



HAL
open science

Rôle du récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1) dans la sénescence cellulaire pulmonaire : application thérapeutique dans les maladies respiratoires liées à l'âge

Delphine Beaulieu

► To cite this version:

Delphine Beaulieu. Rôle du récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1) dans la sénescence cellulaire pulmonaire : application thérapeutique dans les maladies respiratoires liées à l'âge. Pneumologie et système respiratoire. Université Paris-Est, 2021. Français. NNT : 2021PESC0018 . tel-03666675

HAL Id: tel-03666675

<https://theses.hal.science/tel-03666675v1>

Submitted on 12 May 2022

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.



Thèse de doctorat

Université Paris-Est - Ecole doctorale Science de la vie et de la santé

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée par :

Delphine BEAULIEU

Rôle du récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1) dans la sénescence cellulaire pulmonaire : application thérapeutique dans les maladies respiratoires liées à l'âge.

Directeur de thèse :

Pr Serge ADNOT

Thèse soutenue le 13 décembre 2021 devant le jury composé de :

Pr BOCZKOWSKI Jorge	Président
Pr FRIGUET Bertrand	Rapporteur
Pr BONCOEUR Emilie	Rapporteur
Dr BERNARD David	Examineur
Dr URBACH Valérie	Examineur
Pr ADNOT Serge	Directeur de thèse

Thèse réalisée dans le laboratoire :

Sénescence, Métabolisme et Maladies Cardiovasculaires

Dirigé par le **Pr Geneviève DERUMEAUX**

Au sein de l'Unité INSERM U955

Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB)



Adresse :

Faculté de médecine de Créteil

8 rue du Générale Sarrail

94010 Créteil cedex

À mes parents,

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse. A commencer par le Pr Jorge Boczkowski d'avoir accepté d'être président de mon jury, ainsi que le Dr Valérie Urbach et le Dr David Bernard de me faire l'honneur d'être examinateurs de mon jury de thèse. Je tiens, tout particulièrement, à remercier le Dr Emilie Boncoeur et le Pr Bertrand Friguet d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je remercie le Pr Serge Adnot de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour effectuer ma thèse. Cette expérience unique et enrichissante à tous niveaux m'apportera, sans aucun doute, beaucoup à l'avenir.

Une attention particulière pour le Pr Bertrand Friguet, le Dr Isabelle Petropoulos et le Dr David Bernard pour nos échanges et l'ensemble de vos précieux conseils durant cette thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe, Elisabeth, Shariq, Amal, Nora, Larissa pour m'avoir formé et soutenu durant ces quatre années de thèse. Grâce à votre énergie, j'ai eu l'occasion de publier mon premier article scientifique et j'en suis très fière, un grand merci ! Je garde de très bons souvenirs partagés avec vous notamment durant les congrès. Shariq, toi qui as été un pilier dans cette aventure, ta bonne humeur nous a particulièrement manqué depuis ton départ. Merci pour tous ces « trucs et astuces » partagés tout le long de la thèse, notamment durant la soumission de l'article. Manue, Manouelle, Manoushka ou Patat' pour d'autre... nous avons démarré cette thèse à un mois d'intervalle et nous soutenons la même semaine. Après tous ce qu'on a partagé ensemble, notamment avec Shariq et Amal, nous y voilà ! Co-pilote de thèse, sans toi, les souvenirs ne seraient pas les mêmes.

Je remercie également, Geneviève Derumeaux et toute son équipe pour nos échanges scientifiques et le partage de bons moments notamment à l'Abbaye des Vaux de Cernay.

J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'IMRB qui m'ont permis de faire avancer mes travaux de thèse de près ou de loin, particulièrement aux membres de la plateforme d'histologie et de l'animalerie que j'ai très souvent sollicités. Merci également à Rachid Souktani pour avoir pratiqué les mesures de Flexivent. Juliette, merci pour nos échanges et ton dynamisme incroyable.

Merci à toute ma famille, particulièrement à mes parents et ma sœur Solène pour leur soutien sans faille. Maman, Papa, merci de m'avoir transmis vos valeurs complémentaires ! Elles m'ont permis de relever les différents défis rencontrés durant cette thèse et ont participé à son accomplissement. Sans oublier Solène et tes nombreux passages dans la capitale qui m'ont beaucoup aidé à décompresser lorsque j'en avais besoin.

Merci également à Gait et Bertrand pour leur soutien durant ces années. Nos discussions enrichissantes m'ont aidé à relativiser et évoluer sereinement durant cette thèse.

Merci à mes amis, Paulo, Estephe, JM, Samira, Elisabeth, Michel, Victor, Damien et Baptiste. Merci pour ces supers bons moments partagés, pour votre soutien ! Merci d'être qui vous êtes chacun d'entre vous.

Jb, Jbouille, JBâo, Jean-Baptiste, mon cœur, finalement, tu as bien fait de m'avoir encouragé à faire une thèse. Merci de m'avoir accompagné et d'avoir supporté de vivre avec moi pendant cette période, tu as tenu le coup, BRAVO ! Merci, en plus de tous ces efforts, d'avoir trouvé l'énergie de me faire découvrir la glisse sur la neige et sur l'eau. Merci d'avoir accepté d'accueillir notre chère Bastet, devenue officiellement nouvelle propriétaire de notre appartement.

Résumé

La sénescence cellulaire est un processus clé dans la physiopathologie des maladies liées à l'âge, en particulier les maladies pulmonaires telle la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la fibrose pulmonaire. L'accumulation de cellules sénescents dans le poumon conduit à un défaut de régénération tissulaire associé à une inflammation par la production du SASP ou « sécrétome associé à la sénescence ». Limiter la sénescence cellulaire et le SASP représente un objectif thérapeutique majeur dans les maladies pulmonaires liées à l'âge. L'objectif de ma thèse était d'évaluer le rôle de l'activation de PLA2R1 (récepteur 1 de la phospholipase A2) dans la sénescence cellulaire pulmonaire associée à la BPCO et en définir les applications thérapeutiques. Nous avons montré que PLA2R1 est augmenté dans plusieurs types cellulaires ayant des caractéristiques de cellules sénescents dans les poumons de patients BPCO. L'inactivation génétique de PLA2R1 par ARN interférents permet d'augmenter la capacité de doublement de population et d'inhiber les composants du SASP. La transduction du gène *PLA2R1* induit une sénescence cellulaire précoce qui est inhibée en présence du ruxolitinib, inhibiteur sélectif de JAK1/2. Chez la souris, la surexpression constitutive de PLA2R1 (PLA2R1-TG) induit une sénescence cellulaire précoce et le développement d'emphysème et de fibrose pulmonaires à l'âge de 5 mois. L'emphysème et la fibrose pulmonaires sont réduits par l'administration de ruxolitinib. La surexpression pulmonaire de PLA2R1 induite par l'injection intratrachéale d'un lentivirus codant pour le gène PLA2R1 (LV-PLA2R1) conduit au développement d'un emphysème pulmonaire après quatre semaines, qui est fortement atténué par le traitement concomitant au ruxolitinib.

Afin de comprendre l'effet du ruxolitinib sur la sénescence cellulaire et sur le SASP associés aux altérations pulmonaires indépendamment de PLA2R1, nous avons ensuite évalué l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib sur la sénescence cellulaire dans deux modèles d'altérations pulmonaires, l'emphysème induit par l'élastase et la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. L'élastase administrée aux souris exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur p16 (souris p16-luciférase) induit un fort signal luminescent partiellement inhibé par le ruxolitinib. Chez les souris C57Bl6/J, l'élastase induit une augmentation de la compliance et un emphysème pulmonaire associés à l'augmentation des marqueurs de sénescence cellulaire (p21 et p16) et du SASP. Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de diminuer la compliance et l'emphysème ainsi que les marqueurs de sénescence cellulaire et le SASP. Dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine, on mesure une diminution de la compliance et une augmentation des dépôts de collagène dans le poumon, associés à une augmentation des marqueurs de sénescence cellulaire. Le traitement préventif par le ruxolitinib permet d'augmenter la compliance et de réduire les dépôts de collagène ainsi que les marqueurs de sénescence cellulaire. Ces résultats soulignent l'importance de la voie JAK/STAT dans le contrôle de la sénescence cellulaire et du SASP dans les modèles murins d'emphysème pulmonaire et de fibrose pulmonaire.

Ces résultats confirment le rôle majeur de l'activation de PLA2R1 dans la sénescence des cellules pulmonaires et les altérations pulmonaires dans la BPCO. L'inhibition de la voie JAK/STAT pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour limiter les altérations pulmonaires et la sénescence des cellules pulmonaires dans les maladies pulmonaires humaines.

Mots clefs : Sénescence cellulaire, PLA2R1, maladies pulmonaires, JAK/STAT, BPCO, fibrose pulmonaire

Abstract

Title: Role of the phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1) in lung cell senescence: therapeutic application in age-related lung diseases.

Cell senescence is a key process in age-associated dysfunction and diseases, notably chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung fibrosis. Senescent cells accumulation in the lung limits the tissue renewal potential and contributes to chronic inflammation through the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Limiting cellular senescence and the SASP may represent a new therapeutic approach in age-related lung diseases. The goal of my thesis was to assess the role of PLA2R1 (phospholipase A2 receptor 1) on cellular senescence in the context of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We found that PLA2R1 was overexpressed in various cell types exhibiting senescence characteristics in COPD lungs. PLA2R1 knockdown extended the population doubling capacity of these cells and inhibited the SASP. PLA2R1-mediated cell senescence in COPD was largely reversed by treatment with the potent JAK1/2 inhibitor ruxolitinib. *In vivo*, constitutive PLA2R1 overexpression in transgenic mice (PLA2R1-TG mice) led to early lung-cell senescence and to a combination of lung emphysema and lung fibrosis in 5-month-old mice. Lung overexpression of PLA2R1 induced by intratracheal injection of a lentivirus encoding the murine PLA2R1 gene lead to the development of lung emphysema within four weeks, which was markedly attenuated by concomitant ruxolitinib treatment.

To question whether ruxolitinib could affect lung cell senescence, reduce the SASP, and protect against lung alterations independently of PLA2R1, we next evaluated the effect of the JAK/STAT inhibitor ruxolitinib in two mouse models of lung alterations: elastase-induced lung emphysema and bleomycin-induced lung fibrosis. Elastase injection in p16-luciferase mice induced a strong luminescent signal partially inhibited by ruxolitinib. In C57Bl6/J mice, elastase injection led to severe lung emphysema which was associated with increased in cellular senescence markers (p21 and p16) and the SASP. Preventive treatment with ruxolitinib reduced lung emphysema and cellular senescence markers together with a reduction of the SASP. In mice injected with bleomycin, lung fibrosis developed, together with an increase in lung cellular senescence markers. Preventive treatment with ruxolitinib partially prevented lung fibrosis and cellular senescence markers. These results emphasized the importance of the JAK/STAT pathway in controlling cellular senescence and the SASP in mouse models of lung emphysema and lung fibrosis. These data support a major role for PLA2R1 activation in driving lung-cell senescence and lung alterations in COPD. Inhibition of the JAK/STAT pathway may represent a new therapeutic strategy for limiting lung alterations and lung cell senescence in human lung diseases.

Key words: Cellular senescence, PLA2R1, lung diseases, JAK/STAT, COPD, lung fibrosis.

