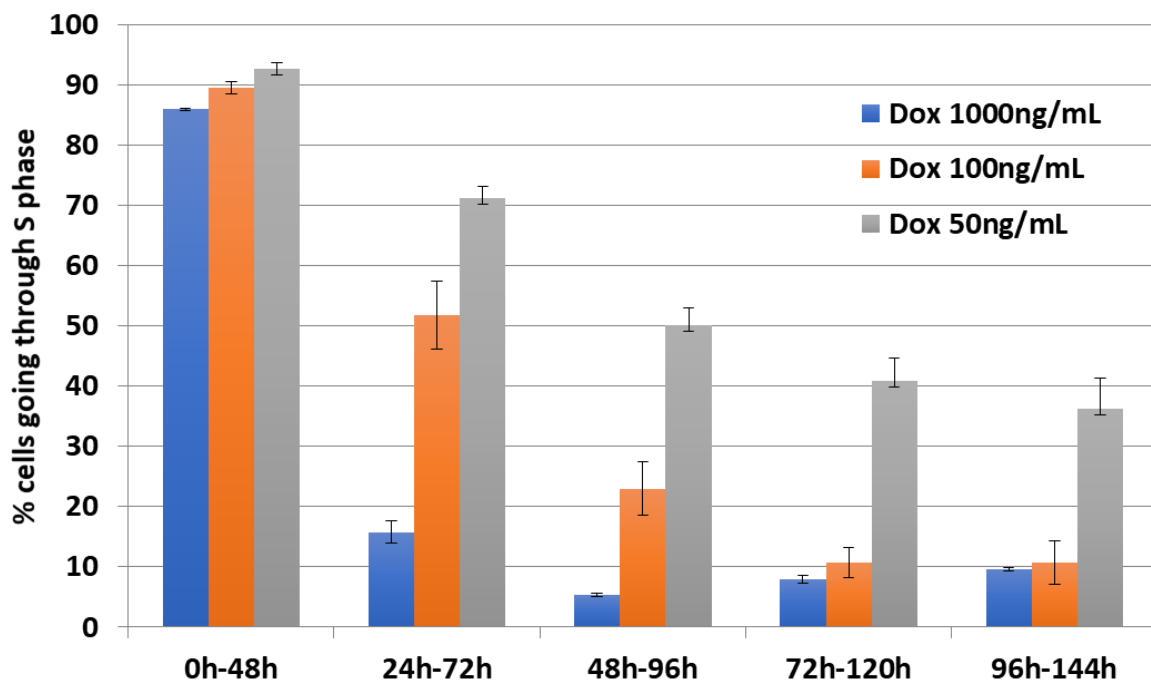


Figure 18 : Cinétique d'arrêt de prolifération après expression de B-RAF^{V600E}

Mesure du pourcentage de cellules incorporant de l'EdU par période de 48h, à différents temps après ajouts de différentes concentrations de doxycycline. Comptage des noyaux totaux et des noyaux marqués à l'aide d'un microscope de criblage haut débit. 3 puits par conditions.

Nous avons ainsi pu observer qu'à une dose de doxycycline de 1000ng/ml, une inhibition de la synthèse d'ADN était visible après 1 jour et la synthèse d'ADN suspendue 2 jours après l'ajout de doxycycline (Figure 18). Contrairement à ce qui a été observé avec RAS^{Val12} (Di Micco et al., 2006; A. W. Lin et al., 1998), on n'observe pas de burst prolifératif avant la sortie des cellules du cycle cellulaire. Pour une dose plus faible de 100ng/ml, l'arrêt complet des cellules nécessite plus de temps, soit 3 jours. Lorsque l'on diminue encore plus le niveau d'expression de B-RAF^{V600E}, à 50ng/ml, on observe alors que les cellules continuent de proliférer 5 jours après l'initiation de l'expression de doxycycline.

Ce résultat nous permet donc d'affirmer qu'aux hauts niveaux d'expression de B-RAF^{V600E} les cellules arrêtent leur prolifération extrêmement rapidement, la plupart étant incapable de répliquer leur ADN dès 24 heures après le début de l'expression de l'oncogène. Nous ne pouvons toutefois pas affirmer qu'à des doses faibles de doxycycline, les cellules finissent par ne plus être capable de synthétiser de l'ADN.

Nous avons donc réalisé une autre expérience, de clonogénicité, sur une durée plus longue afin de nous permettre de déterminer si les cellules sont toujours capables de proliférer. À cette fin, nous avons planté des cellules très diluées afin que chaque cellule pousse de manière isolée et aboutisse à la formation d'un clone. Nous avons traité les cellules avec différentes concentrations de doxycycline, nous les avons laissé proliférer pendant 10 jours, puis nous les avons colorées à l'aide d'un colorant des protéines et de l'ADN, le cristal violet.

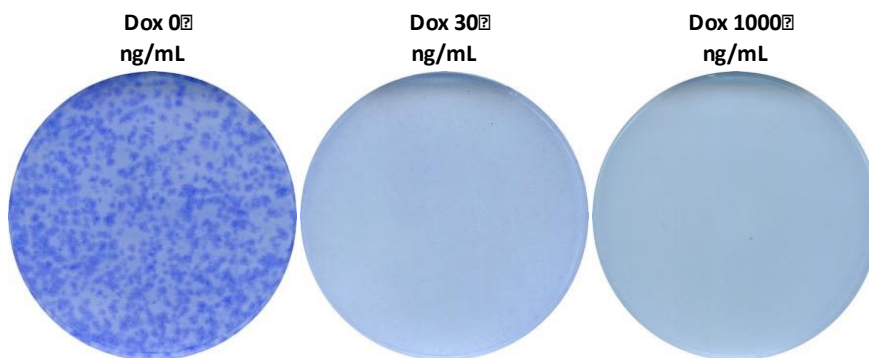


Figure 19 : Clonogénicité à différents niveaux d'expression de B-RAF^{V600E}

6000 cellules plantées dans une boîte 10cm, prolifération pendant 10 jours en présence de doxycycline ou de solvant. La condition Dox 0 ng/mL correspond à la capacité de prolifération libre. Coloration à l'aide de cristal violet.

Sur une durée de 10 jours, on observe que les cellules non induites sont capables de proliférer jusqu'à former des colonies visibles (Figure 19). Lorsque l'on traite les cellules à 1000ng/ml, qui induit un arrêt total des cellules en 2 jours, on ne voit pas la formation de clone. Lorsque que l'on induit faiblement l'expression de B-RAF^{V600E}, à 30ng/ml, on n'observe pas la formation de clone. Cela nous permet donc d'affirmer que même à des faibles doses d'expression de B-RAF^{V600E}, on induit un arrêt de la prolifération *in vitro*.

Par la suite, nous avons décidé d'utiliser principalement la plus haute expression de l'oncogène afin de bénéficier de l'induction quasi synchrone de la sénescence dans nos cellules.

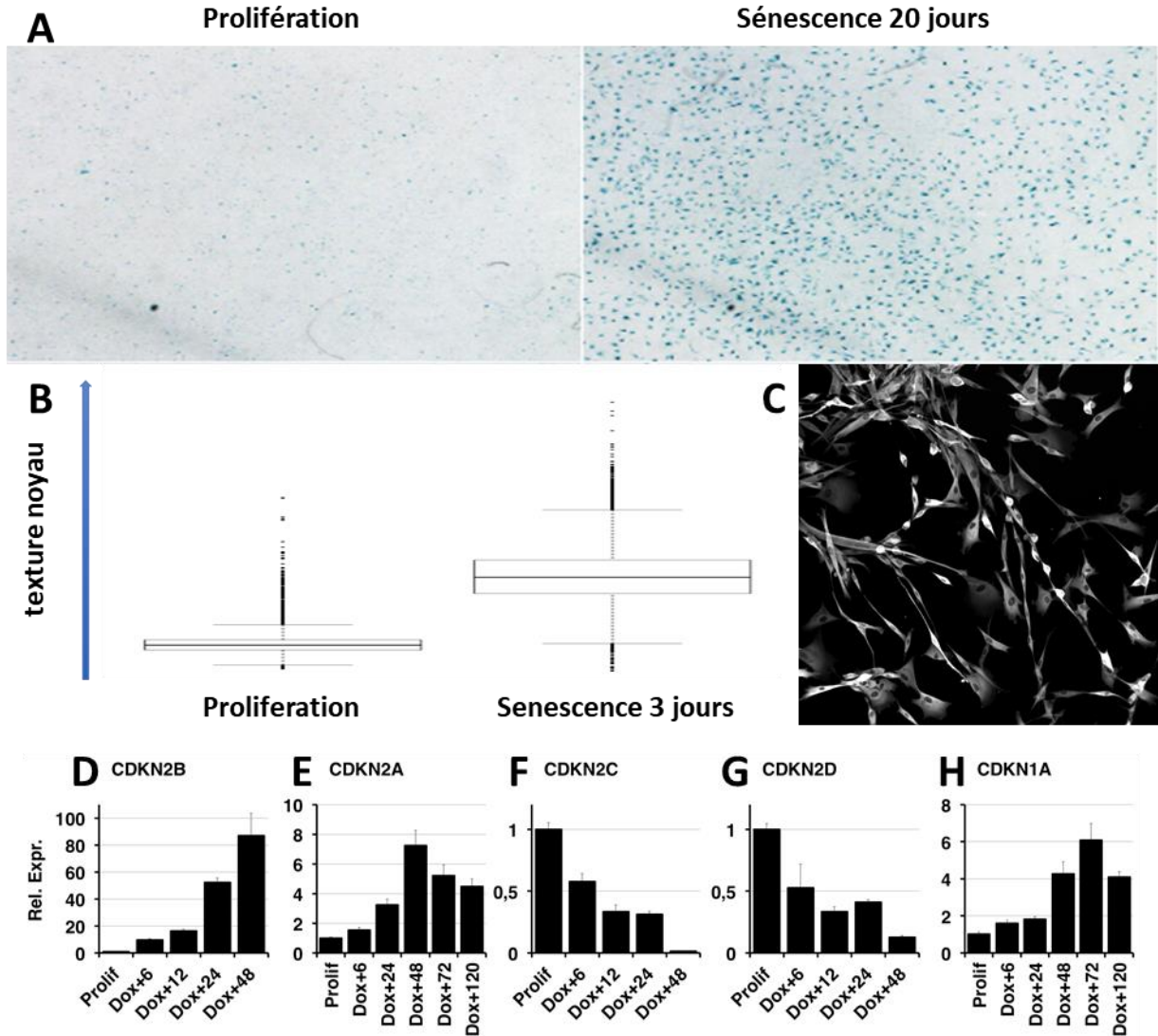


Figure 20 : Caractérisation de la sénescence après expression de B-RAF^{V600E}

A) Microscopie présentant une augmentation de l'activité SA-β-Galactosidase après 20 jours d'expression de l'oncogène muté. B) Score de texture du noyau (*Saddle score*) obtenu à l'aide d'un microscope de criblage haut débit Operetta présentant l'augmentation de la « rugosité » du noyau après expression de l'oncogène muté. C) Modification morphologique des cellules, présentée ici en immunohistochimie. D, E, F, G et H) RT qPCR en cinétique présentant le niveau d'expression du transcrite de différents CKI, respectivement CDKN2B, CDKN2A, CDKN2C, CDKN2D et CDKN1A après différents temps d'expression de l'oncogène muté à doxycycline 1000ng/ml. Temps indiqué en heure. Normalisation par GAPDH. Les données des expériences D, F et G correspondent aux mêmes extraits cellulaires. Les données des expériences E et H correspondent aux mêmes extraits cellulaires.

Après avoir montré un arrêt du cycle cellulaire, nous nous sommes intéressés aux autres marqueurs de sénescence. Dans notre modèle cellulaire, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'activité SA-β-Galactosidase (Figure 20A), l'apparition de SAHF (Figure 20B) et on note l'apparition d'une modification de la morphologie des cellules, avec un étirement des cellules en fuseau (Figure 20C). Cette transformation morphologique distingue la sénescence induite par les kinases RAF de la sénescence induite par RAS (Serrano et al., 1997).

L'expression de CDKN2A p16 a été décrite comme étant un marqueur de sénescence (Beauséjour et al., 2003; Erickson et al., 1998; Rayess, Wang, & Srivatsan, 2012; Serrano et al., 1997) et démontré par le laboratoire comme étant induit et nécessaire pour la sénescence induite par Raf1 (C-RAF) dans des fibroblastes humains WI-38hTERT (Jeanblanc et al., 2012). Dans la même étude, nous avons pu mettre en évidence le rôle de CDKN1A dans l'induction de sénescence mais aussi une dérégulation d'autres CKI (CDKN2B par exemple).

Ici, après expression forte de l'oncogène B-RAF^{V600E}, on observe une dérégulation des CKI (Figure 20D, E, F, G et H). Nous observons ainsi une dérégulation rapide de CDKN2B p15, visible et importante en RTqPCR dès 6 heures après addition de la doxycycline. La dérégulation de CDKN1A et CDKN2A est de moindre ampleur et significative après 48 heures. On remarque aussi une répression rapide de CDKN2C et CDKN2D.

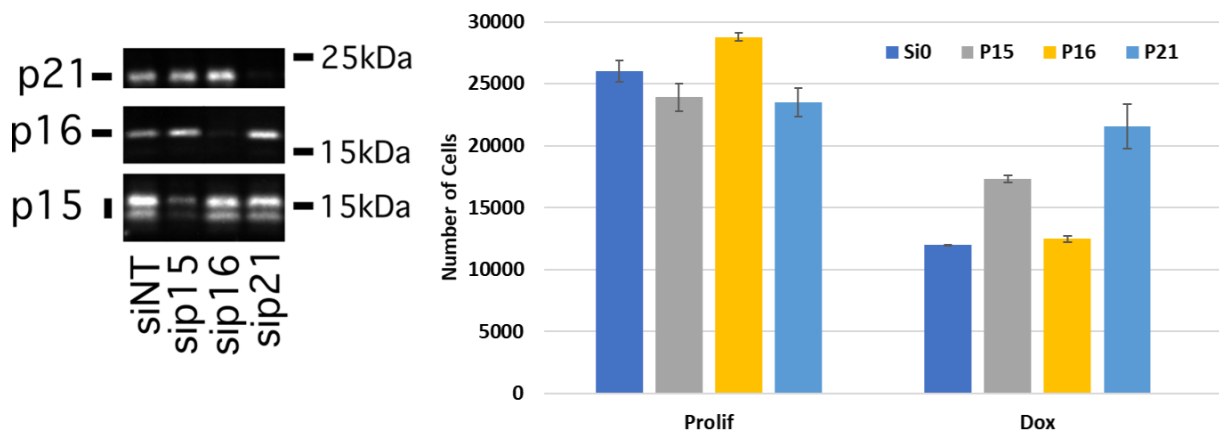


Figure 21 : Effet de la déplétion de CDKN1A, CDKN2A et CDKN2B lors de l'induction de sénescence.

A) Western Blot présentant les effets de déplétions des différents siRNA sur les CKI choisis. Récolte 72h après transfection siRNA et après 48h d'expression de 3HA-B-RAF^{V600E} à doxycycline 1000ng/ml. B) Nombre de cellules en présence de différents siRNA. 4000 cellules plantées, le lendemain transfection des siRNA à 100pM final, 24h après, traitement à doxycycline 1000ng/ml ou solvant (respectivement Dox et Prolif). Si0 : siRNA control. P15 : siRNA dirigé contre CDKN2B. P16A : siRNA dirigé contre CDKN2A. P21 : siRNA dirigé contre CDKN1A. 2 puits par conditions. Comptage des noyaux à l'aide d'un microscope de criblage haut débit 4 jours après l'ajouts des drogues.

Nous avons donc voulu étudier l'effet des déplétions de ces gènes sur l'entrée en sénescence. Pour cela, nous avons transfecté les cellules avec des siRNA puis 24h après nous avons induit l'expression de l'oncogène. Nous avons validé l'effet de déplétion induit par chaque siRNA spécifique après 48 heures d'expression de B-RAF^{V600E} (Figure 21A). La déplétion de ces CKIs n'a pas d'effet sur la prolifération sans induction de l'oncogène. Nous avons ensuite observé l'effet sur la prolifération après expression de l'oncogène : après 4 jours, nous avons compté les cellules (Figure 21B). La déplétion de p21 permet aux cellules

de proliférer malgré l'expression de B-RAF^{V600E}, à un niveau de prolifération proche de celui des cellules n'exprimant pas l'oncogène. La déplétion de p16 ne permet pas d'effet sur la prolifération après expression de B-RAF^{V600E}. La déplétion de p15 donne un résultat intermédiaire, avec un niveau de prolifération inférieur à celui des cellules n'exprimant pas B-RAF^{V600E}.

Avec l'ensemble de ces résultats, nous avons pu donc démontrer que nous avons un modèle cellulaire dans lequel nous pouvons réguler finement le niveau d'expression d'un oncogène d'intérêt pour l'Homme, et que la vitesse d'arrêt de prolifération des cellules est directement corrélée avec le niveau d'expression de l'oncogène. Nous avons observé l'augmentation de l'activité SA-β-Galactosidase, des SAHF, d'une modification morphologique des cellules, ainsi que la dérégulation de CKI. Nous avons aussi pu mettre en évidence le rôle des CKI, plus particulièrement p15 et p21, dans l'induction de sénescence dans notre modèle de fibroblastes humains BJhTERT.

2. Effet des glucocorticoïdes sur la sénescence

Lors d'un stage de fin d'étude au laboratoire, une étudiante avait effectué un crible phénotypique d'une chimiothèque avec pour objectif d'identifier des molécules capables de moduler la sénescence, en éliminant spécifiquement des cellules sénescents, ou de permettre la prolifération des cellules sénescences. La chimiothèque utilisée était la Prestwick Chemical Library, composée d'environ 1200 composés dont l'usage a été validé pour la médecine humaine.

Lors de ce crible, l'ensemble des molécules appartenant à la classe des glucocorticoïdes avait permis une augmentation de la prolifération malgré l'expression d'un oncogène, Raf1 (C-RAF). Les effets des glucocorticoïdes avaient déjà été décrit comme permettant une augmentation du nombre de doublements possibles de fibroblastes humains en retardant la sénescence répliquative (Grove & Cristofalo, 1977; S. Li et al., 1998; Mawal-Dewan et al., 2003; Rosner & Cristofalo, 1979). D'autres expériences avaient aussi démontré la capacité des glucocorticoïdes à moduler de manière spécifique certains composants de la sénescence, comme le SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) (Laberge et al., 2012). L'ensemble de ces raisons nous a donc poussé à étudier les effets des glucocorticoïdes sur l'induction de sénescence par B-RAF^{V600E}.

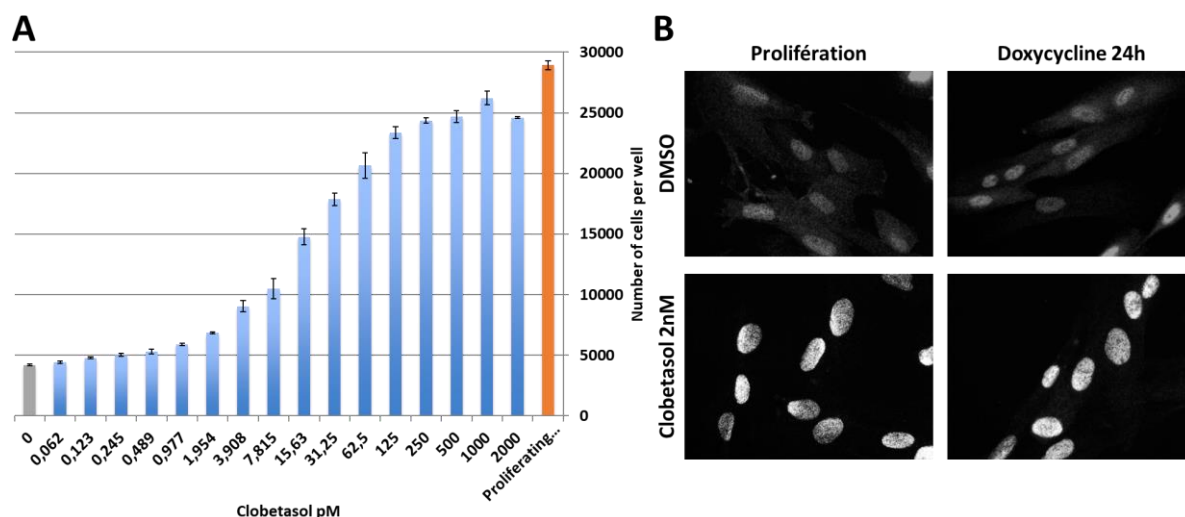


Figure 22 : Effet des glucocorticoïdes sur l'induction de sénescence et translocation du récepteur des glucocorticoïdes.

A) Nombre de cellules après 4 jours en présence de différentes concentrations de clobetasol en présence de doxycycline à 1000ng/ml. 4000 cellules plantées, le lendemain traitement avec les différentes drogues. En gris, les cellules traitées par doxycycline 1000ng/ml et DMSO, le solvant du clobetasol, donnant l'information du nombre de cellules en absence de glucocorticoïdes. En orange, les cellules en présence de d'éthanol et de DMSO, les solvant de la doxycycline et du clobetasol, permettant de connaître le nombre de cellules en prolifération libre. En bleu, le nombre de cellules en fonction de la concentration de clobetasol, en présence de doxycycline. Nombre de noyau par puits compté à l'aide d'un microscope de criblage haut débit. 4 puits par conditions. B) Immunofluorescence montrant la translocation du récepteur de glucocorticoïdes (GR) après ajout du clobetasol à 2nM pendant 2 heures et l'absence d'effet lors de l'ajout du solvant (DMSO). L'expérience a été réalisé dans des cellules en présence d'éthanol ou de doxycycline 1000ng/ml (Prolifération et doxycycline 24h).

Le crible ayant été effectué sur une autre lignée cellulaire de fibroblastes humains (WI38hTERT) et la sénescence induite par un autre oncogène (Raf1-ER), nous avons au préalable voulu confirmer les effets observés dans notre lignée cellulaire. Pour cela, nous avons induit la sénescence à l'aide d'une forte expression de B-RAF^{V600E}, 1000ng/mL. Nous avons décidé d'utiliser un niveau d'expression élevé de l'oncogène afin d'induire un arrêt prolifératif rapide et attendre ensuite 5 jours, permettant ainsi d'avoir une différence importante entre le nombre de cellules induites en sénescence et les cellules en prolifération. Cet écart important pourra alors nous permettre de détecter de faibles effets sur la prolifération.

Pour étudier les effets des glucocorticoïdes, nous avons choisi de travailler avec le propionate de clobetasol (appelé clobetasol par la suite) pour plusieurs raisons. Tout d'abord, lors du crible précédent, ce glucocorticoïde était celui qui permettait la plus grande capacité de prolifération. De plus, il est fréquemment utilisé en médecine humaine en application topique, ce qui rendait son utilisation pertinente pour observer des effets *in vivo* sur la formation de névi et mélanomes induits par B-RAF^{V600E}. Nous avons donc

traité les cellules avec différentes doses de clobetasol et au même moment, induit l'expression de l'oncogène par l'ajout de doxycycline. Nous avons attendu 5 jours après l'ajout des différentes drogues, puis nous avons compté les cellules.

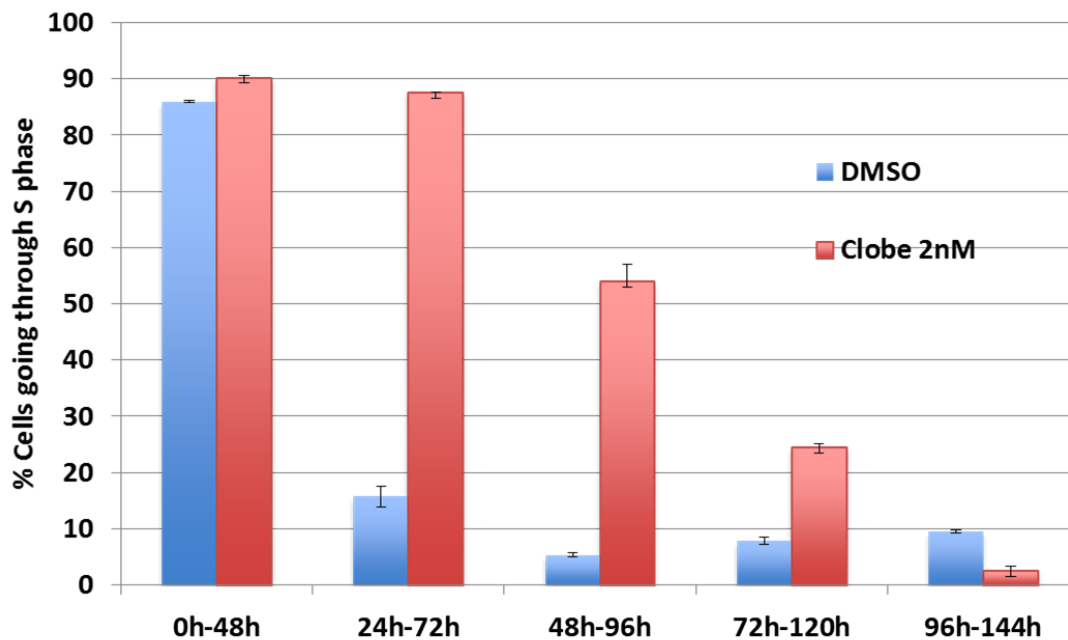


Figure 23 : Cinétique d'arrêt de prolifération après traitement par le clobetasol.

Mesure du pourcentage de cellules incorporant de l'EdU par période de 48h. À 0h ajout de doxycycline 1000ng/ml dans tous les puits. En bleu ajout du solvant DMSO et en rouge de clobetasol à 2nM (DMSO et Clobe 2nM). 3 puits par conditions.

Nous notons alors que les cellules induites en sénescence et traitées par des doses supérieures à 125pM de clobetasol sont capable de proliférer à des niveaux proches des cellules non induites en sénescence (Figure 22A). On observe aussi qu'à de faibles concentration (4pM) des effets sur la prolifération sont notables. Ces concentrations sont extrêmement faibles, pour rappel la concentration circulante de cortisol varie entre 80nM la nuit à 700nM au réveil. En tenant compte du fait qu'il est ici fait mention de la concentration circulante et non pas de la concentration intracellulaire, cela nous interpelle sur l'action que pourrait avoir une augmentation même faible des niveaux de cortisol circulant. De plus, le cortisol est un glucocorticoïde ayant une affinité moindre que le clobetasol pour le récepteur des glucocorticoïdes. Nous avons décidé d'effectuer toutes nos expériences à une concentration de 2nM. Cette concentration faible permet de n'avoir que de très faibles effets sur la prolifération libre des cellules (Figure 24A). En effet, il était important pour nous que les concentrations de clobetasol utilisées n'influent pas sur la capacité de prolifération libre des cellules, les glucocorticoïdes pouvant parfois inhiber la

prolifération cellulaire (Alexandre, Céline, Patrice, Carole, & Philippe, 2014; Ayroldi et al., 2007; Engelbrecht et al., 2003; Poulsen et al., 2014; Ramalingam et al., 1997; Smith & Cidlowski, 2010).

Nous avons ensuite étudié la synthèse d'ADN dans des cellules après induction de sénescence et traitement par le clobetasol. Dans cette expérience, nous observons que les cellules exprimant B-RAF^{V600E} sont capables de synthétiser l'ADN pendant plus longtemps en présence de clobetasol (Figure 23). Je traiterai plus loin la question de l'échappement total ou partiel à la sénescence induite par B-RAF^{V600E} lors d'un traitement par les glucocorticoïdes.

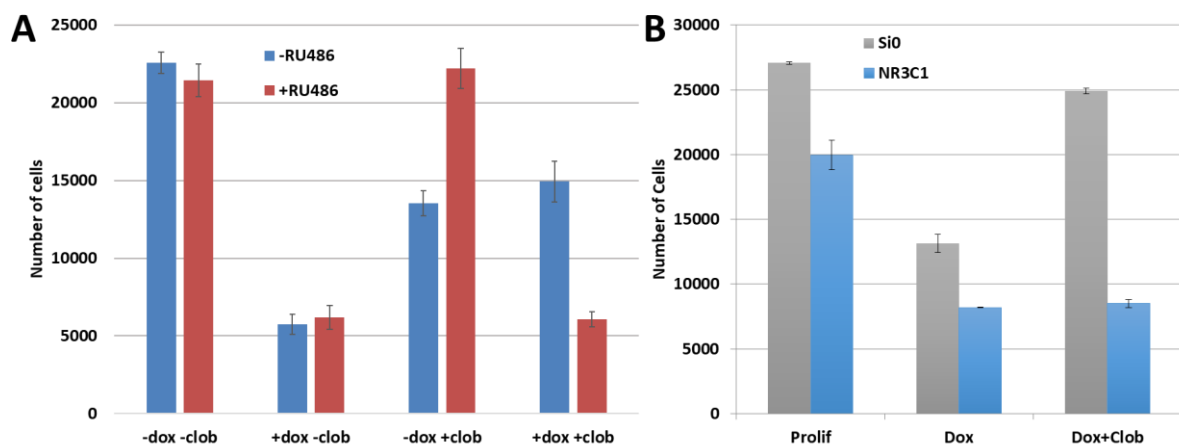


Figure 24 : Contrôle du rôle du récepteur des glucocorticoïdes.

A) Nombre de cellules après 4 jours en présence de RU486. 4000 cellules plantées, le lendemain traitement avec les différentes drogues. En bleu, les cellules traitées par le solvant, DMSO, et en rouge par RU486 à 1 μ M (respectivement -RU486 et +RU486). -dox : solvant éthanol. +dox : doxycycline 1000ng/ml. -clob : solvant DMSO. +clob : Clobetasol 2nM. Nombre de noyau par puits compté à l'aide d'un microscope de criblage haut débit. 4 puits par conditions. B) Nombre de cellules en présence de siRNA. 4000 cellules plantées, le lendemain transfection des siRNA à 100pM final, 24h après, traitement à doxycycline 1000ng/ml ou solvant avec DMSO (respectivement Dox et Prolif) ou avec doxycycline 1000ng/ml et clobetasol 2nM (Dox+Clob). Si0 : siRNA control. NR3C1 : siRNA dirigé contre le récepteur de glucocorticoïdes NR3C1. 2 puits par conditions. Comptage des noyaux à l'aide d'un microscope de criblage haut débit 4 jours après l'ajout des drogues.

Afin de nous assurer de la spécificité des effets observés, nous avons vérifié que les effets que nous contemplions étaient bien dépendants du récepteur des glucocorticoïdes (gène NR3C1), et n'étaient pas dus à un autre mécanisme d'action (par exemple via le récepteur des minéralocorticoïdes). Dans un premier temps, on observe la translocation du récepteur des glucocorticoïdes (GR pour la suite) dans le noyau après l'ajout de

glucocorticoïde (Figure 22B). Par la suite, nous inhibons le récepteur des glucocorticoïdes par deux techniques différentes.

Dans un second temps, nous inhibons la fixation du clobetasol sur le GR à l'aide du RU486 (ou mifépristone), un antagoniste chimique du récepteur des glucocorticoïdes et du récepteur à la progestérones (Figure 24A).

Dans cette expérience, on observe que l'inhibition du récepteur des glucocorticoïdes n'influe pas sur la prolifération libre, ni sur l'induction de sénescence. Comme précédemment décrit dans la littérature, la présence de clobetasol inhibe légèrement les capacités de prolifération des cellules, qui voient leurs capacités normales de prolifération restaurées après traitement par le RU486. Lorsque l'expression de l'oncogène et le traitement clobetasol sont concomitants, on observe ici aussi que les cellules sont capables de proliférer plus que les cellules non traitées par les glucocorticoïdes. Si l'on ajoute l'antagoniste du récepteur des glucocorticoïdes, on constate alors une capacité de prolifération identiques aux cellules non traitées par le clobetasol, ce qui indique que nos résultats sur la prolifération dépendent de la fixation du clobetasol sur le récepteur des glucocorticoïdes.

Nous avons ensuite effectué une déplétion de NR3C1 par l'utilisation d'un siRNA. Dans cette expérience, on peut observer une perte totale des effets du clobetasol sur l'échappement de sénescence (Figure 24B). En effet, lorsque l'on déplete NR3C1, on n'observe aucune différence entre les cellules sénescents traitées par le clobetasol et les cellules sénescents non traitées par le clobetasol. L'ensemble de ces résultats nous permet donc de conclure que les effets observés du clobetasol sur la prolifération dépendent du récepteur des glucocorticoïdes.

3. Modulation de la voie MAPK

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les glucocorticoïdes sont capables de moduler l'activation de la voie MAPK via l'expression de DUSP1 (aussi appelé MKP-1) (Engelbrecht et al., 2003; Gupta, Awasthi, & Wagner, 2007; O Kassel et al., 2001; Shah, King, Chandrasekhar, & Newton, 2014) ou de GiLZ (aussi appelé TSC22D3) (Ayroldi et al., 2002, 2007; Ayroldi & Riccardi, 2009; Cheng et al., 2013) en diminuant la phosphorylation des protéines Erk1 et Erk2 (désigné par la suite par Erk). Des analyses transcriptomiques

nous ont aussi permis d'identifier DUSP1, DUSP5 et GILZ dont l'expression était régulée par le clobetasol (Figure 25A).

Nous avons alors voulu vérifier si les effets sur la prolifération des glucocorticoïdes n'étaient pas dus à une modulation de la voie MAPK. En effet, une diminution de l'activation de la voie MAPK après expression de B-RAF^{V600E} pourrait aboutir à une diminution de l'activité et causer un retard d'entrée en sénescence. Pour cela nous avons regardé par Western Blot la phosphorylation de Erk après expression de B-RAF^{V600E}, en présence ou non de clobetasol. Nous pouvons dans un premier temps noter que la phosphorylation de Erk semble maximale après 6 heures d'expression de l'oncogène. On note également que la présence de glucocorticoïde ne modifie pas le niveau de phosphorylation de Erk (Figure 25B).

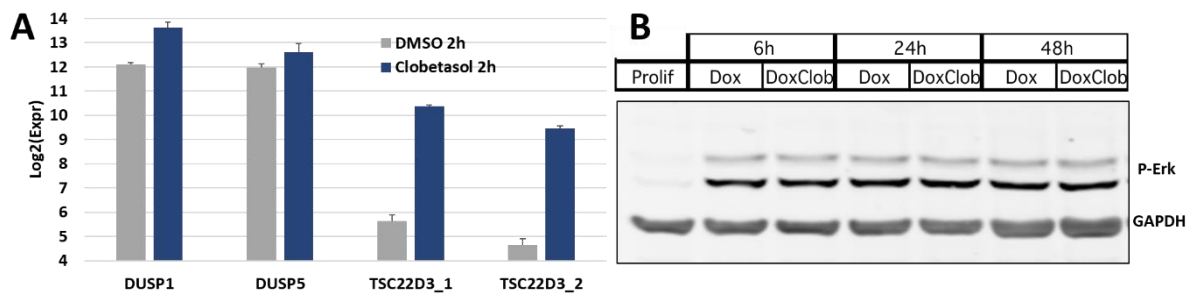


Figure 25 : Quantité relative de DUSP1 DUSP5 et GILZ après traitement par les glucocorticoïdes et effet des glucocorticoïdes sur la phosphorylation de Erk.

A) Analyse transcriptomique bead-array sur des cellules en prolifération, traité par le solvant ou les glucocorticoïdes pendant 2 heures (DMSO 2h et Clobetasol 2h). Log fold change d'expression, n=3. B) Western blot présentant les niveaux de phosphorylation de Erk. Cellules en prolifération en présence d'éthanol et DMSO (Prolif) ou traités pendant 6h, 24h ou 48h en présence de doxycycline 1000ng/ml et DMSO ou doxycycline 1000ng/ml et clobetasol 2nM (respectivement Dox et DoxClob). Normalisation sur la quantité totale de protéine chargée et GAPDH

Ces résultats tendent à montrer une absence d'effet sur la phosphorylation de Erk, mais DUSP1 et DUSP5 sont aussi capables de moduler la voie SAPK/JNK et p38MAPK. De plus les effets de GILZ sont multiples et peuvent moduler la voie AKT/PKB, ainsi que moduler la phosphorylation de Rb. Pour ces raisons, nous avons ensuite réalisé un *knock-down* de ces gènes, afin de quantifier leur rôle dans le retard d'entrée en sénescence des cellules.

Nous avons commencé par valider la déplétion de ces gènes par RTqPCR, après induction par les glucocorticoïdes et utilisation d'un siControl ou d'un siTarget dirigé contre le gène d'intérêt (Figure 26A), on observe bien une déplétion du transcrite des gènes ciblés. Nous avons ensuite réalisé une expérience de déplétion de ces gènes sur le même modèle que celui réalisé à la Figure 21. Nous avons néanmoins rajouté une condition dans

laquelle nous induisons l'expression de B-RAF^{V600E} et dans le même temps nous traitons les cellules avec du clobetasol. L'objectif est ici d'éclaircir sur le rôle de chaque protéine dans le retard d'entrée en sénescence des cellules après traitement par les glucocorticoïdes (Figure 26B). La déplétion de DUSP1 et DUSP5 limite la prolifération libre des cellules, ainsi que la prolifération en sénescence ou en sénescence traité par les glucocorticoïdes (Figure 26), il est donc impossible de conclure sur leur rôle dans la modulation de la sénescence par les glucocorticoïdes. La déplétion de TSC22D3 n'induit pas de différence avec le contrôle, dans aucune des conditions étudiées (prolifération, doxycycline, doxycycline+clobetasol) et nous pensons que cela indique que ce facteur n'est pas un médiateur de l'action des glucocorticoïdes sur la sénescence.

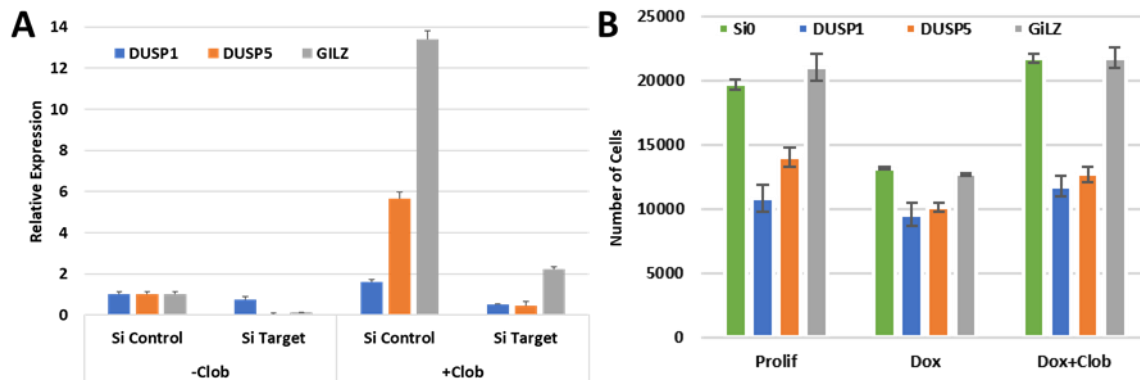


Figure 26 : Validation et caractérisation des effets de la déplétion de DUSP1, DUSP5 et GILZ sur l'induction de sénescence.

A) RT qPCR présentant le niveau d'expression des transcrit DUSP1, DUSP5 et TCS22D3 (GiLZ) en présence de solvant ou de clobetasol 2nM pendant 8h (-Clob et +Clob). Les cellules ont été transfectées 24 heures avant l'ajout des drogues avec un siRNA contrôle (Si Control) ou un siRNA dirigé contre le transcrit d'intérêt (Si Target) à une concentration finale de 100pM. Normalisation par GAPDH, Si Control = 1. B) Nombre de cellules en présence de différents siRNA. 4000 cellules plantées, le lendemain transfection des siRNA à 100pM final, 24h après, traitement à doxycycline 1000ng/ml ou solvant avec DMSO (respectivement Dox et Prolif) ou avec doxycycline 1000ng/ml et clobetasol 2nM (Dox+Clob). Si0 : si control. DUSP1 : siRNA dirigé contre DUSP1. DUSP5 : siRNA dirigé contre DUSP5. GiLZ : siRNA dirigé contre TSC22D3. 2 puits par conditions. Comptage des noyaux à l'aide d'un microscope de criblage haut débit 4 jours après l'ajouts des drogues.