Tables des matières

Remerciements	4
Résumé	6
Abstract	7
Tables des matières	8
Liste des abréviations	12
Introduction	17
CHAPITRE 1 : La sénescence cellulaire	17
I / L'induction de la sénescence	17
1. Le raccourcissement des télomères	17
1.1 Structure et régulation des télomères	18
1.2 Réplication incomplète des télomères	19
1.3 La télomérase	19
1.4 Héritéité de la longueur des télomères	21
1.5 Les facteurs environnementaux impactant la longueur des télomères	21
1.6 Le raccourcissement des télomères et la sénescence cellulaire	21
2. Les dommages à l'ADN	22
2.1 Cassures double-brins et lésions simple-brin	23
2.2 Réparation par jonction des extrémités non-homologues : <i>NHEJ</i>	25
2.3 Réparation par recombinaison homologue	25
2.4 Extrémités des télomères : inductrices des DDRs	26
2.5 Rôle de p53 dans les DDRs	26
3. Le stress oxydatif	27
4. La sénescence cellulaire induite par activation d'oncogènes	28
4.1 La voie Ras	28
4.2 La voie Myc	29
5. Les suppresseurs de tumeurs	30
5.1 La voie p16 ^{INK4a} /Rb	30
5.2 La voie p19 ^{ARF} /p53/p21 ^{Cip1}	31
5.3 La voie PTEN/p27 ^{Kip1}	32
II/ Caractéristiques d'une cellule sénescence	33
1. Les voies de signalisation marqueurs de la sénescence cellulaire	33
1.1 La réponse aux dommages à l'ADN	33
1.2 Les inhibiteurs de CDKs et l'arrêt du cycle cellulaire	33
1.3 La résistance à l'apoptose	34

1.4 Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP).....	35
2. Les altérations morphologiques : marqueurs de la sénescence cellulaire.....	37
2.1 Les modifications morphologiques	37
2.2 Composition de la membrane plasmique	37
2.3 Augmentation du contenu lysosomal	37
2.4 Accumulation des mitochondries.....	38
2.5 Réorganisation de la chromatine et modifications nucléaires.....	38
III/ La sénescence cellulaire et physiopathologie.....	40
1. Sénescence cellulaire et développement embryonnaire.....	40
2. Sénescence cellulaire : Effets bénéfiques	40
3. Sénescence cellulaire : Effets délétères	41
3.1 Elimination génétique des cellules sénescents	43
3.2 Protection contre la sénescence cellulaire.....	44
CHAPITRE 2 : La sénescence cellulaire dans la bronchopneumopathie chronique obstructive et la fibrose pulmonaire	49
I/ Le poumon	49
1. Structure.....	49
2. Fonction de l'organe.....	50
3. L'épithélium respiratoire : des voies aériennes supérieures aux alvéoles.	51
II/ La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO).....	53
1. Caractéristiques de la BPCO	53
2. Causes de la BPCO	54
2.1. Les facteurs environnementaux	54
2.2. Les facteurs génétiques.....	54
3. Pathogenèse de la BPCO	56
3.1 L'inflammation dans la BPCO	56
3.2 Le remodelage des voies respiratoires dans la BPCO.....	57
3.3 L'emphysème pulmonaire	58
3.4 Exacerbations dans la BPCO	59
3.5 Les modèles animaux de la BPCO.....	60
4. La BPCO : une pathologie liée à l'âge	62
4.1 Vieillesse et BPCO	62
4.2 Raccourcissement des télomères.....	62
4.3 La sénescence cellulaire induite dans la BPCO.....	63
4.4 La sénescence cellulaire dans les modèles animaux BPCO	66
4.5 Le rôle du SASP chez les patients BPCO	67

III/ La fibrose pulmonaire	72
1. Les causes de la FPI.....	72
1.1 Les facteurs environnementaux.....	72
1.2 Les facteurs génétiques.....	72
2. Caractéristiques cliniques, diagnostiques et traitement de la FPI	73
3. Pathogenèse de la FPI.....	74
4. La sénescence cellulaire dans la fibrose pulmonaire	76
CHAPITRE 3 : Les voies PLA2R1 et JAK/STAT	82
I/ La voie du récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1)	82
1. Les phospholipases : généralités	82
1.1 Groupes des PLA2s	82
1.2 Expression et fonctions des sPLA2s.....	83
1.3 Les PLA2s dans le poumon	83
2. Le récepteur PLA2R1	85
2.1 Découverte de PLA2R1	85
2.2 Expression et structure de PLA2R1	86
2.3 Régulation transcriptionnelle et épigénétique de PLA2R1	87
2.4 Fonction de PLA2R1.....	87
II/ La voie des JAK/STAT	95
1. Découverte de la voie JAK/STAT.....	95
1.1 Voie induite par les cytokines.....	95
1.2 Découvertes des protéines kinases JAK	98
1.3 Découvertes des protéines Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs) ...	99
2. Description de la voie JAK/STAT	103
2.1 Rôles des STATs	104
2.2 Régulation des voies JAK/STAT.....	105
2.3 Les mutations affectant la voie JAK/STAT	106
3. Implications de la voie JAK/STAT dans les cancers.....	106
4. La voie JAK/STAT comme cible thérapeutique	108
5. La voie JAK/STAT dans la sénescence cellulaire	110
6. La voie JAK/STAT dans les maladies pulmonaires	111
6.1 La voie JAK/STAT dans la BPCO et l'emphysème	112
6.2 La voie JAK/STAT dans la fibrose pulmonaire.....	113
7. La voie JAK/STAT dans la fibrose	113
Problématique	117
Résultats	119

Etude 1 : Le récepteur 1 de la phospholipase A2 favorise la sénescence des cellules pulmonaires et l'emphysème dans les maladies pulmonaires obstructives.	119
Introduction étude 1 :	120
Résultats étude 1 :	120
Discussion étude 1 :	121
Conclusion étude 1 :	123
Etude 2 : Effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT sur la sénescence cellulaire dans des altérations pulmonaires : emphysème et fibrose pulmonaires.	159
Introduction étude 2 :	160
Matériels et méthodes étude 2 :	162
Résultats étude 2 :	166
Discussion et perspectives étude 2 :	176
Conclusion étude 2 :	180
Tables des illustrations	182
Tables des tableaux	183
BIBLIOGRAPHIE	184

Liste des abréviations

AAT : alpha-1 antitrypsine

ACHN : cellules humaines d'adénocarcinome rénal

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AEC : cellules épithéliales alvéolaires de type 1 et 2

AGER: *Advanced Glycosylation End-Product Specific Receptor*

ALT : allongement alternatif des télomères

AML : leucémie myéloïde aigue

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATM: ataxia telangiectasia mutated

ATR: ATM- and Rad3-Related

BALT: bronchiolar-associated lymphoid tissue

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

C/EBP : famille des CCAT/Enhancer Binding Protein

CAB : corps de Cajal

CCR : carcinome des cellules rénales

CDK : kinases cycline-dépendantes

ChIP : Chromatin immunoprecipitation

CK2 : caséine-kinase II

CNTF: ciliary neurotrophic factor

cPLA2s: PLA2 cytosoliques

CREB: cAMP response element-binding protein

CTC1: conserved telomere protection component 1

CVF: capacité vitale forcée, en anglais forced vital capacity, FVC

CysLT : cysteinyl leukotrines

DDR : DNA damage response ; réponse aux dommages à l'ADN

DKC1 : dyskerine

DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase

DNMT : méthyltransférase de l'ADN

DSBs: double-stranded DNA breaks; cassures d'ADN double brin

EGF: epidermal growth factor

EPO : érythropoïétine

ERR α : récepteur aux œstrogènes

FAM13A: family with sequence similarity 13 member A

FDPS: farnesyl diphosphate synthase

FKBP-Casp8: FK506-binding-protein-caspase8

FPI: fibrose pulmonaire idiopathique

GAR1: encoding H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1

GAS: gamma-activated sequence

GBP: guanylate binding protein

GFP: green fluorescent protein

GM-CSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor.

GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

GWAS : genome-wide association studies, génotypage de polymorphismes à l'échelle du génome

HD: histone déacetylase

HHIP: Hedgehog-interacting protein

HIFs: Hypoxia Inductible Factors

HMECs: Human Mammary Epithelial Cells

hnRNP : RNA-binding protein

HR: homologous recombination

HSP: heat-shock protein

IFN: interféron

IGFBP: insulin-like growth factor binding protein

IL: Interleukine

IREB2: iron-responsive element-binding protein 2

ISRE: interferon-stimulated response element

ITSE: INK4A transcription silence element

JAK: Janus kinase

kb: kilobase

KC: keratinocytes-derived chemokine

LBA : lavage broncho-alvéolaire

LIF: leukaemia inhibition factor

LT: leucotriènes

MCP : monocyte chemoattractant protein

MDM2 : murine double minute 2

MEC : matrice extracellulaire
MEF: Mouse Embryonic Fibroblasts
MGF: mammary gland factor
miARNs: micro-ARN
MMPs: métalloprotéinases
mTOR: mammalian Target of Rapamycin
mTORC: mammalian Target of Rapamycin Complex
NAC: N-acétylcystéine
NHEJ: non-homologous end joining
NHP: non-histone protein
NOP10: nucleolar protein 10
OIS: Oncogene-induced senescence
OSM: oncostatin M
PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1
PD ou PDL: population doubling
PGs : prostaglandines
PI3K: PI3-kinase
PIKKs: kinases phosphatidylinositol-3-kinase-like
PIP₃: 3,4,5-triphosphate
PLA2 : phospholipases
PLA2R1 : Récepteur 1 de la phospholipase A2
PLA2R1KO: PLA2R1 Knockdown
PLA2R1OE: PLA2R1 overexpression
POT1 : protection of telomeres 1
pRb : protéine du rétinoblastome
PRC : complexes du groupe polycomb
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
PTK: protéines tyrosine kinases
RE : réticulum endoplasmique
ROS: reactive oxygen species
RPA: Replication protein A
SAHF: senescence-associated heterochromatin foci
SASP: phénotype sécrétoire associé à la sénescence

SA-β Gal: senescence-associated beta-galactosidase
SCID: severe combined immunodeficiency
SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë
SERPIN: plasminogen activated inhibitor
SH2: Src-homology-2
shRNA: short hairpin RNA
SIE: sis-incuctible element
SIRT1: sirtuin 1
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SPHG : syndrome de progeria de Hutchinson-Gilford
sPLA2s : PLA2 sécrétées
Spp1 : secreted phosphoprotein 1
ssDNA: single-strained DNA
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
STN1: Suppressor of Cdc Thirteen Homolog 1
TCAB1: telomerase cajal body protein 1
TEM: transition épithélio-mésenchymateuse
TEN1: telomeric pathway with STN1
TERC: telomerase RNA component
TERT: telomerase reverse transcriptase
THOR: TERT hypermethylated oncological region
TIMP: inhibiteurs de métalloprotéinases
TIN2: TRF1-interacting nuclear protein 2
TNF: tumor necrosis factor
TOPBP1: topoisomerase-II-binding protein 1
TPP1: TIN2-interacting protein
TRF: Telomeric-repeat-binding factor
Tyk2: tyrosine kinase 2
UPR: unfolded protein response
VEGF: vascular endothelial growth factor
VEMS: volume expiratoire forcé maximum en une seconde, en anglais forced expiratory volume in 1 second, FEV₁
VHL: Von Hippel-Lindau

WT: Wild type

α -SMA : alpha-smooth muscle actin

Introduction

CHAPITRE 1 : La sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois par Hayflick et Moorhead en 1961 qui ont mis évidence la capacité de division limitée de plusieurs souches de fibroblastes diploïdes humains issus de fœtus. C'est en 1965 que Hayflick constate que les cellules diploïdes humaines ont un potentiel de doublement limité à environ 50 ± 10 . *In vitro*, les cellules ont une première phase I où elles prolifèrent faiblement puis une phase II durant laquelle elles se divisent de façon exponentielle pour enfin arriver à un plateau, la phase III, caractérisée comme la sénescence cellulaire et aussi appelée « limite de Hayflick ». La sénescence cellulaire se définit comme un arrêt stable et permanent de la prolifération cellulaire et est accompagnée d'anomalies chromosomiques. Ces dommages accumulés sont observés chez un animal ou un humain vieillissant.

I / L'induction de la sénescence

Plus tard, dans les années 90, ont été décrits 2 types de sénescence cellulaire : la sénescence répllicative et la sénescence prématurée. La sénescence répllicative est liée au raccourcissement des télomères au fur et à mesure des divisions cellulaires. Tandis que la sénescence prématurée est induite par des expositions à différents agents toxiques (UV, radiations ionisantes...), par l'augmentation d'expression d'oncogènes ou l'augmentation des ROS (espèces réactives à l'oxygène) induisant un stress cellulaire.

1. Le raccourcissement des télomères

La sénescence répllicative est due au raccourcissement des télomères induit à chaque division cellulaire. C'est un phénomène normal qui se produit par la perte d'une partie de la séquence d'ADN des télomères. Les télomères se trouvent aux extrémités de chaque chromosome des cellules eucaryotes, ils jouent un rôle dans le maintien et la stabilité du génome et sont indispensables pour protéger les chromosomes linéaires de la fusion par un processus cellulaire de réparation d'ADN. Chez les mammifères, les télomères de 1 à 50 kilobases (kb), sont formés d'une séquence d'ADN répétée en tandem hautement conservée (TTAGGG) à l'extrémité 3'. Les télomères humains font entre 10 à 15 kb dans les cellules germinatives et sont plus courts dans les cellules somatiques. Les souris de laboratoire (*Mus musculus*) ont des télomères qui excèdent une taille de 30 kb.

1.1 Structure et régulation des télomères

La structure des télomères est en forme de lasso, appelée t-loop, constituée d'un double brin proximal et d'un simple-brin distal de 50-300 nucléotides riche en guanine. Les télomères sont en général associés à trois types de protéines : les nucléosomes, le complexe des protéines Shelterine et des facteurs de transcription. Chez les eucaryotes, les télomères sont principalement sous forme d'hétérochromatine enrichie en histones 3 et 4 triméthylées (H3K9me3 et H4K20me3), et des isoformes de protéines hétérochromatine (HP). Le complexe Shelterine (**Figure1**) comprends 6 sous-unités : TRF1 et TRF2 (Telomeric-repeat-binding factor 1 and 2), POT1 (protection of telomeres 1), TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein 2), TPP1 (TIN2-interacting protein), et l'adaptateur RAP1. Ce complexe régule la longueur des télomères, protège la fin des chromosomes en réprimant les signaux de la réponse aux dommages à l'ADN (DNA damage response : DDRs). TRF1 et 2 se lient à la séquence double brin et régulent négativement la longueur des télomères, ils régulent également la formation de la boucle t-loop. POT1 se lie à l'ADN simple brin, protège la fin des télomères de la fusion et inhibe l'une des voies de réparation de l'ADN. RAP1 interagit indirectement avec l'ADN en complexant avec TRF2 supprimant les recombinaisons homologues au niveau des télomères.

D'autres protéines contribuent à la régulation et au maintien des télomères, le complexe protéique hétérotrimérique CST constitué de CTC1 (conserved telomere protection component 1), STN1 (suppressor of cdc thirteen homolog 1) et TEN1 (telomeric pathway with STN1). Ce complexe est localisé sur le simple brin et régule la longueur des télomères en formant une protection ou « capping ». (Turner, Vasu et al. 2019, Srinivas, Rachakonda et al. 2020).

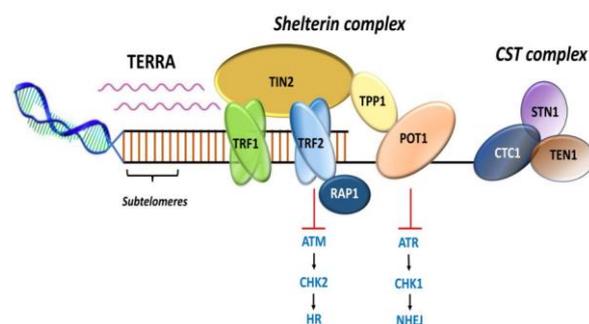


Figure 1 : Représentation schématique des complexes régulant les télomères : le complexe Shelterin et le complexe CST (Turner, Vasu et al. 2019).

1.2 Réplication incomplète des télomères

La réplication incomplète à l'extrémité des chromosomes par l'ADN polymérase induit un raccourcissement progressif des télomères à chaque division. L'ADN polymérase Pol α avec une amorce ARN simple brin initie la synthèse d'un nouveau brin direct (« leading strand ») en 5' vers 3'. Elle est remplacée par Pol ϵ pour l'élongation formant le brin de lecture. Pour la synthèse du brin indirect (« lagging strand ») en 5' vers 3', de multiples amorces appelées fragments d'Okazaki, sont nécessaires pour l'élongation. Ensuite, la Pol δ permet la liaison de ces fragments pour former un brin continu. L'espace laissé par la dégradation de l'amorce à l'extrémité 5' n'est pas rempli, ce qui entraîne la perte d'un court segment d'ADN à l'extrémité 5' du brin indirect (**Figure 2**).

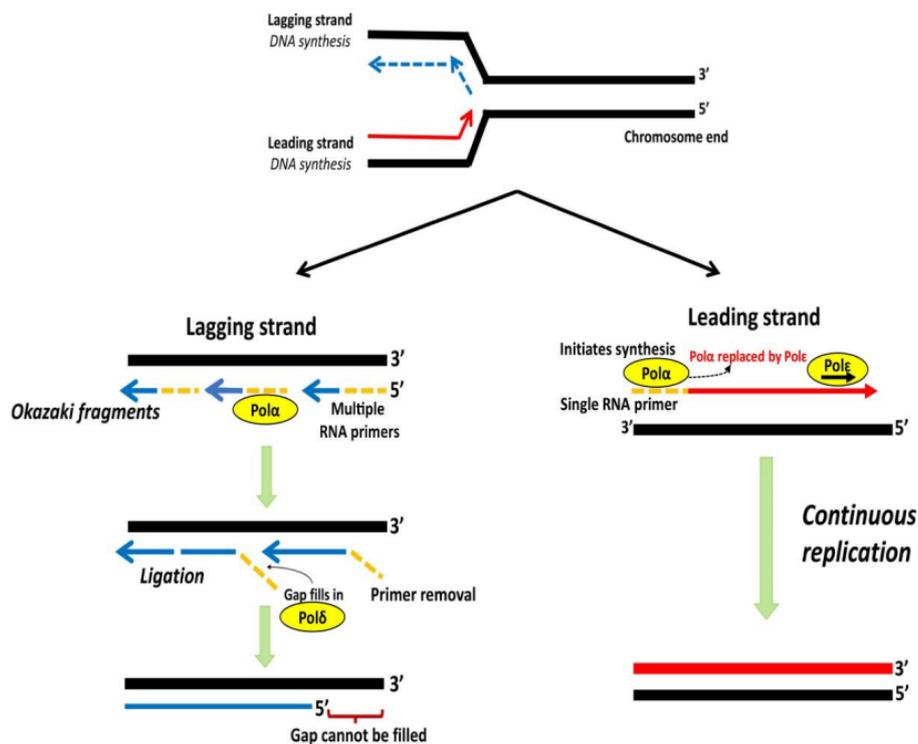


Figure 2 : Schéma expliquant la synthèse de l'ADN par les ADN polymérase des brins directe et indirecte. Issu de (Srinivas, Rachakonda et al. 2020)

1.3 La télomérase

La protéine ribonucléique télomérase s'oppose au raccourcissement des télomères lié à la réplication de l'ADN. La télomérase ajoute les répétitions de télomères par des étapes successives finement contrôlées. La plupart des cellules souches adultes et des tissus somatiques ne contiennent pas suffisamment de télomérase pour maintenir la longueur des télomères à l'infini et subissent donc un raccourcissement des télomères lié à l'âge.

La télomérase est composée d'une sous-unité catalytique, la transcriptase inverse télomérase (telomerase reverse transcriptase, TERT) et d'un composant ARN (telomerase RNA component, TERC). TERT et TERC agissent pour étendre les répétitions de nucléotides télomériques. Les protéines dyskerine (DKC1), NOP10 (nucleolar protein 10), NHP2 (non-histone protein 2), et GAR1 (encoding H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1) interagissent avec TERC par la liaison à la boîte H/ACA (**Figure 3**). TERC et TERT s'assemblent pour former le complexe mature de la télomérase qui est recruté sur le corps de Cajal (CAB) par la protéine TCAB1 (telomerase cajal body protein 1). Pendant la phase S, les corps de Cajal facilitent le recrutement du complexe télomérase mature au niveau des télomères.

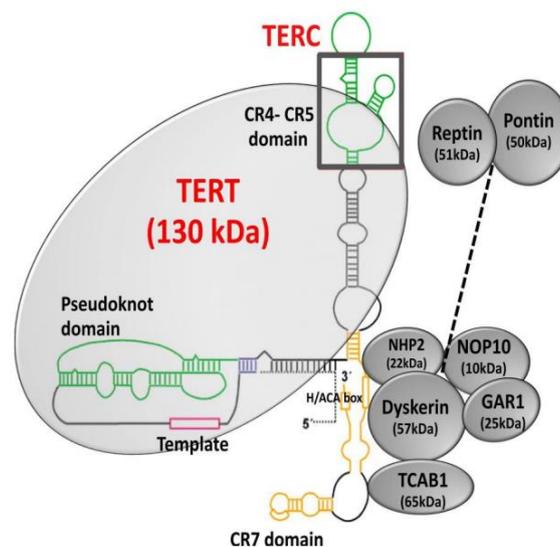


Figure 3 : Schéma représentant les complexes de la télomérase (Srinivas, Rachakonda et al. 2020)

La télomérase diminue avec l'âge mais elle est souvent réactivée dans les tumeurs à cause de mécanismes génétiques et épigénétiques touchant *TERT* et *TERC*. La télomérase est surexprimée dans 90% des cancers. Elle est souvent retrouvée dans les cancers de l'ovaire, de l'œsophage, l'adénocarcinome pulmonaire et le carcinome cellulaire squameux. Des mutations somatiques dans le promoteur de *TERT* entraînent de nouvelles liaisons à des facteurs de transcription et sont retrouvées dans les cancers de la peau, du foie ou le glioblastome. De plus, des mécanismes épigénétiques ont un effet sur la réactivation de la télomérase. Le gène *TERT* contient des îlots CpG connus sous le nom de région oncologique hyper-méthylée de *TERT* (TERT hypermethylated oncological region : THOR). La région THOR est hyper-méthylée dans les tumeurs malignes et hypo-méthylée dans les tissus normaux et les cellules souches. L'hyper-méthylation prévient la liaison des répresseurs au promoteur ce qui induit une surrégulation de *TERT* et de l'activité télomérase (Srinivas, Rachakonda et al. 2020).

1.4 Héritéité de la longueur des télomères

Une méta-analyse impliquant près de 20 000 sujets montre une héritabilité des télomères de 70% et une corrélation entre les télomères maternels et ceux de leur progéniture, due à un mécanisme lié au chromosome X et à l'ADN mitochondrial (Srinivas, Rachakonda et al. 2020).

Douze études GWAS (genome-wide association studies) sur la longueur des télomères ont permis d'identifier les locus associés à cette longueur. Plusieurs SNPs (single-nucleotide polymorphisms) ont été identifiés, notamment dans les locus du gène *TERC*.