Pour finir, nous avons étudié l'expression de 4 gènes cibles de la voie MAPK, dans des cellules exprimant ou non B-RAF^{V600E} et traitées ou non par le clobetasol, de façon à mettre en évidence des effets globaux du traitement par les glucocorticoïdes sur ces cibles. En effet, il était envisageable que l'activation globale de la voie MAPK soit modifiée par le clobetasol, malgré l'absence de répression importante de la phosphorylation de ERK1/2 analysée par western-blot. Pour cela nous avons observé l'effet d'un traitement court de clobetasol pendant 8h sur des cellules traitées ou non à l'aide de doxycycline 1000ng/ml pendant 8h sur l'expression des gènes DUSP1, c-Fos, JUN et MSK1. Comme attendu, on

observe bien une augmentation de l'expression de tous ces gènes après expression de B-RAF^{V600E} et activation de la voie MAPK (Figure 27).

On observe qu'un traitement clobetasol induit l'expression du gène DUSP1, aussi bien en prolifération qu'après expression de B-RAF^{V600E}. On n'observe pas d'effet de régulation de c-Fos et JUN par le clobetasol, que l'on exprime l'oncogène ou non. Concernant MSK1, dont l'augmentation de l'expression en sénescence a déjà été montré dans cette lignée par un collaborateur (Culerrier, Carraz, Mann, & Djabali, 2016), on n'observe pas d'effet d'un traitement clobetasol en prolifération, alors qu'après expression de B-RAF^{V600E}, on observe une légère diminution de MSK1 après traitement par le clobetasol. Ces résultats montrent que le clobetasol régule différemment des cibles de la voie des MAPK, ce qui nous permet de conclure que ses effets sur la sénescence ne sont pas dus à une diminution globale de la voie des MAPK.

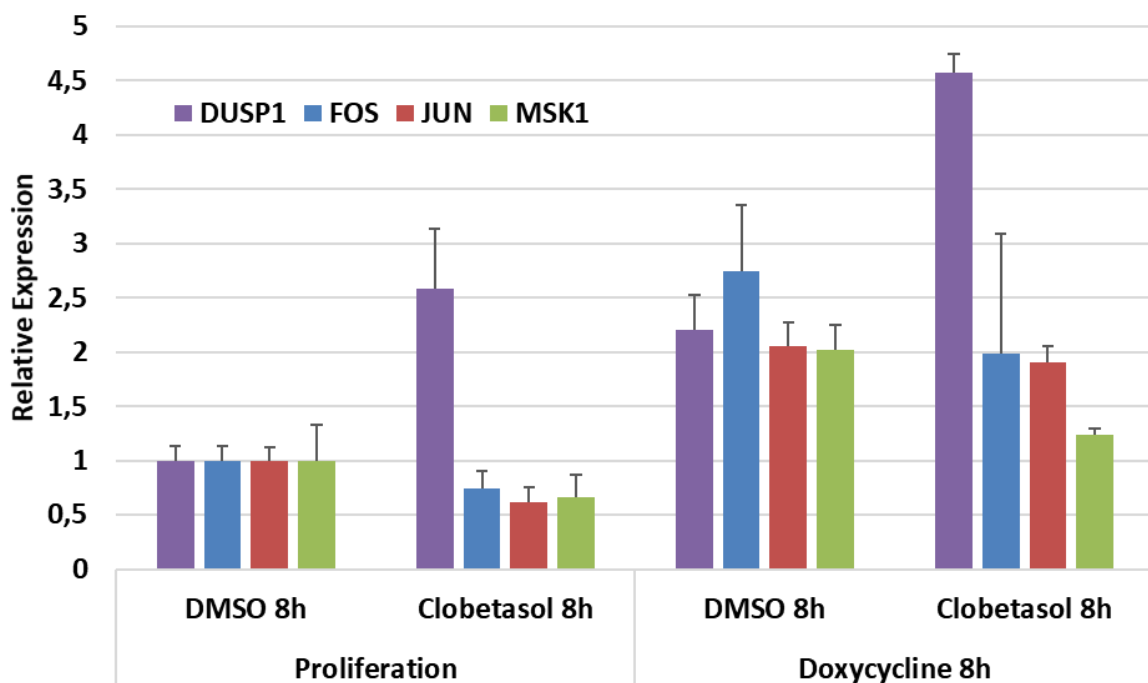


Figure 27 : Effet des glucocorticoïdes sur des gènes cibles de la voie des MAPK.

RT qPCR présentant le niveau d'expression des transcrit DUSP1, c-Fos, Jun et MSK1 en prolifération ou après 8h de traitement doxycycline 1000ng/ml (Prolifération et Doxycycline 8h). Dans le même temps les cellules sont aussi traitées à l'aide de DMSO ou de clobetasol 2nM pendant 8h (DMSO 8h et Clobetasol 8h). Normalisation par GAPDH, Condition « Prolifération DMSO8h » = 1.

Le retard d'entrée en sénescence par les glucocorticoïdes ne semble pas donc pas passer par une inhibition de la voie des MAPK par le clobetasol.

4. Rôle de la voie NF- κ B

En médecine humaine, une des utilisations principales des glucocorticoïdes est de lutter contre l'inflammation (Beck et al., 2009), et un des mécanismes de cette régulation passe par la répression de l'activité NF- κ B (Croxtall, van Hal, Choudhury, Gilroy, & Flower, 2002; Gustafsson, 2015; Hayashi, Wada, Ito, & Adcock, 2004; Hofmann, Hehner, Bacher, Dröge, & Schmitz, 1998; Wikström, 2003). De plus, comme nous l'avons vu précédemment, une des fonctions des glucocorticoïdes sur la sénescence est la modulation de certains composant du SASP, en partie via la modulation de la voie NF- κ B (Laberge et al., 2012). Parmi les activités des composés du SASP on peut citer l'induction de la sénescence de façon paracrine, ou au moins de renforcer les effets de la sénescence (Coppe et al., 2008; Kuilman et al., 2008; Oubaha et al., 2016).

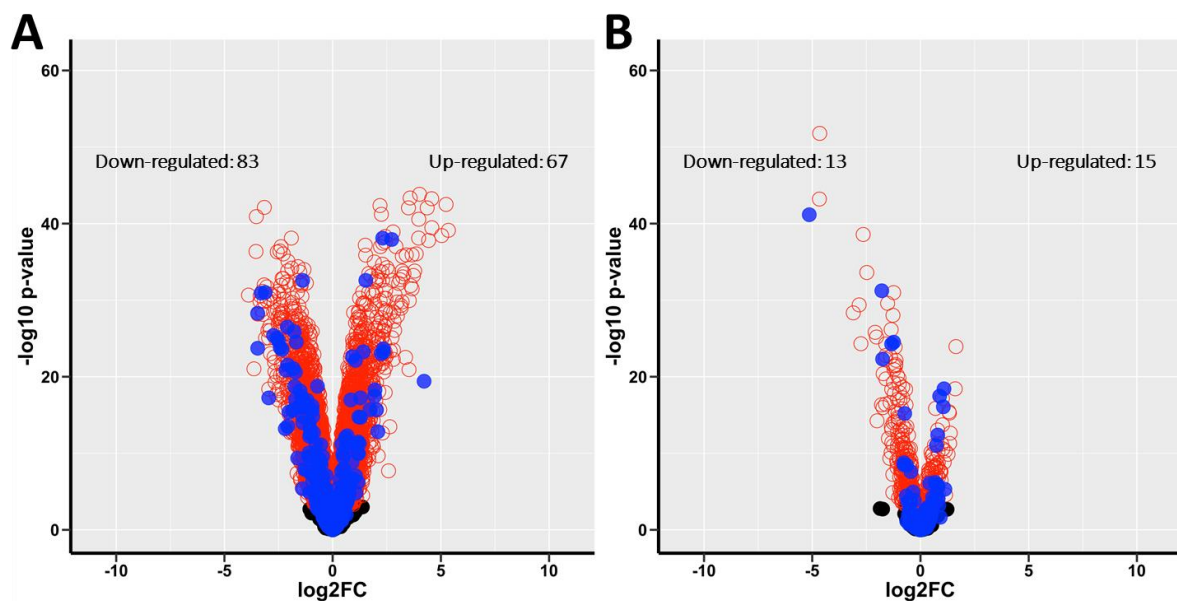


Figure 28 : Volcano plot présentant les gènes cibles de la voie NF- κ B

A) Gènes cibles de la voie NF- κ B (bleu) différentiellement exprimés après 24 heures de présence de doxycycline 1000ng/mL comparé aux cellules en prolifération. 178 gènes non différentiellement exprimé. B) Gènes cibles de la voie NF- κ B (bleu) différentiellement exprimés un traitement de deux heures de clobetasol 2nM ou non sur des cellules traitées à l'aide de doxycycline 1000ng/mL depuis 24h. 300 gènes non différentiellement exprimé.

La liste complète des 347 gènes est présente dans le Matériel et Méthode : Identification des gènes cibles de NF- κ B.

La première étape était de vérifier si dans notre lignée on observait l'induction de gènes dépendants de NF- κ B et dont on pouvait observer la modulation par les glucocorticoïdes. Nous avons pour cela utilisé des données obtenues lors d'une expérience de transcriptomique décrite à la Figure 34. Dans un premier temps nous avons observé que l'expression de l'oncogène B-RAF^{V600E} induisait une expression différentielle

(augmentation et diminution) d'un nombre restreint de gènes cibles de la voie NF- κ B (Figure 28A).

Par ailleurs, un traitement court avec clobetasol ne permet la modification que d'un très petit nombre de gènes de la voie NF- κ B (Figure 28B), ce qui semble indiquer que la répression de la voie NF- κ B par le clobetasol ne joue pas de rôle majeur dans la modulation de l'expression différentielle de ces gènes lors de l'induction de la sénescence.

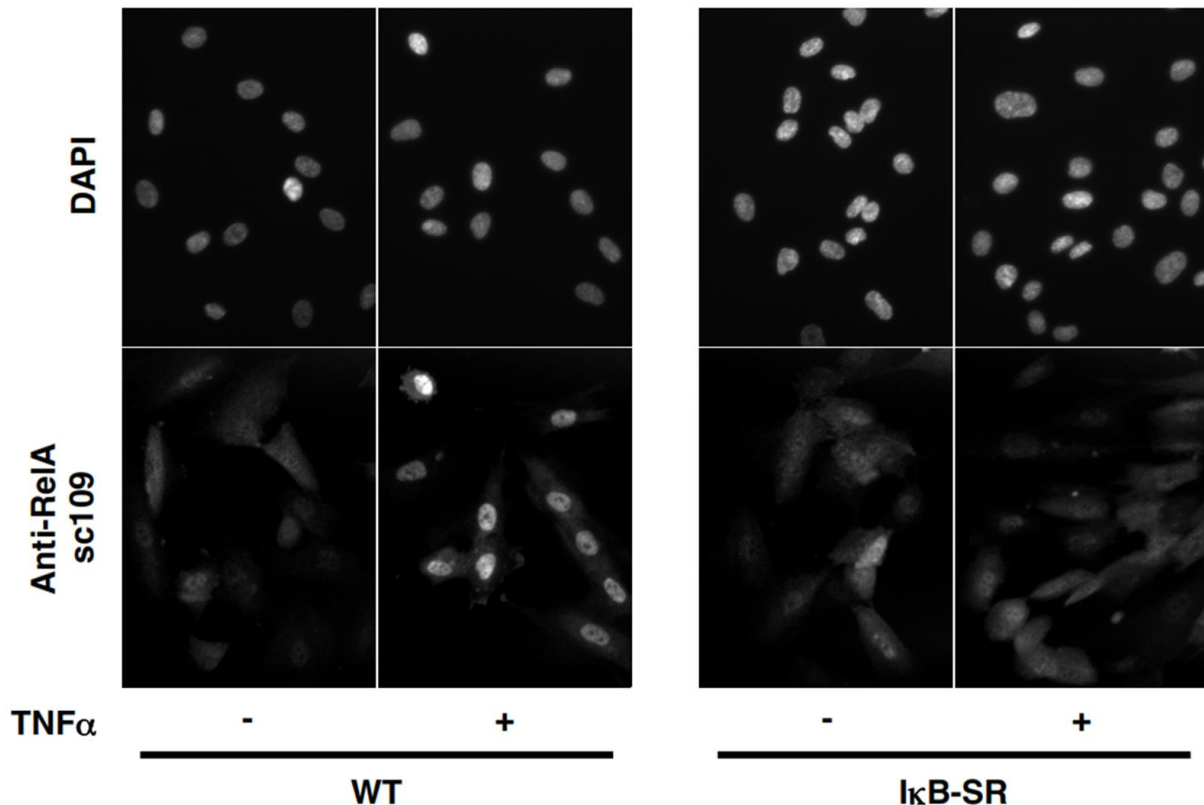


Figure 29 : Absence de translocation de RelA dans la lignée exprimant I κ B mutée comparé à la lignée contrôle

Immunofluorescence présentant l'intensité et la translocation de RelA dans le noyau dans la lignée parentale (WT) et dans la lignée exprimant I κ B-SR (I κ B-SR). Cellules traitées ou non à l'aide de Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α).

Pour évaluer différemment l'implication de la voie NF- κ B, nous avons voulu étudier l'importance de la voie RelA sur l'induction de sénescence dans notre modèle. Dans un premier temps, nous avons utilisé une construction exprimant constitutivement une protéine I κ B mutée, l'I κ B-Super Répresseur (I κ B-SR), dans la lignée de fibroblastes humains hBJ-V600E (Boehm et al., 2007; Brown, Gerstberger, Carlson, Franzoso, & Siebenlist, 1995). RelA est séquestré dans le cytoplasme par I κ B-SR, ce qui empêche la formation du complexe NF- κ B dans le noyau et donc l'expression des gènes dépendants de NF- κ B/RelA (Figure 29). I κ B-SR ne régule pas la protéine RelB qui est séquestrée dans le cytosol uniquement par p100 (Solan, Miyoshi, Carmona, Bren, & Paya, 2002).

Nous avons voulu en premier lieu vérifier s'il était possible d'induire la sénescence dans des cellules n'exprimant pas les molécules du SASP par séquestration de RelA. Nous avons donc traité les cellules avec différentes doses de doxycycline pour faire varier l'expression de l'oncogène et induire la sénescence. Lorsque l'on compare les résultats obtenus dans la lignée exprimant IκB-SR (Figure 30A) par rapport à la lignée parentale (Figure 17A), on voit qu'il n'y a aucune différence entre les deux lignées, nous permettant d'affirmer que l'activité transcriptionnelle de NF-κB/RelA n'est pas nécessaire pour l'induction de la sénescence par B-RAF^{V600E} dans notre modèle.

Nous avons donc reproduit l'expérience de la Figure 22A dans la lignée exprimant IκB-SR (Figure 30B). On peut observer que la présence de clobetasol permet ici aussi une prolifération soutenue des cellules, malgré un niveau d'expression élevé de l'oncogène. Ces résultats nous permettent de conclure que l'expression des gènes dépendants de RelA n'est ni nécessaire à l'induction de sénescence dans notre modèle, ni responsable de l'échappement de sénescence observé lors du traitement par les glucocorticoïdes.

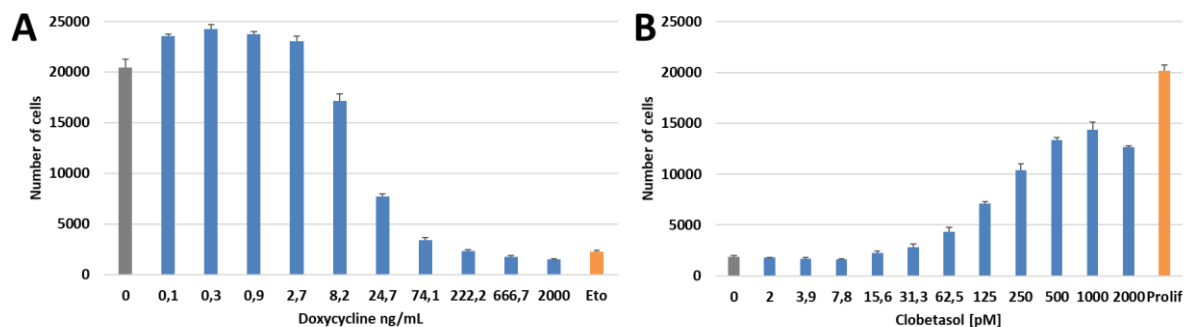


Figure 30 : Expression de B-RAF^{V600E} et traitement clobetasol dans une lignée séquestrant RelA dans le cytoplasme.

A) Nombre de cellules après 4 jours en présence de différentes concentrations de doxycycline, étoposide ou solvant. 4000 cellules plantées, le lendemain traitement avec les différentes drogues. En gris, les cellules traitées avec le solvant donnant l'information du nombre de cellules en prolifération libre. En orange, les cellules en présence d'étoposide, induisant un arrêt du cycle rapide, permettant de connaître le nombre de cellules au moment du plantage. En bleu les différentes concentrations de doxycycline. Nombre de noyau par puits compté à l'aide d'un microscope de criblage haut débit. 6 puits par conditions. B) Nombre de cellules après 4 jours en présence de différentes concentrations de clobetasol en présence de doxycycline à 1000ng/ml. 4000 cellules plantées, le lendemain traitement avec les différentes drogues. En gris, les cellules traitées doxycycline 1000ng/ml et DMSO, le solvant du clobetasol, donnant l'information du nombre de cellules en absence de glucocorticoïdes. En orange, les cellules en présence de d'éthanol et de DMSO, les solvant de la doxycycline et du clobetasol, permettant de connaître le nombre de cellules en prolifération libre. En bleu, le nombre de cellules en fonction de la concentration de clobetasol, en présence de doxycycline. Nombre de noyau par puits compté à l'aide d'un microscope de criblage haut débit. 4 puits par conditions.

De plus le clobetasol a des effets identiques sur la lignée qui exprime IκB-SR, ce qui suggère que les effets ne passent pas par une inhibition des gènes dépendants de RelA, mais plutôt d'une action sur la transcription d'autres gènes.

Néanmoins, ce mutant IκB-SR ne séquestre qu'une composante de la voie NF-κB dans le noyau, et on peut toujours imaginer que d'autres composants vont pouvoir exprimer une réponse inflammatoire. Un des effets principalement recherchés lors de l'usage des glucocorticoïdes en médecine humaine est la diminution de l'inflammation. Cependant les traitements glucocorticoïdes peuvent induire un grand nombre d'effets secondaires, comme, entre autres, l'hyperglycémie, l'immunodéficience, l'ostéoporose, la cataracte, le glaucome, la prise de poids, l'insuffisance surrénalienne... (Moghadam-Kia & Werth, 2010). Il existe aujourd'hui des analogues de glucocorticoïdes ayant pour fonction de ne réprimer que la voie NF-κB afin d'éviter les effets secondaires liés à l'usage des glucocorticoïdes (Beck et al., 2013; De Bosscher et al., 2005; Sundahl, Bridelance, Libert, De Bosscher, & Beck, 2015) et de ne garder que les propriétés anti-inflammatoires des glucocorticoïdes, fonction qui est majoritairement recherchée lors de leurs usages.

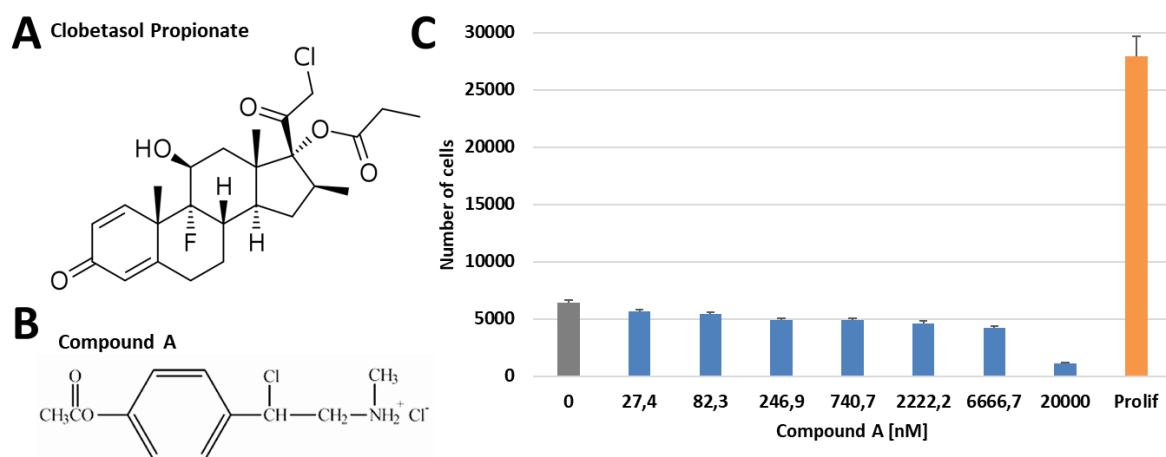


Figure 31 : Comparaison entre le CompoundA et le clobetasol et effet du CompoundA sur l'induction de sénescence.

A) Structure chimique en représentation de Cram du propionate de clobetasol (clobetasol), un stéroïde B) Structure chimique en représentation de Lewis du CompoundA (CpdA), un composé non stéroïdien. C) Nombre de cellules après 4 jours en présence de différentes concentrations de CompoundA en présence de doxycycline à 1000ng/ml. 4000 cellules plantées, le lendemain traitement avec les différentes drogues. En gris, les cellules traitées doxycycline 1000ng/ml et DMSO, le solvant du CompoundA, donnant l'information du nombre de cellules en absence de CompoundA. En orange, les cellules en présence de d'éthanol et de DMSO, les solvant de la doxycycline et du CompoundA, permettant de connaître le nombre de cellules en prolifération libre. En bleu, le nombre de cellules en fonction de la concentration de CompoundA, en présence de doxycycline 1000ng/ml. Nombre de noyau par puits compté à l'aide d'un microscope de criblage haut débit. 4 puits par conditions.

Nous avons donc décider d'utiliser le CompoundA, identifié en 2005 par De Bosscher *et al.*, comme présentant des capacités de répressions de la voie NF-κB. Le Compound A fait partie de la classe des AINS (Anti-Inflammatoire Non Stéroïdiens) (Figure 31A et B). Les traitements glucocorticoïdes à long-terme induisent un grand nombre d'effets secondaires indésirable qui sont dus à l'activation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes par

la présence du récepteur des glucocorticoïdes (Figure 10). Le compound A a été identifié comme permettant l'inhibition de l'expression des gènes dépendants de NF-κB sans activer la transcription des autres gènes pouvant être responsable des effets secondaires des traitements glucocorticoïdes (De Bosscher et al., 2005). Nous avons donc reproduit l'expérience d'échappement de sénescence effectuée avec le clobetasol, en utilisant le Compound A à la place, afin de mesurer l'importance de l'inhibition de l'activité NF-κB dans le délai d'entrée en sénescence. Nous pouvons ici remarquer qu'à aucune des concentrations utilisées nous n'observons d'augmentation de la capacité de prolifération des cellules, et que la concentration la plus élevée a même un effet d'inhibition de la prolifération des cellules (Figure 31C).

Ces résultats sont appuyés par les résultats que nous avons vu au chapitre précédent : GILZ est aussi connu pour se fixer à NF-κB et inhiber la transcription des gènes dépendant de NF-κB (Ayroldi et al., 2001; Cheng et al., 2013; Di Marco et al., 2007), et sa déplétion n'a pas d'effet sur la capacité du clobetasol à moduler l'induction de la sénescence (Figure 30B).

Nous avons donc démontré que NF-κB ne semble pas jouer de rôle majeur dans l'induction de la sénescence. De plus, les glucocorticoïdes modulent la sénescence de façon indépendante à celles de leurs effets sur la voie NF-κB.

Ainsi, malgré les effets connus des glucocorticoïdes sur l'inflammation et les gènes du SASP, ainsi que les effets du SASP sur l'induction et le renforcement de la sénescence, les effets des glucocorticoïdes observés précédemment sur le retard d'entrée des cellules en sénescence ne semblent pas dépendre de la voie NF-κB.

5. Effets du clobetasol sur les CKI

Nous avons remarqué que les CKI p15 et p21 jouaient un rôle dans l'induction de sénescence et que les glucocorticoïdes permettaient de moduler l'induction de sénescence dans notre modèle. Nous avons voulu savoir si la modulation de sénescence par les glucocorticoïdes était due à une modification de l'expression de ces CKI.

Pour cela nous avons observé l'expression des CKI en sénescence, traité ou non par les glucocorticoïdes. Nous avons vu dans la Figure 20D que la dérégulation de l'expression de CDKN2B en sénescence était rapide et importante. Ici nous observons que le traitement

des cellules par le clobetasol induit une diminution forte de l'expression de CDKN2B (Figure 32A), qui reste cependant supérieure à l'expression en prolifération. Concernant CDKN1A, nous avons vu Figure 20H que la dérégulation était plus lente, et nous voyons ici (Figure 32B) que les glucocorticoïdes induisent une diminution du niveau d'expression de CDKN1A, allant jusqu'à réduire l'expression à un niveau comparable à celui observé en prolifération.

Cette expérience nous permet donc de montrer que le niveau d'expression des CKI est régulé par la présence de clobetasol.

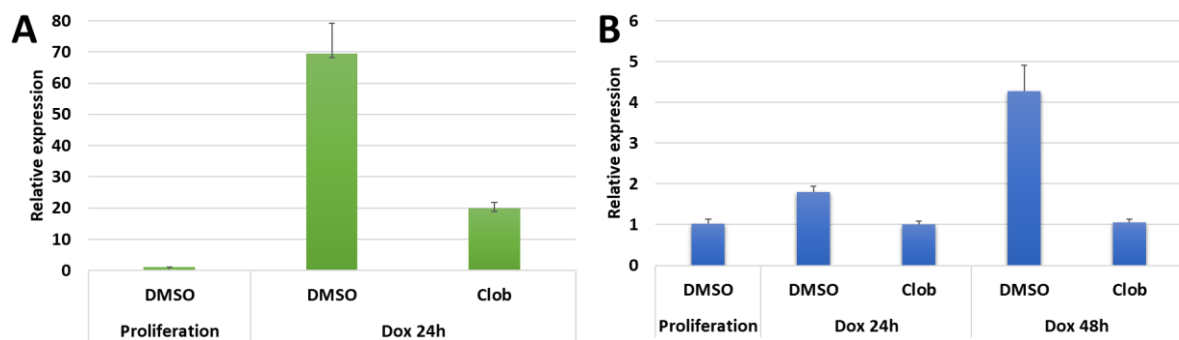


Figure 32 : Effet de l'expression de B-RAF^{V600E} et d'un traitement clobetasol sur l'expression de CDKN2B et CDKN1A.

A) RT qPCR présentant le niveau d'expression du transcrit CDKN2B en prolifération ou après 24h de traitement doxycycline 1000ng/ml (Prolifération et Dox 24h). Dans le même temps les cellules sont aussi traitées à l'aide de DMSO ou de clobetasol 2nM pendant 24h (DMSO et Clob). Normalisation par GAPDH, Condition « Prolifération DMSO » = 1. B) RT qPCR présentant le niveau d'expression du transcrit CDKN1A en prolifération, après 24h ou 48h de traitement doxycycline 1000ng/ml (Prolifération, Dox 24h et Dox 48h). Dans le même temps les cellules sont aussi traitées à l'aide de DMSO ou de clobetasol 2nM pendant 24h (DMSO et Clob). Normalisation par GAPDH, Condition « Prolifération DMSO » = 1.

Nous avons voulu par la suite savoir si la déplétion de CDKN1A et CDKN2B par les glucocorticoïdes étaient responsable de l'ensemble des effets des glucocorticoïdes sur le retard d'entrée en sénescence observé. Pour cela, nous avons repris nos expériences de déplétions de CDKN1A et CDKN2B (Figure 21), mais nous avons aussi traité les cellules avec les glucocorticoïdes et effectué une déplétion simultanée de CDKN1A et CDKN2B (Figure 33).

Dans un premier temps, on remarque qu'en prolifération, aucune des déplétions n'a d'effet substantiel sur le nombre de cellules, pas même la double déplétion (« Prolif », barre grise, cyan et verte vs barre bleu).

Lorsque les cellules exprimant fortement B-RAF^{V600E} sont traités par le clobetasol à 2nM, on observe un niveau de prolifération équivalent à celui des cellules non induites (barres bleues, « Sen+Clobe » vs « Prolif »), rappelant les résultats observées Figure 22A et Figure 24B. Lorsque l'on déplete CDKN1A ou CDKN2B et que l'on traite les cellules avec

du clobetasol, on observe une augmentation du niveau de prolifération comparé aux cellules pour lesquelles les CKI n'ont pas été déplétés (« Sen+Clobe », barre grises et cyan vs bleu). De même, l'effet de la déplétion d'un CKI couplée à un traitement glucocorticoïdes est systématiquement supérieur à l'effet de la déplétion d'un CKI sans traitement glucocorticoïde (« Sen » vs « Sen+Clobe »). Il est intéressant de noter que le niveau de prolifération des cellules déplétées pour un CKI et traitées par clobetasol est équivalent à celui des cellules dont les deux CKI ont été déplétés mais sans addition de glucocorticoïde. Ce résultat peut s'expliquer simplement : nous avons relevé précédemment que les glucocorticoïdes réprimaient l'expression des CKI, donc un traitement clobetasol couplé à une simple déplétion a pour effet de diminuer l'expression des deux CKI.

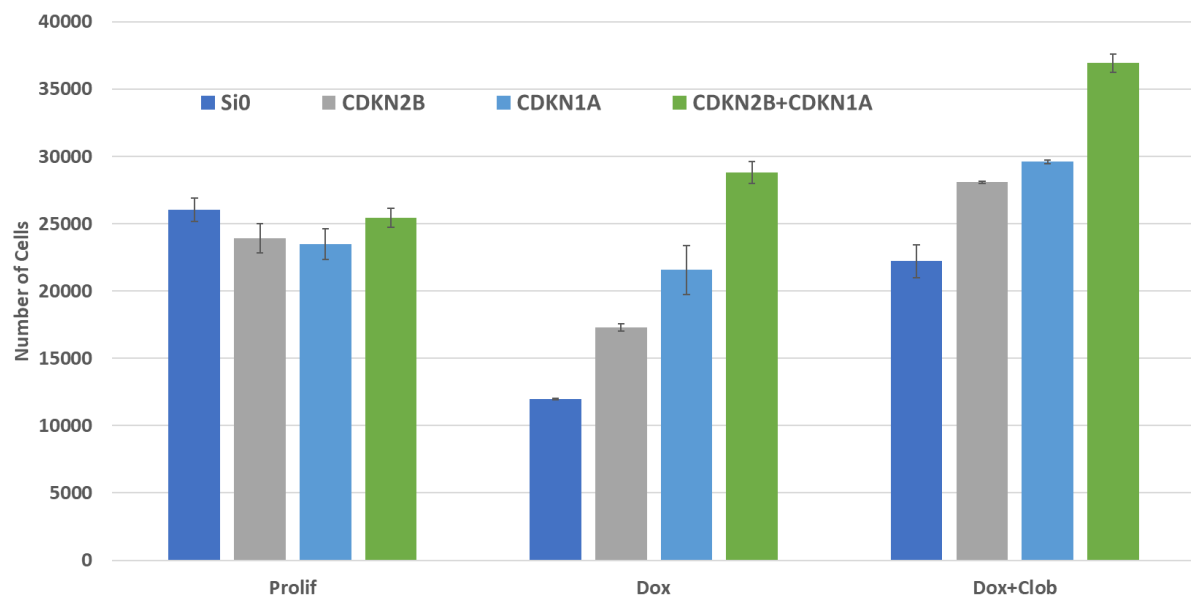


Figure 33 : Effet de la déplétion de CDKN1A et CDKNB lors de l'induction de sénescence et traitement clobetasol

Nombre de cellules en présence de différents siRNA. 4000 cellules plantées, le lendemain transfection des siRNA à 100pM final, 24h après, traitement à doxycycline 1000ng/ml ou solvant avec DMSO (respectivement Dox et Prolif) ou avec doxycycline 1000ng/ml et clobetasol 2nM (Dox+Clob). SiO : siRNA control (bleu). CDKN2B : siRNA dirigé contre CDKN2B (gris). CDKN1A : siRNA dirigé contre CDKN1A (cyan). CDKN2B+CDKN1A : siRNA dirigé contre CDKN2B et CDKN1A (vert). 2 puits par conditions. Comptage des noyaux à l'aide d'un microscope de criblage haut débit 4 jours après l'ajouts des drogues.

Cependant, lorsque les cellules subissent une double déplétion CDKN1A et CDKN2B après expression de B-RAF^{V600E} on observe un effet synergique, permettant aux cellules une prolifération supérieure à celle observée pour une simple déplétion (« Sen », barre verte vs barre grise et cyan). La double déplétion, combinée au traitement clobetasol lors de l'induction de sénescence, nous permet aussi d'observer une « hyperprolifération » des

cellules (supérieure aux cellules en prolifération libre) (barre verte, « Sen+Clobe » vs « Prolif »).

Ces observations confirment un rôle synergique de p15 et p21 dans l'arrêt prolifératif lors de l'expression de B-RAF^{V600E}, et au-delà, montrent qu'une stimulation mitogène couplée à la déplétion de CKIs permet une prolifération accrue des cellules. Le fait que le clobetasol permette systématiquement une prolifération accrue, même dans le cas de la double déplétion CDKN2B/CDKN1A indique qu'il existe d'autres cibles qui freinent la prolifération lors de l'induction de la sénescence.

6. Effets transcriptomiques du clobetasol et identification de cibles

Afin d'identifier les gènes modulés par le clobetasol, nous sommes passés d'une approche ciblée sur des gènes déjà identifiés comme jouant un rôle dans notre modèle (CDKN2B et CDKN1A) à une approche globale. Pour cela, nous avons effectué une analyse transcriptomique en *bead-array* sur des échantillons en prolifération, induit en sénescence pendant 24h et traité ou non par le clobetasol. Nous avons voulu identifier des cibles directes, en effectuant un traitement court (2heures) par le clobetasol.

Nous recherchions des gènes répondant au profil suivant :

- l'expression est modulée par l'induction de sénescence
- le traitement clobetasol restaure une expression proche de celle en prolifération
- le traitement par Compound A n'a pas d'effet ou un effet différent de celui du clobetasol

Nous avons donc pu identifier une liste de gènes répondant à ces critères (Figure 34).

En parallèle à cette étude, et en collaboration avec la plateforme PARI au CEA, nous avons effectué un crible pilote de siRNAs sur un petit ensemble de 200 gènes exprimant des protéines associées à la chromatine et impliquées dans la transcription et la régulation épigénétique. Le but de ce crible était d'identifier des gènes nécessaires à l'induction de la sénescence. Nous avons pu comparer les résultats de ce crible avec les résultats de notre analyse transcriptomique, et nous avons eu la chance de constater que la déplétion de

EGR1 permet une prolifération accrue lors de l'induction de sénescence, alors que EGR1 est induit par l'expression de B-RAF^{V600E}, et est un gène candidat pour une régulation directe par le clobetasol, sans être affecté par le Compound A (Figure 35A et B).

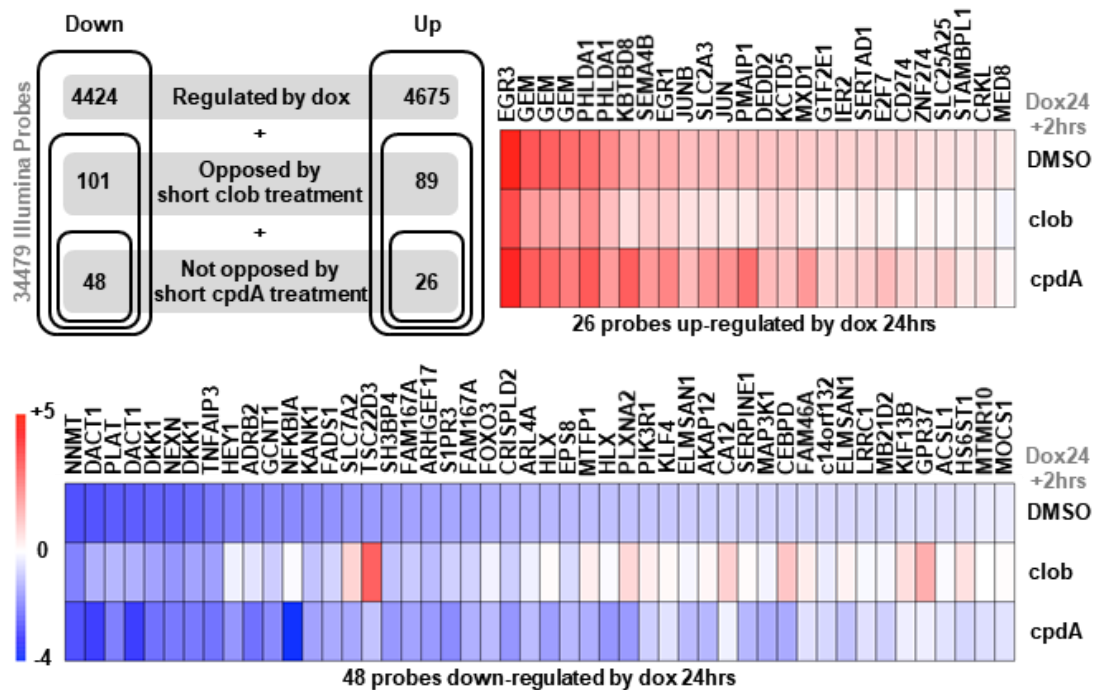


Figure 34 : Liste gènes identifiés par analyse transcriptomique en bead-array

Liste des sondes identifiées répondant au profil recherché à savoir dont l'expression est modulée par l'induction de sénescence (Regulated by Dox), où le traitement clobetasol restaure une expression proche de celle en prolifération (Opposed by short clob treatment) et où le traitement par Compound A n'a pas d'effet ou un effet différent de celui du clobetasol (Not opposed by short cpdA treatment)

Il est intéressant de noter que la déplétion de EGR1 n'a pas d'effet significatif sur la prolifération normale. Il est à noter que la déplétion de JUNB, qui était présent dans la banque de siRNAs utilisée, ne permet pas d'échappement significatif de la sénescence.

De façon remarquable, E2F7 est aussi un gène candidat issu de notre analyse. E2F7 a récemment été impliqué dans la sénescence induite par les oncogènes (Aksoy et al., 2012) dans un modèle de fibroblastes IMR90 exprimant une protéine RAS mutée. Dans cette étude, E2F7 était le seul membre de la famille E2F dont le niveau était augmenté en sénescence, et les auteurs ont montré que la déplétion de E2F7 et pRB permettait un échappement complet de la sénescence dans leur modèle, et que la déplétion seule de E2F7 permettait cet échappement dans des fibroblastes BJ exprimant RasV12. Cela nous indique donc que la méthode d'analyse choisie nous permet d'identifier des gènes pertinents dans l'induction de sénescence par les oncogènes.

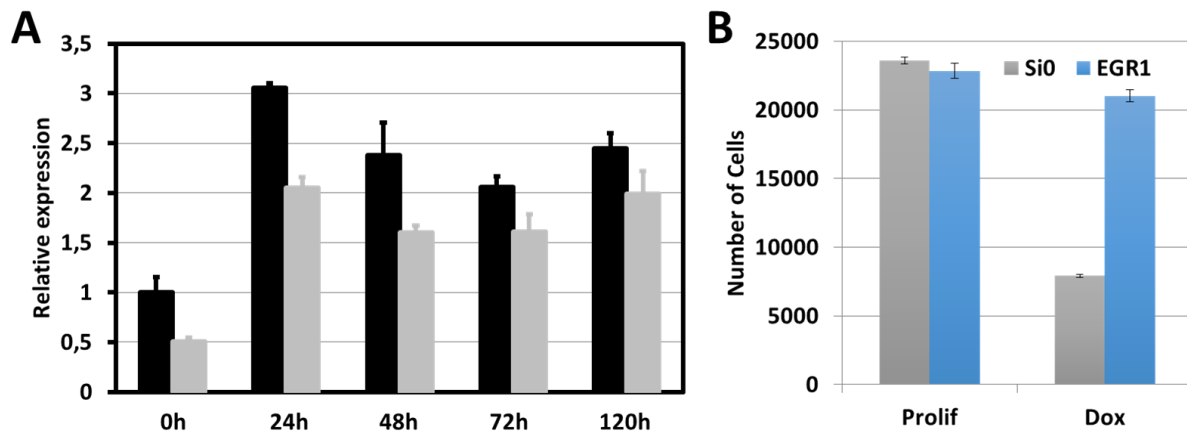


Figure 35 : Identification de EGR1 par double approche transcriptomique et siRNA

A) Analyse des données obtenues en *bead-array* présentant l'expression relative de EGR1 après différents temps de présence de doxycycline 1000ng/mL, respectivement 0h, 24h, 48h, 72h et 120h, avec traitement court (2h) de DMSO (barre noire) ou de clobetasol 2nM (barre grise). B) Nombre de cellules en présence de différents siRNA. 4000 cellules plantées, le lendemain transfection des siRNA à 100pM final, 24h après, traitement à doxycycline 1000ng/ml ou solvant avec DMSO (respectivement Sen et Prolif). Si0 : siRNA control (gris). EGR1 : siRNA dirigé contre EGR1 (cyan).

Comptage des noyaux à l'aide d'un microscope de criblage haut débit 4 jours après l'ajouts des drogues.

Enfin, on remarque que ni CDKN1A, ni CDKN2B ne figurent dans cette liste. En effet, dans les données de Bead-Array, ni CDKN1A ni CDKN2B ne sont significativement réprimés par un traitement de 2hrs par le clobetasol. En RT-qPCR, nous n'avons pas non plus observé d'effet significatif de traitements courts. Ces données suggèrent que ni CDKN1A ni CDKN2B ne sont des cibles directes du clobetasol.

7. EGR-1 et CKI

EGR-1 est potentiellement une cible directe des glucocorticoïdes, et sa déplétion permet une prolifération accrue lors de l'induction de la sénescence (Figure 35B). EGR1 est un facteur de transcription, pourrait-il être impliqué dans l'induction de CDKN1A et CDKN2B ? Un lien entre EGR-1 et CDKN2B avait déjà été établi dans un autre contexte de lignée hépatocytaire (Hu et al., 2010) alors que le lien entre EGR-1 et CDKN1A a lui été démontré à de nombreuses reprises dans des modèles différents (Choi et al., 2008; Della Ragione et al., 2003; S.-J. Kim, Kim, Shim, & Chang, 2014; Parra, Gutiérrez, & Ferreira, 2013; S. Y. Shin et al., 2010). De plus des analyses in-silico et des données présentes sur ENCODE indiquent qu'un grand nombre de site de fixation de EGR-1 sont présent à proximité de sites d'initiation de la transcription de CDKN1A (Figure 36).

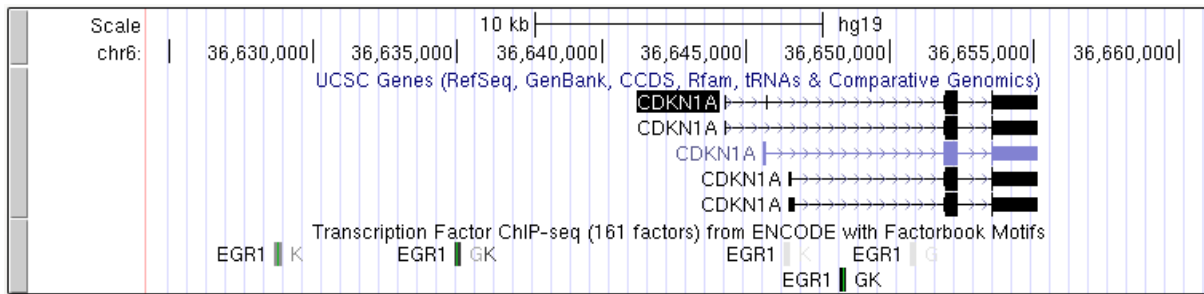


Figure 36 : Site de fixation EGR-1 connu sur le promoteur de CDKN1A

Données Encode présentant les sites de fixations vérifiés de EGR-1 sur le promoteur de CDKN1A.

Nous avons observé que l'expression de B-RAF^{V600E} induit l'expression de EGR-1, qui est réprimée par les glucocorticoïdes. Dans le même temps, nous avons observé que le traitement par les glucocorticoïdes induisait une répression de CDKN1A et CDKN2B. Nous nous sommes donc demandé si l'expression de CDKN1A et CDKN2B était régulée par EGR-1 dans notre modèle d'induction de sénescence (Figure 37).

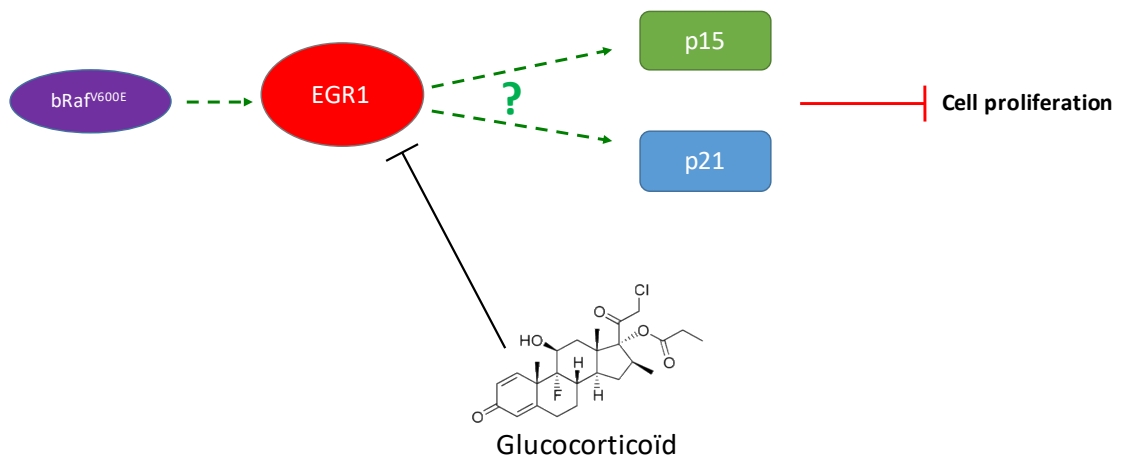


Figure 37 : Hypothèse de régulation de l'expression de CDKN1A et CDKN2B par EGR-1

Schéma présentant une voie simplifiée de l'inhibition de la prolifération après expression de 3HA-B-RAF^{V600E} via EGR1 puis CDKN1A (p21) et CDKN2B (p15). On présente aussi la répression de EGR1 par les glucocorticoïdes.

Nous avons alors étudié les effets de la déplétion de EGR1 par siRNA sur l'expression de CDKN2B et CDKN1A (Figure 38A) en prolifération et après 24 heures et 48 heures d'induction forte de l'oncogène. Comme attendu, on observe bien l'induction de ces CKI lors de l'induction de sénescence. On observe aussi que la déplétion de EGR1 (validée en Western blot Figure 38B) induit une diminution de l'induction de CDKN2B et CDKN1A.

L'augmentation forte de l'expression de CDKN2B après expression de B-RAF^{V600E} n'est cependant pas inhibée lors de la déplétion de EGR1. On note que le niveau d'expression reste largement supérieur à celui des cellules où B-RAF^{V600E} n'est pas exprimé. L'expression de CDKN1A après expression de B-RAF^{V600E} augmente entre 24h et 48h, mais reste

mesurée comparée à l'augmentation de l'expression de CDKN2B. À 24h, la déplétion de EGR1 régule l'expression de CDKN1A au niveau observé en prolifération. À 48h, malgré la déplétion de EGR1, on observe une augmentation du niveau d'expression de CDKN1A.

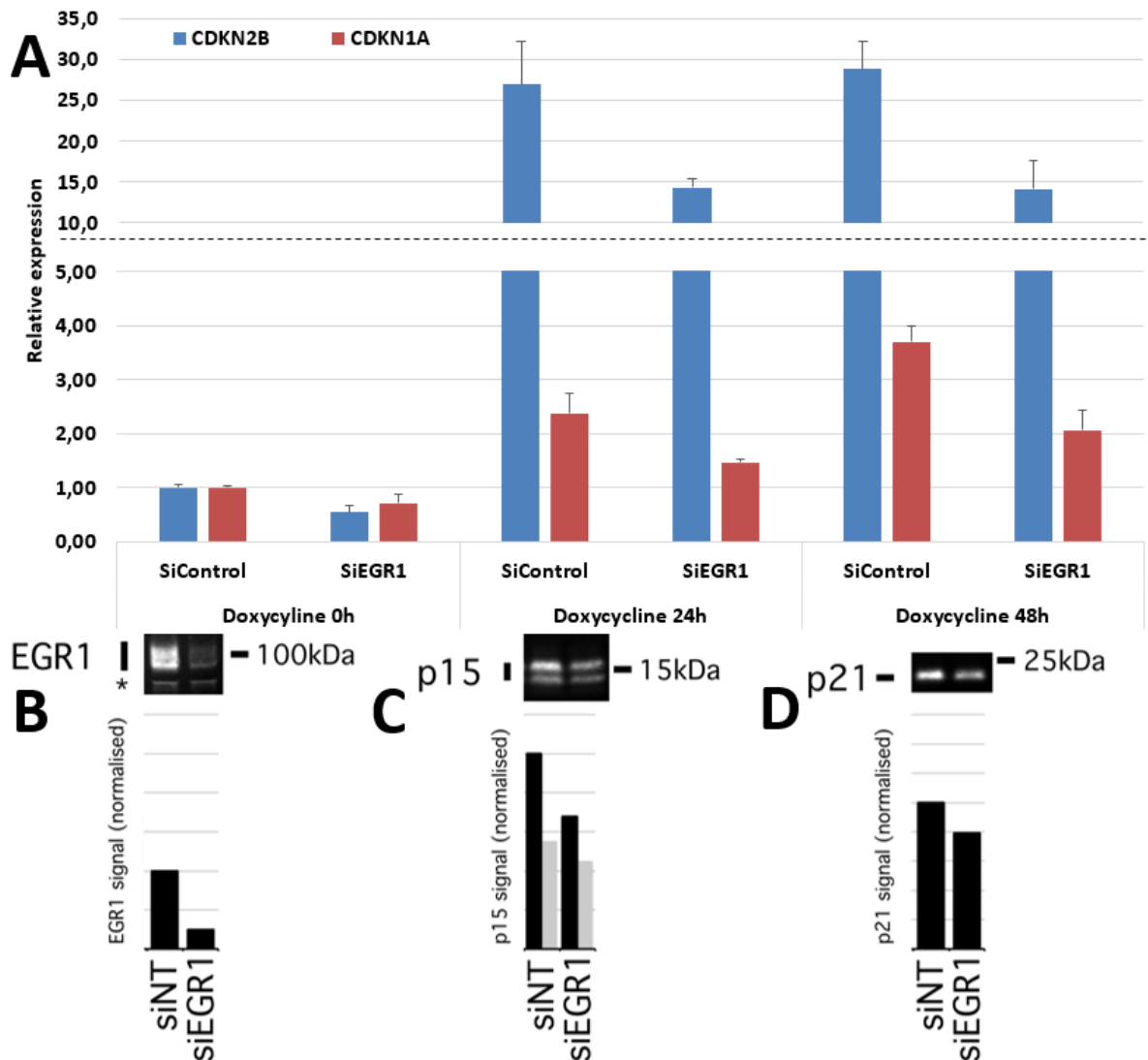


Figure 38 : Effet de la déplétion de EGR1 sur CDKN2B p15 et CDKN2A p21.

A) RT qPCR présentant le niveau d'expression de CDKN2B et CDKN1A après différents temps d'expression de 3HA-B-RAF^{V600E}. ARN récolté après 0h, 24h et 48h de doxycycline 1000ng/ml. Les cellules ont été transfectés 24 heures avant l'ajout des drogues avec un siRNA control (SiControl) ou un siRNA dirigé contre le transcrit d'EGR1(SiEGR1) à une concentration finale de 100pM. Normalisation par GAPDH, Si Control = 1. B) Western blot présentant l'efficacité de la déplétion de EGR1 et ses effets sur la quantité de p15 et p21. Les cellules ont été transfectés 24 heures avant l'ajout des drogues avec un siRNA control (siNT) ou un siRNA dirigé contre le transcrit d'EGR1(siEGR1) à une concentration finale de 100pM. Le lendemain les cellules ont été traitées à doxycycline 1000ng/ml pendant 48h puis récoltées. La détection de p15 présente deux bandes, chaque bande a été quantifiée séparément, d'où la présence d'une barre noire et d'une barre grise. La normalisation a été effectuée sur la quantité de protéines chargée.

Les effets de la déplétion de EGR1 ont ensuite été vérifiés au niveau de la traduction de p15 et p21. Un Western blot a été réalisé sur des extraits récoltés 72h après transfection du siRNA EGR1 et 48h de traitement doxycycline 1000ng/ml. Nous avons alors

pu observer une diminution de la quantité de p15 d'environ 30% après déplétion de EGR1 (Figure 38C). Les effets de la déplétion de EGR1 sur la quantité de p21 sont plus faibles, on observe une diminution de la quantité de p21 d'environ 20% (Figure 38D). On notera que les effets de la déplétion de EGR1 sont plus importants au niveau de l'ARN qu'au niveau protéique. Nous concluons de ces expériences qu'EGR-1 participe à l'augmentation de l'expression de CDKN2B et CDKN1A en sénescence, mais n'est sans doute pas le seul facteur responsable de la transcription de ces CKI.

La question suivante était de savoir si les effets observés sur la prolifération par les glucocorticoïdes dépendaient de cette régulation des CKI par EGR1 ou s'il existait d'autres voies impliquées. Pour cela nous avons donc effectuées des combinaisons de déplétions de différents transcrits : EGR1, CDKN2B et CDKN1A (Figure 39).

Dans un premier temps on peut remarquer qu'aucune de ces déplétions, mêmes combinées, ne semble avoir d'effet substantiel sur les cellules en prolifération. Lorsque l'on induit les cellules en sénescence, on observe des effets différents selon les gènes ciblés, la déplétion de EGR1 ou CDKN1A ayant des effets plus prononcés que celle de CDKN2B seul.

Lorsque l'on étudie les doubles déplétions, on observe que pour la déplétion EGR1+CDKN2B les effets sont antagonistes à ceux de la seule déplétion de EGR1.

La double déplétion EGR1+CDKN1A présente elle un effet de prolifération légèrement supérieur à chaque déplétion seul, on a donc un faible effet synergique.

La double déplétion CDKN2B+CDKN1A, comme déjà observé lors des chapitres précédents, permet aux cellules de proliférer comme les cellules n'ayant pas été induite en sénescence, comme pour la double déplétion EGR1+CDKN1A. Les effets additionnels dû à la triple déplétion EGR1+CDKN1A est celle qui, en sénescence, donne la plus grande capacité de prolifération des cellules.

Par la suite, on étudie les effets combinés des multiples déplétions et d'un traitement glucocorticoïde sur l'induction de sénescence.

Les résultats concernant la déplétion de CDKN2B, CDKN1A ou CDKN2B+CDKN1A sont comparables à ceux examinés à la Figure 21.

On note que la déplétion de EGR1 couplé à un traitement clobetasol donne un niveau de prolifération accru, avec une augmentation du nombre de cellule supérieur à 50% après 4 jours de prolifération par rapport aux cellules non sénescents. De façon remarquable,

cette prolifération est équivalente à celle observée quand EGR1, CDKN2B et CDKN1A sont déplétés avec traitement clobetasol, et supérieure à la prolifération observée pour les combinaisons EGR1+CDKN2B et EGR1+CDKN1A. Il faut noter cependant que la densité cellulaire dans un puit de boîte 96-puits avec plus de 45000 noyaux comptés est très forte, à un niveau tel que la prolifération pourrait être fortement réprimée par inhibition de contact. Il faut aussi noter que nous avons observé que la mesure du nombre de cellules était moins fiable à ces densités. Il n'est donc pas exclu que la prolifération des cellules déplétées en EGR1+CDKN2B+CDKN1A en présence de clobetasol soit supérieure à la prolifération des cellules simplement déplétées en EGR1.

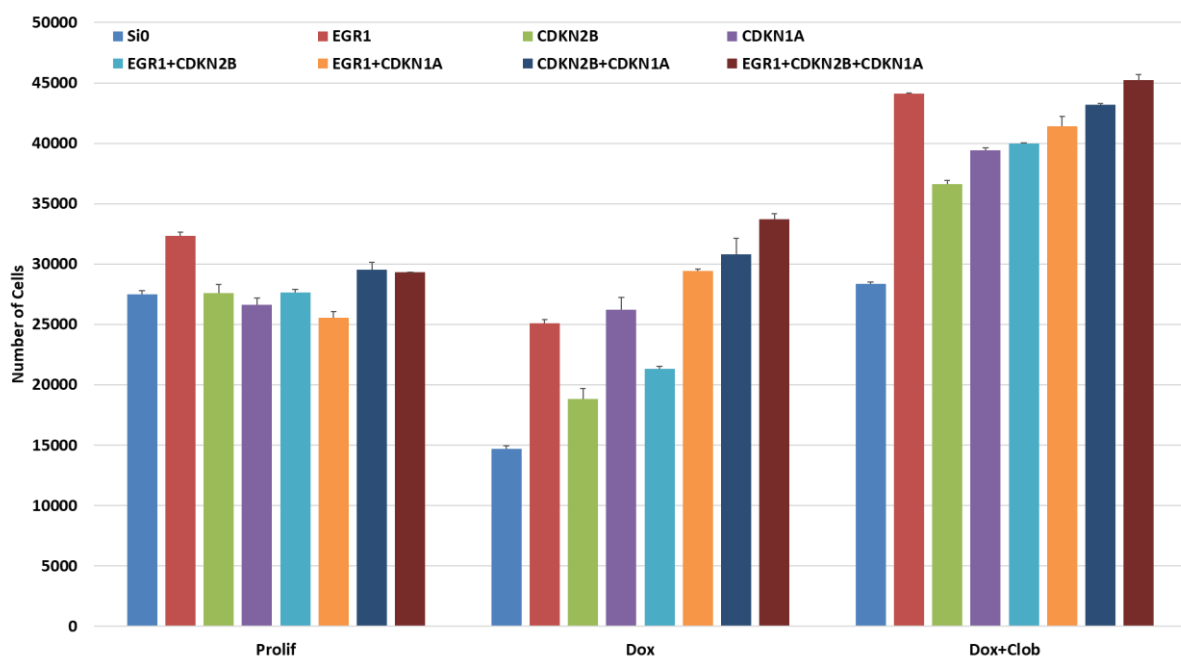


Figure 39 : Déplétions combinées de EGR1, CDKN2B et CDKN1A sur l'induction de sénescence

Nombre de cellules en présence de différents siRNA. 4000 cellules plantées, le lendemain transfection des siRNA à 100pM final, 24h après, traitement à doxycycline 1000ng/ml ou solvant avec DMSO (respectivement Dox et Prolif) ou avec doxycycline 1000ng/ml et clobetasol 2nM (Dox+Clob). SiControl : siRNA control. EGR1 : siRNA dirigé contre EGR1. CDKN2B : siRNA dirigé contre CDKN2B. CDKN1A : siRNA dirigé contre CDKN1A. EGR1+CDKN2B : siRNA dirigé contre EGR1 et CDKN2B. EGR1+CDKN1A : siRNA dirigé contre EGR1 et CDKN1A. CDKN2B+CDKN1A : siRNA dirigé contre CDKN2B et CDKN1A. EGR1+CDKN2B+CDKN1A : siRNA dirigé contre EGR1, CDKN2B et CDKN1A. 2 puits par conditions. Comptage des noyaux à l'aide d'un microscope de criblage haut débit 4 jours après l'ajouts des drogues.

Comme nous l'avons observé précédemment, le fait que le clobetasol permette systématiquement une prolifération accrue, même dans le cas de la triple déplétion EGR1+CDKN2B+CDKN1A indique qu'il existe d'autres cibles qui freinent la prolifération lors de l'induction de la sénescence.

Par ailleurs, nous avons observé des différences morphologiques entre les cellules sauvages et les cellules déplétées en EGR1 lors de l'induction de sénescence. On n'observe

pas ni l'allongement des cellules, ni l'organisation en « réseau » que nous avons vue après induction de sénescence par B-RAF^{V600E} dans les fibroblastes (Figure 20C).

8. EGR-1 et échappement de sénescence

Pour mieux caractériser le rôle de EGR-1 dans l'induction de sénescence, nous avons analysé la capacité des cellules déplétées en EGR1 à répliquer leur ADN lors de l'induction de sénescence. Nous avons repris la même expérience que pour la Figure 18 avec ici une déplétion de EGR1 24h avant le début de l'expression de B-RAF^{V600E}, et traitement ou non par clobetasol (Figure 40).

Sans traitement par le clobetasol, lorsque EGR1 est déplété, on constate que 40% des cellules encore la capacité d'entrer en phase S 48h après l'induction de sénescence. On remarque toutefois que cette capacité est perdue 72h après l'induction de sénescence. Nous observons aussi que 25% des cellules traitées par le siRNA contrôle ont toujours la capacité d'entrer en phase S 72h après l'induction de sénescence si elles sont traitées par le clobetasol.

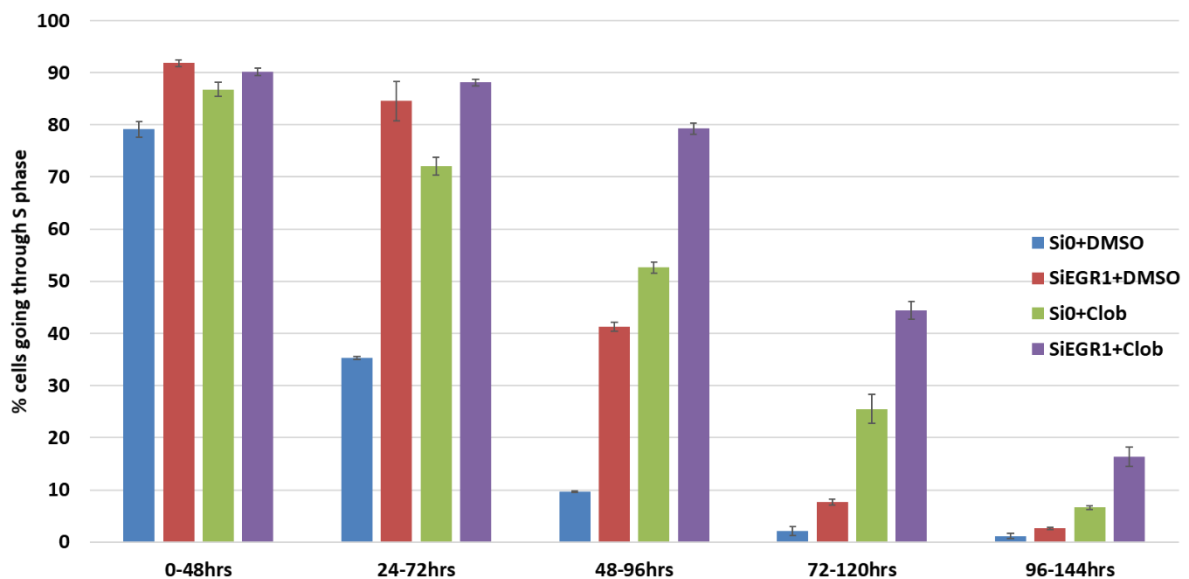


Figure 40 : Cinétique d'arrêt de prolifération après expression de B-RAF^{V600E}, avec et sans déplétion de EGR1

Mesure du pourcentage de cellules incorporant de l'EdU par période de 48h. À 0h ajout de doxycycline 1000ng/ml dans tous les puits. Clob indique les cellules traitées par sur clobetasol 2nM et DMSO les cellules traitées par le solvant DMSO. Les cellules ont été transfectées avec un siRNA contrôle (Si0) ou dirigé contre EGR1 (SiEGR1) à une concentration finale de 100pM 24 heures avant l'ajout des drogues. 3 puits par conditions.

Enfin, on observe un effet synergique entre la déplétion de EGR1 et le traitement par le clobetasol pour retarder la perte de la capacité à entrer en phase S. Ces résultats sont cohérents avec la capacité proliférative observée par comptage de noyaux à la Figure 39.

La question suivante était de savoir si la perte de EGR1 permet aux cellules d'échapper complètement à la sénescence induite par l'expression de B-RAF^{V600E}. Malheureusement, l'utilisation de siRNA pour dépléter l'ARNm de EGR1 ne permet pas de répondre à cette question. En effet, il est certain que les divisions successives entraînent une dilution du siRNA transfecté, jusqu'à rendre la déplétion inefficace après un certain nombre de passages. Il faut d'ailleurs noter que cela pourrait expliquer la perte progressive de capacité à entrer en phase S.

Nous avons donc décidé de créer une lignée où l'expression de EGR1 est durablement réprimée (nous avons précédemment observé que la déplétion de EGR1 n'empêchait pas la prolifération cellulaire, et par ailleurs EGR1 n'est pas essentiel chez la souris). Nous avons dans un premier temps tenté d'obtenir une déplétion stable de EGR1 par shRNA, en utilisant des vecteurs commerciaux, sans résultat. Nous avons alors choisi de créer une lignée où l'expression de EGR1 est empêchée par édition du génome.

9. Création de la lignée KO EGR1

Nous avons utilisé une technique impliquant deux coupures simple-brin par un mutant de Cas9 (voir matériel et méthodes : CrispR cas9), pour minimiser la possibilité d'édition de génome *off-target*, et obtenir une lignée clonale *knock-out* EGR1 à partir de la lignée de fibroblastes immortalisés exprimant l'oncogène 3HA-B-RAF^{V600E}. Cette lignée a été isolée, après amplification clonale, par un test phénotypique où l'absence d'expression de EGR1 est déterminée par immunofluorescence (Figure 41A).

Après obtention de clones où EGR-1 ne peut pas être détecté, le séquençage permet de valider l'édition de génome sur les 2 allèles (Figure 41B). Nous avons ainsi créé une lignée cellulaire de fibroblastes humains, dans laquelle nous pouvons exprimer l'oncogène B-RAF^{V600E} et où EGR1 n'est pas exprimé. Nous confirmons par ailleurs que EGR1 n'est pas nécessaire à la croissance normale des cellules.

Enfin, nous avons confirmé l'absence d'expression de EGR1 par Western-Blot (Figure 41C), et que le clone KO EGR1 exprimait B-RAF^{V600E} de manière similaire à la lignée parentale (Figure 41C).

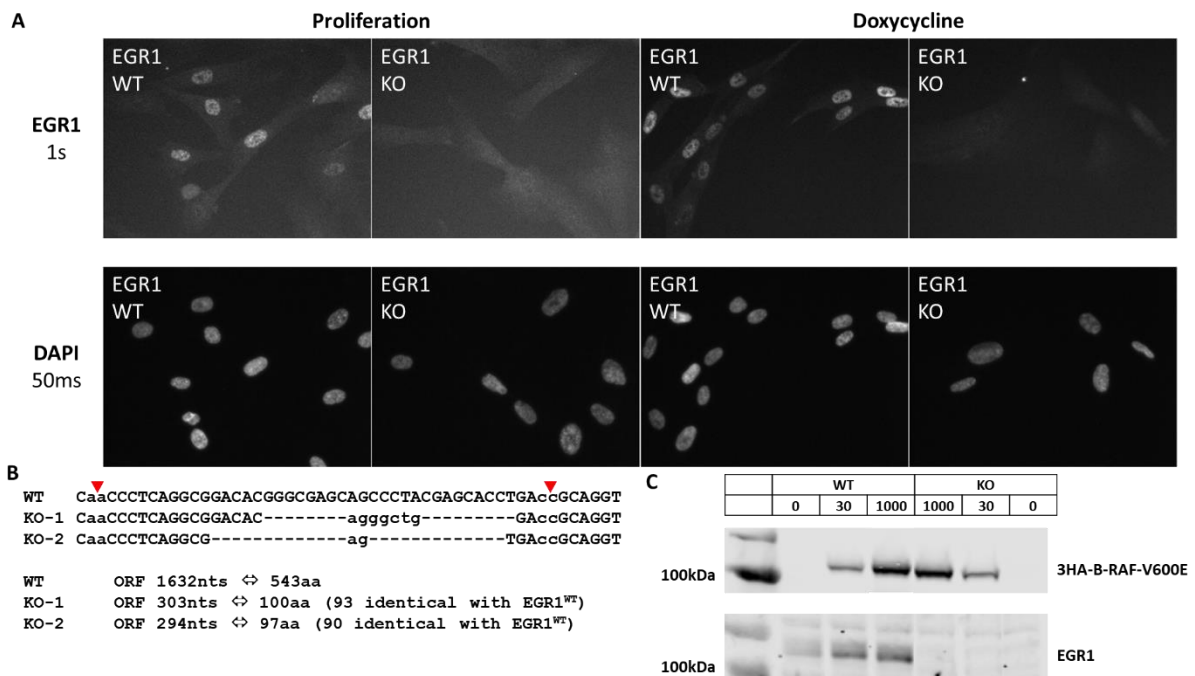


Figure 41 : Caractérisation de la déplétion de EGR1 via CRISPR

A) Immunofluorescence présentant l'intensité du signal EGR1 dans les cellules sauvages (WT) et KO, dans des conditions de prolifération et en présence de doxycycline 1000ng/ml pendant 24 heures. B) Présentation de la séquence sauvage de EGR1 ainsi que des indels présents sur chaque allèle dans la lignée KO et tailles des protéines obtenues. Les triangles rouges représentent les sites de coupures. C) Western Blot présentant la quantité totale de protéines 3HA-B-RAF^{V600E} (ligne du haut) ou de EGR1 (ligne du bas) exprimée dans des cellules exprimant EGR1 (WT) ou une version tronquée de la protéine (KO) en prolifération et après 24 heures de traitement doxycycline à 30ng/mL ou 1000ng/ml (respectivement 0, 30 et 1000). Normalisation sur la quantité totale de protéine chargée.

10. Effets du KO de EGR1 sur l'induction de sénescence

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés aux effets du niveau d'expression de B-RAF^{V600E} sur la prolifération des cellules. Pour cela, nous avons analysé la capacité de prolifération des cellules à différents niveaux d'expression de B-RAF^{V600E} de manière identique à ce que nous avons effectué pour la Figure 17. À l'aide de cette expérience, nous souhaitons ainsi déterminer si, en absence de EGR1, nous observons un comportement identique à celui observé lors de la déplétion de EGR1 ou si les effets étaient plus importants, avec un échappement de sénescence.

Dans un premier temps, nous avons observé les effets de l'expression de l'oncogène à différents niveaux sur les capacités de prolifération des cellules, sur le modèle de l'expérience réalisé à la Figure 17.

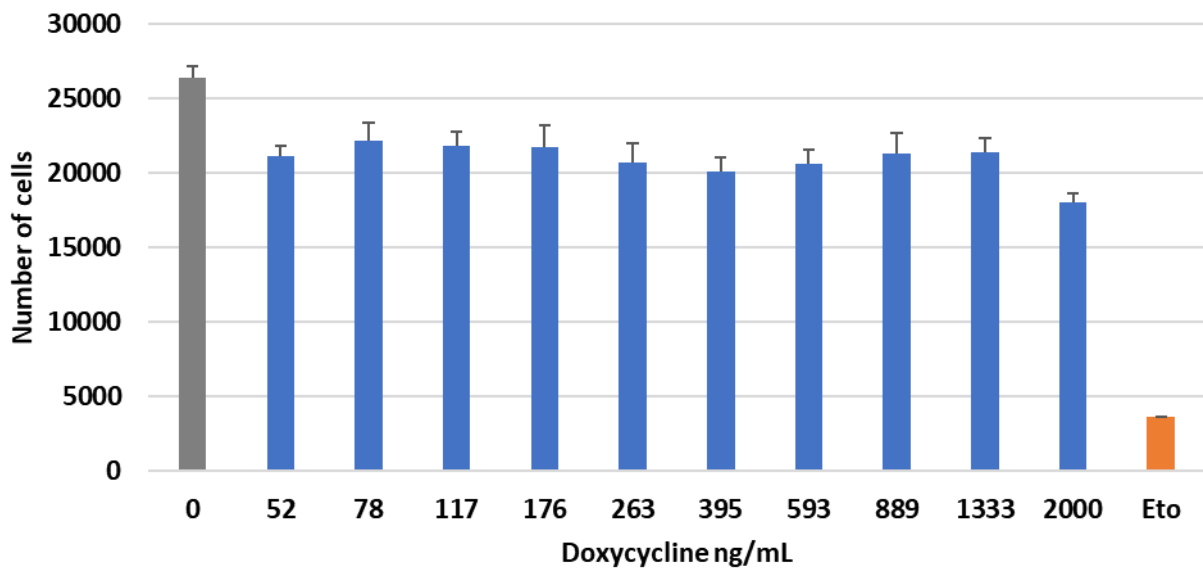


Figure 42 : Contrôle de l'expression de B-RAF^{V600E} dans la lignée KO EGR1 et effet sur la prolifération

Nombre de cellules après 4 jours en présence de différentes concentrations de doxycycline, étoposide ou solvant. 4000 cellules plantées, le lendemain traitement avec les différentes drogues. En gris, les cellules traitées avec le solvant. En orange, les cellules en présence d'étoposide. En bleu les différentes concentrations de doxycycline. Nombre de noyau par puits compté à l'aide d'un microscope de criblage haut débit. 6 puits par conditions.

On note alors que, pendant les 4 premiers jours suivant l'ajout de doxycycline, les cellules n'exprimant pas EGR1 sont capable de proliférer à un niveau voisin de celui des cellules non traitées, sans influence notable de la concentration de doxycycline et donc du niveau d'expression de B-RAF^{V600E} (Figure 41C et Figure 42).

Afin de déterminer si nous étions en situation d'échappement de sénescence, nous avons mesuré la capacité de prolifération des cellules par des courbes de prolifération. Dans ces expériences, les cellules qui prolifèrent sont maintenues en conditions de division exponentielle par des passages réguliers. Les cellules, dans les différentes conditions expérimentales, sont comptées tous les 2 à 3 jours, et nous représentons le nombre de divisions en fonction du temps. Pour les cellules qui prolifèrent, cette expérience permet de ne plus être limité par des problèmes de densité cellulaire.

Nous observons dans un premier temps que les cellules parentales et les cellules KO EGR1 ont des vitesses de prolifération similaires. On observe aussi que les cellules KO EGR1, comme les cellules parentales, ne prolifèrent plus après 7 jours. Enfin, alors que le

nombre de cellules parentales n'augmente plus 2 jours après l'ajout de doxycycline, le nombre de cellules KO EGR1 augmente lui entre 2 et 4 jours (Figure 43).

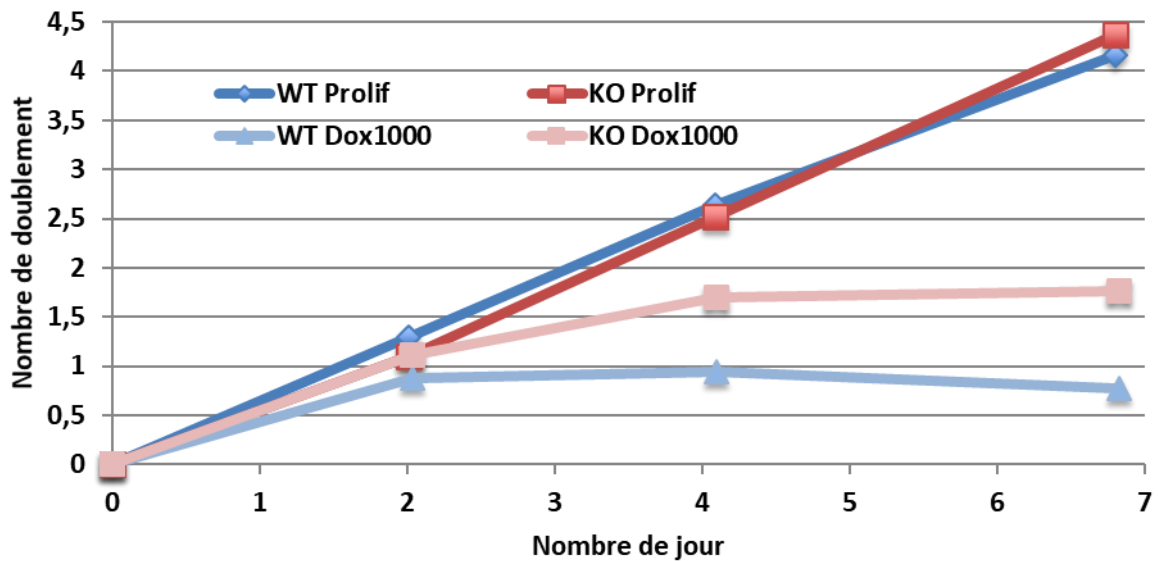


Figure 43 : Cinétique d'arrêt de prolifération des cellules KO EGR1 après expression de B-RAF^{V600E}

Courbes de prolifération des cellules exprimant ou non EGR1 (WT et KO) pendant 7 jours, en présence de solvant ou de doxycycline 1000ng/ml (Prolif et Dox1000). Représentation du nombre de doublement des cellules, la valeur 0 correspondant au nombre de cellules au moment du traitement solvant ou doxycycline 1000ng/mL. Les cellules sont passées tous les 2 à 3 jours, puis replantées à une densité cellulaire équivalente à celle observée lors de l'ajout des drogues (0 jour).

Ces données nous indiquent que la présence de EGR1 n'est pas nécessaire à l'arrêt du cycle cellulaire après expression forte de B-RAF^{V600E}, mais que cet arrêt est retardé en absence de EGR1.

Nous avons précédemment observé, par une mesure du nombre de cellules après 4 jours, que l'arrêt prolifératif des cellules parentales dépend de la concentration de doxycycline. La Figure 42B indiquait que le nombre de cellules KO EGR1 ne diminuait pas de façon importante après 4 jours de traitement par la doxycycline à toutes les concentrations testées (qui est compatible avec la courbe de prolifération de la Figure 43 effectué à doxycycline 1000ng/mL). Nous avons donc souhaité observer l'influence des niveaux plus faible d'expression de B-RAF^{V600E} sur la cinétique d'arrêt des cellules KO EGR1.

Nous avons alors quantifié le nombre de doublement effectué par les cellules à différents niveaux d'expression de l'oncogène, sur le modèle de l'expérience décrite à la Figure 43. Les données pour 0ng/mL et 1000ng/mL correspondent à celles de la Figure 43 à 7 jours.

Dans les cellules WT, les données sont similaires à celles observées à la Figure 17 avec un nombre de cellules dépendant du niveau d'expression de B-RAF^{V600E} (Figure 44A). Dans les cellules KO EGR1, on observe au contraire que le niveau d'expression de B-RAF^{V600E} semble ne pas avoir d'effet sur la capacité de doublement des cellules : un arrêt de la prolifération est observé dans les cellules KO EGR1 à tous les niveaux d'expression de B-RAF^{V600E} et la cinétique d'arrêt n'est pas dépendante du niveau d'expression de l'oncogène.

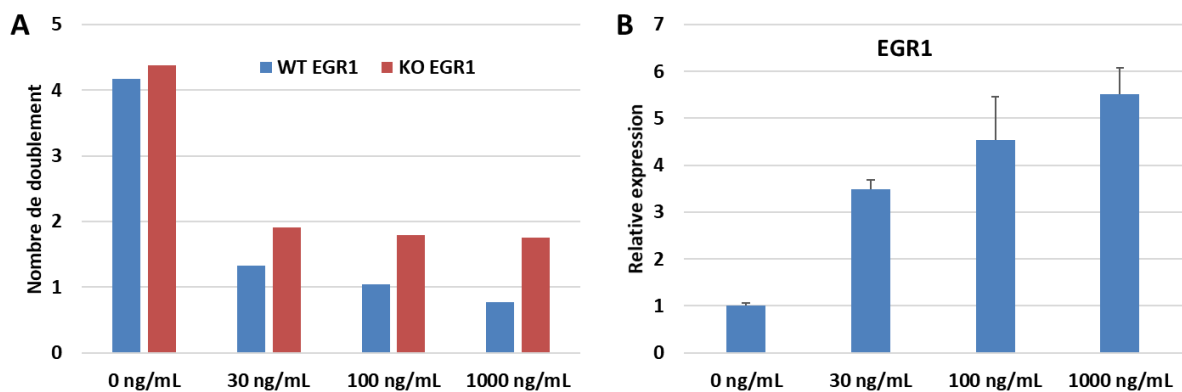


Figure 44 : Comparaison des effets des faibles niveau d'expression de B-RAF^{V600E} dans une lignée EGR1 WT et EGR1 KO

A) Histogramme présentant le nombre de doublement de cellules effectué pendant une période de 7 jours en présence de différentes concentrations de doxycycline (0, 30, 100 et 1000ng/mL) dans des cellules exprimant ou non EGR1 (WT EGR1 et KO EGR1). Représentation du nombre de doublement des cellules, la valeur 0 correspondant au nombre de cellules au moment du traitement solvant ou doxycycline 1000ng/mL. B) RT qPCR présentant le niveau d'expression des transcrits EGR1 après 24h en présence de différentes concentrations de doxycycline 0, 30, 100 et 1000ng/mL. Normalisation par GAPDH, Condition « 0 ng/ml » = 1.