1.5 Les facteurs environnementaux impactant la longueur des télomères

D'autres facteurs influencent la longueur des télomères comme le stress oxydatif, l'inflammation, le mode de vie et l'exposition aux agents cancérogènes. Le stress oxydatif serait l'une des causes les plus importantes du raccourcissement des télomères. Comme les télomères sont riches en guanine, ils sont une cible du dommage oxydatif avec la formation de 8-oxodG (8-hydroxy-2-déoxyguanosine) un marqueur important du stress oxydatif, qui provoque un raccourcissement accéléré. Les cassures simple-brin accumulés dans les télomères à la suite du stress oxydatif induisent le blocage de la fourche de réplication et une réplication incomplète des extrémités des chromosomes qui conduit au raccourcissement des télomères. L'exposition aux ultra-violets, aux radiations ionisantes ou aux carcinogènes, comme l'arsenic, conduit à des dommages à l'ADN qui, directement ou non, induisent un dommage oxydatif. D'autres facteurs comme la fumée de cigarette, l'obésité et le manque d'exercice favorisent le raccourcissement des télomères (Srinivas, Rachakonda et al. 2020).

1.6 Le raccourcissement des télomères et la sénescence cellulaire

Harley et al décrivent en 1990 un lien entre le raccourcissement des télomères et le vieillissement. Ils constatent que la longueur des télomères diminue proportionnellement avec l'âge en mettant en culture des fibroblastes humains non transformés de donneurs. La perte des télomères peut causer un arrêt permanent du cycle cellulaire et une instabilité chromosomique caractéristique des fibroblastes sénescents. *In vivo*, la perte de l'ADN télomérique peut contribuer à une fréquence élevée des réarrangements chromosomiques observés chez les personnes âgées (Harley, Futcher et al. 1990).

Des études utilisant les gènes du papillomavirus humain E6 et E7, inactivant p53 et pRB (protéine du rétinoblastome) respectivement, ou des oligonucléotides antisens, ont montré le rôle de p53 et pRB dans la sénescence réplivative. L'inactivation de p53 ou pRB est suffisante pour étendre la durée de

vie des cellules humaines et l'inactivation de ces deux protéines est plus efficace dans cette prolongation de durée de vie que l'inactivation unique de l'une ou de l'autre. L'inactivation de p53 et pRB est nécessaire pour la réactivation de la synthèse de l'ADN par les cellules sénescentes (Itahana, Dimri et al. 2001).

Un mauvais fonctionnement des télomères conduit à des dommages à l'ADN et à leur raccourcissement. Selon le type cellulaire, le fond génétique et le dommage au télomère, la cellule peut mourir par apoptose, arrêter son cycle cellulaire en entrant en sénescence ou acquérir des anomalies de structure chromosomale. La conséquence principale d'un dysfonctionnement des télomères dans les cellules mitotiques est le développement de cancer par génération d'une instabilité génomique. Certaines cellules cancéreuses acquièrent des mécanismes pour stabiliser leurs télomères et prévenir leur érosion en réactivant leur télomérase par exemple. D'autre part, le dysfonctionnement des télomères peut conduire au vieillissement. Un raccourcissement ou une dysfonction des télomères est reconnu comme une cassure double brin pouvant conduire à la sénescence répllicative (Rodier, Kim et al. 2005).

2. Les dommages à l'ADN

Le maintien et la stabilité du génome nécessite un contrôle par plusieurs processus cellulaires, notamment la réplication et la réparation de l'ADN ainsi que la progression du cycle cellulaire. Une cellule proliférative suit le cycle de prolifération cellulaire constitué de quatre phases majeures (**Figure 4**) : la phase S où se déroule la réplication de l'ADN; la phase M appelée mitose durant laquelle la cellule mère se divise en deux cellules filles avec séparation égale des chromosomes ; les phases G1 et G2 (gap) permettant la préparation de la cellule à l'entrée dans les phases suivantes, respectivement phase S et M. Le stade G0, en dehors du cycle cellulaire, est caractéristique d'une cellule qui ne se divise pas, processus réversible (à la différence de la sénescence) que l'on appelle la quiescence. Les trois premières phases du cycle, G1, S et G2, constituent l'interphase qui se distingue de la phase de division cellulaire, la mitose, durant laquelle la cellule perd son enveloppe nucléaire (**Figure 5**).

Le cycle cellulaire est finement régulé par des checkpoints permettant la transition ou non vers la phase suivante du cycle. Les complexes de kinases cycline-dépendantes (CDKs) et des cyclines permettent cette régulation fine. Le complexe CDK4-6/cycline D contrôle le cycle durant la phase G1 et les complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A contrôlent la transition de G1/S et la phase S.

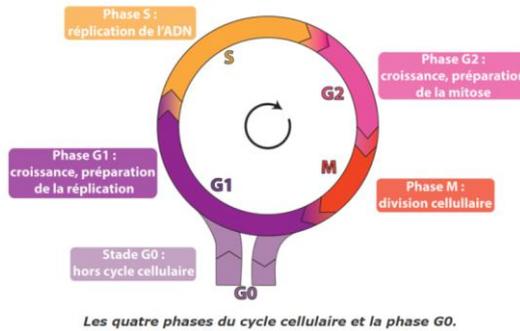


Figure 4 : Schéma illustrant le cycle cellulaire.

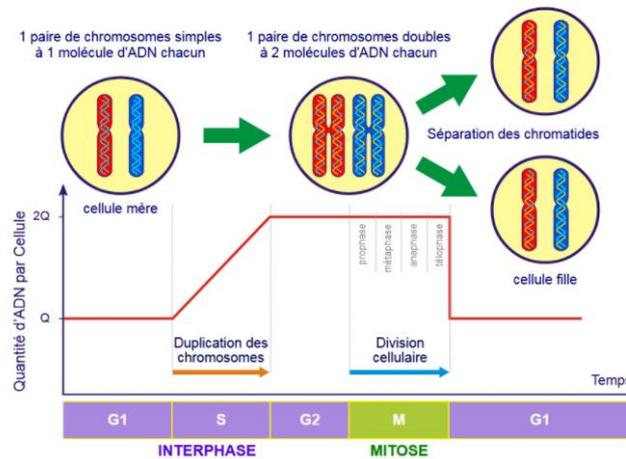


Figure 5 : Schéma illustrant l'évolution des chromosomes et de l'ADN au cours du cycle cellulaire.

2.1 Cassures double-brins et lésions simple-brin

Au cours de la vie, les cellules vont subir des stress intrinsèques et extrinsèques perturbant l'intégrité de leur génome. Pour se protéger des stress génotoxiques, les cellules possèdent des mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN appelées DDRs (DNA damage response). Ces réponses permettent de signaler un problème sur l'ADN pouvant conduire à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN ou à l'élimination de la cellule par apoptose lorsque les dommages sont trop sévères. Ainsi la cellule évite la transmission de son ADN endommagé aux cellules filles par réparation de l'ADN. Les voies de signalisation DDRs sont activées par des structures aberrantes de l'ADN reconnues par des protéines. L'ADN simple brin (**single-stranded DNA, ssDNA**) ou les cassures double brins d'ADN (**double-stranded DNA breaks, DSBs**) induisent une activation des DDRs. Chez les mammifères, les principales protéines recrutées dans les DDRs sont les kinases ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ATM- and Rad3-Related), et les DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase). Ces sérine/thréonine kinases appartiennent à la famille des kinases phosphatidylinositol-3-kinase-like (PIKKs). En réponse aux dommages à l'ADN, plusieurs protéines, sont phosphorylées par ATM et ATR. (Maréchal and Zou 2013).

ATM est recrutée sur les cassures de l'ADN à l'aide du complexe protéique MRN (**Figure 6A**). L'activation d'ATM à la suite des DSBs conduit à la phosphorylation de Chk2 (checkpoint kinase 2), p53 et de l'histone H2AX. Pour initier une réponse, ATM doit reconnaître la chromatine contenant des DSBs, cela se produit grâce à la protéine Mdc1 (DNA-damage checkpoint 1). Mdc1 se lie directement aux H2AX phosphorylées, γ H2AX, et il est requis pour la formation complète des foci γ H2AX. L'accumulation de γ H2AX se trouve à une centaine de kilobases du site de lésion et ces foci nucléaires se désassemblent une fois la lésion à l'ADN réparée par des phosphatases qui déphosphorylent γ H2AX. Des lésions rapidement réparées conduisent à des petits foci et les cassures d'ADN persistantes à de plus gros foci. La capacité de Mdc1 à lier γ H2AX et ATM permet de cibler ATM aux nucléosomes contenant les γ H2AX et à ATM de reconnaître la chromatine DSBs et ainsi de propager la phosphorylation de γ H2AX le long de la chromatine.

Le recrutement d'ATM à la chromatine peut être régulé par d'autres mécanismes (**Figure 6B**). L'acétyltransférase Tip60, interagit constitutivement avec ATM et peut être recrutée avec ce dernier aux DSBs. En réponse aux DSBs, Tip60 acétyle ATM induisant son activation. Tip60 activée interagit avec l'histone H3 triméthylée sur sa lysine 9 (H3K9me3), une marque d'histone associée à l'hétérochromatine. L'activation initiale d'ATM et des kinases Chk2 conduit à la dissocation de l'histone H3K9me3 induisant un relâchement de la chromatine autour des DSBs. Ceci expose la marque d'histone à Tip60 et stimule la fonction d'ATM. La phosphorylation de H2AX par ATM autour des DSBs met en action une cascade d'ubiquitylation et de SUMOylation pour promouvoir le recrutement de Brca1 et 53BP1. Ces dernières sont indispensables aux recombinaisons homologues des DSBs. En plus de leur fonction de régulation de réparation des DSBs, Brca1 et 53BP1 contribuent à une phosphorylation des substrats d'ATM et sont impliqués dans l'activation des checkpoints du cycle cellulaire (Maréchal and Zou 2013).

Lors d'exposition à de l'ADN simple brin (ssDNA), la protéine RPA (Replication protein A) permet le recrutement d'ATR. L'activité kinase d'ATR est augmentée par le complexe hétérotrimérique 9-1-1 composé de RAD9, RAD1 et HUS1 et de TOPBP1 (topoisomérase-II-binding protein 1).

Le recrutement d'ATR et ATM à un certain niveau déclenche des facteurs des DDRs sur le site de lésion. Une fois ce niveau atteint, ATM active Chk1 et Chk2 par phosphorylation qui vont diffuser dans le nucléoplasme et à leur tour activer d'autres substrats comme p53 (d'Adda di Fagagna 2008).