Il est alors intéressant de mettre en parallèle la capacité de doublement des cellules WT EGR1 de la Figure 44A avec le niveau d'expression de EGR1 dans ces cellules, en fonction de l'expression de l'oncogène (Figure 44B). Les données semblent indiquer que la vitesse d'arrêt des cellules est corrélée au niveau d'expression de B-RAF^{V600E} et de EGR1, et qu'en absence de EGR-1 la cinétique d'arrêt ne dépend pas de la quantité d'oncogène exprimée.

11. Effet des glucocorticoïdes en l'absence de EGR1

Nous avons identifié EGR1 comme gène candidat différentiellement exprimé lors de l'induction de la sénescence et relais possible de l'action des glucocorticoïdes sur la

sénescence. Nous avons aussi montré que la présence de glucocorticoïdes entraînait une diminution de la quantité de transcrit EGR1 et de la quantité de protéine EGR-1. Cependant, au cours du chapitre précédent, nous avons mis en évidence un arrêt de prolifération des cellules n'exprimant pas EGR1 après l'expression de l'oncogène B-RAF^{V600E}.

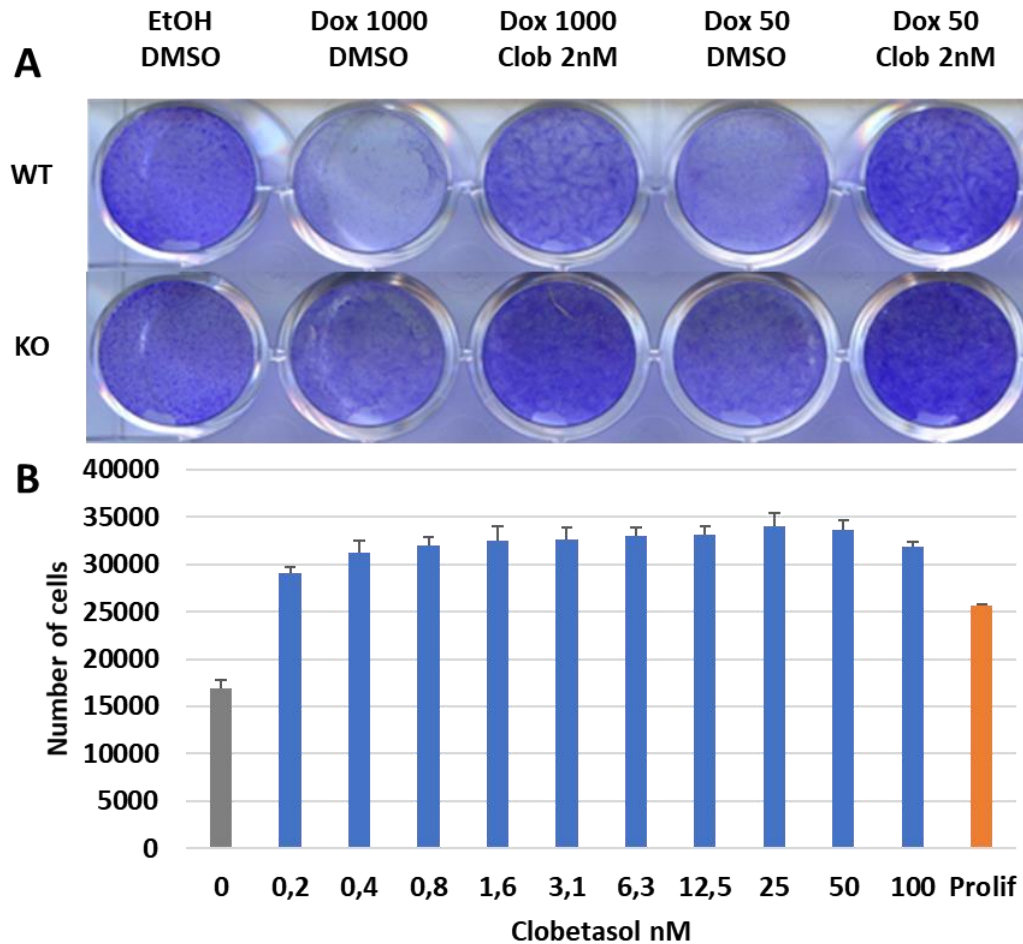


Figure 45 : Effet du clobetasol sur la prolifération de cellules KO EGR1 après expression de B-RAF^{V600E}

A) Coloration en cristal violet après 7 jours de prolifération en présence de différentes concentrations de doxycycline (0, 50 et 1000ng/ml) dans des cellules exprimant ou non EGR1 (WT et KO). Dans le même temps, les cellules ont été traitées à l'aide du clobetasol à 2nM ou du solvant DMSO (Clob 2nM et DMSO). B) Nombre de cellules après 4 jours en présence de différentes concentrations de clobetasol en présence de doxycycline à 1000ng/ml dans des cellules n'exprimant pas EGR1. 4000 cellules plantées, le lendemain traitement avec les différentes drogues. En gris, les cellules traitées doxycycline 1000ng/ml et DMSO, le solvant du clobetasol, donnant l'information du nombre de cellules en absence de glucocorticoïdes. En orange, les cellules en présence de d'éthanol et de DMSO, les solvant de la doxycycline et du clobetasol, permettant de connaître le nombre de cellules en prolifération libre. En bleu, le nombre de cellules en fonction de la concentration de clobetasol, en présence de doxycycline. Nombre de noyau par puits compté à l'aide d'un microscope de criblage haut débit. 4 puits par conditions.

Nous avons donc voulu savoir si les glucocorticoïdes étaient capables de retarder l'arrêt prolifératif des cellules malgré l'absence de EGR1. Pour cela, nous avons repris le modèle présenté en Figure 43A. Nous avons planté des cellules, ajouté de la doxycycline à

50ng/mL ou 1000ng/mL ou un contrôle éthanol, et dans le même temps ajouté du clobetasol ou un contrôle DMSO. Nous avons ensuite attendu 7 jours, puis nous avons effectué une coloration à l'aide de cristal violet.

Comme le montre la Figure 45A, dans les cellules parentales (WT), et comme nous l'avons observé dans la Figure 17, le niveau d'expression de B-RAF^{V600E} détermine la capacité de prolifération des cellules exprimant EGR1. Le clobetasol permet une prolifération accrue.

À contrario, la capacité de prolifération des cellules KO EGR1 est indépendante du niveau d'expression de B-RAF^{V600E}. Comme le montre la Figure 45A, le clobetasol permet aussi une prolifération accrue. L'intensité de la coloration cristal violet indique même la possibilité d'une prolifération plus importante en présence de clobetasol et de doxycycline que dans les cellules non traitées. La Figure 39 montrait une « hyperprolifération » des cellules déplétées en EGR1 et traitées avec clobetasol. Dans la Figure 45B, nous confirmons cet effet à différentes doses de clobetasol.

Ainsi, en dépit de l'absence de EGR1, les glucocorticoïdes sont toujours capables de prolonger la capacité de prolifération des cellules malgré l'induction de B-RAF^{V600E}, ce qui montre que EGR1 n'est pas le seul médiateur de leur effet sur la sénescence.

12. Cellules KO EGR1, glucocorticoïdes et induction de CKI

Après avoir créé et caractérisé la lignée EGR1 KO puis étudié les effets des glucocorticoïdes sur cette lignée, nous avons voulu confirmer les effets de l'absence de EGR1 sur l'expression des CKI CDKN1A et CDKN2B comme nous l'avons vu lors de la déplétion de EGR1 (Figure 38A). Nous avons obtenu des données transcriptomiques par séquençage des ARNm, après 24 heures d'expression de BRAFV600E, dans les cellules WT EGR1 et dans la lignée KO EGR1, avec et sans un traitement continu par le clobetasol.

Les effets sur l'expression de CDKN1A et CDKN2B dans les cellules WT EGR1 ont déjà été décrits Figure 32 et sont observés de façon comparable ici (Figure 46) : forte induction du transcrit CDKN2B et répression partielle par le clobetasol, faible induction du transcrit CDKN1A et répression par le clobetasol.

Dans les cellules KO EGR1, on observe une augmentation du transcrit de CDKN1A dans toutes les conditions comparées à la lignée sauvage. On notera cependant que l'expression de l'oncogène ou un traitement glucocorticoïdes ne permettent pas de moduler l'expression de CDKN1A, contrairement à ce que nous observons dans les cellules WT EGR1. Ces données viennent contredire ce que nous avons observé à la Figure 38A, où nous avons vu, que la déplétion de EGR1 induisait une répression de l'expression de CDKN1A, semblant indiquer que la présence de EGR1 jouait un rôle dans l'activation de l'expression de CDKN1A. Ici, la présence de EGR1 semble jouer un rôle dans la répression de l'expression de CDKN1A.

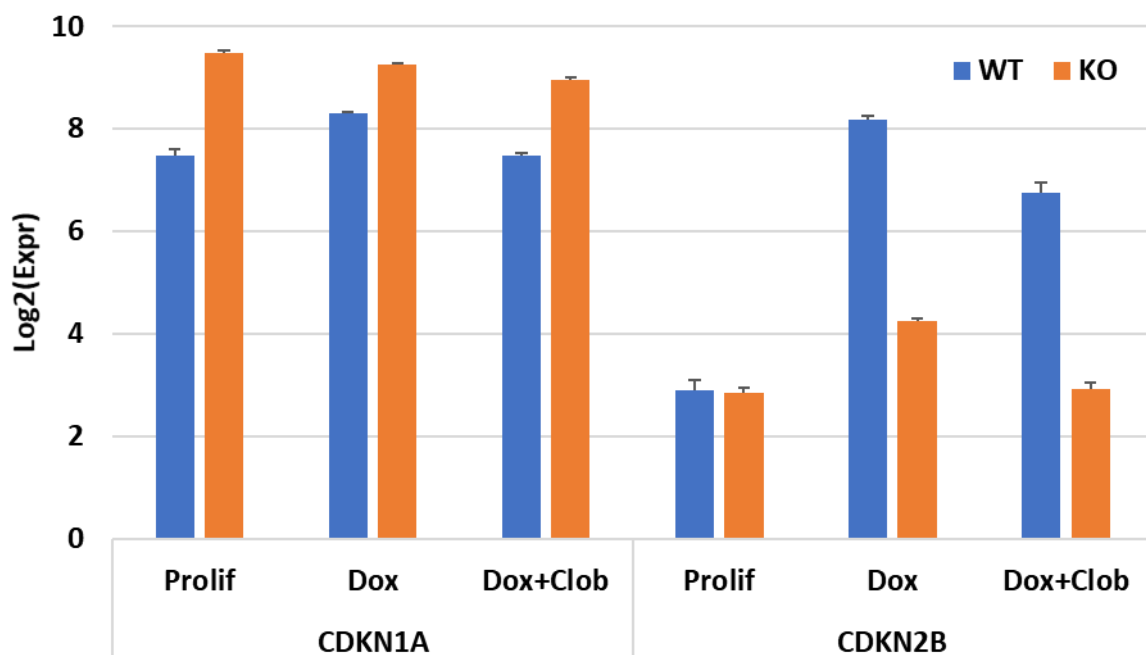


Figure 46 : Comparaison du niveau d'expression de CDKN2B et CDKN1A dans la lignée WT et KO EGR1, après traitement doxycycline et clobetasol

Analyse des données obtenues en RNAseq présentant l'expression relative de CDKN1A et CDKN2B traitement 24h à l'aide doxycycline 1000ng/mL (Dox), doxycycline 1000ng/mL et clobetasol 2nm (Dox+Clob) ou en prolifération contrôle (Prolif) dans des cellules WT EGR1 (bleu) ou KO EGR1 (orange) clobetasol 2nM pendant 24h (DMSO et Clob).

Concernant CDKN2B, on n'observe pas de différence sur son niveau d'expression en prolifération lié à la présence ou non de EGR1. L'amplitude de l'induction de CDKN2B après expression de B-RAF muté est réduite dans les cellules KO EGR1 comparé aux cellules WT EGR1. Le traitement clobetasol permet de restaurer un niveau d'expression de CDKN2B équivalent à celui observé en prolifération.

13. Expériences préliminaires

Dans ce chapitre, nous aborderons des résultats exploratoires n'ayant pas encore été confirmés mais qui apportent des idées et pistes de réflexion sur le fonctionnement du modèle d'induction de sénescence par B-RAF^{V600E}, ainsi qu'une base pour la suite du projet dans le laboratoire après mon départ.

13.1 Glucocorticoïdes et échappement de sénescence

Mes expériences mesurant la capacité des cellules à synthétiser l'ADN (Figure 23) semblaient suggérer que, même en présence de clobetasol, les cellules perdent progressivement la capacité de proliférer quand B-RAF^{V600E} est exprimé. Cependant, dans les expériences où j'ai compté les cellules avec et sans induction de la sénescence, et en présence ou absence de clobetasol (Figure 22, Figure 24, Figure 30, ...), nous avons observé que le glucocorticoïde, malgré l'expression de l'oncogène, permet une prolifération similaire à celle des cellules non traitées. Ces deux types d'expériences sont réalisées sur des durées courtes après l'induction de l'expression de B-RAF^{V600E}. Nous avons donc voulu évaluer la capacité proliférative des cellules exprimant B-RAF^{V600E} en présence de clobetasol.

Pour cela, nous avons simplement cultivé les cellules, en les comptant régulièrement et en reportant le nombre de doublement en fonction du temps, de manière identique à ce qui a été effectué à la Figure 43. Lors de la mise au point de cette expérience, nous avons constaté que les cellules traitées avec doxycycline et clobetasol, en l'absence de passage régulier (traitement avec trypsine/EDTA pour les décoller du support de culture), arrêtent de proliférer de manière compatible avec les expériences précédentes (non présentées). Nous avons cependant observé qu'au moment où la courbe de prolifération indique un arrêt, les cellules étaient assez denses dans nos conditions expérimentales, et montraient un changement rapide de morphologie. En changeant le milieu, nous avons observé une atténuation des effets morphologiques, mais pas d'augmentation de la capacité de proliférer. Cependant, la trypsinisation régulière des cellules traitées avec doxycycline et clobetasol permet de maintenir leur capacité proliférative (Figure 47).

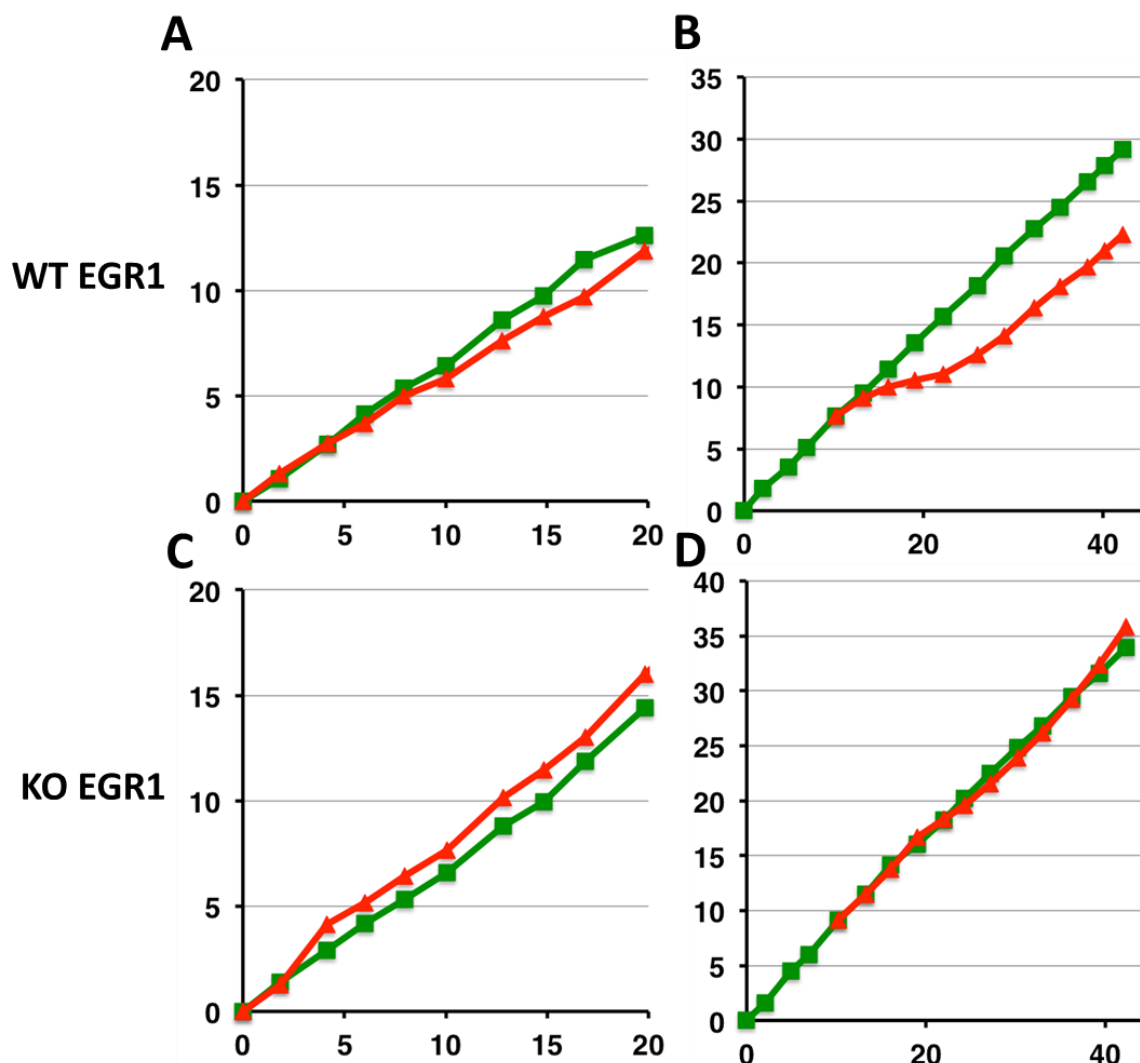


Figure 47: Effets des glucocorticoïdes sur l'échappement de sénescence lors des conditions de croissances « stimulantes »

A) Courbes de prolifération des cellules WT EGR1 pendant 20 jours, en présence de solvant éthanol et DMSO (courbe verte) ou de doxycycline 30ng/ml et clobetasol (courbe rouge). B) Courbes de prolifération des cellules WT EGR1 pendant 45 jours, en présence de solvant éthanol et DMSO (courbe verte) ou de doxycycline 1000ng/ml et clobetasol (courbe rouge). C) Courbes de prolifération des cellules KO EGR1 pendant 20 jours, en présence de solvant éthanol et DMSO (courbe verte) ou de doxycycline 30ng/ml et clobetasol (courbe rouge). D) Courbes de prolifération des cellules KO EGR1 pendant 45 jours, en présence de solvant éthanol et DMSO (courbe verte) ou de doxycycline 1000ng/ml et clobetasol (courbe rouge). Représentation du nombre de doublement des cellules. Les cellules sont passées tous les 2 à 3 jours, puis systématiquement replantées à la même densité (300000 cellules/60cm²).

Ces observations préliminaires montrent que le clobetasol permet un échappement complet à la sénescence quand les cellules sont régulièrement décollées de leur support de culture, aussi bien dans les cellules WT que dans les cellules KO EGR1. La forme des courbes, pour les cellules KO EGR1 traitées avec 30ng/mL (Figure 47C) et 1000ng/mL (Figure 47D) de doxycycline, et pour les cellules WT traitées avec 30ng/mL de doxycycline (Figure 47A), semble exclure la sélection d'une sous-population cellulaire et nous pensons que dans ces conditions le clobetasol permet à toutes les cellules d'échapper à la

sénescence induite par B-RAF^{V600E}. Néanmoins, pour les cellules WT traitées avec 1000ng/mL de doxycycline, la forme de la courbe pourrait indiquer soit un ralentissement transitoire, soit la sélection d'une sous-population (Figure 47B). Des analyses complémentaires sont nécessaires pour distinguer entre ces deux possibilités.

Les cellules WT et KO EGR1 peuvent donc conserver leur capacité proliférative en présence de B-RAF^{V600E}, à partir du moment où elles sont cultivées en présence de glucocorticoïdes et régulièrement traitées avec trypsine et EDTA. Ici encore, des expériences complémentaires seront nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués, et en particulier évaluer l'importance des contacts cellules-cellules et entre cellules et matrice extracellulaire dans l'induction de la sénescence par B-RAF^{V600E}. De plus, il nous faudra aussi déterminer comment les glucocorticoïdes permettent d'échapper complètement à la sénescence dans ces conditions.

13.2 Résultat préliminaire de ChIP contre EGR1

Pour identifier les gènes directement régulés par EGR1, nous avons entrepris des expériences d'immunoprécipitation de chromatine. Je présenterai ici uniquement des données préliminaires, l'analyse complète des expériences finales étant encore en cours au laboratoire à ce jour. Pour identifier les sites de fixation de EGR1, et les corrélérer avec des analyses de transcriptomiques en RNAseq effectuées en parallèle, nous avons cultivé des cellules WT pendant 24hrs en présence de 1000ng/mL de doxycycline. J'ai mis au point les conditions de fixation des cellules au formaldéhyde, les conditions de fractionnement de la chromatine par sonication et les conditions d'immunoprécipitation. La fabrication des bibliothèques de fragments immunoprécipités et le séquençage massif ont été effectués par la plateforme de séquençage de l'I2BC. L'analyse bio-informatique des séquences a été faite par l'équipe. Je présenterai ici quelques figures montrant les promoteurs de différents gènes d'intérêt, les sites de fixations connus dans les bases de données et les résultats de notre expérience préliminaire.

Pour commencer, on peut observer en haut de chaque graphique les coordonnées génétiques de chaque gène ainsi que leurs sites d'initiation de la transcription, les exons et les introns. Au milieu de l'image, on trouve les données de notre expérience de ChIP préliminaire, représentant l'enrichissement des « reads », et donc la fixation de EGR-1, lors du séquençage. Les sites de fixations de EGR-1 connus sont représentés en bas de l'image

par des rectangles gris à noir. La couleur représente l'intensité du signal obtenue, les signaux les plus intense étant représentés en noir. La présence d'une barre verte indique une séquence consensus pour la fixation de EGR-1.

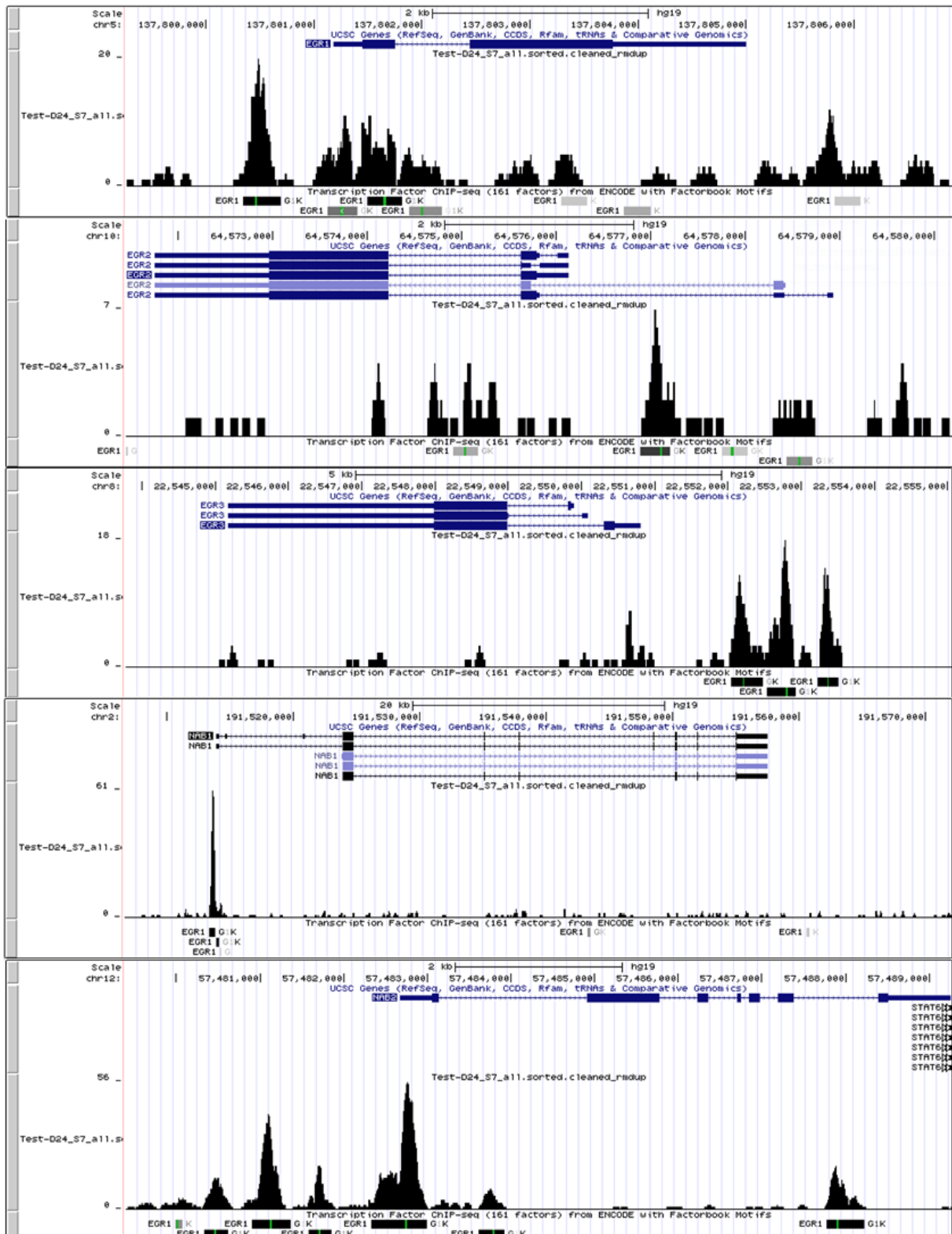


Figure 48 : Fixation de EGR1 aux promoteurs de EGR1, EGR2, EGR3, NAB1 et NAB2

Représentation de l'enrichissement en séquence lors d'une expérience préliminaire de ChIP dirigé contre EGR1.

La première étape a donc été de vérifier la présence de EGR-1 sur des sites de fixations connu. Pour cela nous avons observé si nous pouvions détecter un enrichissement de EGR-1 sur le promoteur de EGR1, EGR2, EGR3, NAB1 et NAB2 (Figure 48). Le lien entre l'expression des 3 EGR et de leur répresseurs NAB ont été démontré (Krones-Herzig et al., 2005; Kubosaki et al., 2009; Kumbrink et al., 2010; Spaapen et al., 2013; H. H. Zhang et al., 2014). Nous avons utilisé *genome browser* pour représenter les enrichissements de séquence et pouvoir les comparer avec des sites de fixation déjà connu présent dans la base de données « Factorbook Motifs ». Lors de cette expérience, nous avons identifié des sites d'enrichissement spécifique de EGR1 au niveau des promoteurs de ces 5 gènes, qui avaient déjà été détectés et annotés. Cela nous permet donc de confirmer dans notre modèle la fixation de EGR-1 sur le promoteur de ces 5 gènes à des sites spécifiques et connues. Nous avons ainsi pu démontrer à l'aide de cette expérience préliminaire la preuve de concept de cette expérience.

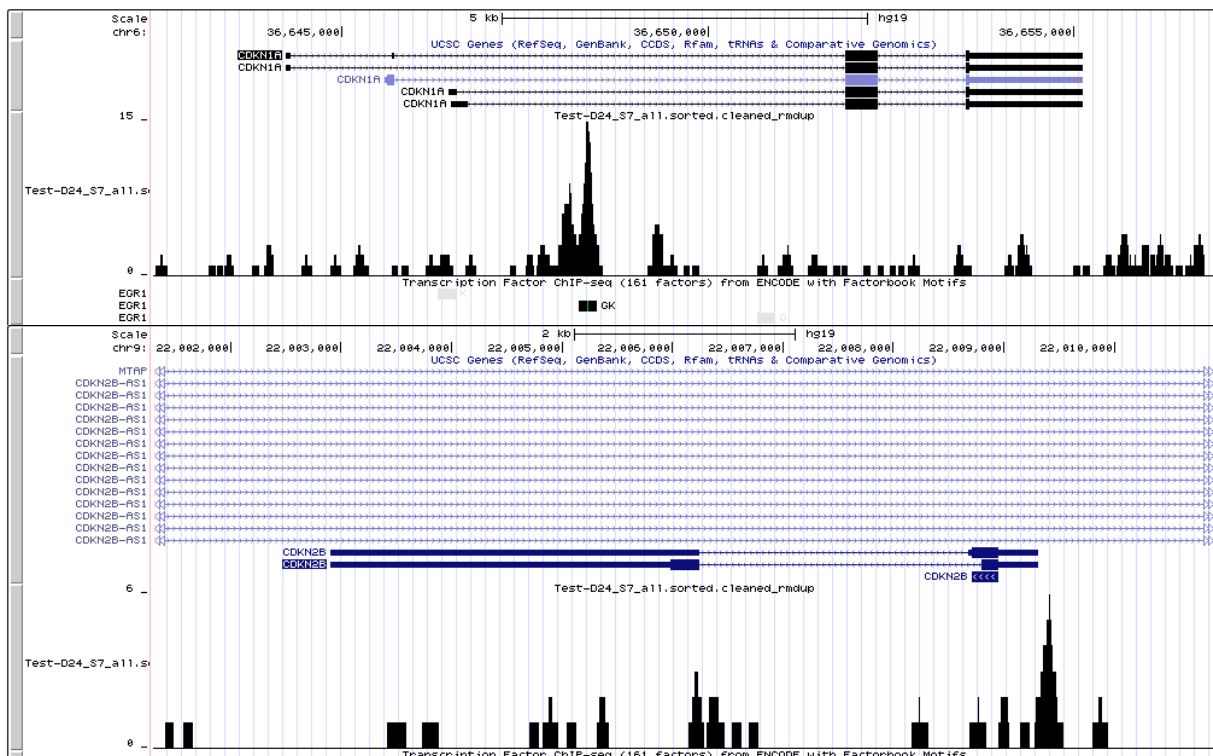


Figure 49 : Fixation de EGR1 aux promoteurs de CDKN1A et CDKN2B

Représentation de l'enrichissement en séquence lors d'une expérience préliminaire de ChIP dirigé contre EGR1.

Nous avons donc ensuite voulu vérifier la présence de EGR-1 sur les promoteurs des CKIs étudiées, CDKN2B et CDKN1A. On observe bien la présence de EGR-1 sur le promoteur de CDKN1A au niveau d'un site de fixation référencé. Il n'existe pas de site décrit de fixation de EGR1 sur le promoteur de CDKN2B dans la base de donnée ENCODE, cependant

une équipe a identifié un site de fixation de EGR-1 en amont de CDKN2B (Hu et al., 2010). Au niveau du promoteur de CDKN2B on observe un léger enrichissement de EGR1 correspondant au site décrit précédemment.

Il me faut néanmoins préciser qu'après analyse des séquences obtenues lors de cette expérience préliminaire, nous avons très peu de séquences uniques (~5M sur 25M séquencés). Nous avons ainsi pu identifier un problème de taille moyen de fragment après sonication, non compatible avec la méthode de préparation de la librairie employée. Cela engendrait une perte de tous les fragments de taille supérieurs à 250 paires de bases pour le séquençage, ce qui a fini par aboutir à un séquençage multiple de chaque fragment. Depuis ce travail, l'ensemble du protocole a été optimisé, et des résultats permettant une détermination des sites de fixation (*peak-calling*) et l'analyse corrélative avec les données de transcriptomique ont été obtenus.

13.3 H2A.J dans la sénescence induite par B-RAF^{V600E}

Le laboratoire travaille sur un autre projet, concernant l'accumulation en sénescence d'un variant d'histone H2A, H2A.J (Contrepois et al., 2017). J'ai donc tenté de rapprocher les différents sujets du laboratoire et observer les effets de l'expression de l'oncogène B-RAF^{V600E} sur l'expression de H2AFJ et sur la quantité de protéine finale H2A.J.

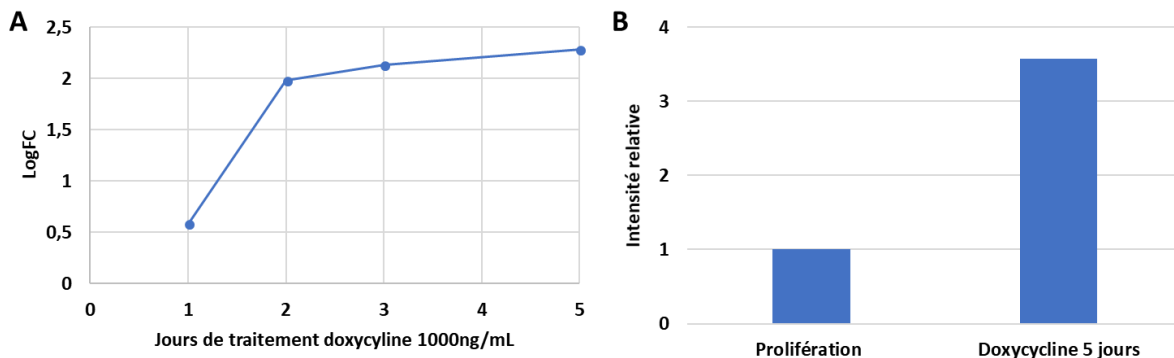


Figure 50 : Niveau d'expression de H2AFJ et quantité de protéine H2A.J

A) Représentation des données obtenues en bead-array sur l'abondance du transcrit H2AFJ au cours du temps lors de traitement doxycycline 1000ng/ml. Niveau d'expression comparé au niveau exprimé en prolifération. B) Immunofluorescence présentant l'intensité relative du signal H2A.J par cellules en prolifération ou après 120h de traitement doxycycline 1000ng/ml (Prolifération et Doxycycline 5 jours). Normalisation à 1 pour l'intensité du signal en « Prolifération ».

Dans notre modèle nous avons pu observer rapidement une augmentation de l'expression du transcrit dans les premières 48 heures, puis un niveau d'expression qui

augmente plus légèrement jusqu'à 5 jours d'expression de l'oncogène B-RAF^{V600E} (Figure 50A).

Dans le même temps, nous avons voulu déterminer si les effets au niveau transcriptomique avaient une répercussion au niveau traductionnel. Pour cela, nous avons observé par immunofluorescence l'intensité du signal H2A.J dans les noyaux. On observe une augmentation importante de l'intensité du signal H2A.J après 5 jours d'expression de B-RAF^{V600E} (Figure 50B). Les données observées ici relient parfaitement l'augmentation du niveau d'expression du transcrite et la quantité de protéine final. Ces données vont à l'encontre de ce qui avait été observé dans la publication où l'on constate un découplage entre transcription et traduction. Il faut cependant signaler que l'accumulation observé de H2A.J après sénescence induite par l'étoposide était bien plus importante.

Nous avons pu observer cette accumulation de H2A.J sans observer d'apparition de foyer H2AX, de la même manière que ce qui a été observé lors de l'induction de sénescence par C-RAF-ER déjà décrit précédemment (Jeanblanc et al., 2012). En absence de dommage à l'ADN, l'augmentation de H2A.J reste donc limitée dans notre modèle.

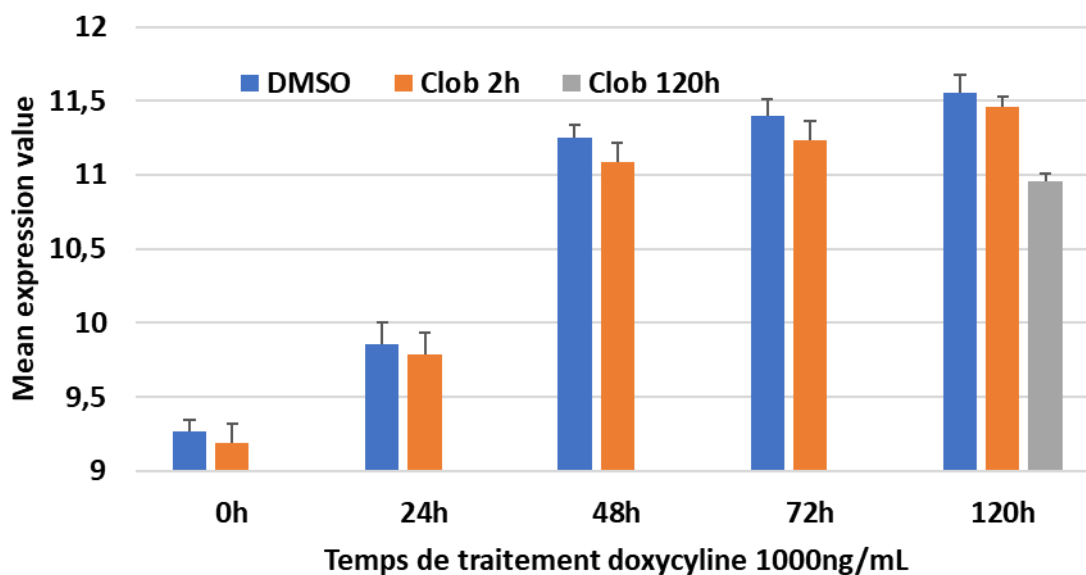


Figure 51 : Effet du clobetasol sur l'expression de H2AFJ

Représentation des données obtenues en bead-array sur l'abondance du transcrite H2AFJ au cours du temps lors de traitement doxycycline 1000ng/ml. Les cellules ont été traité par DMSO ou par clobetasol 2nM pendant les 2h précédant la récolte (respectivement DMSO et Clob 2h) ou un traitement continu de 120h (Clob 120h), débuté au moment de l'ajout de la doxycycline.

Par la suite, nous avons voulu savoir si les glucocorticoïdes pouvaient moduler l'expression de H2AFJ. Nous avons alors exprimé pendant différentes périodes de 0 heure

(prolifération libre) à 120 heures l'oncogène et nous avons traité nos cellules avec du DMSO ou effectué des traitements courts, 2 heures, de clobetasol à 2nM (Figure 51). Lors d'un traitement court de clobetasol nous n'avons pas vu de différence d'expression avec les cellules non traitées. Cela nous indique que les glucocorticoïdes ne permettent pas la régulation directe du transcrit H2AFJ. Nous avons ensuite voulu savoir si un traitement continu pendant 5 jours permettait une modulation du niveau d'expression de H2AFJ. Nous observons dans cette configuration de traitement une diminution de l'expression faible des cellules traitées comparée aux cellules non traitées (Figure 51). On note cependant que la répression n'est pas totale et le niveau d'expression est toujours bien supérieurs à ceux observés en prolifération.

Nous avons pu démontrer que l'induction de sénescence par B-RAF^{V600E} permettait d'augmenter la quantité de transcrit et de protéine de façon corrélée. Par la suite nous avons pu montrer l'absence de régulation direct entre les glucocorticoïdes et la transcription de H2AFJ, mais dans le même temps nous avons montré qu'un traitement long par les glucocorticoïdes pouvait réduire le niveau de transcrit. Cette donnée ne nous permet cependant pas de conclure à une régulation indirecte ou à plus long terme de H2AFJ par les glucocorticoïdes, car comme nous l'avons vu précédemment, la présence continue de glucocorticoïdes retarde l'entrée des cellules en sénescence. La diminution observée de la quantité de transcrit peut donc être simplement dus au retard d'entrée en sénescence. Il serait intéressant d'observer les effets d'un traitement continu des glucocorticoïdes sur des cellules dont la sénescence est induite par des dommages à l'ADN, comme présenté dans la publication du laboratoire (Contrepolis et al., 2017).

Discussions et Conclusions

La fleur en bouquet fane, et jamais ne renâit !

Guillaume Briat,
Kaamelott, Livre II, 44 : *Le Dialogue de Paix*, écrit par Alexandre Astier.

Discussions et Conclusions

1. B-RAF^{V600E}

Le laboratoire possédait un modèle d'étude de la sénescence induite par les oncogènes qui consistait en des fibroblastes WI-38hTERT exprimant la protéine de fusion GFP- Δ C-RAF-ER (Jeanblanc et al., 2012). Afin d'étudier la sénescence induite par un oncogène plus pertinent pour la médecine humaine, nous avons décidé d'utiliser B-RAF^{V600E}, retrouvé dans près de 80% des névi mais aussi dans environ 50% des mélanomes. Nous avons aussi changé de lignée cellulaire, en choisissant des fibroblastes « BJ » issus de peau de prépuce humain. Une des raisons ayant motivée notre choix était lié à l'absence d'impact du stress oxydant sur la prolifération normale de cette lignée cellulaire à 20% O₂, rendant ainsi possible sa culture par nos partenaires de la plateforme PARI, avec laquelle le laboratoire a collaboré pour le crible siRNA (la plateforme ne disposant pas d'incubateur avec une régulation du taux de dioxygène).

Nous avons donc construit un modèle cellulaire de fibroblastes humain dans lequel nous pouvons faire varier le niveau d'expression d'une forme oncogénique de la kinase B-RAF qui est la plus pertinente à la cancérologie humaine, B-RAF^{V600E}, de façon très fine (Figure 16). Nous avons montré qu'en surexprimant B-RAF^{V600E} cela aboutissait à un arrêt rapide de la prolifération, en moins de 48 heures. De plus, en faisant varier l'expression de l'oncogène et en ayant un niveau d'expression faible (mais supérieur aux 6ng/mL observé

à la Figure 16C correspondant à celui de B-RAF endogène), l'arrêt du cycle cellulaire est plus lent et prend plus d'une semaine. Nous avons observé que la cinétique d'arrêt du cycle était directement dépendante du niveau d'expression de l'oncogène (Figure 17, Figure 18 et Figure 19).

Nous avons ensuite observé plusieurs caractéristiques des cellules sénescentes telles que l'arrêt du cycle cellulaire, l'augmentation de l'activité SA- β -Galactosidase, la formation de SAHF, la dérégulation des gènes du SASP, nous permettant alors d'affirmer que le phénotype observé après expression de B-RAF^{V600E} correspondait bien à l'induction de sénescence dans nos cellules. Nous avons aussi observé une modification morphologique des cellules (Figure 20).



Figure 52 : Induction de sénescence à l'aide de B-RAF^{V600E} dans notre modèle et rôle de p15 et p21

Schéma simplifié de notre modèle d'induction de sénescence après expression de l'oncogène B-RAF^{V600E}

Les mécanismes d'induction de la sénescence par les oncogènes ont régulièrement été décrits comme dépendant des axes p53/p21 et p16/pRB (Beauséjour et al., 2003; Braig & Schmitt, 2006; Campisi, Andersen, Kapahi, & Melov, 2011; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Coppe et al., 2008; Dalle Pezze et al., 2014; Hemann & Narita, 2007; Iannetti et al., 2014; Kollarovic et al., 2016; Kuilman et al., 2008, 2010; J. Li, Han, Cousin, & Conboy, 2014; Rayess et al., 2012; Sharpless & Sherr, 2015; van Deursen, 2014). Dans notre modèle d'induction de sénescence par B-RAF^{V600E} dans les fibroblastes, nous avons observé une augmentation du niveau d'expression de CDKN2A, CDKN2B et CDKN1A après expression de B-RAF^{V600E}.

Les importances respectives de ces CKIs dans la sénescence induite par l'expression d'oncogènes varient en fonction des lignées cellulaires et des oncogènes (Haferkamp, Scurr, et al., 2009; Jeanblanc et al., 2012; McNeal et al., 2015). Dans notre modèle, les CKIs les plus importants pour l'arrêt de la prolifération sont p21 et p15, puisque la déplétion de chacun d'entre eux conduit à un échappement (au moins partiel) de la sénescence. À contrario, nous n'avons pas observé d'effet de la déplétion de CDKN2A sur l'induction de

la sénescence par B-RAF^{V600E} (Figure 21). Nous avons aussi noté un effet synergique de la déplétion combinée de p15 et p21 (Figure 33), et (dans des expériences qui ne figurent pas dans ce manuscrit), nous n'avons pas observé d'effets synergiques de la déplétion de p16 avec p21 et p15.

L'expression de CDKN2A est augmentée dans les névi *in vivo* (Karim et al., 2009; Talve, Sauroja, Collan, Punnonen, & Ekfors, 1997). La perte d'un allèle de CDKN2A induit une augmentation de la taille des névi (Florell et al., 2004; Newton Bishop et al., 2000) ainsi qu'une augmentation de la fréquence d'apparition des mélanomes (Aoude, Wadt, Pritchard, & Hayward, 2015; De Snoo & Hayward, 2005) et l'inactivation des deux allèles n'est présente que dans les formes les plus avancées des mélanomes (Cancer Genome Atlas Network, 2015; Shain et al., 2015; Shain & Bastian, 2016). Les équipes de Bosenberg et Marais ont montré que, dans un modèle murin, la perte concomitante de CDKN2A (INK4A et/ou Arf) et l'expression de B-RAF^{V600E} conduisait à une pénétrance des mélanomes atteignant 100% (Damsky et al., 2015; Dankort et al., 2009; Dhomen et al., 2009).

Concernant CDKN1A, son expression a été associée à l'induction de sénescence après expression de B-RAF^{V600E} et phosphorylation de FOXO4 (De Keizer et al., 2010). De même l'expression de C-RAF dans différentes lignées cellulaires aboutit à l'induction de CDKN1A (Houben et al., 2009). L'expression de CDKN1A est fortement diminuée dans les mélanomes par AP1 (Jalili et al., 2012). La suppression de AP1, et l'augmentation de la quantité de p21 qui en découle aboutit à un arrêt du cycle cellulaire dans ces cellules. Néanmoins, dans 30% des mélanomes et 40% des métastases associées, on ne détecte pas p21. De même, plus les lésions seront invasives, moins on détectera la présence de p21 (Maelandsmo et al., 1996). Une étude publiée en 2006 vient cependant nuancer ces résultats en présentant une augmentation du nombre de cellules positives pour p21 dans les névi dysplasiques comparé aux névi bénins, et 100% des mélanomes à croissance radiale exprimeront p21 alors que p21 sera absent des mélanomes à croissance verticale (Gray-Schopfer et al., 2006). Le rôle de CDKN1A dans l'induction de sénescence semble grandement dépendre du type cellulaire et de l'inducteurs de sénescence, une induction RAS ou C-RAF ne semblant pas nécessiter la présence de p21 (Haferkamp, Tran, et al., 2009).

Dans des mélanocytes en culture, le niveau d'expression de CDKN2B est corrélé avec le niveau d'expression de B-RAF muté (McNeal et al., 2015), de manière identique à ce que nous avons observé. Dans ce modèle, la perte de CDKN2B (et pas de p16, p21) permet la progression du névus vers le mélanome.

En conclusion, dans notre modèle de sénescence induite par B-RAF^{V600E} dans des fibroblastes humains, nous observons l'induction de p15, p16 et p21, et un rôle prépondérant de p15 et p21 dans les étapes précoces de l'induction de la sénescence. Ces CKIs sont aussi induits dans des contextes plus physiologiques (mélanocytes et névi), et leur perte est corrélée avec l'évolution vers la formation de mélanomes. Notre modèle est donc pertinent pour l'étude des mécanismes d'induction de la sénescence induite par B-RAF^{V600E}.

2. Glucocorticoïdes

L'usage des glucocorticoïdes est fréquent en médecine humaine (Buckingham, 2006; Caratti et al., 2015; Kadmiel & Cidlowski, 2013; Newton, 2000; Stellato, 2012). Nous avons montré que les glucocorticoïdes peuvent moduler l'induction de sénescence dans notre modèle. Il permet aux cellules de continuer à proliférer, malgré un niveau d'expression d'oncogène très supérieur au niveau physiologique.

De nombreuses équipes ont publié des travaux présentant une modulation de la voie MAPK par les glucocorticoïdes (Ayroldi et al., 2002, 2007; Caunt & Keyse, 2013; Cheng et al., 2013; A. R. Clark & Lasa, 2003; Gutierrez-Mecinas et al., 2011; O Kassel et al., 2001; Shah et al., 2014). Les interactions entre les glucocorticoïdes et la voie MAPK sont nombreuses et peuvent avoir lieu à différents niveaux de la voie. On note des interactions directes avec RAS ou RAF, l'expressions des protéines DUSP par les glucocorticoïdes qui vont inhiber la phosphorylation de la voie, ou encore l'expression de GILZ pouvant agir à différents niveaux de la voie. Nous avons donc dans un premier temps voulu vérifier si les effets de retard d'entrée en sénescence observés n'était pas dus à une diminution de l'activation de la voie MAPK. Nous avons bien observé comme attendu une modification de l'expression de DUSP1, DUSP5 ou GILZ par les glucocorticoïdes, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence une diminution de la phosphorylation de Erk après traitement par

les glucocorticoïdes. Nous avons aussi déplété ces gènes lors de l'induction de sénescence et de traitement glucocorticoïdes, et nous n'avons pas noté d'effet sur la prolifération nous laissant imaginer qu'un de ces gènes puisse être responsable des effets observés normalement par les glucocorticoïdes. Pour finir, nous avons observé l'expression de gènes cibles de la voie des MAPK et encore une fois, nous n'avons pas pu mettre en évidence une diminution spécifique de l'activation de la voie par un traitement glucocorticoïde. Cela semble donc indiquer que les effets observés ne sont pas dépendant d'une simple diminution globale de l'activation de la voie MAPK par les glucocorticoïdes.

Les glucocorticoïdes jouent un rôle, déjà démontré, dans la répression de certains gènes du SASP (Laberge et al., 2012). Le SASP a été décrit comme capable d'induire la sénescence dans les cellules environnantes, par effet paracrine, ou de renforcer le processus de sénescence des cellules qui expriment le SASP, par effet autocrine (Malaquin, Martinez, & Rodier, 2016). Dans notre modèle, nous n'avons pas mis en évidence l'activation spécifique de la voie NF- κ B après expression de l'oncogène B-RAF^{V600E}. De même, nous n'avons pas démontré que l'activation de la voie NF- κ B était nécessaire pour l'entrée en sénescence. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que des gènes identifiés comme des cibles de la voie NF- κ B jouent un rôle dans l'induction de sénescence, mais qu'ils seraient, ici, régulés par d'autres facteurs de transcription, par exemple EGR1. Nous sommes arrivés à cette conclusion par deux approches. La première est l'expression d'un gène I κ B-SR (super répresseur) empêchant la translocation nucléaire de RelA, et donc l'activation de la voie qui en dépend. La deuxième est une approche avec une molécule appartenant à la classe des composés SEGRA (SElective Glucocorticoid Receptor Agonists), une classe de composés présentant les caractéristiques désirables des glucocorticoïdes (anti-inflammation, immunosuppresseur, ...) et pas leurs effets secondaires décrit. La liste des effets secondaires associés aux traitements ou dérèglement glucocorticoïde est vaste, on peut noter le diabète, l'apparition d'ostéoporose, la prise de poids, l'hyperfragilité de la peau, le syndrome de Cushing et d'autres... (Gennari, 1993; Keenan et al., 1996; Klein, Go, & Cunha, 2001; Koch, Doppman, Patronas, Nieman, & Chrousos, 2000; Moghadam-Kia & Werth, 2010). Nous avons démontré via l'utilisation du compound A (Beck et al., 2013; De Bosscher et al., 2005) que l'inhibition des gènes dépendant de l'activation par NF- κ B n'était pas responsable des effets sur le retard d'entrée en sénescence observé. À la lumière de ces résultats, il nous paraît ainsi peu probable que l'activation de la voie NF- κ B

joue un rôle majeur dans les premières étapes d'induction de sénescence à une expression forte d'oncogène.

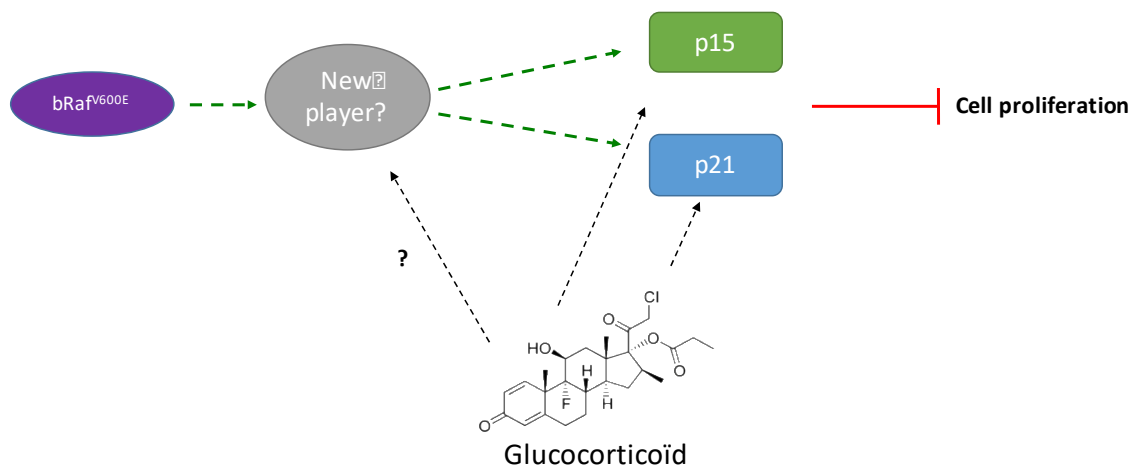


Figure 53 : Modèle de régulation des CKI par les glucocorticoïdes et rôle d'une protéine encore inconnue

Schéma simplifié de notre modèle d'induction de sénescence après expression de l'oncogène B-RAF^{V600E} et la modulation par les glucocorticoïdes.

Après avoir identifié les CKI jouant un rôle sur l'induction de sénescence dans notre modèle, CDKN2B et CDKN1A, il était logique de regarder si les effets observés lors des traitements glucocorticoïdes étaient dus à la modulation de ces CKI. Nous avons mis en évidence un impact des glucocorticoïdes sur le niveau d'expression de certains CKI, la présence de glucocorticoïdes induisant la diminution de leurs expressions (Figure 53). Nous avons, à l'aide d'expériences combinées de déplétion de CDKN2B et CDKN1A avec traitement clobetasol, pu déterminer que les deux CKI présentées n'étaient pas les seules cibles modulées par les glucocorticoïdes responsables de l'échappement de sénescence observé. Nos données de transcriptomiques suggèrent aussi que CDKN1A et CDKN2B ne sont pas des cibles directes des glucocorticoïdes.

Nous avons effectué une analyse transcriptomique avec différents temps d'induction de B-RAF^{V600E}, en présence de clobetasol, Compound A ou de contrôle, afin d'identifier d'autres cibles des glucocorticoïdes, ce qui nous a permis d'analyser le rôle d'une cible potentiellement directe, le facteur de transcription EGR1.

3. EGR1

Nous avons identifié EGR1 à l'aide d'une analyse transcriptomique dont les résultats ont été analysés en parallèle d'un crible préliminaire de siRNA. Les cibles de ce crible étaient constituées d'un petit ensemble gènes codants pour de protéines associées à la chromatine. Ces deux expériences nous ont alors permis d'identifier EGR1 comme étant modulé par les glucocorticoïdes et permettant une prolifération soutenue malgré l'expression de B-RAF^{V600E}.

EGR1 est un facteur de transcription à domaine doigt de zinc décrit comme pouvant jouer un rôle dans la sénescence réplivative. En effet, il a été montré que la déplétion de EGR1 permettait un échappement total de la sénescence réplivative dans une lignée de fibroblastes embryonnaire murin KO EGR1 (Krones-Herzig et al., 2003). Dans ce modèle, la perte d'EGR1 induisait une diminution de l'expression de p53. Il faut noter que, après mon départ, le laboratoire a montré que notre modèle de cellules KO EGR1 est toujours capable d'induire la phosphorylation de p53 et l'expression de p21 en réponse aux dommages de l'ADN induits par l'étoposide, de manière indistinguable de la lignée sauvage (Régis Courbeyrette, communication personnelle).

Une autre étude a montré un rôle de EGR1 dans l'induction de sénescence induite par Ras (Salotti et al., 2015). Cependant dans cette étude, l'induction de Ras induit une répression de EGR1 dans une lignée cellulaire murine transformée, ce qui est contraire à nos observations à la suite de l'expression de B-RAF^{V600E} dans des fibroblastes humains non-transformés.

Dans notre modèle, nous avons vu que le clobetasol réprime l'induction de l'expression de EGR1 par B-RAF^{V600E}. Il avait déjà été décrit par plusieurs équipes que les glucocorticoïdes étaient capable de moduler négativement l'expression de EGR1 dans des monocytes (Hass et al., 1992; Kharbanda et al., 1991; Mittelstadt & Ashwell, 2001) alors qu'une équipe a montré des effets opposés, avec une stimulation de l'expression de EGR1 après traitement glucocorticoïdes dans des neurones (Revest et al., 2005, 2010). Ces données laissent penser qu'il existe une possible régulation directe entre les glucocorticoïdes et EGR1.

Nous avons observé une modulation du niveau de l'expression et de la transcription de CDKN2B et CDKN1A lors de la déplétion de EGR1, ce qui semble indiquer un contrôle de ces deux CKIs par EGR1 (Figure 38). Un contrôle de l'expression de CDKN1A par EGR1 a déjà été démontré dans d'autres modèles (Choi et al., 2008; Della Ragione et al., 2003; S.-J. Kim et al., 2014; S. Y. Shin et al., 2010).

Une publication dont les travaux ont été effectués sur une lignée hépatocytaire cancéreuse montre qu'EGR1, après stimulation par TPA peut induire l'expression de CDKN2B (Hu et al., 2010). Malgré le caractère artificiel de cette stimulation de l'expression de EGR1, cela montre que EGR1 peut contrôler l'expression de CDKN2B. De plus et comme nous l'avons vu au premier chapitre de la discussion, le lien entre le niveau d'expression de l'oncogène B-RAF et CDKN2B a déjà été démontré (McNeal et al., 2015). Cet effet est médié par TGF- β . Dans leur modèle, McNeal et al. observent aussi une augmentation de EGR1 après expression de B-RAF^{V600E}. Il a donc été proposé par l'auteur que l'induction de TGF- β se fasse par l'intermédiaire de EGR1. En effet, il a déjà été montré que EGR1 pouvait réguler l'expression de TGF- β (Baron, Adamson, Calogero, Ragona, & Mercola, 2006). Cependant, dans notre modèle, nous n'avons pas mis en évidence d'induction de TGF- β au niveau transcriptionnel, mais nous observons aussi une augmentation de CDKN2B liée à une augmentation de EGR1. De plus, nos résultats préliminaires de CHIP-Seq nous ont permis d'identifier EGR-1 sur le promoteur de CDKN2B (Figure 49). Nous pensons donc que EGR-1 contrôle directement l'expression de CDKN2B dans le contexte de l'induction de la sénescence par l'expression de B-RAF^{V600E} dans les fibroblastes BJ.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux effets des glucocorticoïdes sur les CKIs en absence de EGR1. Nous avons observé dans les cellules KO EGR1 que les glucocorticoïdes permettaient des effets de modulation du même ordre que ceux observés dans les cellules exprimant EGR1 pour CDKN2B et des effets faibles sur la modulation de l'expression de CDKN1A (Figure 46). Il semblerait donc que la répression de CDKN2B par les glucocorticoïdes ne nécessite pas EGR-1, mais que l'induction forte de CDKN2B dépende partiellement de EGR-1. Il semble alors qu'un autre mécanisme soit responsable de l'expression de CDKN2B, sans doute le même que celui permettant l'arrêt des cellules en absence de EGR-1. Cette autre voie nécessite plus de temps pour aboutir à la sénescence et un arrêt complet du cycle, comme nous pouvons l'observer par le faible

niveau d'expression de CDKN2B en absence de EGR1. Dans cette même expérience, on observe que la perte de EGR1 induit une augmentation du niveau d'expression de CDKN1A, qui ne semble alors plus modulé par l'expression de l'oncogène ou la présence de glucocorticoïdes. Ces résultats viennent contredire les résultats observés lors de la déplétion de EGR1 par siRNA (Figure 38). Il est possible que ces divergences d'effets soient dus à la perte totale de EGR-1 dans les KO alors qu'une quantité faible, mais néanmoins suffisante pour assurer une fonction, de EGR-1 peut subsister après déplétion par siRNA. Considérant l'ensemble de nos expériences, EGR-1 semble pouvoir être un régulateur positif et négatif de l'expression de CDKN1A.

Nous avons mis en évidence qu'en absence de EGR1, un traitement glucocorticoïdes sur des cellules exprimant B-RAF^{V600E} induisait une hyperprolifération des cellules, indépendamment de la concentration de clobetasol utilisée ou du niveau d'expression de B-RAF^{V600E}. Cette hyperprolifération est à caractériser, mais nous pouvons soumettre l'hypothèse que des *checkpoints* du cycle cellulaire sont passés plus vite, avec une durée de phase G1 fortement diminuée, ou bien une insensibilité à l'inhibition de contact lorsque les fibroblastes arrivent à forte densité en culture.

Dans notre modèle, nous avons montré que EGR1 joue un rôle dans l'induction de sénescence par B-RAF^{V600E}. Nous avons pu exposer un lien direct entre le niveau d'expression de B-RAF^{V600E} et EGR1 (Figure 16 et Figure 44B). Nous avons par la suite pu mettre en relation le niveau d'expression de EGR1 et le temps nécessaire pour parvenir à un arrêt du cycle cellulaire (Figure 18). La lignée KO EGR1 nous a ensuite permis d'observer que EGR1 n'était pas nécessaire à un arrêt du cycle cellulaire après expression d'une version mutée de B-RAF et que la cinétique d'arrêt des cellules, plus lente qu'en présence de EGR1, ne semblait plus dépendre du niveau d'expression de B-RAF. Ce résultat pourrait indiquer que EGR1 est un senseur du niveau d'expression de B-RAF^{V600E}, requis pour un arrêt rapide de la prolifération quand l'oncogène est fortement exprimé.

De façon remarquable, un traitement clobetasol sur des cellules KO EGR1 exprimant B-RAF^{V600E} permet un échappement de la sénescence. Cela semble indiquer qu'une autre voie d'induction de la sénescence, ne dépendant pas de EGR-1 ni du niveau d'expression de B-RAF^{V600E}, existe. Cette voie est elle aussi modulée par les glucocorticoïdes (Figure 54).

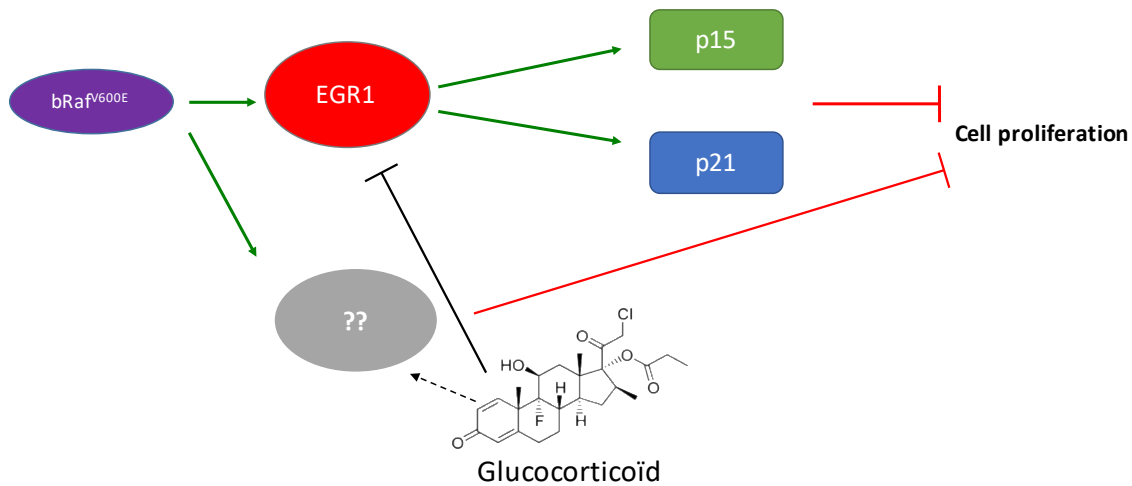


Figure 54 : Modèle d'induction de sénescence par B-RAF^{V600E}, rôle de EGR1, des glucocorticoïdes et nouveaux mécanismes d'action

Schéma simplifié de notre modèle d'induction de sénescence après expression de l'oncogène B-RAF^{V600E} et la modulation par les glucocorticoïdes ainsi que le rôle de EGR1. La présence d'un ou des facteurs encore inconnus y est présenté.

Pour finir, nous avons eu les résultats préliminaires d'une expérience de ChIP-Seq dirigé contre EGR-1 sur des cellules exprimant fortement B-RAF^{V600E} pendant 24 heures. Nous avons alors pu confirmer la présence de EGR-1 aux promoteurs des autres EGR et de leurs régulateurs sur des sites de fixations déjà décrit dans la littérature, nous permettant alors de confirmer la faisabilité de nos résultats. Nous avons aussi pu détecter un enrichissement de EGR-1 aux promoteurs de CDKN1A et de CDKN2B.

4. Conclusion générale

Lors de ma thèse, j'ai donc caractérisé un nouveau modèle d'induction de sénescence dans des fibroblastes humains à l'aide de l'oncogène B-RAF^{V600E}. J'ai montré que la cinétique d'arrêt du cycle cellulaire dépendait du niveau d'expression de l'oncogène. J'ai montré que les glucocorticoïdes permettaient de moduler la cinétique d'entrée des cellules en sénescence et j'ai pu identifier plusieurs cibles potentielles, dont EGR1. J'ai pu observer un lien entre la quantité de protéine EGR-1 et la cinétique d'arrêt. J'ai aussi obtenu des données montrant que EGR1 participe au contrôle transcriptionnel de CDKN1A et CDKN2B. Malgré cela, EGR1 n'est pas nécessaire à l'induction de sénescence par B-RAF^{V600E} mais pourrait cependant être un médiateur de l'arrêt rapide de prolifération et un senseur du niveau d'expression de l'oncogène.

Perspectives

Ave Cesar, rosae rosam, et spiritus rex ! Ah non, parce que là, j'en ai marre !

François Rollin,
Kaamelott, Livre III, L'Assemblée des rois 2^e partie, écrit par Alexandre Astier.

Perspectives

Avant mon arrivée au laboratoire, le travail précédemment effectué avait permis de mettre en évidence que l'ensemble des glucocorticoïdes de la chimiothèque Prestwick permettait aux cellules de proliférer malgré l'expression d'un oncogène.

Lors de ma thèse, je me suis efforcé dans un premier temps de valider l'induction de sénescence dans un autre type cellulaire et avec un oncogène plus physiologique, B-RAF^{V600E}. J'ai pu mettre en évidence le rôle de CDKN2B et CDKN1A dans l'induction de sénescence par B-RAF^{V600E}.

J'ai d'abord commencé par valider les effets des glucocorticoïdes observés dans le précédent modèle, puis je les ai caractérisés. J'ai ensuite exploré leurs mécanismes d'action, ce qui m'a permis de découvrir le rôle joué par EGR1 dans la sénescence induite par l'oncogène B-RAF^{V600E}.

J'ai pu démontrer que EGR1 est un facteur prépondérant de l'induction rapide de sénescence par B-RAF^{V600E}, mais qu'il n'est pas suffisant pour induire la sénescence.

1. Rôle de EGR1 dans l'induction de la sénescence

Nous avons mis en évidence le rôle d'EGR1 sur la sénescence via la régulation de CDKN2B et CDKN1A, mais nous avons aussi montré que d'autres voies, indépendantes de EGR1, existaient. Par la suite, nous voulons dans un premier temps confirmer les mécanismes de régulation de CDKN1A par EGR1 et vérifier la fixation de EGR1 sur CDKN2B par des expériences de CHIP-Seq dont l'analyse est en cours. Ces expériences de CHIP dirigé contre EGR1 ont été effectuées dans 3 conditions, la première avec des cellules non traitées (afin de connaître les sites de fixations de base de EGR1), la seconde avec des

cellules exprimant fortement B-RAF^{V600E} pendant 24 heures (afin de détecter un enrichissement de EGR1 à des promoteurs spécifiques) et la troisième condition avec des cellules exprimant fortement B-RAF^{V600E} et traitées à l'aide du clobetasol en continu pendant 24 heures (afin d'observer un enrichissement plus faible ou différentiel des cellules non traitées par le clobetasol). Ces mêmes expériences vont aussi nous permettre d'identifier quels sont les autres protéines modulées par EGR1 dans notre contexte d'induction de sénescence et quels sont les effets des glucocorticoïdes sur les gènes cibles de EGR1, identifié à l'aide d'analyses transcriptomiques par RNAseq qui ont été effectuées dans les mêmes conditions que le CHIP-Seq.

2. Autres mécanismes d'action des glucocorticoïdes

Afin d'identifier d'autres mécanismes d'action des glucocorticoïdes que la régulation, et confirmer un lien de régulation direct de EGR1 par les glucocorticoïdes en sénescence, nous avons entrepris la réalisation d'une expérience de CHIP-Seq dirigé contre le récepteur des glucocorticoïdes (GR).

La réalisation de cette expérience a été entreprise après mon départ du laboratoire et n'a pas encore abouti. Un résultat préliminaire prometteur avait été obtenu, avec une immunoprécipitation suivie de séquençage à une faible profondeur (~10 millions de « reads ») montrait quelques pics de GR sur des cibles connues, coïncidant avec des pics identifiés par le consortium ENCODE. Il avait alors été décidé d'utiliser un kit commercial soi-disant « optimisé », mais qui n'a actuellement pas permis d'obtenir de résultats satisfaisants : après séquençage à grande profondeur (>30 millions de « reads »). Il a été conclu que l'immunoprécipitation avait échoué (aucun pic analysable, répartition « homogène » des séquences).

Les résultats attendus devraient nous permettre d'identifier si il existe un lien direct entre GC et EGR1 puis, identifier les autres cibles des glucocorticoïdes permettant de moduler la sénescence, même en absence de EGR1. Couplé à nos analyses d'expériences de transcriptomiques, cela nous permettra d'identifier les gènes dont l'expression est modulée par les glucocorticoïdes et dont on retrouve le récepteur dans le promoteur.

Cette liste de gènes candidats sera ensuite tester à l'aide d'un crible siRNA. Lors de ce crible nous auront ainsi deux groupes de gènes cibles :

- les gènes induits en sénescence et réprimés par le clobetasol (comme EGR1). La déplétion de ces gènes doit alors permettre un échappement partiel ou total de sénescence.
- les gènes réprimés en sénescence et induits par le clobetasol. La déplétion de ces gènes doit-elle inhiber partiellement ou totalement les effets du clobetasol sur la prolifération cellulaire.

Notre première approche sera d'analyser la présence du récepteur des glucocorticoïdes sur le promoteur de EGR1. Des expériences préliminaires nous ont exposé une capacité des glucocorticoïdes à moduler l'expression de EGR1 en moins de 30 minutes. Étant donné la cinétique rapide de modulation, il nous semble fort peu probable qu'elle fasse intervenir d'autres facteurs et que le mécanisme soit indirect. Aucun site de fixation du récepteur des glucocorticoïdes n'est décrit au promoteur de EGR1, ce qui pourrait au premier abord affaiblir cette approche, mais il a été démontré que le récepteur des glucocorticoïdes pouvait agir via la fixation sur un autre facteur de transcription et ainsi activer ou réprimer le gène cible (Caratti et al., 2015; Kadmiel & Cidlowski, 2013; Louw-du Toit, Hapgood, & Africander, 2014; Mangelsdorf et al., 1995; Newton, 2000; Oakley & Cidlowski, 2011, 2013; Revollo & Cidlowski, 2009; Wikström, 2003). Il est intéressant de noter ici qu'un grand nombre de facteurs de transcription ont été décrit comme présent au promoteur de EGR1, et que le récepteur des glucocorticoïdes a été présenté comme capable d'interagir avec un certain nombre d'entre eux (Figure 55).

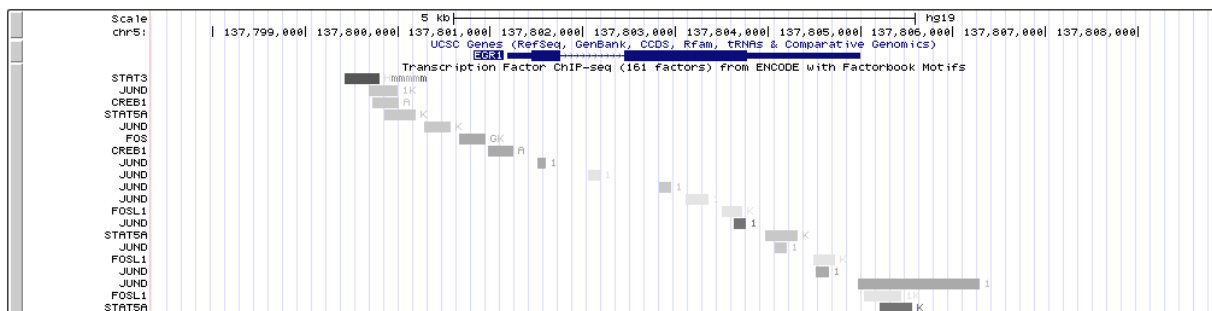


Figure 55 : Sites de fixation de facteurs de transcription connus pour interagir avec le récepteur des glucocorticoïdes

Représentation des sites de fixation des facteurs de transcriptions connu comme interagissant avec le GR sur le promoteur de EGR1

Avec l'utilisation des cellules KO EGR1, et à l'aide d'expérience de RNAseq en cours, nous espérons pouvoir identifier d'autres voies régulant l'entrée en sénescence des cellules après l'expression de B-RAF^{V600E}. L'étude des gènes modulés par les glucocorticoïdes dans cette lignée pourra aussi nous aider à identifier de nouvelles protéines impliquées dans l'induction de sénescence. En utilisant l'approche combinée RNAseq et expériences de siRNA que nous avons déjà utilisées pour identifier EGR1, nous espérons identifier les mécanismes responsables de la réponse à l'expression de B-RAF^{V600E}, qui, quand ils sont perturbés par les glucocorticoïdes, permettent le retard ou l'échappement total sénescence.

3. Se rapprocher du *in vivo*

Lors de ma thèse, nous avons, quasi exclusivement, induit la sénescence en exprimant des niveaux non physiologiques de B-RAF^{V600E}, privilégiant la rapidité de l'arrêt pour identifier des mécanismes. Nous avons néanmoins pu mettre en évidence un arrêt du cycle cellulaire lors de l'expression faible d'oncogène, équivalent à l'expression de B-RAF sauvage. Cependant, il nous reste à caractériser les mécanismes d'induction de sénescence en présence d'une expression *de novo*, « mono allélique », de B-RAF^{V600E}.

Nous disposons pour cela de plusieurs modèles d'étude.

Notre lignée cellulaire permet de finement moduler l'expression de notre oncogène B-RAF^{V600E} et ainsi de nous retrouver dans des conditions proches des conditions *in vivo*. Nous espérons ainsi évaluer l'importance d'EGR1 lors de ce contexte d'induction de sénescence, et aussi valider les autres mécanismes responsables de l'induction de sénescence que nous aurons pu identifier lors de la surexpression de B-RAF^{V600E}.

Nous pourrons aussi étudier les effets des glucocorticoïdes sur l'induction de sénescence dans les fibroblastes dans ces conditions de faible expression de B-RAF^{V600E}, et ainsi confirmer les effets conférant des propriétés d'échappement total de la sénescence par les glucocorticoïdes.

Nous avons aussi entrepris la création d'une lignée de souris exprimant la protéine B-RAF^{V600E} après recombinaison (Dankort et al., 2007).

Ce modèle sera utilisé pour confirmer nos observations *in vitro* sur l'induction de sénescence B-RAF^{V600E} dans les mélanocytes, aboutissant à l'apparition de névi. Nous

souhaitons là aussi confirmer le rôle joué par EGR1 dans notre modèle de fibroblastes et valider les autres mécanismes responsables de l'induction de sénescence *in vitro*. Nous allons aussi étudier les effets des glucocorticoïdes lors d'applications topiques coïncidentes avec l'événement de recombinaison. Nous sommes particulièrement intéressés par le devenir des névi ainsi formés. D'après nos données, nous pouvons nous attendre à une taille moyenne des névi beaucoup plus importantes, les glucocorticoïdes ayant, dans notre modèle, présentés un retard d'entrée en sénescence. La formation de mélanome après traitement par les glucocorticoïdes est cependant à envisager, l'échappement de sénescence pouvant être total. Nous nous intéresserons à la vitesse d'apparition des névi, leurs nombres, leurs tailles mais aussi au devenir des névi et leurs capacités de transformation en mélanome. Nous pouvons aussi utiliser le RU486 afin de mesurer les effets des concentrations circulantes de glucocorticoïdes sur la formation et vérifier le rôle plus général des glucocorticoïdes.

Notre lignée de souris recombinante sera dans le même temps accouplé avec une lignée CDKN2A KO (Krimpenfort, Quon, Mooi, Loonstra, & Berns, 2001) afin de permettre la dérivation de mélanocytes et étudier la sénescence *in vitro*. Cela nous permettra alors de nous rapprocher de notre modèle de névi et mélanome *in vivo* tout en ayant la possibilité d'effectuer des expériences de CHIP-Seq, RNAseq ou de déplétion de gènes cibles à l'aide de siRNA.

Nous envisageons dans le même temps l'acquisition de souris KO EGR1, afin de les accoupler elles aussi avec nos souris recombinantes afin d'exprimer B-RAF^{V600E}. Nous voulons alors observer quelles seront les effets de l'absence de EGR1 *in vivo*. Des études ont montré que EGR1 permettait un contrôle de la prolifération dans cellules de la peau dans le cadre de pathologies hyperproliférative (Fang et al., 2007), nous souhaitons donc vérifier cette hypothèse dans notre modèle d'induction de sénescence par B-RAF^{V600E}.

4. Les glucocorticoïdes en médecine humaine

L'usage des glucocorticoïdes en médecine humaine est fréquent dans le cadre des chimiothérapies (Coleman, 1992). Les effets décrits sont parfois antagoniste, certains décrivant des effets antiprolifératifs (Dobos, Kenessey, Tímár, & Ladányi, 2011; Landi,

Baccarelli, Calista, Fears, & Landi, 2001) alors que d'autres présentent des effets opposés (Collinson et al., 2008; Jensen et al., 2009; C. Zhang et al., 2007).

Il existe un cas documenté d'association entre une exposition aux glucocorticoïdes et le développement de mélanome (Lazarus & Kaufman, 2012). Les conclusions font ici suggestions d'une diminution de l'efficacité des lymphocytes T ou de leur nombre, ne permettant pas l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire. On peut citer en plus de ce mécanisme la diminution de l'expression de certains des composés du SASP dans les cellules sénescentes. La non-élimination des cellules sénescentes par le système immunitaire permet alors la présence continue de cellules sénescentes, favorisant l'apparition de cancer via une inflammation chronique.

Les patients greffés doivent utiliser un traitement à vie d'immunosuppresseur, parmi lesquels on trouve fréquemment les glucocorticoïdes. Il existe aujourd'hui un grand nombre d'études (Gerlini, Romagnoli, & Pimpinelli, 2005; Jensen et al., 2009; Karagas et al., 2001; Krynitz et al., 2013; Lazarus & Kaufman, 2012; Mire, Hollowood, Gray, Bordea, & Wojnarowska, 2006; Muthusamy, Mumford, Hudson, Fuggle, & Friend, 2012; Troche et al., 2014) ayant démontré une augmentation de la prévalence du nombre de cancer de la peau chez des patients greffés.

Ces études montrent donc qu'un lien existe entre la présence de glucocorticoïdes et la survenue de différents types de cancer de la peau. Ces données peuvent être mise en parallèle à mes données obtenues sur la modulation de sénescence par les glucocorticoïdes et aux données connues portant sur la modification de la réponse inflammatoire par les glucocorticoïdes. L'étude des mécanismes d'induction de la sénescence et leurs modulations par les glucocorticoïdes peuvent ainsi permettre de mieux comprendre les raisons et les mécanismes impliqués dans l'augmentation du risque d'apparition des cancers de la peau chez les patients greffés.