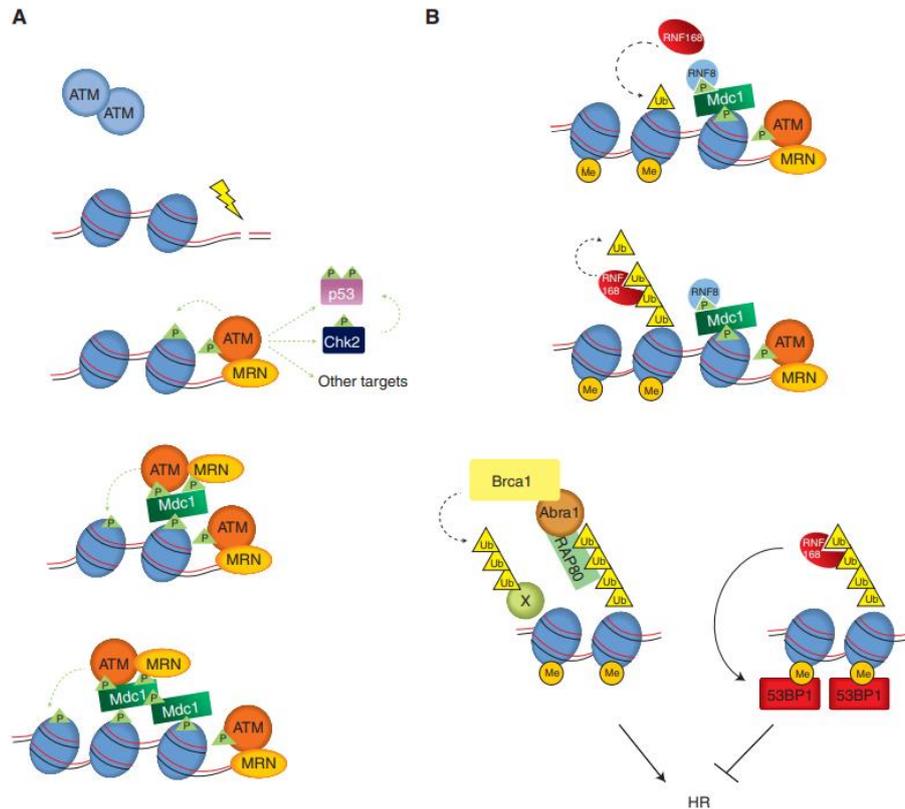


Figure 6 : Activation d'ATM par les cassures d'ADN double brins (Maréchal and Zou 2013)

2.2 Réparation par jonction des extrémités non-homologues : NHEJ

Dans les cellules de mammifères, les DSBs apparaissent avant la réplication de l'ADN et la première ligne de réparation est la jonction d'extrémités non-homologues (**Non-Homologous End-Joining, NHEJ**). Ce processus faisant participer la protéine ATM, est sujet à des erreurs mais c'est un moyen rapide et robuste de rejoindre les extrémités de l'ADN. Comme la fraction du génome humain codant des gènes est très faible, ce processus local de perte d'ADN est majoritairement tolérable.

2.3 Réparation par recombinaison homologue

Lorsque les DSBs sont générés durant la phase S au niveau des fourches de réplication de l'ADN ou durant la phase G2, une deuxième voie de réparation est possible : la **recombinaison homologue (RH)**. La RH est une voie sans erreur à la différence de la NHEJ. La recombinaison homologue requiert des séquences d'ADN homologues (chromatides sœurs) comme base de réparation mais aussi d'extrémité ssDNA pour rechercher des séquences homologues. Ce processus de réparation induit l'activation d'ATR et d'ATM (d'Adda di Fagagna 2008, Maréchal and Zou 2013, Ou and Schumacher 2018).

2.4 Extrémités des télomères : inductrices des DDRs

Les extrémités linéaires des télomères constituées de séquences répétées n'activent pas les DDRs bien qu'elles soient des extrémités physiques de l'ADN. Ce sont les complexes protéiques associés aux télomères qui inhibent les réponses DDRs. *In vitro* et *in vivo*, des études montrent que TRF2 et POT1, inhibent l'activité d'ATM et d'ATR respectivement. La réplication des télomères est incomplète conduisant au raccourcissement des télomères limitant la durée de vie des cellules humaines. Cependant, ce raccourcissement conduit progressivement à la perte des inhibiteurs d'ATM et d'ATR liés aux télomères. Lorsque le niveau de raccourcissement des télomères atteint un certain niveau cela déclenche des DDRs. (d'Adda di Fagagna 2008).

2.5 Rôle de p53 dans les DDRs

Le dommage à l'ADN va engendrer deux principaux résultats. Soit une réparation erronée qui conduit à des mutations ou à des aberrations chromosomiques altérant l'information génétique pouvant induire le développement de cancer. Soit un dommage à l'ADN persistant qui bloque la transcription et la réplication conduisant à l'apoptose ou à la sénescence cellulaire.

ATM transmet les signaux de dommage à l'ADN à p53. P53 est phosphorylée dans les cellules sénescents mais la phosphorylation est différente de celle retrouvée sur p53 dans les cellules avec dommage à l'ADN (Itahana, Dimri et al. 2001).

Le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle très important dans le contrôle de la prolifération cellulaire dans un contexte de dommages à l'ADN. Normalement, p53 est une protéine à courte durée de vie et son activité est finement régulée par différents processus, transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels. P53 est rapidement ubiquitinée par MDM2 (murine double minute 2) conduisant à sa dégradation protéosomale. Cependant, lors de dommages à l'ADN, p53 est stabilisé par les DDRs. Il est activé par des modifications post-traductionnelles comme sa phosphorylation sur la sérine 15 par ATM et ATR ou sur la serine 20 par Chk2. Ces phosphorylations interagissent avec la liaison entre p53 et MDM2 induisant une stabilisation et une accumulation de p53. Lors de réponse au dommage à l'ADN, p53 peut induire l'apoptose mais peut également induire l'arrêt du cycle cellulaire en activant transcriptionnellement le gène CDKN1A (cyclin-dépendent kinase inhibitor 1A), p21 qui inhibe des CDKs. L'arrêt du cycle cellulaire est important pour donner le temps à la cellule de réparer son ADN. (Ou and Schumacher 2018).

Tyner et al ont généré des souris p53^{+m} pour lesquelles, l'allèle m comprend une forme tronquée et hyperactive de p53. Le souris p53^{+m} sont hautement protégées des tumeurs mais ont un vieillissement accéléré. De plus, en fonction de l'âge, ces souris ont un nombre réduit de cellules

souches hématopoïétiques, ceci confirme qu'une activité augmentée de p53 peut conduire à une diminution de production des cellules progénitrices et des cellules matures différenciées à partir de cellules souches ce qui contribue à un phénotype vieillissant (Ou and Schumacher 2018).

3. Le stress oxydatif

En 1995, von Zglinicki et al remarquent que l'exposition à une hyperoxie (40% d'oxygène) des cellules WI-38, lignée cellulaire diploïde de fibroblastes humains dérivés de tissu pulmonaire de fœtus, conduit à un arrêt de la prolifération. Les fibroblastes restent cependant viables deux mois après cet arrêt qui devient irréversible 4-5 semaines après l'exposition à l'hyperoxie. Il y a une corrélation entre l'âge des cellules en culture, la durée d'exposition à l'hyperoxie et l'irréversibilité de l'arrêt de prolifération cellulaire. Les fibroblastes exposés au stress oxydatif (40 % d'oxygène durant 51 jours à passage 33) ont une augmentation de la fraction de cellules à ADN tétraploïde similaire à celle observée dans les fibroblastes sénescents (passage 44) reflétant une augmentation de cellules en phase G2 mais avec une majorité de cellules stoppées en G1. D'autres similarités sont observées entre ces deux populations de cellules en arrêt, elles ont une taille augmentée, une forme élargie et une augmentation de lipofuscine. Dans les cellules normales prolifératives, le raccourcissement des télomères est en moyenne de 90 paires de base (pb) par doublement de population (population doubling ou PD). Alors que dans les cellules exposées à l'hyperoxie et dans les cellules sénescents induites par les passages, il est de l'ordre de 500 pb par PD. L'augmentation du raccourcissement des télomères est associée à une augmentation significative des cassures simple-brin dans les télomères. Le raccourcissement des télomères induit par le stress oxydatif ou par la sénescence replicative conduit à une augmentation intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui produisent des dommages à l'ADN et peuvent suffire à l'activation de la voie p53. Ceci conduit à une réplication incomplète qui accélère le raccourcissement des télomères observé avec l'hyperoxie dans les cellules normales. Les auteurs concluent que le stress oxydatif peut accélérer la limite de Hayflick et le vieillissement par la génération de dommages aux télomères médiés par les radicaux libres (Lu and Finkel 2008).

La plupart des cellules dans notre corps sont exposées à 5 % d'oxygène alors qu'une fois mise en culture, elles sont exposées à 20 %. Packer et Fuehr ont montré que le nombre de capacité de doublement de population (PD) est influencé par le taux d'oxygène. En effet, les fibroblastes humains, WI-38, mis en culture avec 10% d'oxygène ont un PD augmenté par rapport aux cellules soumises à 20% d'oxygène et inversement, les cellules sous 50% d'oxygène ont une diminution des PD. Des expérimentations sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) mise en culture à 20% d'oxygène comparées à 3% d'oxygène ont 3-4 fois plus de dommages à l'ADN et entrent en

sénescence alors que celles sous 3% d'oxygène ne rentrent pas en sénescence (Parrinello, Samper et al. 2003). A 20% d'oxygène, les cellules de souris ont plus de dommages à l'ADN que les cellules humaines, ce qui montre une différence de sensibilité à l'oxygène entre les espèces. L'exposition au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sur plusieurs lignées primaires humaines induit un état semblable à celui de la sénescence réplivative avec un arrêt majoritaire en G1 et une augmentation de la protéine p53 et de l'expression de p21 (Chen, Fischer et al. 1995).

4. La sénescence cellulaire induite par activation d'oncogènes

La sénescence cellulaire peut également être induite par l'activation d'oncogènes on parle alors de sénescence induite par un oncogène (ou Oncogene-induced senescence : OIS). L'activation des oncogènes est une marque de transformation cellulaire et de cancers. Cependant, dans les cellules normales, cette activation induit l'OIS. C'est un mécanisme onco-suppresseur qui empêche la cellule de poursuivre le cycle cellulaire. Ce type de sénescence est indépendant du raccourcissement des télomères. L'OIS induit une activation de la réponse aux dommages à l'ADN et ces réponses sont différentes de celles induites par le raccourcissement des télomères. (d'Adda di Fagagna 2008).

4.1 La voie Ras

Ras est l'oncogène le plus important dans les cancers humains où il est amplifié et activé constitutivement à la suite de mutations. La prévalence des mutations de *Ras* est de 20 % dans les tumeurs humaines. *Ras* est impliqué dans la prolifération, la survie, la génération de stress oxydatif et les modifications du cytosquelette. L'activation de *Ras* se produit par le recrutement à la membrane avec d'autres protéines, qui reconnaissent des sites de tyrosines phosphorylées sur les récepteurs de facteurs de croissance. Dans la transformation des cellules primaires de rongeurs, *Ras* et un autre oncogène, *c-Myc*, sont surexprimés.

Zhu et al ont induit une surexpression de *Ras* dans des fibroblastes humains primaires, des fibroblastes embryonnaires primaires de souris et des fibroblastes immortels de rats par l'infection avec un rétrovirus contenant l'allèle activé de *Ras*, H-rasV12. L'induction de *Ras* dans ces cellules induit un élargissement des cellules et dès 3 jours un arrêt du cycle cellulaire principalement en G1. Les cellules ont un phénotype similaire à celui des cellules sénescentes car elles restent adhérentes et élargies pendant un mois et ont une activité β -galactosidase augmentée. Les auteurs différencient cet arrêt de la quiescence cellulaire où l'on ne retrouve pas la surexpression des onco-suppresseurs. Cette étude montre que l'induction de *Ras* dans les fibroblastes normaux induit une sénescence cellulaire et non pas une transformation. L'induction de sénescence par *Ras* est accompagnée d'une

surexpression de $p16^{INK4a}$ et de $p19^{ARF}$ et d'une activation de *Rb* et *p53*. Les expressions de *p53*, *p21* et *p16* sont augmentées de 10 à 20 fois par rapport aux cellules contrôles. L'inactivation de *Rb* inhibe l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire provoquée par la surexpression de *Ras*. De plus, l'inactivation de *p53* ou *p16* dans les MEFs ou dans les fibroblastes de rats qui ont *Ras* activé continuent de proliférer. Ceci montre que *p53* et *p16* sont essentiels pour l'arrêt de prolifération des MEFs induite par *Ras*. En revanche, dans les fibroblastes humains IMR90, *p53* et *p16* ne sont pas indispensables à l'arrêt du cycle induit par *Ras*. Dans la sénescence cellulaire induite par *Ras*, l'activation de la voie Raf/Mek/Erk joue un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire.