Matériels et méthodes

*Mon frère, il peut pas aller à l'école.
Quand on lui explique un machin technique, il s'évanouit.*

Jean-Christophe Hembert,
Kaamelott, Livre II, *O'Brother*, écrit par Alexandre Astier.

Matériels et méthodes

1. Cellules, expression d'oncogène et conditions de culture cellulaire

Les expériences de ma thèse ont été effectuées sur plusieurs lignées de fibroblastes : BJ, IMR90 ou WI38. Les lignées cellulaires étaient immortalisées via l'expression constitutive de la télomérase holoenzyme hTert (human telomerase reverse transcriptase) ou non.

Plusieurs oncogènes ont été utilisés. J'ai utilisé principalement l'oncogène B-RAF^{V600E} dont l'expression est sous contrôle d'un promoteur TET-ON afin d'induire la sénescence. La protéine B-RAF^{V600E} muté contient 3 tag HA, permettant ensuite la détection de l'expression de la protéine. J'ai aussi utilisé l'expression de l'oncogène NRAS^{Val12} sous contrôle d'un promoteur TET-ON. Les expériences préliminaires, dont le crible chimique, ont été effectuées sur des cellules dont l'expression de la sénescence dépendait de l'activation de C-RAF. Dans ce modèle, on a utilisé une construction contenant le domaine kinase de la protéine C-RAF fusionné au récepteur des œstrogènes. Lors de l'ajout de 4-Hydroxy-Tamoxifen (4HT), on modifie la conformation de la protéine et découvre le domaine kinase de la protéine, la rendant alors active.

Dans le cas de l'étude de la voie NF- κ B et ses implications en sénescence, nous avons utilisé un vecteur d'expression constitutif exprimant un ARN codant pour la protéine I κ B muté, ne disposant pas de site de clivage, empêchant donc la translocation de RelA dans le noyau et donc l'expression des gènes dépendant du complexe NF- κ B.

La croissance des cellules s'effectue en MEM additionné de Sérum de Veau Fœtal à 10% final, de pyruvate de Sodium à 1% final, d'un mélange d'Acide Aminé Non Essentiel à 1% final et de Glutamax à 1% final.

Les cellules sont cultivées à 37°C à 5% de CO₂, à taux d'O₂ ambiant.

2. Traitements et drogues utilisées

La doxycycline utilisée pour induire la sénescence B-RAF^{V600E} et NRAS est utilisée à une concentration finale de 1 μ g/ml, diluée en éthanol. Le 4HT utilisé pour induire la sénescence C-RAF-ER est utilisé à une concentration finale de 1 μ g/mL.

Les traitements glucocorticoïdes ont été fait à l'aide de propionate de clobetasol, resuspendu en DMSO. La concentration finale du clobetasol est de 2nM. Un inhibiteur du récepteur des glucocorticoïde a aussi été utilisé, le RU486, aussi appelé mifépristone, à une concentration finale de 1 μ M en DMSO. Le Compound A (CpdA), un agoniste du récepteur des glucocorticoïde, connu pour n'activer que la réponse inflammatoire des GC via l'inhibition de l'expression des gènes dépendant de NF- κ B a été utilisé à une concentration finale de 1 μ M en DMSO.

Afin de mesurer la synthèse d'ADN, un analogue de nucléotide a été utilisé, l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). La concentration finale d'EdU était de 25nM.

3. Microscopie haut débit, inversé et immunofluorescence

Pour les expériences de comptage de cellules, les cellules sont incubées 30 minutes en présence de Hoechst H33342 à une concentration final de 50 μ g/ml. Alternativement, les cellules ont été fixé et coloré à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 1,6% + H33342 à 50 μ g/mL final. On utilise ensuite un algorithme de détection des noyaux sur un

microscope de criblage haut-débit, Perkin Elmer Operetta ou ThermoScientific CellInsight CX5.

Pour étudier les SAHF, nous avons mis au point un programme sur Perkin Elmer Operetta nous permettant de déterminer un score de texture dans le noyau. Le score de texture est dépendant de l'homogénéité du signal de fluorescence en DAPI. Pour cela, on fixe les cellules 15' à l'aide de formaldéhyde 1,6% final. Les cellules sont ensuite lavées et perméabilisées par deux lavages de 10' en PBS + 0,1% Tw-20 puis on incube les cellules dans une solution de DAPI 100ng/mL pendant 30' à température ambiante.

La synthèse d'ADN a été mesurée en suivant le kit et le protocole Click-It EdU Thermo Fischer. Un groupement contenant un fluorochrome (détectable à 488nm, 594nm ou 646 nm) a été ajouté sur le nucléotide modifié (EdU) par réaction chimique, permettant ensuite sa détection. Là aussi, j'ai utilisé de manière indifférencié les deux microscopes de criblage haut-débit. À l'aide d'un algorithme adapté, j'ai pu déterminer le nombre de noyau ayant incorporé le nucléotide modifié sur au moins une phase S.

Pour la microscopie inversée, on fixe les cellules 15' à l'aide de formaldéhyde 1,6% final. Les cellules sont ensuite lavées et perméabilisées par deux lavages de 10' en PBS + 0,1% Tw-20. L'anticorps primaire est ensuite incubé 1h à température ambiante (ou toute la nuit à 4°C) dans du PBS + 0,1% Tw-20. On lave ensuite 3 fois à l'aide d'une solution de PBS + 0,1% Tw-20, puis on incube l'anticorps secondaire 30' à température ambiante. On lave de nouveau 3 fois à l'aide d'une solution de PBS + 0,1% Tw-20 puis on incube les cellules dans une solution de DAPI 100ng/mL pendant 30' à température ambiante. Les anticorps utilisés sont résumés dans le tableau.

4. ARN : extraction, RT, qPCR et séquençages hauts débits

L'ARN est extrait des cellules en suivant le protocole d'extraction Standard du kit Macheray Nagel NucleoSpin RNA. L'ARN est ensuite quantifié à l'aide d'un ThermoScientific Nanodrop 2000. Une étape de reverse transcription est effectuée selon le protocole Maxima Reverse Transcriptase à partir de 500ng ou 1µg d'ARN. L'ADNc obtenu est ensuite dilué au 1/10 avant d'effectuer les qPCR.

Les PCR quantitatives en temps réel ont effectuées en utilisant le réactif et le protocole du kit Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix à l'aide d'un IQ5 BioRad en utilisant le niveau d'expression de GAPDH comme contrôle de normalisation.

La liste des primers utilisés est présente dans le tableau suivant :

Cible	séquence forward	séquence reverse
3-HA-B-RAF ^{FV600E}	ACAGTAGGCCAACGGATAGG	TTGCTGTGGTGTAGGGGCGAG
CDKN1A	CACTCAGAGGAGGCCCATGTCA	CCCAGGCCGAAGTCACCCTCCA
CDKN2A(INK4A)	CACCGAATAGTTACGGTCGG	GCACGGGTCGGGTGAGAGTG
CDKN2B	GGACTAGTGGAGAAGGTGCG	GGGCGCTGCCCATCATCATG
CDKN2C	GGGGACCTAGAGCAACTTAC	GTAGCAGTCTCCTGGCAATC
CDKN2D	CTCAACCGCTTCGGCAAGAC	GGACTGGTACCGGAGGTGTC
DUSP1	ACAAGAGCATCCCTGTGGAG	CAGTGGACAAACACCCTTCC
DUSP5	CTCGCTACTCGCTTGCCTAC	TCCACGCAACTCAGGATA
EGR1	AGCCCTACGAGCACCTGAC	GTTTGGCTGGGGTAACTGGT
c-Fos	GGGGCAAGGTGGAACAGTTAT	CCGCTTGGAGTGTATCAGTCA
GAPDH	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	GGGGTCATTGATGGCAACAATA
JUN	TCCAAGTGCCGAAAAGGAAG	CGAGTTCTGAGCTTTCAAGGT
MSK1	TCCTCACTGTCAAGCACGAG	GGACCTTCAGGAGCTCAAAA
NR3C1	TTCCTGGTCTGAACAGTTTT	AGAGTTTGGGAGGTGGTCCT
TSC22D3	TGGTGGCCATAGACAACAAG	CTGCTCCTTCAGGATCTCCA

Des ARN extraits à partir du kit Macheray Nagel NucleoSpin RNA ont aussi été utilisé pour des expériences de Bead-array Illumina v2 ou des expériences de RNAseq.

5. Identification des gènes cibles de NF- κ B

La liste de gènes définis comme étant des cibles de NF- κ B a été défini d'après les données du laboratoire Gilmore (<https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>) ainsi que celles du laboratoire Abadie (<http://bioinfo.lifl.fr/NF-KB/>).

La liste des 347 gènes sélectionnés est présente dans le tableau suivant :

ABCA1	ABCB1	ABCB4	ABCC6	ABCG8	ADH1A	ADORA1	ADORA2A
AFP	AGER	AGT	AICDA	ALOX12	ALOX12B	AMACR	AMH
ANGPT1	APOBEC2	APOC3	APOD	APOE	AQP4	AR	ARFRP1
ART1	ASPH	ASS1	ATP1A2	B2M	BACE1	BAX	BCL2
BCL2A1	BCL2L1	BCL2L11	BCL3	BDKRB1	BDNF	BLNK	BMP2
BMP4	BNIP3	BRCA2	BTK	C2CD4A	C3	C4A	C4BPA
CALCB	CASP4	CCL1	CCL11	CCL15	CCL17	CCL19	CCL2
CCL20	CCL22	CCL23	CCL28	CCL3	CCL4	CCL5	CCND1
CCND2	CCR5	CCR7	CD209	CD274	CD38	CD3G	CD40
CD40LG	CD44	CD48	CD69	CD74	CD80	CD83	CD86
CDK6	CDX1	CEBPD	CFB	CFLAR	CHI3L1	CIDEA	COL1A2

CR2	CREB3	CRP	CSF1	CSF2	CSF3	CTSB	CXCL1
CXCL10	CXCL2	CXCL3	CXCL5	CXCL8	CXCL9	CXCR2	CXCR5
CYP19A1	CYP27B1	CYP7B1	DEFB4A	DIO2	DMP1	DNASE1L2	E2F3
EBI3	EDN1	EGFR	ELF3	ENG	EPHA1	EPO	ERBB2
ERVW-1	F3	F8	FABP6	FAS	FASLG	FCER2	FCGRT
FGF8	FN1	FSTL3	FTH1	G6PC	GADD45B	GATA3	GBP1
GCLC	GCLM	GNAI2	GNRH2	GRM2	GSTP1	GZMB	HAMP
HAS1	HBE1	HBZ	HIF1A	HLA-B	HLA-G	HMGN1	HMOX1
HOXA9	HSD11B2	HSP90AA1	ICAM1	IER3	IFNB1	IFNG	IGFBP2
IL10	IL11	IL12A	IL12B	IL13	IL15	IL15RA	IL17A
IL1A	IL1B	IL1RN	IL2	IL23A	IL27	IL2RA	IL32
IL6	IL9	INHBA	IRF1	IRF2	IRF4	IRF7	JUNB
KCNK5	KCNN2	KDM6B	KISS1	KITLG	KLK3	KLRA1P	KRT15
KRT3	KRT5	KRT6B	LAMB2	LBP	LCN2	LEF1	LGALS3
LIPG	LTA	LTB	LYZ	MADCAM1	MBP	MDK	MMP1
MMP3	MMP9	MTHFR	MUC2	MYB	MYC	MYLK	MYOZ1
NCAM1	NFKB1	NFKB2	NFKBIA	NFKBIE	NFKBIZ	NGF	NLRP2
NOD2	NOS1	NOS2	NOX1	NPY1R	NQO1	NR4A2	NRG1
NUAK2	OLR1	OPN1SW	OPRD1	OPRM1	ORM1	OXTR	PAFAH2
PDGFB	PDYN	PENK	PGLYRP1	PGR	PI3	PIGF	PIK3CA
PIM1	PLAU	PLCD1	PLK3	POMC	PPARGC1B	PRDM1	PRF1
PRKACA	PRKCD	PRL	PSG6	PSMA2	PSMB9	PSME1	PSME2
PTAFR	PTEN	PTGDS	PTGS2	PTHLH	PTPN1	PTX3	PYCARD
RACK1	RAG1	RAG2	RBBP4	REL	RELB	S100A4	S100A6
SAA1	SAA2	SAT1	SCNN1A	SDC4	SELE	SELP	SENP2
SERPINA1	SERPINA3	SERPINB1	SERPINE1	SERPINE2	SH3BGRL	SKP2	SLC11A2
SLC16A1	SLC2A5	SLC3A2	SLC6A6	SNAI1	SOD1	SOD2	SOX9
SP7	SPI1	SPP1	ST6GAL1	ST8SIA1	STAT5A	TACR1	TAP1
TAPBP	TERT	TFEC	TFF3	TFPI2	TGM1	TGM2	TICAM1
TLR2	TLR9	TNC	TNF	TNFAIP3	TNFRSF4	TNFRSF9	TNFSF10
TNFSF13B	TNFSF15	TNIP1	TNIP3	TP53	TPMT	TRAF1	TRAF2
TREM1	TRPC1	TWIST1	UPK1B	UPP1	VCAM1	VEGFC	VIM
WT1	XIAP	YY1					

6. SiRNA

Les expériences de *knock-down* ont été effectuées sur des fibroblastes hBJ-B-RAF^{V600E} en suivant le protocole suivant pour 3 puits de boîte 96 puits.

Les siRNAs proviennent de Thermo Fischer Silencer® Select utilisés à une concentration finale de 1,25nM en suivant le protocole suivant :

- Diluer 2µL de lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) dans 40µL final d'OptiMEM (Invitrogen) pendant 10'
- Incuber 9µL de siRNA dans 36µL final du mix OptiMEM+RNAiMax pendant 15'.
- Ajouter 144µL de MEM complet au mix OptiMEM+RNAiMax + siRNA.

-Ajouter 50µL par puits de la solution préparée (volume final 200µL)

Les ARN ciblés et référence des siRNA sont présents dans le tableau suivant.

Target	Silencer Select		Dharmacon	
	Reference	Sequence	Reference	Sequence
Control	4390843		12061420	
CDKN2B	s2843		003245-03-005	
CDKN2A (INK4A)		CGCACCGAAUAGUUACGGU		CCAACGCACCGAAUAGUUUUU
CDKN1A	s415		003471-00-005	
NR3C1	-		003424-03-005	
DUSP1	s4363			
DUSP5	s4375			
TSC22D3	s4331 + s4330			
EGR1	s4538		006526-01-005	

7. Western Blot

Les culots de cellules sont dans un premier temps resuspendu dans du PBS puis on ajoute du Sample Buffer 4x contenant des inhibiteurs de protéase (PIC Biotool) et des inhibiteurs de phosphatase. Les échantillons sont ensuite chauffés 5' à 95°C puis déposés sur un gel SDS-PAGE de la concentration adapté à la séparation des protéines d'intérêt. On transfère ensuite sur une membrane de nitrocellulose Amershan Protran 0,2µm NC GE Healthcare. La membrane est ensuite bloquée en tampon PBS+Odyssey blocking buffer (ratio 1:1). Les anticorps primaire sont incubés en tampon PBS+Odyssey blocking buffer (ratio 1:1) sur la nuit à 4°C. La membrane est ensuite lavée 3 fois à l'aide d'une solution de PBS + 0,1% TW20 puis incubé en anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante. La membrane sera de nouveau lavée 3 fois en PBS + 0,1% TW20 puis sera scanné à l'aide du système d'imagerie infrarouge LiCor Odyssey.

8. CrispR cas9

Transfection de la lignée BJhB-RAF^{V600E} Puro :

- 200 000 cellules BJh B-RAF^{V600E} Puro sont transfectées en boîte 6 puits avec le plasmide AIO-GFP-EGR1 Ex1 260-302:
- 200µl OptiMEM + 2 µg ADN + 3µl TransfeX (ATCC Ref : ACS-4005)
- Incubé 15' RT puis 200µl Mix ajouté à 2 ml de MEM complet sans P/S par puits (3 puits sont transfecté)
- Changement du milieu 5h après transfection

Tri cellulaire sur FACS BD ARIA :

- 72h après transfection les 3 puits sont trypsinisés et poolés, centrifugé et repris dans 500 µl de MEM complet + EDTA 0,5mM + P/S
- Trie des cellules GFP positive et amplification de cette population cellulaire en MEM Complet + P/S

Clonage cellulaire :

- Dilution limite à 1 cellule/puits des BJh B-RAF^{V600E} AIO GFP EGR1 trié au FACS planté dans une boîte 96 puits avec 2 000 cellules BJh B-RAF^{V600E} Blasti induite en senescence depuis 4 jours.
- 10 jours plus tard ajout de puromycine 2µg/ml pendant 4 jours puis 1 µg/ml ensuite afin d'éliminer les cellule sénescence B-RAF V600E Blasti.
- Amplification des puits présentant des clones
- Screening par IF par détection d'EGR1 après induction senescence dox 1µg/ml pendant 24h (anticorps Cell Signaling Ref : 4154S)
- Séquençage de l'ADNg pour identifier la délétion

9. Chromatin Immuno-Precipitation

Protocole Crosslink et sonication :

- 10M de cellules, fixé en formaldéhyde (EM grade) 1% pendant 10 minutes (1,375mL formaldéhyde dans 22mL de milieu, 5mL/boîte).
- Quenchage 10minutes avec glycine en concentration finale 0,2M (2,4mL Glycine 2,5M dans 5mL de milieu, 1mL/boîte).
- Lavage PBS froid 10mL.
- Récolte PBS (scrap) puis centrifugation (10min à 1500g). Pellet lavé en PBS.
- Suspension dans 1mL de tampon LB3 et sonication Covaris. Programme Covaris : 150W, 10%, 200 burst/cycle, 5x2'
- Ajout de 100µL de Triton X-100 10%, puis centrifugation 15min à 20000g à 4°C
- Prélever 20µL pour protéinase K, purification, dosage et dépose sur gel afin de vérifier la taille de sonication

Préparation des billes de sepharose : (~4h)

- Bien resuspendre les billes
- Prévoir 70µL de billes par échantillon (30µL IgG + 30µL Ac Spé) (repérer le volume total sur le tube)
- Laver les billes à l'aide du tampon LB3+
- Centrifuger à 20000g 4°C pendant 1 minute
- Laisser reposer 30 seconde sur rack avant de retirer le surnageant

- Incuber les billes pendant au moins 3h avec de la BSA 2% en chambre froide sur roue
- Centrifuger à 20000g 4°C pendant 1 minute
- Lavage avec 1mL de LB3+
- Resuspendre les billes en LB3+ dans le volume d'origine
- Garder les billes à 4°C

Chromatin immunoprecipitation :

- Préparer 250µL de chromatine par échantillon dans 500µL de LB3+ final
- Prélever 12,5µL par échantillon dans 25µL de LB3+ et congeler (→ input (5%))
- Pour chaque échantillon, préparer 6µg d'Ac final
- Incubation Overnight sur roue en chambre froide (4°C)
- Ajouter 30µL de billes/échantillon 2h sur roue à 4°C

Lavage :

- Centrifuger à 20000g 4°C pendant 1 minute
- Laver 1 fois avec 800µL de LPS
- Centrifuger à 20000g 4°C pendant 1 minute
- Laver avec 800µL de LTS
- Centrifuger à 20000g 4°C pendant 1 minute
- Laver avec 800µL de LiCl
- Centrifuger à 20000g 4°C pendant 1 minute
- Laver 1 fois avec 800µL de TE
- Centrifuger à 20000g 4°C pendant 1 minute
- Resuspendre dans 200µL de TE-SDS

Reverse crosslink, extraction d'ADN préparation des librairies et sizing

- Ajouter 1,25µL de protéinase K, puis incuber à 65°C O/N au Thermomix©
- Centrifuger à 20000g 4°C pendant 1 minute
- Extraire l'ADN à l'aide du kit Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up© ou en faisant une extraction phénol/chloroforme
- ChIP-Seq amplification de la library et sizing réalisés à l'aide du SX-8G IP-Star de Diagenode
- Création de la library à l'aide du kit diagenode MicroPlex Library Preparation kit v2 (REF : C05010012)
- Sizing à 325pb avec les bille AMPure XP (Beckman Coulter Ref : A63880)
- Contrôle des library sur Bio Analyzer Agilent High Sensitivity DNA Kit (Ref : 5067-4626), et dosage ADN sur Qubit (Invitrogen Qubit dsDNA HS Ref : Q32851).

Composition des tampons utilisés.

Tampon LB3 (50mL) :

-10mM Tris-HCl (pH8) -> 500µL Trizma 1M (pH7,5, ajusté avant)

-100mM NaCl -> 1mL NaCl 5M
-1mM EDTA -> 100µL EDTA 0,5M
-0,5mM EGTA -> 50µL EGTA 0,5M
-0,1% Na-Deoxycholate -> 500µL solution 10% (4g dans 40mL H2O final)
-0,5% N-lauroylsarcosine -> 2,5mL solution 10% (4g dans 40mL H2O final)
-qsp H2O 50mL -> 45,35mL

Tampon LB3+ (50mL) :

-10mM Tris-HCl (pH8) -> 500µL Trizma 1M (pH7,5, ajusté avant)
-100mM NaCl -> 1mL NaCl 5M
-1mM EDTA -> 100µL EDTA 0,5M
-0,5mM EGTA -> 50µL EGTA 0,5M
-0,1% Na-Deoxycholate -> 500µL solution 10% (4g dans 40mL H2O final)
-0,5% N-lauroylsarcosine -> 2,5mL solution 10% (4g dans 40mL H2O final)
-1 tablet Roche PIC
-qsp H2O 50mL -> 45,35mL

Tampon LPS (250mL) :

-20mM Tris-HCl (pH8) -> 5mL Trizma 1M
-150mM NaCl -> 7,5mL NaCl 5M
-2mM EDTA -> 1000µL EDTA 0,5M
-0,1% SDS
-0,25% Triton X-100 -> 6,25mL de Tx 10%
-qsp H2O 250mL -> 186,2mL

Tampon LTS (250mL) :

-20mM Tris-HCl (pH8) -> 5mL Trizma 1M
-500mM NaCl -> 25mL NaCl 5M
-2mM EDTA -> 1000µL EDTA 0,5M
-0,1% SDS
-0,25% Triton X-100 -> 6,25mL de Tx 10%
-qsp H2O 250mL -> 186,2mL

Tampon LiCl (50mL) :

-10mM Tris-HCl (pH8) -> 500µL Trizma 1M
-250mM LiCl -> 2,5mL LiCl 5M
-1mM EDTA -> 100µL EDTA 0,5M
-0,1% Na-Deoxycholate -> 500µL solution 10% (4g dans 40mL H2O final)
-1% NP-40 ou Igepal CA-630 -> 5mL de NP-40 à 10%
-qsp H2O 50mL -> 45,35mL

Tampon TE (100mL) :

-10mM Tris-HCl (pH8) -> 1000µL Trizma 1M
-1mM EDTA -> 200µL EDTA 0,5M

Tampon TE-SDS (50mL) :

-10mM Tris-HCl (pH8) -> 500µL Trizma 1M

-1mM EDTA -> 100µL EDTA 0,5M
-1% SDS

Bibliographie

*C'est pour ça : j'lis jamais rien. C'est un vrai piège à cons c't'histoire-là.
En plus j'sais pas lire.*

Franck Pitiot,
Kamelott, Livre I, *Le Chaudron Rutilant*, écrit par Alexandre Astier.

Bibliographie

- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., ... Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, *15*(8), 978–990. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>
- Acosta, J. C., O’Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., ... Gil, J. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, *133*(6), 1006–1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.038>
- Ahmed, M. M., Chendil, D., Lele, S., Venkatasubbarao, K., Dey, S., Ritter, M., ... Mohiuddin, M. (2001). Early growth response-1 gene: potential radiation response gene marker in prostate cancer. *American Journal of Clinical Oncology*, *24*(5), 500–505. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11586104>
- Aksoy, O., Chicas, A., Zeng, T., Zhao, Z., McCurrach, M., Wang, X., & Lowe, S. W. (2012). The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes and Development*, *26*(14), 1546–1557. <https://doi.org/10.1101/gad.196238.112>
- Alexandre, G., Céline, V., Patrice, M., Carole, C.-M., & Philippe, H. (2014). Effects of topical corticosteroids on cell proliferation, cell cycle progression and apoptosis: In vitro comparison on HaCaT. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.066>
- Aoude, L. G., Wadt, K. A. W., Pritchard, A. L., & Hayward, N. K. (2015, March 1). Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell and Melanoma Research*. Wiley/Blackwell (10.1111). <https://doi.org/10.1111/pcmr.12333>
- Atadja, P. W., Stringer, K. F., & Riabowol, K. T. (1994). Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(7), 4991–4999. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.7.4991>
- Ayroldi, E., Cannarile, L., Migliorati, G., Nocentini, G., Delfino, D. V., & Riccardi, C. (2012). Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: Genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB Journal*, *26*(12), 4805–4820. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216382>
- Ayroldi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., ... Riccardi, C. (2001). Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor κB. *Blood*, *98*(3), 743–753. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.743>
- Ayroldi, E., Petrillo, M. G., Bastianelli, A., Marchetti, M. C., Ronchetti, S., Nocentini, G., ... Riccardi, C. (2014). L-GILZ binds p53 and MDM2 and suppresses tumor growth through p53 activation in human cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, *22*(1), 118–130. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.129>
- Ayroldi, E., & Riccardi, C. (2009). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(11), 3649–3658. <https://doi.org/10.1096/fj.09-134684>
- Ayroldi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R., & Riccardi, C. (2007). GILZ

- mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 117(6), 1605–1615. <https://doi.org/10.1172/JCI30724>
- Ayroldi, E., Zollo, O., Macchiarulo, A., Di Marco, B., Marchetti, C., & Riccardi, C. (2002). Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Molecular and Cellular Biology*, 22(22), 7929–7941. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.22.7929>
- Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derks, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., ... de Keizer, P. L. J. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*, 169(1), 132–147.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.031>
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., ... van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184–189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Bandyopadhyay, D., Okan, N. A., Bales, E., Nascimento, L., Cole, P. A., & Medrano, E. E. (2002). Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes. *Cancer Research*, 62(21), 6231–6239. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414652>
- Barnes, P. J. (2011). Glucocorticosteroids: Current and future directions. *British Journal of Pharmacology*, 163(1), 29–43. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01199.x>
- Baron, V., Adamson, E. D., Calogero, A., Ragona, G., & Mercola, D. (2006). The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFβ1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Therapy*, 13(2), 115–124. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700896>
- Baron, V., Duss, S., Rhim, J., & Mercola, D. (2003). Antisense to the early growth response-1 gene (Egr-1) inhibits prostate tumor development in TRAMP mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1002(1), 197–216. <https://doi.org/10.1196/annals.1281.024>
- Baschant, U., Lane, N. E., & Tuckermann, J. P. (2012). The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(11), 645–655. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.166>
- Baschant, U., & Tuckermann, J. P. (2010). The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 120(2–3), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.03.058>
- Bastian, B. C. (2014). The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual Review of Pathology*, 9, 239–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104658>
- Bataille, V., Kato, B. S., Falchi, M., Gardner, J., Kimura, M., Lens, M., ... Spector, T. D. (2007). Nevus size and number are associated with telomere length and represent potential markers of a decreased senescence in vivo. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(7), 1499–1502. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0152>
- Beauséjour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P., & Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO Journal*, 22(16), 4212–4222.
- Beck, I. M., Drebert, Z. J., Hoya-Arias, R., Bahar, A. a., Devos, M., Clarisse, D., ... De Bosscher, K. (2013). Compound A, a Selective Glucocorticoid Receptor Modulator, Enhances Heat Shock Protein Hsp70 Gene Promoter Activation. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069115>
- Beck, I. M., Vanden Berghe, W., Gerlo, S., Bougarne, N., Vermeulen, L., De Bosscher, K., & Haegeman, G. (2009). Glucocorticoids and mitogen- and stress-activated protein kinase 1 inhibitors: possible partners in the combat against inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 77(7), 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.12.008>
- Bellavance, M. A., & Rivest, S. (2012). The neuroendocrine control of the innate immune system in health and brain diseases. *Immunological Reviews*, 248(1), 36–55.

- <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01129.x>
- Benhamed, M., Herbig, U., Ye, T., Dejean, A., & Bischof, O. (2012). Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Nature Cell Biology*, *14*(3), 266–275. <https://doi.org/10.1038/ncb2443>
- Bennett, D. C. (2003, May 19). Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206446>
- Berry, D. C., Jiang, Y., Arpke, R. W., Berglund, E. D., Kyba, M., Graff, J. M., ... Reading, D. (2017). Cellular Aging Contributes to Failure of Cold-Induced Beige Adipocyte Formation in Old Mice and Humans. *Cell Metabolism*, *25*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.023>
- Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J., & Tsao, H. (2003). Cutaneous Melanomas Associated With Nevi. *Archives of Dermatology*, *139*(12), 1620. <https://doi.org/10.1001/archderm.139.12.1620>
- Bhattacharyya, S., Wu, M., Fang, F., Tourtellotte, W. G., Feghali-Bostwick, C., & Varga, J. (2011). Early growth response transcription factors: Key mediators of fibrosis and novel targets for anti-fibrotic therapy. *Matrix Biology*, *30*(4), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.03.005>
- Biddie, S. C., Conway-campbell, B. L., & Lightman, S. L. (2012). Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology*, *51*(3), 403–412. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker215>
- Bischof, O., & Martínez-Zamudio, R. I. (2015). MicroRNAs and lncRNAs in senescence: A re-view. *IUBMB Life*, *67*(4), 255–267. <https://doi.org/10.1002/iub.1373>
- Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Seftor, E., Hendrix, M., ... Trent, J. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, *406*(6795), 536–540. <https://doi.org/10.1038/35020115>
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2007). The functional contrariety of JNK. *Molecular Carcinogenesis*, *46*(8), 591–598. <https://doi.org/10.1002/mc.20348>
- Boehm, J. S., Zhao, J. J., Yao, J., Kim, S. Y., Firestein, R., Dunn, I. F., ... Hahn, W. C. (2007). Integrative Genomic Approaches Identify IKBKE as a Breast Cancer Oncogene. *Cell*, *129*(6), 1065–1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.052>
- Bogdan, I., Smolle, J., Kerl, H., Burg, G., & Böni, R. (2003). Melanoma ex naevo: a study of the associated naevus. *Melanoma Research*, *13*(2), 213–217. <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000056226.78713.99>
- Bonito, N. A., Drechsler, J., Stoecker, S., Carmo, C. R., Seckl, M. J., Hermanns, H. M., & Costa-Pereira, A. P. (2014). Control of gp130 expression by the mitogen-activated protein kinase ERK2. *Oncogene*, *33*(17), 2255–2263. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.159>
- Boon, K., Bailey, N. W., Yang, J., Steel, M. P., Groshong, S., Kervitsky, D., ... Schwartz, D. A. (2009). Molecular Phenotypes Distinguish Patients with Relatively Stable from Progressive Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). *PLoS ONE*, *4*(4), e5134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005134>
- Bot, P. T. G., Hoefler, I. E., Sluijter, J. P. G., van Vliet, P., Smits, A. M., Lebrin, F., ... Goumans, M.-J. (2009). Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke*, *40*(2), 439–447. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.522284>
- Braig, M., & Schmitt, C. A. (2006). Oncogene-induced senescence: Putting the brakes on tumor development. *Cancer Research*, *66*(6), 2881–2884. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4006>
- Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G., & Siebenlist, U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, *267*(5203), 1485–1488. <https://doi.org/10.1126/science.7878466>
- Brusker, I., Rhodes, J. M., & Goldman, R. (1982). β -Galactosidase—An indicator of the maturational stage of mouse and human mononuclear phagocytes. *Journal of Cellular Physiology*, *112*(3), 385–390. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041120312>
- Buchwalter, G., Gross, C., & Wasylyk, B. (2004, January 7). Ets ternary complex transcription factors. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.028>

- Buckingham, J. C. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology*, *147 Suppl*, S258-68. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706456>
- Buehring, B., Viswanathan, R., Binkley, N., & Busse, W. (2013). Glucocorticoid-induced osteoporosis: An update on effects and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(5), 1019–1030. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.040>
- Bulavin, D. V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L. A., Anderson, C. W., ... Fornace, A. J. (2004). Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16Ink4a-p19 Arf pathway. *Nature Genetics*, *36*(4), 343–350. <https://doi.org/10.1038/ng1317>
- Bultink, I. E., Baden, M., & Lems, W. F. (2013). Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on current pharmacotherapy and future directions. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *14*(2), 185–197. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.761975>
- Buschmann, T., Potapova, O., Bar-Shira, A., Ivanov, V. N., Fuchs, S. Y., Henderson, S., ... Ronai, Z. (2001). Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(8), 2743–2754. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.8.2743-2754.2001>
- Busillo, J. M., Azzams, K. M., & Cidlowski, J. A. (2011). Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(44), 38703–38713. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.275370>
- Busillo, J. M., & Cidlowski, J. A. (2013). The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: Ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *24*(3), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.005>
- Buttgereit, F. (2012). A fresh look at glucocorticoids: How to use an old ally more effectively. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, *70*(SUPPL. 1), 26–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23259655>
- Calipel, A., Lefevre, G., Pouponnot, C., Mouriaux, F., Eychène, A., & Mascarelli, F. (2003). Mutation of B-Raf in Human Choroidal Melanoma Cells Mediates Cell Proliferation and Transformation through the MEK/ERK Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(43), 42409–42418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308709200>
- Calogero, A., Cuomo, L., D'Onofrio, M., de Grazia, U., Spinsanti, P., Mercola, D., ... Ragona, G. (1996). Expression of Egr-1 correlates with the transformed phenotype and the type of viral latency in EBV genome positive lymphoid cell lines. *Oncogene*, *13*(10), 2105–2112. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8950977>
- Campisi, J., Andersen, J., Kapahi, P., & Melov, S. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age related degenerative disease? *Seminars in Cancer Biology*, *21*(6), 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2011.09.001>
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cancer Genome Atlas Network, T. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, *161*(7), 1681–1696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>
- Cao, X., Koski, R. A., Gashler, A., McKiernan, M., Morris, C. F., Ray, R. V., & Sukhatme, V. P. (1990). Identification and characterization of the egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein by differentiation and growth signals. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(5), 1931–1939.
- Cao, X., Mahendran, R., Guy, G. R., & Tan, Y. H. (1993). Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(23), 16949–16957.
- Caratti, G., Matthews, L., Poolman, T., Kershaw, S., Baxter, M., & Ray, D. (2015). Glucocorticoid receptor function in health and disease. *Clinical Endocrinology*, *34*(9), 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>
- Carrasco-Serrano, C., & Criado, M. (2004). Glucocorticoid activation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene: Involvement of transcription factor Egr-1. *FEBS Letters*, *566*(1–3), 247–250. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.049>
- Carrel, A. (1912). On the Permanent Life of Tissues Outside of the Organism. *The Journal of*

- Experimental Medicine*, 15(5), 516–528. <https://doi.org/10.1084/jem.15.5.516>
- Carter, J. H., Lefebvre, J. M., Wiest, D. L., & Tourtellotte, W. G. (2007). Redundant role for early growth response transcriptional regulators in thymocyte differentiation and survival. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(11), 6796–6805. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.11.6796>
- Catling, A. D., Schaeffer, H. J., Reuter, C. W., Reddy, G. R., & Weber, M. J. (1995). A proline-rich sequence unique to MEK1 and MEK2 is required for raf binding and regulates MEK function. *Molecular and Cellular Biology*, 15(10), 5214–5225. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.10.5214>
- Caunt, C. J., & Keyse, S. M. (2013, January). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): Shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS Journal*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x>
- Cenci, S., Weitzmann, M. N., Gentile, M. A., Aisa, M. C., & Pacifici, R. (2000). M-CSF neutralization and egr-1 deficiency prevent ovariectomy-induced bone loss. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(9), 1279–1287. <https://doi.org/10.1172/JCI8672>
- Chan, H. M., Narita, M., Lowe, S. W., & Livingston, D. M. (2005). The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53-p21 senescence pathway. *Genes & Development*, 19(2), 196–201. <https://doi.org/10.1101/gad.1280205>
- Chandra, T., Ewels, P. A., Schoenfelder, S., Furlan-Magaril, M., Wingett, S. W., Kirschner, K., ... Reik, W. (2015). Global Reorganization of the Nuclear Landscape in Senescent Cells. *Cell Reports*, 10(4), 471–483. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.055>
- Chandra, T., & Kirschner, K. (2016). Chromosome organisation during ageing and senescence. *Current Opinion in Cell Biology*, 40, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.03.020>
- Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J., Pope, B. D., Newman, S., Ahmed, K., ... Narita, M. (2013). Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. *Molecular Cell*, 47(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.010.Independence>
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R. M., Campisi, J., Janakiraman, K., ... Francisco, S. (2017). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine*, 22(1), 78–83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010.Clearance>
- Changelian, P. S., Feng, P., King, T. C., & Milbrandt, J. (1989). Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(1).
- Chehrehasa, F., Meedeniya, A. C. B., Dwyer, P., Abrahamsen, G., & Mackay-Sim, A. (2009). EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *Journal of Neuroscience Methods*, 177(1), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.10.006>
- Chen, H., Gu, X., Su, I. H., Bottino, R., Contreras, J. L., Tarakhovskiy, A., & Kim, S. K. (2009). Polycomb protein Ezh2 regulates pancreatic β -cell Ink4a/Arf expression and regeneration in diabetes mellitus. *Genes and Development*, 23(8), 975–985. <https://doi.org/10.1101/gad.1742509>
- Chen, Q., & Ames, B. N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4130–4134. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4130>
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B. E., ... Cobb, M. H. (2001). MAP kinases. *Chemical Reviews*, 101(8), 2449–2476. <https://doi.org/10.1021/cr000241p>
- Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., ... Pandolfi, P. P. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051), 725–730. <https://doi.org/10.1038/nature03918>
- Cheng, Q., Fan, H., Ngo, D., Beaulieu, E., Leung, P., Lo, C. Y., ... Morand, E. F. (2013). GILZ overexpression inhibits endothelial cell adhesive function through regulation of NF- κ B and MAPK activity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(1), 424–433. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202662>
- Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., ... Lowe, S. W. (2010). Dissecting the Unique Role of the Retinoblastoma Tumor Suppressor during Cellular Senescence. *Cancer Cell*,

- 17(4), 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.01.023>
- Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J., & Van Deursen, J. M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science*, *354*(6311), 472–477. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6659>
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, *21*(12), 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Choi, B. H., Kim, C. G., Bae, Y.-S. S., Byeong, H. C., Chang, G. K., Bae, Y.-S. S., ... Soon, Y. S. (2008). p21 Waf1 / Cip1 Expression by Curcumin in U-87MG Human Glioma Cells : Role of Early Growth Response-1 Expression Cells : Role of Early Growth Response-1 Expression. *Cancer Research*, *68*(5), 1369–1377. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5222>
- Clark, A. R., & Belvisi, M. G. (2012). Maps and legends: The quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. *Pharmacology and Therapeutics*, *134*(1), 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.004>
- Clark, A. R., & Lasa, M. (2003). Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Current Opinion in Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(03\)00073-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(03)00073-0)
- Clark, W. H., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, *15*(12), 1147–1165. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6500548>
- Coenraads, P.-J. (2012). Hand Eczema. *New England Journal of Medicine*, *367*(19), 1829–1837. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1104084>
- Cogswell, P. C., Mayo, M. W., & Baldwin, A. S. (1997). Involvement of Egr-1/RelA synergy in distinguishing T cell activation from tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B1 transcription. *The Journal of Experimental Medicine*, *185*(3), 491–497. <https://doi.org/10.1084/JEM.185.3.491>
- Cole, T. J., Blendy, J. A., Monaghan, A. P., Kriegstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., ... Schütz, G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes and Development*, *9*(13), 1608–1621. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1608>
- Coleman, R. E. (1992). Glucocorticoids in cancer therapy. *Biotherapy*, *4*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1007/BF02171708>
- Collado, M., & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews. Cancer*, *10*(1), 51–57. <https://doi.org/10.1038/nrc2772>
- Collins, S., Lutz, M. A., Zarek, P. E., Anders, R. A., Kersh, G. J., & Powell, J. D. (2008). Opposing regulation of T cell function by Egr-1/NAB2 and Egr-2/Egr-3. *European Journal of Immunology*, *38*(2), 528–536. <https://doi.org/10.1002/eji.200737157>
- Collinson, F. J., Lam, T. K., Bruijn, W. M. J., de Wilt, J. H. W., Lamont, M., Thompson, J. F., & Kefford, R. F. (2008). Long-term Survival and Occasional Regression of Distant Melanoma Metastases after Adrenal Metastasectomy. *Annals of Surgical Oncology*, *15*(6), 1741–1749. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-9836-y>
- Contrepois, K., Coudereau, C., Benayoun, B. A., Schuler, N., Roux, P.-F., Bischof, O., ... Mann, C. (2017). Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nature Communications*, *8*(May), 14995. <https://doi.org/10.1038/ncomms14995>
- Coppe, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology*, *5*, 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Coppe, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 29568–29574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200>
- Coppe, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., ... Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the

- p53 tumor suppressor. *PLoS Biology*, 6(12), 2853–2868. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
- Courtois-Cox, S., Genter Williams, S. M., Reczek, E. E., Johnson, B. W., McGillicuddy, L. T., Johannessen, C. M., ... Cichowski, K. (2006). A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, 10(6), 459–472. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.003>
- Craig, V. J., Zhang, L., Hagood, J. S., & Owen, C. A. (2015, November 30). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0020TR>
- Crescenzi, E., Palumbo, G., & Brady, H. J. M. (2003). Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *The Biochemical Journal*, 375(Pt 2), 263–274. <https://doi.org/10.1042/BJ20030868>
- Croxtall, J. D., van Hal, P. T. W., Choudhury, Q., Gilroy, D. W., & Flower, R. J. (2002). Different glucocorticoids vary in their genomic and non-genomic mechanism of action in A549 cells. *British Journal of Pharmacology*, 135(2), 511–519.
- Culerrier, R., Carraz, M., Mann, C., & Djabali, M. (2016). MSK1 triggers the expression of the INK4AB/ARF locus in oncogene-induced senescence. *Molecular Biology of the Cell*, 27(17), 2726–2734. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-11-0772>
- Dadzie, O. E., Yang, S., Emley, A., Keady, M., Bhawan, J., & Mahalingam, M. (2009). RAS and RAF mutations in banal melanocytic aggregates contiguous with primary cutaneous melanoma: clues to melanomagenesis. *British Journal of Dermatology*, 160(2), 368–375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08887.x>
- Dalle Pezze, P., Nelson, G., Otten, E. G., Korolchuk, V. I., Kirkwood, T. B. L., von Zglinicki, T., & Shanley, D. P. (2014). Dynamic modelling of pathways to cellular senescence reveals strategies for targeted interventions. *PLoS Computational Biology*, 10(8), e1003728. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003728>
- Damsky, W. E., & Bosenberg, M. (2017). Melanocytic nevi and melanoma: Unraveling a complex relationship. *Oncogene*, 36(42), 5771–5792. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.189>
- Damsky, W. E., Micevic, G., Meeth, K., Muthusamy, V., Curley, D. P., Santhanakrishnan, M., ... Raza Zaidi, M. (2015). mTORC1 activation blocks brafV600E-induced growth arrest but is insufficient for melanoma formation. *Cancer Cell*, 27(1), 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.014>
- Dankort, D., Curley, D. P., Cartlidge, R. A., Nelson, B., Karnezis, A. N., Damsky, W. E., ... Bosenberg, M. (2009). BrafV600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature Genetics*, 41(5), 544–552. <https://doi.org/10.1038/ng.356>
- Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., & McMahon, M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy tumors. *Genes & Development*, 21(415), 379–384. <https://doi.org/10.1101/gad.1516407.GENES>
- Das, A., Chendil, D., Dey, S., Mohiuddin, M., Mohiuddin, M., Milbrandt, J., ... Ahmed, M. M. (2001). Ionizing Radiation Down-regulates p53 Protein in Primary Egr-1 -/- Mouse Embryonic Fibroblast Cells Causing Enhanced Resistance to Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3279–3286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008454200>
- Das, M., Jiang, F., Sluss, H. K., Zhang, C., Shokat, K. M., Flavell, R. A., & Davis, R. J. (2007). Suppression of p53-dependent senescence by the JNK signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15759–15764. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707782104>
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Beck, I. M., Van Molle, W., Hennuyer, N., Hapgood, J., ... Haegeman, G. (2005). A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 15827–15832. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505554102>

- de Castro, M., Elliot, S., Kino, T., Bamberger, C., Karl, M., Webster, E., & Chrousos, G. P. (1996). The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Molecular Medicine*, 2(5), 597–607.
- De Keizer, P. L. J., Packer, L. M., Szybowska, A. A., Riedl-Polderman, P. E., Van Den Broek, N. J. F., De Bruin, A., ... Burgering, B. M. T. (2010). Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer Research*, 70(21), 8526–8536. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1563>
- De Magalhães, J. P. (2013). How ageing processes influence cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(5), 357–365. <https://doi.org/10.1038/nrc3497>
- De Snoo, F. A., & Hayward, N. K. (2005, December 18). Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Letters*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.12.033>
- Decker, E. L., Nehmann, N., Kampen, E., Eibel, H., Zipfel, P. F., & Skerka, C. (2003). Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Research*, 31(3), 911–921. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560487>
- Decker, E. L., Skerka, C., & Zipfel, P. F. (1998). The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(41), 26923–26930. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.41.26923>
- Della Ragione, F., Cucciolla, V., Criniti, V., Indaco, S., Borriello, A., & Zappia, V. (2003). p21Cip1 gene expression is modulated by Egr1. A novel regulatory mechanism involved in the resveratrol antiproliferative effect. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23360–23368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300771200>
- Dellago, H., Preschitz-Kammerhofer, B., Terlecki-Zaniewicz, L., Schreiner, C., Fortschegger, K., Chang, M. W.-F., ... Wieser, M. (2013). High levels of oncomiR-21 contribute to the senescence-induced growth arrest in normal human cells and its knock-down increases the replicative lifespan. *Aging Cell*, 12(3), 446–458. <https://doi.org/10.1111/accel.12069>
- DeMaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., ... Campisi, J. (2016). Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discovery*, 7(2), 165–176. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0241>
- DeMaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., ... Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, 31(6), 722–733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Demunter, A., Stas, M., Degreef, H., De Wolf-Peeters, C., & van den Oord, J. J. (2001). Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology*, 117(6), 1483–1489. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01601.x>
- Deschênes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M. F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., ... Ferbeyre, G. (2013). Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes and Development*, 27(8), 900–915. <https://doi.org/10.1101/gad.203984.112>
- Deschênes-Simard, X., Kottakis, F., Meloche, S., & Ferbeyre, G. (2014, January 15). ERKs in cancer: Friends or foes? *Cancer Research*. American Association for Cancer Research. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2381>
- Dhomen, N., & Marais, R. (2009, June). BRAF Signaling and Targeted Therapies in Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.001>
- Dhomen, N., Reis-Filho, J. S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., ... Marais, R. (2009). Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell*, 15(4), 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.022>
- Di Biase, S., Shim, H. S., Kim, K. H., Vinciguerra, M., Rappa, F., Wei, M., ... Longo, V. D. (2017). Fasting regulates EGR1 and protects from glucose- and dexamethasone-dependent sensitization to chemotherapy. *PLoS Biology*, 15(3), e2001951. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001951>

- Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., & Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Development*, 8(21), 2540–2551. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7958916>
- Di Marco, B., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Di Virgilio, R., Velardi, E., ... Riccardi, C. (2007). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF- κ B interaction: Role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Research*, 35(2), 517–528. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1080>
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., ... D'Adda Di Fagagna, F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 444(7119), 638–642. <https://doi.org/10.1038/nature05327>
- Di Mitri, D., & Alimonti, A. (2016). Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer. *Trends in Cell Biology*, 26(3), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.005>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., ... Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Dinarello, C. A., Donath, M. Y., & Mandrup-Poulsen, T. (2010). Role of IL-1 β in type 2 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 17(4), 314–321. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32833bf6dc>
- Dobos, J., Kenessey, I., Tímár, J., & Ladányi, A. (2011). Glucocorticoid receptor expression and antiproliferative effect of dexamethasone on human melanoma cells. *Pathology Oncology Research : POR*, 17(3), 729–734. <https://doi.org/10.1007/s12253-011-9377-8>
- Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2007). p38 γ MAP Kinase as a Sensor of Reactive Oxygen Species in Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 11(2), 191–205. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.12.013>
- Dorard, C., Estrada, C., Barbotin, C., Larcher, M., Garancher, A., Leloup, J., ... Druillennec, S. (2017). RAF proteins exert both specific and compensatory functions during tumour progression of NRAS-driven melanoma. *Nature Communications*, 8, 15262. <https://doi.org/10.1038/ncomms15262>
- Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M. G., Zhu, J., Sen, P., Wangenstein, K. J., ... Berger, S. L. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature*, 550(7676). <https://doi.org/10.1038/nature24050>
- Ebert, S. N., Balt, S. L., Hunter, J. P. B., Gashler, A., Sukhatme, V. P., & Wong, D. L. (1994). Egr-1 activation of rat adrenal phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 269(33), 20885–20898.
- Eggert, T., Wolter, K., Ji, J., Ma, C., Yevesa, T., Klotz, S., ... Greten, T. F. (2016). Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*, 30(4), 533–547. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.003>
- Ehrengruber, M. U., Muhlebach, S. G., Söhrman, S., Leutenegger, C. M., Lester, H. A., & Davidson, N. (2000). Modulation of early growth response (EGR) transcription factor-dependent gene expression by using recombinant adenovirus. *Gene*, 258(1–2), 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00445-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00445-5)
- Eid, M. A., Kumar, M. V., Iczkowski, K. A., Bostwick, D. G., & Tindall, D. J. (1998). Expression of early growth response genes in human prostate cancer. *Cancer Research*, 58(11), 2461–2468. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622090>
- Engelbrecht, Y., de Wet, H., Horsch, K., Langeveldt, C. R., Hough, F. S., & Hulley, P. A. (2003). Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines. *Endocrinology*, 144(2), 412–422. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220769>
- Erickson, S., Sangfelt, O., Heyman, M., Castro, J., Einhorn, S., & Grandér, D. (1998). Involvement of the Ink4 proteins p16 and p15 in T-lymphocyte senescence. *Oncogene*, 17(5), 595–602.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201965>

- Eyman, D., Damodarasamy, M., Plymate, S. R., & Reed, M. J. (2009). CCL5 secreted by senescent aged fibroblasts induces proliferation of prostate epithelial cells and expression of genes that modulate angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 220(2), 376–381. <https://doi.org/10.1002/jcp.21776>
- Fang, M., Wee, S. A., Ronski, K., Fan, H., Tao, S., & Lin, Q. (2007). Evidence of EGR1 as a differentially expressed gene among proliferative skin diseases. *Genomic Medicine*, 1(1–2), 75–85. <https://doi.org/10.1007/s11568-007-9010-9>
- Fardet, L., Petersen, I., & Nazareth, I. (2012). Risk of cardiovascular events in people prescribed glucocorticoids with iatrogenic Cushing's syndrome: Cohort study. *BMJ (Online)*, 345(7871), e4928. <https://doi.org/10.1136/bmj.e4928>
- Florell, S. R., Meyer, L. J., Boucher, K. M., Porter-Gill, P. A., Hart, M., Erickson, J., ... Leachman, S. A. (2004). Longitudinal assessment of the nevus phenotype in a melanoma kindred. *Journal of Investigative Dermatology*, 123(3), 576–582. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23312.x>
- Franchimont, D. (2004). Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: A good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024(1), 124–137. <https://doi.org/10.1196/annals.1321.009>
- Frémin, C., Saba-El-Leil, M. K., Lévesque, K., Ang, S. L., & Meloche, S. (2015). Functional redundancy of ERK1 and ERK2 MAP kinases during development. *Cell Reports*, 12(6), 913–921. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.011>
- Freund, A., Patil, C. K., & Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO Journal*, 30(8), 1536–1548. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.69>
- Fukunaga, R., & Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO Journal*, 16(8), 1921–1933. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.8.1921>
- Gaggioli, C., Deckert, M., Robert, G., Abbe, P., Batoz, M., Ehrenguber, M. U., ... Tartare-Deckert, S. (2005). HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene*, 24(8), 1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208318>
- Gansauge, S., Gansauge, F., Gause, H., Poch, B., Schoenberg, M. H., & Beger, H. G. (1997). The induction of apoptosis in proliferating human fibroblasts by oxygen radicals is associated with a p53- and p21(WAF1/CIP1) induction. *FEBS Letters*, 404(1), 6–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00059-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00059-8)
- Garnett, M. J., & Marais, R. (2004). Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*, 6(4), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.022>
- Gashler, A., & Sukhatme, V. P. (1995). Early Growth Response Protein 1 (Egr-1): Prototype of a Zinc-finger Family of Transcription Factors. *Progress in Nucleic Acid Research*, 50, 191–224. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7754034>
- Gavin, A. C., & Nebreda, A. R. (1999). A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1. *Current Biology*, 9(5), 281–284. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80120-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80120-1)
- Gennari, C. (1993). Differential effect of glucocorticoids on calcium absorption and bone mass. *British Journal of Rheumatology*, 32 Suppl 2(suppl 2), 11–14. https://doi.org/10.1093/rheumatology/32.suppl_2.11
- Gerlini, G., Romagnoli, P., & Pimpinelli, N. (2005). Skin cancer and immunosuppression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 56(1 SPEC. ISS.), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.11.011>
- Glück, S., Guey, B., Gulen, M. F., Wolter, K., Kang, T. W., Schmacke, N. A., ... Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nature Cell Biology*, 19(9), 1061–1070. <https://doi.org/10.1038/ncb3586>

- Goel, V. K., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., ... Haluska, F. G. (2009). Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene*, *28*(23), 2289–2298. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.95>
- Goldminz, A. M., Au, S. C., Kim, N., Gottlieb, A. B., & Lizzul, P. F. (2013, February). NF- κ B: An essential transcription factor in psoriasis. *Journal of Dermatological Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.11.002>
- Gray-Schopfer, V. C., Cheong, S. C., Chong, H., Chow, J., Moss, T., Abdel-Malek, Z. A., ... Bennett, D. C. (2006). Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: A role for p16? *British Journal of Cancer*, *95*(4), 496–505. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603283>
- Grotegut, S., von Schweinitz, D., Christofori, G., & Lehembre, F. (2006). Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *The EMBO Journal*, *25*(15), 3534–3545. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601213>
- Grove, G. L., & Cristofalo, V. J. (1977). Characterization of the cell cycle of cultured human diploid cells: effects of aging and hydrocortisone. *Journal of Cellular Physiology*, *90*(3), 415–422.
- Guha, M., O'Connell, M. A., Pawlinski, R., Hollis, A., McGovern, P., Yan, S. F., ... Mackman, N. (2001). Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor α expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*, *98*(5), 1429–1439. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.5.1429>
- Gupta, V., Awasthi, N., & Wagner, B. J. (2007). Specific activation of the glucocorticoid receptor and modulation of signal transduction pathways in human lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *48*(4), 1724–1734. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0889>
- Gustafsson, J.-A. (2015). Historical overview of nuclear receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.03.004>
- Gutierrez-Mecinas, M., Trollope, A. F., Collins, A., Morfett, H., Hesketh, S. A., Kersante, F., & Reul, J. M. H. M. (2011). Long-lasting behavioral responses to stress involve a direct interaction of glucocorticoid receptors with ERK1/2-MSK1-Elk-1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(33), 13806–13811. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104383108>
- Haenssle, H. A., Mograby, N., Ngassa, A., Buhl, T., Emmert, S., Schön, M. P., ... Bertsch, H. P. (2016). Association of Patient Risk Factors and Frequency of Nevus-Associated Cutaneous Melanomas. *JAMA Dermatology*, *152*(3), 291. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2015.3775>
- Haferkamp, S., Scurr, L. L., Becker, T. M., Frausto, M., Kefford, R. F., & Rizos, H. (2009). Oncogene-induced senescence does not require the p16 INK4a or p14ARF melanoma tumor suppressors. *Journal of Investigative Dermatology*, *129*(8), 1983–1991. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.5>
- Haferkamp, S., Tran, S. L., Becker, T. M., Scurr, L. L., Kefford, R. F., & Rizos, H. (2009). The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging*, *1*(6), 542–556. <https://doi.org/10.18632/aging.100051>
- Hall, B. M., Balan, V., Gleiberman, A. S., Strom, E., Krasnov, P., Virtuoso, L. P., ... Gudkov, A. V. (2016). Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging*, *8*(7), 1294–1315. <https://doi.org/10.18632/aging.100991>
- Han, J., & Sun, P. (2007). The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(8), 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.06.007>
- Hanaoka, B. Y., Peterson, C. A., & Crofford, L. J. (2012). Glucocorticoid effects on skeletal muscle: Benefit and risk in patients with autoimmune inflammatory rheumatoid diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, *8*(8), 695–697. <https://doi.org/10.1586/eci.12.76>
- Hanaoka, B. Y., Peterson, C. A., Horbinski, C., & Crofford, L. J. (2012, June 12). Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies. *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.85>
- Hansen, K. E., Kleker, B., Safdar, N., & Bartels, C. M. (2014, August). A systematic review and meta-analysis of glucocorticoid-induced osteoporosis in children. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2014.02.002>
- Harada, M., Suzuki, M., Ikeda, T., Kaneko, T., Harada, S., & Fukayama, M. (1997). Clonality in

- Nevocellular and Melanoma: An Expression-Based Clonality Analysis at the X-Linked Genes by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 109(5), 656–660. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12337678>
- Hardy, T., Oakley, F., Anstee, Q. M., & Day, C. P. (2016). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11(1), 451–496. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044224>
- Harris, A., & Seckl, J. (2011). Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and Behavior*, 59(3), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.007>
- Hasan, R. N., & Schafer, A. I. (2008). Hemin upregulates Egr-1 expression in vascular smooth muscle cells via reactive oxygen species ERK-1/2-Elk-1 and NF- κ B. *Circulation Research*, 102(1), 42–50. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.155143>
- Hass, R., Brach, M., Gunji, H., Kharbanda, S., & Kufe, D. (1992). Inhibition of EGR-1 and NF- κ B gene expression by dexamethasone during phorbol ester-induced human monocytic differentiation. *Biochemical Pharmacology*, 44(8), 1569–1576. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90474-W](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90474-W)
- Hayashi, R., Wada, H., Ito, K., & Adcock, I. M. (2004). Effects of glucocorticoids on gene transcription. *European Journal of Pharmacology*, 500(1–3), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.011>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Heasley, L. E., & Han, S. (2006). JNK Regulation of Oncogenesis. *Molecules and Cells*, 21(2), 167–173. <https://doi.org/956> [pii]
- Hecker, L., Logsdon, N. J., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Bernard, K., Hock, T., ... Thannickal, V. J. (2014). Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Science Translational Medicine*, 6(231), 231ra47. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008182>
- Hellstrom, I. C., Dhir, S. K., Diorio, J. C., & Meaney, M. J. (2012). Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone-serotonin-NGFI-A signalling cascade. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1601), 2495–2510. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0223>
- Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., ... Ben-Porath, I. (2016). p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion., 22(4). <https://doi.org/10.1038/nm.4054>
- Hemann, M. T., & Narita, M. (2007). Oncogenes and senescence: Breaking down in the fast lane. *Genes and Development*, 21(1), 1–5. <https://doi.org/10.1101/gad.1514207>
- Henneicke, H., Herrmann, M., Kalak, R., Brennan-Speranza, T. C., Heinevetter, U., Bertollo, N., ... Zhou, H. (2011). Corticosterone selectively targets endo-cortical surfaces by an osteoblast-dependent mechanism. *Bone*, 49(4), 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.06.013>
- Herbig, U., Jobling, W. a, Chen, B. P. C., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Molecular Cell*, 14(4), 501–513. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00256-4)
- Hermoso, M. A., Matsuguchi, T., Smoak, K., & Cidlowski, J. A. (2004). Glucocorticoids and Tumor Necrosis Factor Alpha Cooperatively Regulate Toll-Like Receptor 2 Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, 24(11), 4743–4756. [https://doi.org/10.1128/MCB.24.11.4743–4756.2004](https://doi.org/10.1128/MCB.24.11.4743-4756.2004)
- Hjoberg, J., Le, L., Imrich, A., Subramaniam, V., Mathew, S. I., Vallone, J., ... Silverman, E. S. (2004). Induction of early growth-response factor 1 by platelet-derived growth factor in human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(4), L817–25. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00190.2003>
- Hofmann, T. G., Hehner, S. P., Bacher, S., Dröge, W., & Schmitz, M. L. (1998). Various glucocorticoids differ in their ability to induce gene expression, apoptosis and to repress NF- κ B-dependent transcription. *FEBS Letters*, 441(3), 441–446.
- Holt, D. J., & Grainger, D. W. (2012). Senescence and quiescence induced compromised function in cultured macrophages. *Biomaterials*, 33(30), 7497–7507. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.06.099>

- Honkaniemi, J., Zhang, J. S., Longo, F. M., & Sharp, F. R. (2000). Stress induces zinc finger immediate early genes in the rat adrenal gland. *Brain Research*, 877(2), 203–208. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02673-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02673-1)
- Houben, R., Ortmann, S., Drasche, A., Troppmair, J., Herold, M. J., & Becker, J. C. (2009). Proliferation arrest in B-Raf mutant melanoma cell lines upon MAPK pathway activation. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(2), 406–414. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.214>
- Hsu, T. C., & Moorhead, P. S. (1957). Mammalian chromosomes in vitro. VII. heteroploidy in human cell strains. *Journal of the National Cancer Institute*, 18(3), 463–471. <https://doi.org/10.1093/jnci/18.3.463>
- Hu, C.-T., Chang, T.-Y., Cheng, C.-C., Liu, C.-S., Wu, J.-R., Li, M.-C., & Wu, W.-S. (2010). Snail associates with EGR-1 and SP-1 to upregulate transcriptional activation of p15INK4b. *The FEBS Journal*, 277(5), 1202–1218. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07553.x>
- Huang, R.-P., Fan, Y., De Belle, I., Niemeyer, C., Gottardis, M. M., Mercola, D., & Adamson, E. D. (1997). Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *International Journal of Cancer*, 72(1), 102–109. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970703\)72:1<102::AID-IJC15>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970703)72:1<102::AID-IJC15>3.0.CO;2-L)
- Hudson, W. H., Youn, C., & Ortlund, E. A. (2013). The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(1), 53–58. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2456>
- Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., ... Wagner, E. F. (2007). p38 α suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nature Genetics*, 39(6), 741–749. <https://doi.org/10.1038/ng2033>
- Hui, P., Perkins, A., & Glusac, E. (2001). Assessment of clonality in melanocytic nevi. *Journal of Cutaneous Pathology*, 28(3), 140–144. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168766>
- Iannetti, A., Ledoux, A. C., Tudhope, S. J., Sellier, H., Zhao, B., Mowla, S., ... Perkins, N. D. (2014). Regulation of p53 and Rb links the alternative NF- κ B pathway to EZH2 expression and cell senescence. *PLoS Genetics*, 10(9), e1004642. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004642>
- Ishikawa, F. (2006). Cellular Senescence as a Stress Response. *Cornea*, 25(December), S3–S6. <https://doi.org/10.1097/O1.icc.0000247206.47897.92>
- Itani, O. a, Liu, K. Z., Cornish, K. L., Campbell, J. R., & Thomas, C. P. (2002). Glucocorticoids stimulate human sgk1 gene expression by activation of a GRE in its 5'-flanking region. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 283(5), E971-9. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00021.2002>
- Iwasa, H., Han, J., & Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells*, 8(2), 131–144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00620.x>
- Jalili, A., Wagner, C., Pashenkov, M., Pathria, G., Mertz, K. D., Widlund, H. R., ... Wagner, S. N. (2012). Dual Suppression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors CDKN2C and CDKN1A in Human Melanoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 104(21), 1673–1679. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs373>
- Jeanblanc, M., Ragu, S., Gey, C., Contrepolis, K., Courbeyrette, R., Thuret, J.-Y., & Mann, C. (2012). Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene*, 31(25), 3072–3085. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.481>
- Jeck, W. R., Siebold, A. P., & Sharpless, N. E. (2012). Review: A meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. *Aging Cell*, 11(5), 727–731. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00871.x>
- Jensen, A. Ø., Thomsen, H. F., Engebjerg, M. C., Olesen, A. B., Friis, S., Karagas, M. R., & Sørensen, H. T. (2009). Use of oral glucocorticoids and risk of skin cancer and non-Hodgkin's lymphoma: a population-based case-control study. *British Journal of Cancer*, 100(1), 200–205. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604796>
- Joel, P. B., Smith, J., Sturgill, T. W., Fisher, T. L., Blenis, J., & Lannigan, D. A. (1998). pp90^{rsk1} Regulates

- Estrogen Receptor-Mediated Transcription through Phosphorylation of Ser-167. *Molecular and Cellular Biology*, 18(4), 1978–1984. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.4.1978>
- Joselow, A., Lynn, D., Terzian, T., & Box, N. F. (2017). Senescence-Like Phenotypes in Human Nevi. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1534(1), 175–184. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6670-7_17
- Jun, J.-I., & Lau, L. F. (2010a). Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging*, 2(9), 627–631. <https://doi.org/10.18632/aging.100201>
- Jun, J.-I., & Lau, L. F. (2010b). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature Cell Biology*, 12(7), 676–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2070>
- Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013, September 1). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>
- Kakavand, H., Crainic, O., Lum, T., O’Toole, S. A., Kefford, R. F., Thompson, J. F., ... Scolyer, R. A. (2014). Concordant BRAFV600E mutation status in primary melanomas and associated naevi: implications for mutation testing of primary melanomas. *Pathology*, 46(3), 193–198. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000077>
- Kang, S., Jung, M., Kim, C. W., & Shin, D. Y. (2005). Inactivation of p38 kinase delays the onset of senescence in rabbit articular chondrocytes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126(5), 591–597. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.11.009>
- Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., ... Zender, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10599>
- Karagas, M. R., Cushing, G. L., Greenberg, E. R., Mott, L. A., Spencer, S. K., Nierenberg, D. W., & Nierenberg, D. W. (2001). Non-melanoma skin cancers and glucocorticoid therapy. *British Journal of Cancer*, 85(5), 683–686. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1931>
- Karim, R. Z., Li, W., Sanki, A., Colman, M. H., Yang, Y. H., Thompson, J. F., & Scolyer, R. A. (2009). Reduced p16 and Increased Cyclin D1 and pRb Expression Are Correlated with Progression in Cutaneous Melanocytic Tumors. *International Journal of Surgical Pathology*, 17(5), 361–367. <https://doi.org/10.1177/1066896909336177>
- Kassel, O., & Herrlich, P. (2007). Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: Molecular aspects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.07.003>
- Kassel, O., Sancono, A., Krätzschar, J., Kreft, B., Stassen, M., & Cato, A. C. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *The EMBO Journal*, 20(24), 7108–7116. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7108>
- Kaufmann, K., & Thiel, G. (2002). Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(2), 381–391. <https://doi.org/10.1002/jcb.10145>
- Keenan, P. A., Jacobson, M. W., Soleymani, R. M., Mayes, M. D., Stress, M. E., & Yaladoo, D. T. (1996). The effect on memory of chronic prednisone treatment in patients with systemic disease. *Neurology*, 47(6), 1396–1402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8960717>
- Khachigian, L. M. Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology, 98 *Circulation Research* § (2006). American Heart Association, Inc. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000200177.53882.c3>
- Kharbanda, S., Nakamura, T., Stone, R., Hass, R., Bernstein, S., Datta, R., ... Kufe, D. (1991). Expression of the early growth response 1 and 2 zinc finger genes during induction of monocytic differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(2), 571–577. <https://doi.org/10.1172/JCI115341>
- Kidger, A. M., Rushworth, L. K., Stellzig, J., Davidson, J., Bryant, C. J., Bayley, C., ... Caunt, C. J. (2017). Dual-specificity phosphatase 5 controls the localized inhibition, propagation, and transforming potential of ERK signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(3), E317–E326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614684114>

- Kim, K.-H., Chen, C.-C., Monzon, R. I., & Lau, L. F. (2013). Matricellular Protein CCN1 Promotes Regression of Liver Fibrosis through Induction of Cellular Senescence in Hepatic Myofibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(10), 2078–2090. <https://doi.org/10.1128/MCB.00049-13>
- Kim, S.-J., Kim, J. M., Shim, S. H., & Chang, H. I. (2014). Shikonin induces cell cycle arrest in human gastric cancer (AGS) by early growth response 1 (Egr1)-mediated p21 gene expression. *Journal of Ethnopharmacology*, *151*(3), 1064–1071. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.055>
- Kirsch, K. H., Korradi, Y., & Johnson, J. P. (1996). Mader: a novel nuclear protein over expressed in human melanomas. *Oncogene*, *12*(5), 963–971. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8649813>
- Kittler, H., Seltenheim, M., Dawid, M., Pehamberger, H., Wolff, K., & Binder, M. (2000). Frequency and Characteristics of Enlarging Common Melanocytic Nevi. *Archives of Dermatology*, *136*(3), 316–320. <https://doi.org/10.1001/archderm.136.3.316>
- Klein, N. C., Go, C. H., & Cunha, B. A. (2001). Infections associated with steroid use. *Infectious Disease Clinics of North America*, *15*(2), 423–32, viii. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11447704>
- Koch, C. A., Doppman, J. L., Patronas, N. J., Nieman, L. K., & Chrousos, G. P. (2000). Do glucocorticoids cause spinal epidural lipomatosis? When endocrinology and spinal surgery meet. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *11*(3), 86–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10707048>
- Kollarovic, G., Studencka, M., Ivanova, L., Lauenstein, C., Heinze, K., Lapytsko, A., ... Schaber, J. (2016). To senesce or not to senesce: how primary human fibroblasts decide their cell fate after DNA damage. *Aging*, *8*(1). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26830321>
- Krimpenfort, P., Quon, K. C., Mooi, W. J., Loonstra, A., & Berns, A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature*, *413*(6851), 83–86. <https://doi.org/10.1038/35092584>
- Krishnamurthy, J., Ramsey, M. R., Ligon, K. L., Torrice, C., Koh, A., Bonner-Weir, S., & Sharpless, N. E. (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, *443*(7110), 453–457. <https://doi.org/10.1038/nature05092>
- Krishnaraju, K., Nguyen, H. Q., Liebermann, D. A., & Hoffman, B. (1995). The zinc finger transcription factor Egr-1 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*, *15*(10), 5499–5507.
- Krizhanovskiy, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., ... Lowe, S. W. (2008). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*, *134*(4), 657–667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>
- Krones-Herzig, A., Adamson, E. D., & Mercola, D. (2003). Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(6), 3233–3238. <https://doi.org/10.1073/pnas.2628034100>
- Krones-Herzig, A., Mittal, S., Yule, K., Liang, H., English, C., Urcis, R., ... Mercola, D. (2005). Early growth response 1 acts as a tumor suppressor in vivo and in vitro via regulation of p53. *Cancer Research*, *65*(12), 5133–5143. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3742>
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(21), 12072–12077. <https://doi.org/10.1073/pnas.211053698>
- Krynitz, B., Edgren, G., Lindelöf, B., Baecklund, E., Brattström, C., Wilczek, H., & Smedby, K. E. (2013). Risk of skin cancer and other malignancies in kidney, liver, heart and lung transplant recipients 1970 to 2008 - A Swedish population-based study. *International Journal of Cancer*, *132*(6), 1429–1438. <https://doi.org/10.1002/ijc.27765>
- Kubosaki, A., Tomaru, Y., Tagami, M., Arner, E., Miura, H., Suzuki, T., ... Hayashizaki, Y. (2009). Genome-wide investigation of in vivo EGR-1 binding sites in monocytic differentiation. *Genome Biology*, *10*(4), R41. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-4-r41>

- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & Development*, 24(22), 2463–2479. <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., ... Peeper, D. S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell*, 133(6), 1019–1031. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Kuilman, T., & Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2560>
- Kumbrink, J., Kirsch, K. H., & Johnson, J. P. (2010). EGR1, EGR2, and EGR3 activate the expression of their coregulator NAB2 establishing a negative feedback loop in cells of neuroectodermal and epithelial origin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(1), 207–217. <https://doi.org/10.1002/jcb.22690>
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 2(20), 3613–3622. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11017877>
- Kuwata, T., Kitagawa, M., & Kasuga, T. (1993). Proliferative activity of primary cutaneous melanocytic tumours. *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology*, 423(5), 359–364. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7906909>
- Laberge, R. M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., ... Campisi, J. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology*, 17(8), 1049–1061. <https://doi.org/10.1038/ncb3195>
- Laberge, R. M., Zhou, L., Sarantos, M. R. M., Rodier, F., Freund, A., de Keizer, P. L. J., ... Campisi, J. (2012). Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell*, 11(4), 569–578. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00818.x.Glucocorticoids>
- Landi, M. T., Baccarelli, A., Calista, D., Fears, T. R., & Landi, G. (2001). Glucocorticoid use and melanoma risk. *International Journal of Cancer*, 94(2), 302–303. <https://doi.org/10.1002/ijc.1468>
- Lazarus, M., & Kaufman, H. (2012). An association between corticosteroid use and melanoma recurrence: A case report and review of the literature. *Medical Oncology*, 29(3), 2018–2020. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0064-0>
- Le Beau, M. M., Albain, K. S., Larson, R. A., Vardiman, J. W., Davis, E. M., Blough, R. R., ... Rowley, J. D. (1986). Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 4(3), 325–345. <https://doi.org/10.1200/JCO.1986.4.3.325>
- Leclerc, J., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2017). Pathways from senescence to melanoma: focus on MITF sumoylation. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.292>
- Leclerc, N., Luppen, C. A., Ho, V. V., Nagpal, S., Hacia, J. G., Smith, E., & Frenkel, B. (2004). Gene expression profiling of glucocorticoid-inhibited osteoblasts. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33(1), 175–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0330175>
- Leclerc, N., Noh, T., Cogan, J., Samarawickrama, D. B., Smith, E., & Frenkel, B. (2008). Opposing effects of glucocorticoids and Wnt signaling on Krox20 and mineral deposition in osteoblast cultures. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(6), 1938–1951. <https://doi.org/10.1002/jcb.21587>
- Leclerc, N., Noh, T., Khokhar, A., Smith, E., & Frenkel, B. (2005). Glucocorticoids inhibit osteocalcin transcription in osteoblasts by suppressing Egr2/Krox20-binding enhancer. *Arthritis and Rheumatism*, 52(3), 929–939. <https://doi.org/10.1002/art.20872>
- Lee, K. H., & Kim, J.-R. (2009). Hepatocyte growth factor induced up-regulations of VEGF through Egr-1 in hepatocellular carcinoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 26(7), 685–692. <https://doi.org/10.1007/s10585-009-9266-7>
- Lee, S. L., Sadovsky, Y., Swirnoch, A. H., Polish, J. A., Goda, P., Gavrilina, G., & Milbrandt, J. (1996). Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science (New York, N.Y.)*, 273(5279), 1219–1221.