L'activation de *Raf* dans les fibroblastes humains IMR-90 conduit aussi à un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire. Dans ce cas, cet arrêt conduit à l'expression de *p21* et *p16* mais l'ablation de *p53* et *p21* n'empêche pas l'induction de sénescence. Cependant cet arrêt peut être provoqué par une expression ectopique de *p16* seul (Zhu, Woods et al. 1998). L'induction de la sénescence par *Raf* est indépendante de *p53* et dépendante de *p16* (Yaswen and Campisi 2007).

L'OIS induit des dommages à l'ADN, probablement en augmentant l'expression des régulateurs de la phase S et induit une phosphorylation de *p53* en réponse aux dommages à l'ADN. Dans ce cas, l'inhibition de MDM2 induit la stabilisation de *p53*. PRAK, une kinase sous-jacente à la voie MAPK (mitogen-activated protein kinases) est essentielle dans la sénescence induite par *Ras*. La surexpression de *PRAK* induit la suppression de la prolifération cellulaire. *PRAK* est requis pour l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de *p53* qui est stimulée par *RAS* en phosphorylant directement *p53* sur un résidu différent de celui ciblé dans la réponse aux dommages à l'ADN.

L'augmentation d'expression de *Ras* (mais pas *Raf*) est associée à une augmentation intracellulaire des ROS et ainsi à une réponse de dommages à l'ADN activant la voie *p53*. L'augmentation des ROS semble être importante pour l'induction de la sénescence cellulaire car les cellules mise en culture avec de faible taux d'oxygène ou traitées par l'antioxydant, NAC (N-acétylcystéine) bloquent leur entrée en sénescence induite par *Ras* (Lee, Fenster et al. 1999).

4.2 La voie Myc

L'oncogène *Myc*, comme *Ras* est très fréquemment activé dans les cancers humains. L'activation de *Myc* réprime *CDK2* et induit un arrêt du cycle cellulaire par l'induction de $p21^{CIP1}$ et $p16^{INK4a}$. *Myc* induit également la sénescence par l'activation des DDRs avec l'induction de *p53* et *Rb* (d'Adda di Fagagna 2008). L'apoptose induite par *Myc* serait complémentaire à l'OIS pour échapper au développement des tumeurs (Lee, Schmitt et al. 2011).

5. Les suppresseurs de tumeurs

Des mutations fréquemment retrouvées dans les cancers humains induisent l'inactivation des suppresseurs de tumeurs p53 et p16. Dans les cellules humaines, l'inactivation de p53 et/ou de p16 facilite le processus d'immortalisation. A l'inverse, les voies p53 et p16 sont induites dans le processus de la sénescence cellulaire.

5.1 La voie p16^{INK4a}/Rb

La protéine Rb est le principal substrat des kinases CDK4-6/cyclineD. Sous sa forme non phosphorylée, Rb est associée à plusieurs facteurs de transcription qui l'inactive. Le facteur de transcription qui régule le plus Rb est E2F qui active aussi la transcription des cyclines A et E. Rb phosphorylée par les kinases CDK4-6/D libère E2F pour activer la synthèse d'ADN de ses gènes cibles (**Figure 7**), (Bringold and Serrano 2000) (Rayess, Wang et al. 2012). P16 est un inhibiteur des kinases CDK4/6 ce qui permet le maintien de la protéine du rétinoblastome (Rb) sous sa forme non phosphorylée ce qui empêche la poursuite du cycle cellulaire avec un arrêt en phase G1. P16 est inactivé dans 30% des tumeurs humaines. Comme p53, il n'a pas de rôle évident dans le développement normal ou le contrôle du cycle cellulaire mais il est un puissant suppresseur de tumeurs. Les souris déficientes pour p16 sont viables mais développent des tumeurs (Serrano, Hannon et al. 1993, Bringold and Serrano 2000).

Le gène *p16^{INK4}* a été isolé en 1993. Le locus humain CDKN2A est localisé sur le chromosome 9p21 et code pour les suppresseurs de tumeurs p16 et ARF (p14^{ARF} chez l'humain et p19^{Arf} chez la souris). La protéine p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) permet l'induction de p16^{INK4A}, la protéine AUF1 régule négativement la stabilité de l'ARNm de p16^{INK4A}. Les protéines T box, les histones déacétylases et les régulateurs de transcription E2F1 et c-MYC répriment l'expression de p16^{INK4A} (Mirzayans, Andrais et al. 2012). P16 est transcriptionnellement suractivé dans la réponse au stress oncogénique induisant la sénescence et son expression augmente avec les doublements de population. L'inactivation de la voie p16^{INK4A}-Rb conduit à l'allongement de la durée de vie et à la transformation cellulaire (Bringold and Serrano 2000).

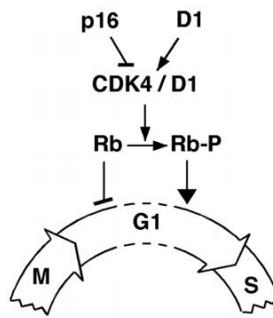


Figure 7 : La voie p16/Rb régule la progression du cycle cellulaire en phase G1 (Serrano 1997).

5.2 La voie p19^{ARF}/p53/p21^{Cip1}

La protéine suppresseur de tumeur p53 est inactivée dans environ la moitié des cancers humains. L'activation de p53 implique des modifications post-traductionnelles induisant sa phosphorylation et son acétylation, ce changement de conformation permet sa liaison à l'ADN et la transactivation. Il existe plusieurs cibles de p53 impliquées dans différents mécanismes comme l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Le niveau de p53 est déterminé principalement par son ubiquitination et la dégradation protéolytique qui s'ensuit. L'enzyme ubiquitine ligase de type E3, MDM2, majeure pour p53 est codée par le gène oncogène *MDM2*. L'activité transcriptionnelle de p53 est progressivement activée par l'accumulation du doublement de population.

Les souris délétées pour p53 ont un développement normal mais ont une susceptibilité augmentée au développement de tumeur. P53 n'est pas requis pour la croissance normale des cellules mais il agit pour la prévention de prolifération dans des conditions de stress cellulaire. En effet, p53 est augmenté à la suite de dommages à l'ADN et d'expositions aux stress cellulaires. L'inhibiteur de kinases cycline-dépendantes, p21^{Cip1} est transcriptionnellement activé par p53 et contribue à l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de p53.

Comme vu précédemment, le locus *CDKN2A* code également pour ARF (p19^{ARF}). Les gènes p19^{ARF} et p16^{INK4a} ont chacun leur promoteur et produisent deux transcrits différents : le transcrit p19^{ARF} constitué des exons 1 β , 2 et 3 et le transcrit p16^{INK4a} des exons 1 α , 2 et 3. Les exons communs 2 et 3 ne sont pas lus avec le même cadre de lecture donc les protéines codées n'ont aucune homologie dans leur séquence d'acides aminés. p19^{ARF} s'oppose à l'activité inhibitrice de MDM2 sur p53, sa sur-expression conduit donc à la stabilisation de p53. p19^{ARF} est aussi transcriptionnellement activé par l'accumulation du doublement de population et l'induction de l'arrêt du cycle car celui-ci requiert l'activité fonctionnelle de p53 qui active p21^{Cip1} (Bringold and Serrano 2000).

5.3 La voie PTEN/p27^{Kip1}

Une autre voie suppresseur de tumeur existe, la voie PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) qui est la phosphatase qui catalyse le 3,4,5-triphosphate (PIP₃) en PIP₂ et qui a le rôle inverse de la kinase PI3-kinase (PI3K). La perte de PTEN est retrouvée dans plusieurs cancers humains et résulte en l'inactivation de p53 ou p16^{INK4a} /p19^{ARF}. L'activation de PI3K est oncogénique et est retrouvée dans le cancer ovarien par exemple. L'inactivation de PI3K ou l'activation de PTEN conduit à la surexpression de p27^{Kip1}, inhibiteur des CDKs. p27^{Kip1} est déstabilisé par sa phosphorylation notamment par CDK2. Le traitement de fibroblastes humains avec des inhibiteurs de PI3K accélère l'entrée en sénescence. De plus, la protéine p27^{Kip1} est accumulée dans des fibroblastes murins sénescents et diminuée dans les tumeurs humaines (Bringold and Serrano 2000). PTEN régule la stabilité de p53 et p53 améliore la transcription de PTEN. Chen et al ont montré que l'inactivation conditionnelle de p53 diminue le phénotype tumoral dans la prostate et l'inactivation de PTEN conduit rapidement au cancer. La double inhibition de PTEN et p53 diminue fortement la survie et les tumeurs induites sont plus volumineuses (Chen, Trotman et al. 2005).

II/ Caractéristiques d'une cellule sénescence

1. Les voies de signalisation marqueurs de la sénescence cellulaire

1.1 La réponse aux dommages à l'ADN

Les dommages à l'ADN qui conduisent à l'activation des DDRs induisent la sénescence cellulaire. Le recrutement de la kinase ATM au site de lésions de l'ADN conduit à la phosphorylation de H2AX qui facilite la réparation. La persistance des DDRs induit la phosphorylation de p53 ce qui lui permet d'induire la transcription de plusieurs gènes. Les protéines γ H2AX et p53 phosphorylées sont souvent utilisées comme marqueurs de la sénescence. Mais ces marqueurs ne sont pas universels à toutes les cellules sénescences (Hernandez-Segura, Nehme et al. 2018).

1.2 Les inhibiteurs de CDKs et l'arrêt du cycle cellulaire

Les inhibiteurs des CDKs, p16 et p21 peuvent être utilisés comme marqueurs de la sénescence cellulaire (**Figure 8**). L'activation transcriptionnelle de p16 est utilisée comme marqueur de sénescence dans les cellules. La méthyl-transférase DNMT3b (DNA méthyltransférase 3b) est responsable de la méthylation *de novo* du promoteur p16, DNMT1 maintient la méthylation existante. Les complexes du groupe polycomb 1 et 2 (PRC1 et PRC2) sont responsables des modifications d'histones réprimant le locus CDKN2A. La déméthylation du promoteur de p16 est associé à un phénotype sénescence. Des facteurs de transcription comme Sp1, Ets, AP1 (en particulier la sous unité JunB) et PPAR γ se lient au promoteur de p16 et déclenchent sa transcription. A l'inverse, ITSE (INK4A transcription silence element), YB1, ID1 et AP1 (sous unité c-Jun) répriment l'activation de p16. Les protéines hnRNP A1 et A2 (RNA-binding proteins) stabilisent les transcrits de p16 alors que la protéine ribonucléaire AUF1 conduit à leur dégradation.

L'affinité de p16 à CDK4 peut être modulée par la phosphorylation de la sérine 140 et la méthylation de l'arginine 138. La poly-ubiquitination de la protéine p16 conduit à sa dégradation potéosomale (Hernandez-Segura, Nehme et al. 2018).

P21 est une protéine de 18kDa qui est capable d'inhiber plusieurs CDKs et qui est aussi nécessaire dans la progression du cycle cellulaire. P21 est constamment sur-régulée en réponse aux différents stimuli induisant la sénescence. Son expression fait partie des réponses DDRs et est principalement régulée par une transactivation directe via p53. P21 peut aussi être activée de façon indépendante de p53 par la voie TNF- β utilisant Sp1 comme principale facteur de transcription.

D'autres mécanismes de régulation de p21 existent, comme une répression transcriptionnelle par c-Myc; le contrôle de la stabilité de son ARNm par la liaison de miARNs (micro-ARN); la phosphorylation via par exemple Akt1/PKB, PKA ou PKC et la dégradation protéosomale via l'ubiquitine ligase E3. AUF1 cible également les ARNm de p21 directement ou indirectement en induisant la dégradation de ces régulateurs comme p53 et c-Myc (Hernandez-Segura, Nehme et al. 2018).

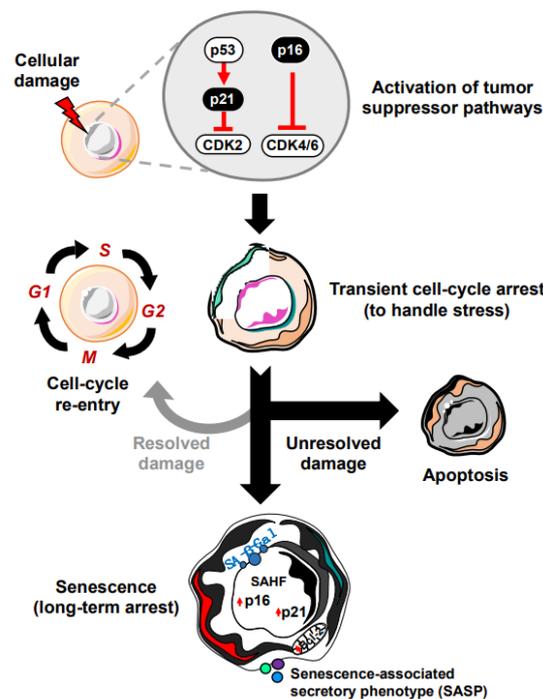


Figure 8 : Induction des suppresseurs de tumeurs induisant l'arrêt du cycle cellulaire caractéristique des cellules sénescences (Prieto, Graves et al. 2020).

1.3 La résistance à l'apoptose

Les cellules sénescences deviennent résistantes à l'apoptose. A la suite d'un traitement induisant l'apoptose, les cellules sénescences sont incapables de diminuer le niveau de la protéine anti-apoptotique BCL-2 à cause de l'activation chronique du facteur de transcription CREB (cAMP response element-binding protein) qui empêche l'inhibition de BCL-2. Les membres de la famille de BCL-2, spécifiquement les anti-apoptotiques BCL-XL et BCL-W, sont essentiels pour la survie des cellules sénescences, ils sont transcriptionnellement sur-régulés durant la sénescence cellulaire. L'induction d'expression des membres de la famille anti-apoptotique BCL-2 peut donc être un moyen d'identification des cellules sénescences (Hernandez-Segura, Nehme et al. 2018).

1.4 Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)

Les cellules sénescents ont pour particularité d'être métaboliquement très actives et produisent le phénotype sécrétoire associé à la sénescence ou SASP (senescence-associated secretory phenotype). Le SASP a été décrit par l'équipe de J. Campisi en montrant que les cellules sénescents induites par passages répétés, par les radiations ionisantes ou encore par l'expression de l'oncogène RAS, produisent des facteurs associés à l'inflammation et au développement de cancer. Le SASP est constitué de nombreuses protéines comme les cytokines et chimiokines (par exemple IL-6 et IL-8), les facteurs de croissance (comme GRO, HGF, IGF1), les protéines de la matrice extracellulaire comme les protéases (MMPs), ou des protéines de surfaces cellulaires comme les ICAMs (Coppé, Patil et al. 2008). Le SASP est très hétérogène et est régulé à différents niveaux rendant son identification complexe.

1.4.1 Induction et modulation du SASP

La plupart des composants du SASP sont augmentés au niveau de leur ARNm. Les gènes pro-inflammatoires exprimés durant la sénescence cellulaire requièrent l'activation de NF- κ B et C/EBP β (famille des CCAT/Enhancer Binding Protein) qui régulent plusieurs composants du SASP comme IL-1 β , IL-6, IL-8 et GRO α . C/EBP β est augmenté durant la sénescence induite par oncogène et est retrouvé lié au promoteur de l'IL-6 dans ce contexte.

Le capteur d'ADN cytosolique cGAS joue un rôle dans l'activation du SASP liée aux dommages à l'ADN. cGAS induit la production du second messenger cGMP qui active la protéine adaptatrice STING, une activatrice de NF- κ B. Indépendamment de cGAS, STING peut également être activée par une voie non-canonique, impliquant p53 et l'ubiquitine ligase E3 TRAF6 et active NF- κ B (Lopes-Paciencia, Saint-Germain et al. 2019).

Le SASP est induit par les dommages à l'ADN mais nécessite une activation des DDRs de manière persistante. L'activation de la voie p38MAPK est rapide et perdure à la suite d'un stress, p38MAPK active les voies p53 et pRb/p16. L'inhibition de p38MAPK retarde modérément la sénescence répllicative et son activité est requise pour l'induction de sénescence induite par l'oncogène RAS. L'activation de p38MAPK est requise pour l'induction du SASP car son inhibition réduit le SASP induit par des stress génotoxiques ou par l'activation de l'oncogène RAS. L'activation de p38MAPK induit le SASP sans induire l'activation d'ATM et Chk2 et la délétion de ces derniers n'a pas d'effet sur l'induction du SASP par p38MAPK. Pour induire NF- κ B dans la sénescence, p38MAPK et ATM sont requis car dans les cellules sénescents, l'activation de la voie p38MAPK n'est pas suffisante pour induire la phosphorylation de NF- κ B. La régulation du SASP par p38MAPK passe donc par l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Freund, Patil et al. 2011).

L'IL-1 α est une cytokine qui régule sa propre synthèse par une boucle de rétroaction positive autocrine médiée par les récepteurs, entraînant l'activation de NF- κ B. L'IL-1 α est aussi un régulateur positif de l'expression de l'IL-6 et l'IL-8 dans les cellules sénescences humaines. La diminution de l'activation de la voie IL-1 α réduit les niveaux d'IL-6 et IL-8 et les activités transcriptionnelles de NF- κ B et C/EBP β (Freund, Orjalo et al. 2010).

NF- κ B induit l'expression de cytokines inflammatoires mais d'autres voies régulent également le SASP. La voie JAK2/STAT3 régule différentes cytokines comme CXCL1/CXCL2, GM-CSF, M-CSF, IL-10 et IL-13.

Au niveau post-transcriptionnel, mTOR régule le SASP par deux mécanismes. D'une part, en induisant la traduction de l'IL-1 α qui active NF- κ B et C/EBP β et d'autre part, indirectement par inhibition de la protéine ZFP36L1, prévenant la dégradation des ARNm des éléments du SASP.

La transcription des gènes du SASP peut aussi être dépendante de modifications épigénétiques. Par exemple, des marqueurs suppresseurs comme H3K9me2 sont réduits sur les promoteurs d'IL-6 et IL-8, les deux composants majeurs du SASP (Hernandez-Segura, Nehme et al. 2018).

1.4.2 Effet paracrine du SASP

Les molécules du SASP sécrétées peuvent avoir un effet autocrine c'est-à-dire agissant sur la cellule qui produit ces molécules. Cependant, la plupart des facteurs du SASP ont un effet sur des cellules voisines (paracrine). Plusieurs membres du SASP sont des protéines solubles qui sont directement sécrétées dans l'espace extracellulaire. Cette sécrétion permet aux cellules sénescences d'avoir un effet à distance parfois par le biais de vésicules extracellulaires (Hernandez-Segura, Nehme et al. 2018). Par exemple, l'inhibition de la caspase 1 ou du récepteur à l'IL-1 réduit l'expression du SASP et prévient partiellement la sénescence induite par oncogène (OIS) à travers l'inhibition de la sénescence paracrine. *In vivo*, le SASP peut causer la sénescence cellulaire et a un effet suppresseur de tumeur de manière paracrine (Acosta, Banito et al. 2013).

1.4.3 Fonctions du SASP

Les facteurs du SASP sont connus pour jouer un rôle dans les processus biologiques normaux dans le développement des structures embryonnaires puis chez l'adulte dans le remodelage et la réparation des tissus et également un rôle dans l'immunité. Les effets du SASP peuvent être bénéfiques par le renforcement de la sénescence cellulaire et permettent l'élimination des cellules sénescences par les cellules immunitaires afin d'améliorer la réparation des tissus.

Le SASP a également des effets délétères avec un effet pro-tumoral par l'induction de la prolifération, de l'angiogenèse ou de la transition épithélio-mésenchymateuse. Une production chronique du SASP conduit à des défauts de remodelage tissulaire dans les maladies liées à l'âge et à une inflammation importante.

Le SASP est majeur dans l'activité des cellules sénescentes et sa quantification peut apporter des informations sur le rôle des cellules qui le produisent par exemple, une réparation tissulaire marquée par la production de MMPs et de facteurs de croissance, tels que le PDGF-A et le VEGF (Hernandez-Segura, Nehme et al. 2018).

2. Les altérations morphologiques : marqueurs de la sénescence cellulaire

2.1 Les modifications morphologiques

Dès la découverte des cellules sénescentes par Hayflick en 1961, il les décrit comme élargies et étalées avec une forme irrégulière (**Figure 9**). La voie mTOR est importante dans l'élargissement du corps cellulaire, mTORC1 intègre les signaux de stress et module la croissance cellulaire. Le changement de la forme cellulaire est principalement induit par des réarrangements du cytosquelette, notamment les filaments de vimentine (Hwang, Yoon et al. 2009).

2.2 Composition de la membrane plasmique

Le changement le plus important dans la composition de la membrane plasmique est l'augmentation de la cavéoline-1 un composant des microdomaines enrichis en cholestérol, les cavéoles (**Figure 9**). La voie p38MAPK régule positivement cavéoline-1 à des niveaux transcriptionnels et post-traductionnels. D'autres protéines de la membrane plasmique ont été identifiées dans des études protéomiques associées à la sénescence mais des études complémentaires doivent être effectuées pour comprendre leur effet mécanistique.

2.3 Augmentation du contenu lysosomal

Le lysosome est l'organite cellulaire consacré à la dégradation de toutes les molécules de la cellule (lipides, polysaccharides, acides nucléiques, protéines). Il existe deux voies de dégradation via le lysosome. La première, l'endocytose qui permet la destruction de protéines extracellulaires par la formation d'endosomes, processus utilisé dans le cas de pinocytose ou de phagocytose. La seconde concerne les protéines intracellulaires apportées au lysosome par l'autophagosome par le processus

d'autophagie. La capacité de dégradation des lysosomes vient de la présence d'enzymes hydrolases, apportées du Golgi par des vésicules. Ces hydrolases sont des protéases, lipases, phospholipases, peptidases, glycosidases et nucléases qui ne sont actives qu'à pH4,5 ou 5. Dans les cellules sénescents, les protéines lysosomales sont augmentées (**Figure 9**).

2.3.1 Activité β -Galactosidase augmentée

L'enzyme β -Galactosidase fait partie des ces hydrolases et permet l'hydrolyse des β -galactosides en monosaccharides. Dans les cellules sénescents, son activité est augmentée (senescence-associated beta-galactosidase = SA- β gal). De plus, son activité est utilisée comme marqueur de sénescence cellulaire car elle devient active à pH6, au lieu de pH4.5 ou 5 dans les cellules normales. La coloration bleu obtenue par clivage du substrat X-Gal à pH6 permet de quantifier le nombre de cellules sénescents (Dimri, Lee et al. 1995).

2.4 Accumulation des mitochondries

Une autre particularité des cellules sénescents est qu'elles ont un grand nombre de mitochondries. Celles-ci ont un potentiel membranaire diminué ce qui provoque le relargage d'enzymes et l'augmentation de la production des ROS (**Figure 9**) (Passos, Saretzki et al. 2007).