<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.273.5279.1219>

- Lee, S. R., Kim, H. K., Youm, J. B., Dizon, L. A., Song, I. S., Jeong, S. H., ... Han, J. (2012). Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, *464*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1155-2>
- Lefloch, R., Pouysségur, J., & Lenormand, P. (2008). Single and Combined Silencing of ERK1 and ERK2 Reveals Their Positive Contribution to Growth Signaling Depending on Their Expression Levels. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(1), 511–527. <https://doi.org/10.1128/MCB.00800-07>
- Lehmann, M., Korfei, M., Mutze, K., Klee, S., Skronska-Wasek, W., Alsafadi, H. N., ... Königshoff, M. (2017). Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo. *European Respiratory Journal*, *50*(2), 1602367. <https://doi.org/10.1183/13993003.02367-2016>
- Leontieva, O. V., & Blagosklonny, M. V. (2010). DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR is associated with conversion to senescence. *Aging*, *2*(12), 924–935. <https://doi.org/10.1093/ajplung.00194.2006> [pii]
- Lewis, D. A., Yi, Q., Travers, J. B., & Spandau, D. F. (2008). UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(4), 1346–1353. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-10-1041>
- Li, C.-J., Ning, W., Matthay, M. A., Feghali-Bostwick, C., & Choi, A. M. K. (2007). MAPK pathway mediates EGR-1-HSP70-dependent cigarette smoke-induced chemokine production. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *292*(5), L1297-303. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00194.2006>
- Li, C.-L., Yang, D., Cao, X., Wang, F., Hong, D.-Y., Wang, J., ... Chen, Y. (2017). Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain. *Oncology Letters*, *13*(5), 3889–3895. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5896>
- Li, H., Qian, W., Weng, X., Wu, Z., Li, H., Zhuang, Q., ... Bian, Y. (2012). Glucocorticoid receptor and sequential P53 activation by Dexamethasone mediates apoptosis and cell cycle arrest of Osteoblastic MC3T3-E1 cells. *PLoS ONE*, *7*(6), e37030. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037030>
- Li, J., Han, S., Cousin, W., & Conboy, I. M. (2014). Age-specific functional epigenetic changes in p21 and p16 in injury-activated satellite cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 1–16. <https://doi.org/10.1002/stem.1908>
- Li, S., Mawal-Dewan, M., Cristofalo, V. J., & Sell, C. (1998). Enhanced proliferation of human fibroblasts, in the presence of dexamethasone, is accompanied by changes in p21(Waf1/Cip1/Sdi1) and the insulin-like growth factor type 1 receptor. *Journal of Cellular Physiology*, *177*(February), 396–401. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199812\)177:3<396::AID-JCP3>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199812)177:3<396::AID-JCP3>3.0.CO;2-K)
- Lin, A. W., Barradas, M., Stone, J. C., Van Aelst, L., Serrano, M., & Lowe, S. W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes and Development*, *12*(19), 3008–3019. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.3008>
- Lin, W. M., Luo, S., Muzikansky, A., Lobo, A. Z. C., Tanabe, K. K., Sober, A. J., ... Duncan, L. M. (2015). Outcome of patients with de novo versus nevus-associated melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *72*(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.09.028>
- Liu, C., Rangnekar, V. M., Adamson, E. D., & Mercola, D. (1998). Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Therapy*, *5*(1), 3–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476963>
- Liu, C., Yao, J., Mercola, D., & Adamson, E. D. (2000). The transcription factor EGR-1 directly transactivates the fibronectin gene and enhances attachment of human glioblastoma cell line U251. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(27), 20315–20323. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909046199>
- Liu, J., Grogan, L., Nau, M. M., Allegra, C. J., Chu, E., & Wright, J. J. (2001). Physical interaction between p53 and primary response gene Egr-1. *International Journal of Oncology*, *18*(4), 863–870.
- Lohoff, M., Giaisi, M., Köhler, R., Casper, B., Krammer, P. H., & Li-Weber, M. (2010). Early growth response protein-1 (Egr-1) is preferentially expressed in T helper type 2 (Th2) cells and is involved

- in acute transcription of the Th2 cytokine interleukin-4. *Journal of Biological Chemistry*, 285(3), 1643–1652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011585>
- Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2007). Nuclear Receptor Coregulators: Judges, Juries, and Executioners of Cellular Regulation. *Molecular Cell*, 27(5), 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.012>
- Louw-du Toit, R., Hapgood, J. P., & Africander, D. (2014). Medroxyprogesterone Acetate Differentially Regulates Interleukin (IL)-12 and IL-10 in a Human Ectocervical Epithelial Cell Line in a Glucocorticoid Receptor (GR)-dependent Manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31136–31149. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.587311>
- Ma, J., Ren, Z., Ma, Y., Xu, L., Zhao, Y., Zheng, C., ... Xiao, W. (2009). Targeted knockdown of EGR-1 inhibits IL-8 production and IL-8-mediated invasion of prostate cancer cells through suppressing EGR-1/NF- κ B synergy. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34600–34606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016246>
- Mackie, R. M., English, J., Aitchison, T. C., Fitzsimons, C. P., & Wilson, P. (1985). The number and distribution of benign pigmented moles (melanocytic naevi) in a healthy British population. *British Journal of Dermatology*, 113(2), 167–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1985.tb02060.x>
- Maelandsmo, G. M., Holm, R., Fodstad, O., Kerbel, R. S., Flørenes, V. A., & Florenes, V. a. (1996). Cyclin kinase inhibitor p21 in malignant melanoma: Reduced expression in metastatic lesions. *American Journal of Pathology*, 149(6), 1813–1822. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4345>
- Malaquin, N., Martinez, A., & Rodier, F. (2016). Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Experimental Gerontology*, 82, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.05.010>
- Malkoski, S. P., & Dorin, R. I. (1999). Composite Glucocorticoid Regulation at a Functionally Defined Negative Glucocorticoid Response Element of the Human Corticotropin-Releasing Hormone Gene. *Molecular Endocrinology*, 13(10), 1629–1644. <https://doi.org/10.1210/mend.13.10.0351>
- Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F., & Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes and Development*, 21(1), 43–48. <https://doi.org/10.1101/gad.1487307>
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., ... Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83, 835–839. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90199-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-X)
- Manwani, N., Gagnon, S., Post, M., Joza, S., Muglia, L., Cornejo, S., ... Sweezey, N. B. (2010). Reduced viability of mice with lung epithelial-specific knockout of glucocorticoid receptor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 43(5), 599–606. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0263OC>
- Marais, R., Light, Y., Fpaterson, H., & Marshall, C. J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal*, 14(13), 3136–3145. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542586>
- Marcotte, R., Lacelle, C., & Wang, E. (2004). Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(10–11), 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.007>
- Marshall, C. J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4(1), 82–89. [https://doi.org/10.1016/0959-437X\(94\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0959-437X(94)90095-7)
- Mason, D. X., Jackson, T. J., & Lin, A. W. (2004). Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene*, 23(57), 9238–9246. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208172>
- Mawal-Dewan, M., Frisoni, L., Cristofalo, V. J., & Sell, C. (2003). Extension of replicative lifespan in WI-38 human fibroblasts by dexamethasone treatment is accompanied by suppression of p21Waf1/Cip1/Sdi1 levels. *Experimental Cell Research*, 285(1), 91–98. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00013-2)
- Mazzantini, M., & Di Munno, O. (2014). Glucocorticoid-induced osteoporosis: 2013 update. *Reumatismo*, 66(2), 144. <https://doi.org/10.4081/reumatismo.2014.787>

- McNeal, A. S., Liu, K., Nakhate, V., Natale, C. a., Duperret, E. K., Capell, B. C., ... Ridky, T. W. (2015). CDKN2B loss promotes progression from benign melanocytic nevus to melanoma. *Cancer Discovery*, 5(10), 1072–1085. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0196>
- Meijsing, S. H., Pufall, M. A., So, A. Y., Bates, D. L., Chen, L., & Yamamoto, K. R. (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science*, 324(5925), 407–410. <https://doi.org/10.1126/science.1164265>
- Melk, A., Kittikowit, W., Sandhu, I., Halloran, K. M., Grimm, P., Schmidt, B. M. W. W., & Halloran, P. F. (2003). Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney International*, 63(6), 2134–2143. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00032.x>
- Melk, A., Schmidt, B. M. W. W., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D. C., & Halloran, P. F. (2004). Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney International*, 65(2), 510–520. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00438.x>
- Meloche, S., & Pouyssegur, J. (2007, May 14). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210414>
- Menzies, S. W., Stevenson, M. L., Altamura, D., & Byth, K. (2011). Variables Predicting Change in Benign Melanocytic Nevi Undergoing Short-term Dermoscopic Imaging. *Archives of Dermatology*, 147(6), 655. <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2011.133>
- Meyyappan, M., Wheaton, K., & Riabowol, K. T. (1999). Decreased expression and activity of the immediate-early growth response (Egr-1) gene product during cellular senescence. *Journal of Cellular Physiology*, 179(1), 29–39. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199904\)179:1<29::AID-JCP4>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199904)179:1<29::AID-JCP4>3.0.CO;2-D)
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M. A. M., ... Peeper, D. S. (2005). BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436(7051), 720–724. <https://doi.org/10.1038/nature03890>
- Midgley, V. C., & Khachigian, L. M. (2004). Fibroblast growth factor-2 induction of platelet-derived growth factor-C chain transcription in vascular smooth muscle cells is ERK-dependent but not JNK-dependent and mediated by Egr-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40289–40295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406063200>
- Milbrandt, J. (1987). A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4828), 797–799. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.3672127>
- Miller, A. J., & Mihm, M. C. (2006). Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 355(1), 51–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052166>
- Miller, D. M., & Flaherty, K. T. (2014). Cyclin-dependent kinases as therapeutic targets in melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 27(3), 351–365. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12211>
- Mire, L., Hollowood, K., Gray, D., Bordea, C., & Wojnarowska, F. (2006). Melanomas in renal transplant recipients. *British Journal of Dermatology*, 154(3), 472–477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.07094.x>
- Mitchell, A., Dass, C. R., Sun, L.-Q., & Khachigian, L. M. (2004). Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNAzymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1. *Nucleic Acids Research*, 32(10), 3065–3069. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh626>
- Mittelstadt, P. R., & Ashwell, J. D. (2001). Inhibition of AP-1 by the Glucocorticoid-inducible Protein GILZ. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29603–29610. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101522200>
- Moghadam-Kia, S., & Werth, V. P. (2010). Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects. *International Journal of Dermatology*, 49(3), 239–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04322.x>
- Moiseeva, O., Mallette, F. A., Mukhopadhyay, U. K., Moores, A., & Ferbeyre, G. (2006). DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged beta-interferon stimulation. *Molecular*

- Biology of the Cell*, 17(4), 1583–1592. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-09-0858>
- Mooi, W. J., & Krausz, T. (1992). Common acquired melanocytic naevi. In *Biopsy Pathology of Melanocytic Disorders* (pp. 56–105). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-6908-8_4
- Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2002, October 1). Pathogenesis of melanocytic naevi: growth arrest linked with cellular senescence? *Histopathology*. Histopathology. Retrieved from <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:sE9mRbJTA24J:https://exploreovid-dev.azurewebsites.net/histopathology/histo/2002/10/001/pathogenesis-melanocytic-naevi-growth-arrest/44/00004124+&cd=3&hl=fr&ct=clnk&gl=fr&client=firefox-b>
- Mora, G. R., Olivier, K. R., Cheville, J. C., Mitchell, R. F. . J., Lingle, W. L., & Tindall, D. J. (2004). The cytoskeleton differentially localizes the early growth response gene-1 protein in cancer and benign cells of the prostate. *Molecular Cancer Research*, 2(2), 115–128. Retrieved from <http://mcr.aacrjournals.org/content/2/2/115.long>
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., ... Serrano, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104–1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>
- Muthukkumar, S., Nair, P., Sells, S. F., Maddiwar, N. G., Jacob, R. J., & Rangnekar, V. M. (1995). Role of EGR-1 in thapsigargin-inducible apoptosis in the melanoma cell line A375-C6. *Mol. Cell Biol.*, 15(0270–7306 (Print)), 6262–6272. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.11.6262>
- Muthusamy, A. S. R., Mumford, L., Hudson, A., Fuggle, S. V., & Friend, P. J. (2012). Pancreas Transplantation From Donors After Circulatory Death From the United Kingdom. *American Journal of Transplantation*, 12(8), 2150–2156. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2012.04075.x>
- Nair, P., Muthukkumar, S., Sells, S. F., Han, S. S., Sukhatme, V. P., & Rangnekar, V. M. (1997). Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 20131–20138. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.20131>
- Nakhoul, H., Ke, J., Zhou, X., Liao, W., Zeng, S. X., & Lu, H. (2014). Ribosomopathies: Mechanisms of Disease. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 7, CMBD.S16952. <https://doi.org/10.4137/CMBD.S16952>
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., ... Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
- Newton Bishop, J. A., Wachsmuth, R. C., Harland, M., Bataille, V., Pinney, E., Mack, P., ... Bishop, D. T. (2000). Genotype/phenotype and penetrance studies in melanoma families with germline CDKN2A mutations. *Journal of Investigative Dermatology*, 114(1), 28–33. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00823.x>
- Newton, R. (2000). Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*, (D), 603–613. Retrieved from <http://thorax.bmj.com/content/55/7/603.short>
- Noren Hooten, N., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., Ejiogu, N., Zonderman, A. B., & Evans, M. K. (2010). microRNA expression patterns reveal differential expression of target genes with age. *PLoS ONE*, 5(5), e10724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010724>
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: New mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3177–3184. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.179325>
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5), 1033–1044. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>
- Olivieri, F., Rippo, M. R., Monsurrò, V., Salvioli, S., Capri, M., Procopio, A. D., & Franceschi, C. (2013). MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Research Reviews*, 12(4), 1056–1068. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.05.001>

- Oubaha, M., Miloudi, K., Dejda, A., Guber, V., Mawambo, G., Germain, M.-A., ... Sapieha, P. (2016). Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological angiogenesis in retinopathy. *Science Translational Medicine*, 8(362), 362ra144-362ra144. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9440>
- Pagel, J.-I., & Deindl, E. (2011). Early growth response 1--a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 48(4), 226–235. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053691>
- Parra, E., Gutiérrez, L., & Ferreira, J. (2013). Increased expression of p21Waf1/Cip1 and JNK with costimulation of prostate cancer cell activation by an siRNA Egr-1 inhibitor. *Oncology Reports*, 30(2), 911–916. Retrieved from <http://www.spandidos-publications.com/or/30/2/911/abstract>
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., & Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature Cell Biology*, 5(8), 741–747. <https://doi.org/10.1038/ncb1024>
- Patton, E. E., Widlund, H. R., Kutok, J. L., Kopani, K. R., Amatruda, J. F., Murphey, R. D., ... Zon, L. I. (2005). BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Current Biology*, 15(3), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.031>
- Pazolli, E., Luo, X., Brehm, S., Carbery, K., Chung, J. J., Prior, J. L., ... Stewart, S. A. (2009). Senescent stromal-derived osteopontin promotes preneoplastic cell growth. *Cancer Research*, 69(3), 1230–1239. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2970>
- Pedersen, M., Viros, A., Cook, M., & Marais, R. (2014, November 1). G12DNRAS and kinase-dead BRAF cooperate to drive naevogenesis and melanomagenesis. *Pigment Cell and Melanoma Research*. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12293>
- Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P., & Fallowfield, J. A. (2014). Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 181–194. <https://doi.org/10.1038/nri3623>
- Pende, M., Fisher, T. L., Simpson, P. B., Russell, J. T., Blenis, J., & Gallo, V. (1997). Neurotransmitter- and growth factor-induced cAMP response element binding protein phosphorylation in glial cell progenitors: role of calcium ions, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 kinase pathway. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(4), 1291–1301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006973>
- Peyssonnaud, C., & Eychène, A. (2001). The Raf / MEK / ERK pathway : new concepts of activation. *Biology of the Cell*, 93(1–2), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(01\)01125-X](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(01)01125-X)
- Pimenta, E., Wolley, M., & Stowasser, M. (2012). Adverse cardiovascular outcomes of corticosteroid excess. *Endocrinology*, 153(11), 5137–5142. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1573>
- Piris, A., Mihm, M. C., & Hoang, M. P. (2015). BAP1 and BRAFV600E expression in benign and malignant melanocytic proliferations. *Human Pathology*, 46(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.10.015>
- Place, R. F., Noonan, E. J., & Giardina, C. (2005). HDAC inhibition prevents NF- κ B activation by suppressing proteasome activity: Down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I κ B β . *Biochemical Pharmacology*, 70(3), 394–406. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.030>
- Poirier, R., Cheval, H., Mailhes, C., Garel, S., Charnay, P., Davis, S., & Laroche, S. (2008). Distinct functions of egr gene family members in cognitive processes. *Frontiers in Neuroscience*, 2(1), 47–55. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.002.2008>
- Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., ... Meltzer, P. S. (2002). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics*, 33(1), 19–20. <https://doi.org/10.1038/ng1054>
- Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., & Marchand, C. (2010, May 28). DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry and Biology*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.04.012>
- Popov, N., & Gil, J. (2010). Epigenetic regulation of the INK4B-ARF-INK4a locus: In sickness and in

- health. *Epigenetics*, 5(8), 685–690. <https://doi.org/10.4161/epi.5.8.12996>
- Poulsen, R. C., Watts, A. C., Murphy, R. J., Snelling, S. J., Carr, A. J., & Hulley, P. A. (2014). Glucocorticoids induce senescence in primary human tenocytes by inhibition of sirtuin 1 and activation of the p53/p21 pathway: In vivo and in vitro evidence. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(7), 1405–1413. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-203146>
- Poynter, J. N., Elder, J. T., Fullen, D. R., Nair, R. P., Soengas, M. S., Johnson, T. M., ... Gruber, S. B. (2006). BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Research*, 16(4), 267–273. <https://doi.org/10.1097/01.cmr.0000222600.73179.f3>
- Price, C. M. (2012). Telomere flip-flop: An unfolding passage to senescence. *EMBO Reports*, 13(1), 5–6. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.237>
- Ramalingam, A., Hirai, A., & Thompson, E. A. (1997). Glucocorticoid inhibition of fibroblast proliferation and regulation of the cyclin kinase inhibitor p21Cip1. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 11(5), 577–586. <https://doi.org/10.1210/mend.11.5.9923>
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007, May 14). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210392>
- Rayess, H., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 130(8), 1715–1725. <https://doi.org/10.1002/ijc.27316>
- Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P. M., & Mirkin, B. L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*, 22(18), 2805–2811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206366>
- Reddy, J. P., & Li, Y. (2011). Oncogene-induced senescence and its role in tumor suppression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(3), 247–256. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9221-5>
- Reimann, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Dörr, J. R., Tabor, V., Aichele, P., ... Schmitt, C. A. (2010). Tumor Stroma-Derived TGF- β Limits Myc-Driven Lymphomagenesis via Suv39h1-Dependent Senescence. *Cancer Cell*, 17(3), 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.043>
- Revest, J.-M., Di Blasi, F., Kitchener, P., Rougé-Pont, F., Desmedt, A., Turiault, M., ... Piazza, P. V. (2005). The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids. *Nature Neuroscience*, 8(5), 664–672. <https://doi.org/10.1038/nn1441>
- Revest, J.-M., Kaouane, N., Mondin, M., Le Roux, A., Rougé-Pont, F., Vallée, M., ... Piazza, P. V. (2010). Glucocorticoid treatment induces expression of Egr-1 and synapsin-I proteins in primary culture of hippocampal neurons. *Molecular Psychiatry*, 15(12), 1125. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.118>
- Revollo, J., & Cidlowski, J. A. (2009). Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Annals of the New York Academy of ...*, 1179, 167–178. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04986.x>
- Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, 1711–1723. Retrieved from <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra050541>
- Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M. C., Morton, J. P., ... Keyes, W. M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes and Development*, 31(2), 172–183. <https://doi.org/10.1101/gad.290635.116>
- Rizzoli, R., & Biver, E. (2015, February 11). Glucocorticoid-induced osteoporosis: Who to treat with what agent? *Nature Reviews Rheumatology*. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.188>
- Roberts, D., Brown, J., Medley, N., & Dalziel, S. R. (2017, March 21). Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. (D. Roberts, Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004454.pub3>
- Robinson, M. J., & Cobb, M. H. (1997, April). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80061-0)
- Robinson, W. A., Lemon, M., Elefanta, A., Harrison-Smith, M., Markham, N., & Norris, D. (1998). Human

- acquired naevi are clonal. *Melanoma Research*, 8(6), 499–503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9918411>
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011, February 21). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Rodier, F., Coppe, J.-P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R., ... Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*, 11(8), 973–979. <https://doi.org/10.1038/ncb1909>
- Rodier, F., Munoz, D. P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., ... Campisi, J. (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of Cell Science*, 124(1), 68–81. <https://doi.org/10.1242/jcs.071340>
- Roh, M. R., Eliades, P., Gupta, S., & Tsao, H. (2015). Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28(6), 661–672. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12412>
- Roninson, I. B. (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Research*, 63(11), 2705–2715. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.03.017>
- Rose, A. J., Vegiopoulos, A., & Herzig, S. (2010). Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: Insights from genetic manipulations. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1–3), 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.02.010>
- Rosner, B., & Cristofalo, V. J. (1979). Hydrocortisone: a specific modulator of in vitro proliferation and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 9, 485–496. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0047637479900897>
- Rössler, O. G., & Thiel, G. (2009). Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca²⁺ concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-40>
- Russo, M. W., Severson, B. R., & Milbrandt, J. (1995). Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15), 6873–6877. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.6873>
- Ryu, S. J., Oh, Y. S., & Park, S. C. (2007). Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death and Differentiation*, 14(5), 1020. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402091>
- Sage, J., Mulligan, G. J., Attardi, L. D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., ... Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G1 control and immortalization. *Genes and Development*, 14(23), 3037–3050. <https://doi.org/10.1101/gad.843200>
- Salah, Z., Maoz, M., Pizov, G., & Bar-Shavit, R. (2007). Transcriptional regulation of human protease-activated receptor 1: a role for the early growth response-1 protein in prostate cancer. *Cancer Research*, 67(20), 9835–9843. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1886>
- Salotti, J., Sakchaisri, K., Tourtellotte, W. G., & Johnson, P. F. (2015). An Arf-Egr-C/EBP β Pathway Linked to Ras-Induced Senescence and Cancer. *Molecular and Cellular Biology*, 35(5), 866–883. <https://doi.org/10.1128/MCB.01489-14>
- Sanchis, A., Alba, L., Latorre, V., Sevilla, L. M., & Pérez, P. (2012). Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing. *PLoS ONE*, 7(1), e29701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029701>
- Sanchis, A., Bayo, P., Sevilla, L. M., & Pérez, P. (2010). Glucocorticoid receptor antagonizes EGFR function to regulate eyelid development. *The International Journal of Developmental Biology*, 54(10), 1473–1480. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103071as>
- Sauer, L., Gitenay, D., Vo, C., & Baron, V. (2010). Mutant p53 initiates a feedback loop that involves Egr-1/EGF receptor/ERK in prostate cancer cells. *Oncogene*, 29(18), 2628–2637. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.24.Mutant>
- Schafer, M. J., White, T. A., Iijima, K., Haak, A. J., Ligresti, G., Atkinson, E. J., ... LeBrasseur, N. K. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nature Communications*, 8, 14532. <https://doi.org/10.1038/ncomms14532>
- Schaffer, J. V. (2015). Update on melanocytic nevi in children. *Clinics in Dermatology*, 33(3), 368–386.

<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.12.015>

- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Möhle-Steinlein, U., Tian, J., ... Wagner, E. F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes and Development*, *13*(5), 607–619. <https://doi.org/10.1101/gad.13.5.607>
- Seibel, M. J., Cooper, M. S., & Zhou, H. (2013, September). Glucocorticoid-induced osteoporosis: Mechanisms, management, and future perspectives. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70045-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70045-7)
- Sells, S. F., Muthukkumar, S., Sukhatme, V. P., Crist, S. a, & Rangnekar, V. M. (1995). The zinc finger transcription factor EGR-1 impedes interleukin-1-inducible tumor growth arrest. *Molecular and Cellular Biology*, *15*(2), 682–692. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=231931&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. H., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell*, *88*(5), 593–602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- Sevetson, B. R., Svaren, J., & Milbrandt, J. (2000). A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(13), 9749–9757. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.13.9749>
- Sevilla, L. M., Latorre, V., Sanchis, A., & Pérez, P. (2013). Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation. *Journal of Investigative Dermatology*, *133*(2), 361–370. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.281>
- Seyfert, V. L., McMahan, S. B., Glenn, W. D., Yellen, A. J., Sukhatme, V. P., Cao, X. M., & Monroe, J. G. (1990). Methylation of an immediate-early inducible gene as a mechanism for B cell tolerance induction. *Science (New York, N.Y.)*, *250*(4982), 797–800. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2237429>
- Seyfert, V. L., Sukhatme, V. P., & Monroe, J. G. (1989). Differential expression of a zinc finger-encoding gene in response to positive versus negative signaling through receptor immunoglobulin in murine B lymphocytes. *Molecular and Cellular Biology*, *9*(5), 2083–2088. <https://doi.org/10.1128/MCB.9.5.2083>
- Shah, S., King, E. M., Chandrasekhar, A., & Newton, R. (2014). Roles for the mitogen-Activated protein kinase (MAPK) phosphatase, DUSP1, in feedback control of inflammatory gene expression and repression by dexamethasone. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(19), 13667–13679. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540799>
- Shain, A. H., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*, *16*(6), 345–358. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>
- Shain, A. H., Yeh, I., Kovalyshyn, I., Sriharan, A., Talevich, E., Gagnon, A., ... Bastian, B. C. (2015). The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *New England Journal of Medicine*, *373*(20), 1926–1936. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502583>
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, *15*(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/nrc3960>
- Sheppard, K. E., Pearson, R. B., & Hannan, R. D. (2015). Unexpected role of CDK4 in a G2/M checkpoint. *Cell Cycle*, *14*(9), 1351–1352. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1022060>
- Sherr, C. J., & DePinho, R. A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*, *102*(4), 407–410. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00046-5)
- Shin, J., Yang, J., Lee, J. C., & Baek, K. H. (2013). Depletion of ERK2 but not ERK1 abrogates oncogenic Ras-induced senescence. *Cellular Signalling*, *25*(12), 2540–2547. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.08.014>
- Shin, S., Dimitri, C. A., Yoon, S. O., Dowdle, W., & Blenis, J. (2010). ERK2 but Not ERK1 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transformation via DEF Motif-Dependent Signaling Events. *Molecular Cell*, *38*(1), 114–127. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.020>
- Shin, S. Y., Bahk, Y. Y., Ko, J., Chung, I.-Y., Lee, Y. S., Downward, J., ... Lee, Y. H. (2006). Suppression of Egr-1 transcription through targeting of the serum response factor by oncogenic H-Ras. *The*

- EMBO Journal*, 25(5), 1093–1103. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600987>
- Shin, S. Y., Kim, C. G., Kim, S. H., Kim, Y. S., Lim, Y., & Lee, Y. H. (2010). Chlorpromazine activates p21Waf1/Cip1 gene transcription via early growth response-1 (Egr-1) in C6 glioma cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 42(5), 395–405. <https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.5.041>
- Shitara, D., Nascimento, M. M., Puig, S., Yamada, S., Enokihara, M. M. S. S., Michalany, N., & Bagatin, E. (2014). Nevus-Associated Melanomas: Clinicopathologic Features. *American Journal of Clinical Pathology*, 142(4), 485–491. <https://doi.org/10.1309/AJCP4L5CJGKTJVDD>
- Shitara, D., Tell-Martí, G., Badenas, C., Enokihara, M. M. S. S., Alós, L., Larque, A. B., ... Bagatin, E. (2015). Mutational status of naevus-associated melanomas. *British Journal of Dermatology*, 173(3), 671–680. <https://doi.org/10.1111/bjd.13829>
- Smith, L. K., & Cidlowski, J. A. (2010). *Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. Progress in brain research* (Vol. 182). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)82001-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)82001-1)
- Smoak, K., & Cidlowski, J. A. (2006). Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 26(23), 9126–9135. <https://doi.org/10.1128/MCB.00679-06>
- Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D., & Paya, C. V. (2002). RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1405–1418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109619200>
- Sone, H., & Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia*, 48(1), 58–67. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1605-2>
- Spaapen, F., van den Akker, G. G. H., Caron, M. M. J., Prickaerts, P., Rofel, C., Dahlmans, V. E. H., ... Voncken, J. W. (2013). The Immediate Early Gene Product EGR1 and Polycomb Group Proteins Interact in Epigenetic Programming during Chondrogenesis. *PLoS ONE*, 8(3), e58083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058083>
- Srinivasan, R., Mager, G. M., Ward, R. M., Mayer, J., & Svaren, J. (2006). NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(22), 15129–15137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600775200>
- Stegmaier, o. c. (1959). Natural regression of the melanocytic nevus. *The Journal of Investigative Dermatology*, 32(3), 413–421. <https://doi.org/10.1038/jid.1959.70>
- Stellato, C. (2012). Posttranscriptional Gene Regulation: Novel Pathways for Glucocorticoids' Anti-inflammatory Action. *Translational Medicine @ UniSa*, 3, 67–73. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3728791&tool=pmcentrez&render_type=abstract
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., ... Keyes, W. M. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 155(5), 1119–1130. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>
- Sturgill, T. W., Ray, L. B., Erikson, E., & Maller, J. L. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, 334(6184), 715–718. <https://doi.org/10.1038/334715a0>
- Sturmlechner, I., Durik, M., Sieben, C. J., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2017). Cellular senescence in renal ageing and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 13(2), 77–89. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.183>
- Sukhatme, V. P. (1990). Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 1(6), 859–866. <https://doi.org/10.1046-667310106-0859>
- Sukhatme, V. P., Cao, X., Chang, L. C., Tsai-Morris, C.-H. H., Stamenkovich, D., Ferreira, P. C. P., ... Adamson, E. D. (1988). A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell*, 53(1), 37–43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90485-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90485-0)

- Sundahl, N., Bridelance, J., Libert, C., De Bosscher, K., & Beck, I. M. (2015). Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacology & Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.001>
- Surjit, M., Ganti, K. P., Mukherji, A., Ye, T., Hua, G., Metzger, D., ... Chambon, P. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*, *145*(2), 224–241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.027>
- Suva, L. J., Ernst, M., & Rodan, G. A. (1991). Retinoic Acid Increases zif268 Early Gene Expression in Rat Preosteoblastic Cells. *Mol Cell Biol*, *11*(5), 2503–2510. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1708092>
- Svaren, J., Sevetson, B. R., Apel, E. D., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., & Milbrandt, J. (1996). NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(7), 3545–3553. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.7.3545>
- Svaren, J., Sevetson, B. R., Golda, T., Stanton, J. J., Swirnoff, A. H., & Milbrandt, J. (1998). Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by Egr transactivators. *The EMBO Journal*, *17*(20), 6010–6019. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.6010>
- Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., ... Imai, K. (2000). p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *The EMBO Journal*, *19*(23), 6517–6526. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6517>
- Talve, L., Sauroja, I., Collan, Y., Punnonen, K., & Ekfors, T. (1997). Loss of expression of the p16(INK4)/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *International Journal of Cancer*, *74*(3), 255–259. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970620\)74:3<255::AID-IJC4>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970620)74:3<255::AID-IJC4>3.0.CO;2-Y)
- Thiel, G., & Cibelli, G. (2002). Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *Journal of Cellular Physiology*, *193*(3), 287–292. <https://doi.org/10.1002/jcp.10178>
- Thigpen, A. E., Cala, K. M., Guileyardo, J. M., Molberg, K. H., McConnell, J. D., & Russell, D. W. (1996). Increased Expression of Early Growth Response-1 Messenger Ribonucleic Acid in Prostatic Adenocarcinoma. *The Journal of Urology*, *155*(3), 975–981. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)66361-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)66361-4)
- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Trembleau, A., Gourdji, D., Driancourt, M.-A., ... Charnay, P. (1998). Multiple Pituitary and Ovarian Defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-Targeted Mice. *Molecular Endocrinology*, *12*(1), 107–122. <https://doi.org/10.1210/mend.12.1.0049>
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current Opinion in Cell Biology*, *8*(2), 205–215. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(96\)80067-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(96)80067-6)
- Troche, J. R., Ferrucci, L. M., Cartmel, B., Leffell, D. J., Bale, A. E., & Mayne, S. T. (2014). Systemic glucocorticoid use and early-onset basal cell carcinoma. *Annals of Epidemiology*, *24*(8), 625–627. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2014.05.009>
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P. C., ... Schütz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nature Genetics*, *23*(1), 99–103. <https://doi.org/10.1038/12703>
- Trougakos, I. P., Saridakis, A., Panayotou, G., & Gonos, E. S. (2006). Identification of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*, *127*(1), 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.08.009>
- Tschandl, P., Berghoff, A. S., Preusser, M., Burgstaller-Muehlbacher, S., Pehamberger, H., Okamoto, I., & Kittler, H. (2013). NRAS and BRAF Mutations in Melanoma-Associated Nevi and Uninvolved Nevi. *PLoS ONE*, *8*(7), e69639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069639>
- Tyan, S. W., Tsai, M. C., Lin, C. L., Ma, Y. L., & Lee, E. H. Y. (2008). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 enhances zif268 expression through the mediation of SRF and CREB1 associated with spatial memory formation. *Journal of Neurochemistry*, *105*(3), 820–832. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05186.x>
- Uryga, A. K., & Bennett, M. R. (2016). Ageing induced vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *The Journal of Physiology*, *594*(8), 2115–2124. <https://doi.org/10.1113/JP270923>

- van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, *509*(7501), 439–446. <https://doi.org/10.1038/nature13193>
- Varnum, B. C., Lim, R. W., Kujubu, D. A., Luner, S. J., Kaufman, S. E., Greenberger, J. S., ... Herschman, H. R. (1989). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tetradecanoyl phorbol acetate induce a distinct, restricted subset of primary-response TIS genes in both proliferating and terminally differentiated myeloid cells. *Molecular and Cellular Biology*, *9*(8), 3580–3583. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2677677>
- Vilasco, M., Communal, L., Mourra, N., Courtin, A., Forgez, P., & Gompel, A. (2011). Glucocorticoid receptor and breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *130*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1689-6>
- Voisin, L., Saba-El-Leil, M. K., Julien, C., Fremin, C., & Meloche, S. (2010). Genetic Demonstration of a Redundant Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1) and ERK2 Mitogen-Activated Protein Kinases in Promoting Fibroblast Proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(12), 2918–2932. <https://doi.org/10.1128/MCB.00131-10>
- von der Kammer, H., Mayhaus, M., Albrecht, C., Enderich, J., Wegner, M., & Nitsch, R. M. (1998). Muscarinic acetylcholine receptors activate expression of the EGR gene family of transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(23), 14538–14544. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.23.14538>
- Von Scheven, E., Corbin, K. J., Stefano, S., & Cimaz, R. (2014, September 8). Glucocorticoid-associated osteoporosis in chronic inflammatory diseases: Epidemiology, mechanisms, diagnosis, and treatment. *Current Osteoporosis Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0228-x>
- Voutsadakis, I. A., & Cairoli, A. (2012). A critical review of the molecular pathophysiology of lenalidomide sensitivity in 5q – myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma*, *53*(5), 779–788. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.623255>
- Vredeveld, L. C. W., Possik, P. A., Smit, M. A., Meissl, K., Michaloglou, C., Horlings, H. M., ... Peeper, D. S. (2012). Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes & Development*, *26*(10), 1055–1069. <https://doi.org/10.1101/gad.187252.112>
- Wada, T., Joza, N., Cheng, H. M., Sasaki, T., Koziaradzki, I., Bachmaier, K., ... Penninger, J. M. (2004). MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nature Cell Biology*, *6*(3), 12–226. <https://doi.org/10.1038/ncb1098>
- Wada, T., & Penninger, J. M. (2004). Stress kinase MKK7: Savior of cell cycle arrest and cellular senescence. *Cell Cycle*, *3*(5), 577–579. <https://doi.org/888> [pii]
- Wada, T., Stepniak, E., Hui, L., Leibbrandt, A., Katada, T., Nishina, H., ... Penninger, J. M. (2008). Antagonistic control of cell fates by JNK and p38-MAPK signaling. *Cell Death and Differentiation*, *15*(1), 89–93. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402222>
- Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M., & Green, M. R. (2008). Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell*, *132*(3), 363–374. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.032>
- Wang, E. (1995). Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to Suppress bell Is Involved. *Cancer Research*, *55*(11), 2284–2292. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7757977>
- Wang, J.-C., Derynck, M. K., Nonaka, D. F., Khodabakhsh, D. B., Haqq, C., & Yamamoto, K. R. (2004). From The Cover: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(44), 15603–15608. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407008101>
- Wang, W., Chen, J. X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J. J., Huang, S., & Sun, P. (2002). Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(10), 3389–3403. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.10.3389-3403.2002>
- Weaver, I. C. G., Hellstrom, I. C., Brown, S. E., Andrews, S. D., Dymov, S., Diorio, J., ... Meaney, M. J. (2014). The methylated-DNA binding protein MBD2 enhances NGFI-A (egr-1)-mediated

- transcriptional activation of the glucocorticoid receptor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1652), 20130513–20130513. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0513>
- Wei, L. L., Wu, X. J., Gong, C. C., & Pei, D. S. (2017). Egr-1 suppresses breast cancer cells proliferation by arresting cell cycle progression via down-regulating CyclinDs. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(10), 10212–10222.
- Wei, N., Yu, Y., Joshi, V., & Schmidt, T. (2013). Glucocorticoid receptor antagonist and siRNA prevent senescence of human bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro. *Cell and Tissue ...*, 354(2), 461–470. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1700-0>
- Wiemann, S. U., Satyanarayana, A., Tsahuridu, M., Tillmann, H. L., Zender, L., Klempnauer, J., ... Rudolph, K. L. (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(9), 935–942. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0977com>
- Wikström, A. C. (2003). Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: Role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. *Journal of Endocrinology*, 178(3), 331–337. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1780331>
- Wu, G. S. (2004). The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 3(2), 156–161. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14764989>
- Wu, J., & Bresnick, E. H. (2007, October 1). Bare rudiments of notch signaling: how receptor levels are regulated. *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.09.002>
- Wu, M., Melichian, D. S., de la Garza, M., Gruner, K., Bhattacharyya, S., Barr, L., ... Varga, J. (2009). Essential roles for early growth response transcription factor Egr-1 in tissue fibrosis and wound healing. *The American Journal of Pathology*, 175(3), 1041–1055. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090241>
- Xing, M. (2005). BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 12(2), 245–262. <https://doi.org/10.1677/erc.1.0978>
- Xu, M., Palmer, A. K., Ding, H., Weivoda, M. M., Pirtskhalava, T., White, T. A., ... Kirkland, J. L. (2015). Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *ELife*, 4(DECEMBER2015), e12997. <https://doi.org/10.7554/eLife.12997>
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., ... Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128), 656–660. <https://doi.org/10.1038/nature05529>
- Yan, S.-F. F., Fujita, T., Lu, J., Okada, K., Shan Zou, Y., Mackman, N., ... Stern, D. M. (2000). Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nature Medicine*, 6(12), 1355–1361. <https://doi.org/10.1038/82168>
- Yanai, H., Shteinberg, A., Porat, Z., Budovsky, A., Braiman, A., Zeische, R., & Fraifeld, V. E. (2015). Cellular senescence-like features of lung fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Aging*, 7(9), 664–672. <https://doi.org/10.18632/aging.100807>
- Yegorov, Y. E., Akimov, S. S., Hass, R., Zelenin, A. V., & Prudovsky, I. A. (1998). Endogenous β -galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. *Experimental Cell Research*, 243(1), 207–211. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4169>
- Yeh, I., von Deimling, A., & Bastian, B. C. (2013). Clonal BRAF mutations in melanocytic nevi and initiating role of BRAF in melanocytic neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(12), 917–919. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt119>
- Yu, J., Zhang, S. S., Saito, K., Williams, S., Arimura, Y., Ma, Y., ... Mustelin, T. (2009). PTEN regulation by Akt-EGR1-ARF-PTEN axis. *The EMBO Journal*, 28(1), 21–33. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.238>
- Zeggini, E., Weedon, M. N., Lindgren, C. M., Frayling, T. M., Elliott, K. S., Lango, H., ... Worthington, J. (2007). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, 316(5829), 1336–1341. <https://doi.org/10.1126/science.1142364>
- Zen, M., Canova, M., Campana, C., Bettio, S., Nalotto, L., Rampudda, M., ... Doria, A. (2011). The

- kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmunity Reviews*, 10(6), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2010.11.009>
- Zhang, C., Wenger, T., Mattern, J., Ilea, S., Frey, C., Gutwein, P., ... Herr, I. (2007). Clinical and mechanistic aspects of glucocorticoid-induced chemotherapy resistance in the majority of solid tumors. *Cancer Biology & Therapy*, 6(2), 278–287. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17224649>
- Zhang, H. H., Chen, X., Wang, J., Guang, W., Han, W., Zhang, H. H., ... Gu, Y. (2014). EGR1 decreases the malignancy of human non-small cell lung carcinoma by regulating KRT18 expression. *Scientific Reports*, 4, 5416. <https://doi.org/10.1038/srep05416>
- Zhang, H., Zheng, H., Mu, W., He, Z., Yang, B., Ji, Y., & Hui, L. (2015). DUSP16 ablation arrests the cell cycle and induces cellular senescence. *FEBS Journal*, 282(23), 4580–4594. <https://doi.org/10.1111/febs.13518>
- Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V. E., Kern, S. E., Hruban, R. H., Hamilton, S. R., ... Kinzler, K. W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*, 276(5316), 1268–1272. <https://doi.org/10.1126/science.276.5316.1268>
- Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., & Bishop, J. M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes and Development*, 12(19), 2997–3007. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.2997>
- Zwang, Y., Oren, M., & Yarden, Y. (2012, March 1). Consistency test of the cell cycle: Roles for p53 and EGR1. *Cancer Research*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3382>

Titre : Modulation de la sénescence induite par les oncogènes par les glucocorticoïdes et rôle de EGR1

Mots clés : Sénescence – Vieillesse – Glucocorticoïdes – EGR1 – Mélanomes

Résumé : La sénescence cellulaire est un mécanisme suppresseur de tumeur. En effet, elle se caractérise par l'inhibition irréversible de la prolifération cellulaire, en réponse par exemple à l'expression de certains oncogènes activés. *In vivo*, les névi, dont 80% expriment l'oncogène B-RAF-V600E, sont des exemples visibles d'un tissu composé de cellules exprimant un oncogène et sénescents, protégeant ainsi de la transformation vers le mélanome. On retrouve cependant B-RAF-V600E dans 50% des mélanomes malin, ce qui implique la possibilité d'un échappement à la sénescence. Lors de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes d'induction de sénescence par B-RAF-V600E, et un possible mécanisme d'échappement induit par les glucocorticoïdes (GC). Les GC sont fréquemment utilisés en traitement topique pour leurs propriétés anti-inflammatoire mais aussi comme immunosuppresseurs. Nous avons constaté qu'ils interfèrent avec l'induction de la sénescence *in vitro*.

En étudiant leurs effets sur les modifications du programme transcriptionnel induites par l'expression de B-RAF-V600E, j'ai mis en évidence le rôle d'une de leurs cibles, le facteur de transcription EGR1, dans l'induction de la sénescence. Les GC réduisent l'expression de EGR1 et EGR1 contrôle positivement l'expression des inhibiteurs de kinases dépendantes de cycline CDKN2B et CDKN1A. EGR1 se comporte comme un senseur du niveau d'activation de la voie MAPK/ERK pour induire un arrêt rapide de la prolifération. J'ai aussi constaté que les GC, mais pas la perte de EGR1, permettent un échappement total à la sénescence induite par B-RAF-V600E, impliquant l'existence d'autres cibles.

Mes résultats montrent le rôle de EGR1 dans l'induction de la sénescence et incitent à évaluer l'effet des glucocorticoïdes sur la tumorigénèse liée à l'expression de B-RAF-V600E et dans l'augmentation de la prévalence des cancers de la peau chez les patients greffés.

Title : Modulation of Oncogene Induced Senescence by glucocorticoid, and EGR1 role

Keywords : Senescence – Aging – Glucocorticoids – EGR1 – Melanoma

Abstract : Cellular senescence is a tumor suppressor mechanism. Indeed, it corresponds to an irreversible cell cycle arrest, in response for instance to the expression of an activated oncogene. *In vivo*, nevi, 80% of which express the B-RAF-V600E oncogene, are composed of cells that expressed an oncogene and became senescent, protecting against progression to melanoma. Nevertheless, B-RAF-V600E is found in 50% of malignant melanoma, which implies mechanisms of senescence escape. During my PhD, I studied the mechanisms of senescence induction by B-RAF-V600E, and a possible escape mechanism by glucocorticoids (GC). GC are often used in topical treatment of skin diseases for their anti-inflammatory properties, and are also used as immunosuppressant. We observed that they

interfere with senescence induction *in vitro*. While studying the effects of GC, I identified one of their targets, transcription factor EGR1, and showed that GC repress EGR1 which positively controls the expression of cell cycle inhibitors CDKN2B and CDKN1A. EGR1 acts as a sensor of the level of MAPK/ERK pathway activation to induce a rapid cell-cycle arrest. I also showed that GC, but not the loss of EGR1, allow full escape to senescence induced by B-RAF-V600E, implying the existence of other targets.

My results demonstrate the role of EGR1 in senescence induction, and highlight the need to evaluate GC action on tumorigenesis linked to B-RAF-V600E, as well as in the higher prevalence of skin cancers in transplanted patients.