2.5 Réorganisation de la chromatine et modifications nucléaires

Les noyaux des cellules sénescents sont de taille augmentée. La protéine structurale de la lamina nucléaire, la lamine B1 est diminuée dans les cellules sénescents. La déstabilisation de la membrane nucléaire conduit à la formation de fragments de chromatine cytoplasmiques (CCFs) qui sont riches en marques épigénétiques associées aux dommages à l'ADN (Ivanov, Pawlikowski et al. 2013). Une autre caractéristique nucléaire retrouvée dans les cellules sénescents, particulièrement dans l'OIS, est la présence de focus d'hétérochromatine (senescence-associated heterochromatin foci [SAHFs]) contenant de la chromatine réprimée (**Figure 9**) (Chandra, Kirschner et al. 2012, Chandra and Kirschner 2016).

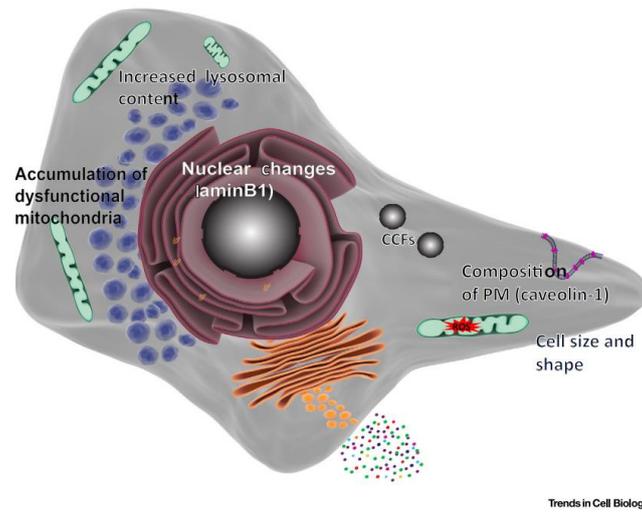


Figure 9 : Modifications nucléaires et cytosoliques caractéristiques des cellules sénescents (Hernandez-Segura, Nehme et al. 2018).

III/ La sénescence cellulaire et physiopathologie

L'induction d'une sénescence transitoire à la suite du remodelage d'un tissu est bénéfique car elle permet d'éliminer les cellules endommagées. La sénescence cellulaire et l'apoptose sont primordiales dans l'élimination des cellules endommagées qui s'accumulent dans le cas de cancer ou de vieillissement. A l'inverse une sénescence persistante avec l'accumulation de cellules sénescents est délétère car elles empêchent la régénération normale du tissu (d'Adda di Fagagna 2008).

1. Sénescence cellulaire et développement embryonnaire

La sénescence cellulaire joue un rôle dans le développement de l'embryon chez les mammifères à différents niveaux. Ceci a été mis en évidence par exemple dans la mise en place du sac endolymphatique, des plaques crâniennes ou encore dans la fermeture du tube neural. Pour la plupart de ces structures, des marqueurs de sénescence ont été mis en évidence comme l'activité β -galactosidase, l'absence du marqueur de prolifération Ki67, l'augmentation de marqueurs d'hétérochromatine comme le H3K9me3 et l'augmentation des inhibiteurs du cycle cellulaire (p15, p21 et p27). L'absence de marqueurs de dommage à l'ADN est à noter dans ces structures. La sénescence cellulaire couplée à l'apoptose est importante durant les phases de développement embryonnaire. La sénescence cellulaire permet notamment d'éliminer les structures transitoires embryonnaires et de réguler le ratio des différentes populations cellulaires au sein d'une même structure.

2. Sénescence cellulaire : Effets bénéfiques

La sénescence cellulaire permet de limiter la division de cellules ayant des dommages et ainsi de limiter leur prolifération dans un tissu. Elle permet le maintien des fonctions et des structures des tissus à la suite d'une lésion. D'autre part une cellule qui devient sénescents par accumulation de dommage est éliminée par les cellules immunitaires. Cela est dû à la reconnaissance directe des cellules sénescents par les cellules T helper et par le recrutement des cellules phagocytaires attirées par les éléments du SASP. L'immuno-surveillance des cellules sénescents est essentielle pour limiter les conditions pathologiques et le vieillissement.

De plus, la sénescence cellulaire est connue pour participer à l'échappement au cancer. En effet, à un certain niveau d'activation des voies des oncogènes au début de la tumorigenèse, les voies suppresseurs de tumeurs comme la voie p16 et p53 s'activent pour prévenir de l'expansion de cellules pré-cancéreuses (Muñoz-Espín and Serrano 2014, Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).

La sénescence peut avoir également des effets positifs dans certaines pathologies. Par exemple dans la fibrose du foie, les cellules stellaires hépatiques deviennent actives et prolifèrent en myofibroblastes. Ces myofibroblastes deviennent sénescents et produisent une cicatrice fibrosée composée d'éléments de la matrice extracellulaire. La sénescence cellulaire permet également une élimination des cellules stellaires hépatiques sénescents par les cellules NK (natural killer). La production d'IL-22 par les cellules stellaires hépatiques activées induit la sénescence cellulaire par l'activation de la voie p53 à travers STAT3-SOCS3 et augmente la production des MMPs. Les souris transgéniques surexprimant IL-22 dans le foie ont une rémission plus efficace et plus rapide (Kong, Feng et al. 2012, Muñoz-Espín and Serrano 2014).

3. Sénescence cellulaire : Effets délétères

Les cellules sénescents s'accumulent avec l'âge et contribuent à l'altération de l'homéostasie des tissus. Ces cellules perturbent la fonction normale des tissus en sécrétant le SASP qui permet le recrutement de cellules inflammatoires et qui remodelent la matrice extracellulaire.

La sénescence cellulaire est liée à de nombreuses pathologies liées à l'âge comme, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, l'ostéo-arthrite, le cancer, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou la fibrose idiopathique pulmonaire (**Figure 10**).

En 2009, Wang et al. montrent que la sénescence induite par le stress dans les fibroblastes d'embryons de souris (MEFs) est accompagnée d'une induction significative des foci γ H2AX. Dans le foie de souris âgées, la fréquence de cellules positives à la β -galactosidase corrèle à la fréquence des cellules positives aux foci γ H2AX. Dans les souris C57Bl6 mâles de 12 à 42 mois, la fréquence de cellules positives aux foci γ H2AX augmente avec l'âge dans le poumon, la rate, le derme, le foie et l'épithélium intestinal. Dans la peau et l'intestin, ces foci ne co-localisent pas avec les télomères. Dans les entérocytes des cryptes intestinales, l'augmentation des foci γ H2AX corrèle avec l'âge et ces entérocytes ne sont pas en apoptose mais sénescents. Les auteurs suggèrent que la fréquence des dommages à l'ADN induisant la sénescence augmente avec l'âge et de façon indépendante des télomères. Ceci montre un lien entre l'apparition de cellules sénescents et le vieillissement (Wang, Jurk et al. 2009).

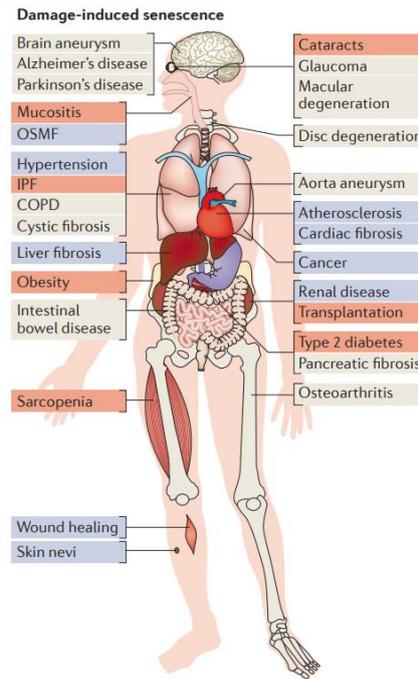


Figure 10 : La sénescence cellulaire impliquée dans de nombreuses pathologies humaines liées à l'âge : en bleu avec des effets bénéfiques, en rouge délétères et en blanc indéterminés (Muñoz-Espín and Serrano 2014).

Dans les tissus normaux, au cours du vieillissement, les marqueurs de dommages à l'ADN sont de plus en plus nombreux (d'Adda di Fagagna 2008). La sénescence cellulaire peut affecter la régénération des tissus en limitant le potentiel prolifératif des cellules progénitrices ou des cellules souches. Par exemple, les cellules musculaires progénitrices accumulent des dommages au niveau de l'ADN et une expression de p16 augmentée. Elles entrent en sénescence et ne sont plus capables de contribuer à la régénération du muscle à la suite d'une lésion (Sousa-Victor, García-Prat et al. 2015). Avec l'âge, les individus ont dans leur circulation une augmentation des molécules inflammatoires. Cette inflammation liée au vieillissement est un facteur de risque pour les maladies chroniques liées à l'âge comme les maladies pulmonaires, cardiovasculaires ou certains cancers, elle contribue également à la perte de poids. Le SASP qui est responsable de l'inflammation peut induire un grand nombre d'effets biologiques qui peuvent être bénéfiques mais aussi délétères (**Figure 11**).

Le SASP peut contribuer au dysfonctionnement de plusieurs organes, l'augmentation de l'IL-6, de l'IL-1RA (IL-1 receptor antagonist) et du récepteur au TNF peuvent être des prédictors de maladies chroniques chez les personnes âgées (Fabbri, An et al. 2015, Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).

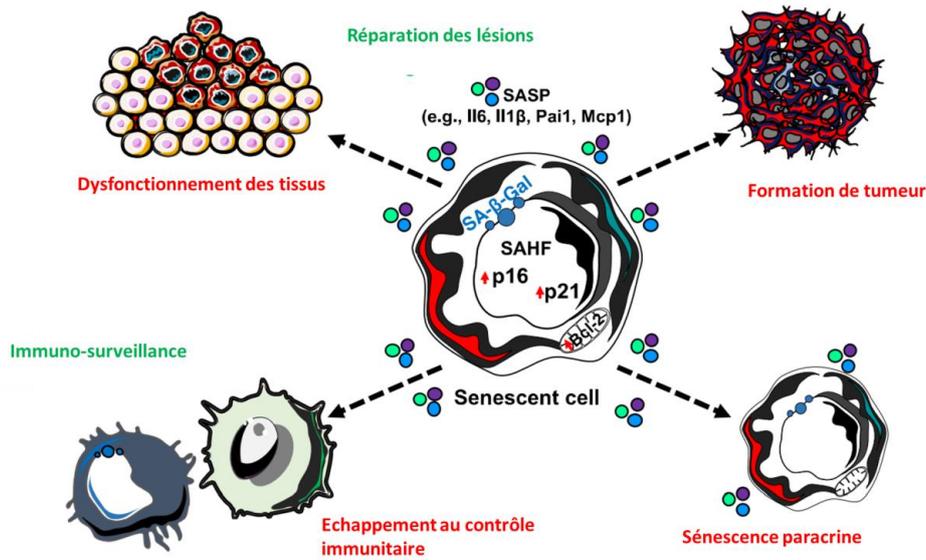


Figure 11 : Les effets bénéfiques (en vert) et néfastes (en rouge) du SASP. (Prieto, Graves et al. 2020)

Des études sur un modèle murin de vieillissement, des souris déficientes pour la protéine de contrôle mitotique BUBR1 (codée par le gène *Bub1b*), ont renforcé le lien entre la sénescence cellulaire et le vieillissement. Chez les souris *Bub1b* ^{-/-}, les muscles squelettiques ou le tissu adipeux sont prématurément âgés et ont un grand nombre de cellules positives pour p16. L'inactivation génétique de p16 chez ces souris permet de bloquer l'apparition de cellules sénescents et de diminuer le phénotype de ces souris comme la sarcopénie, la lipodystrophie ou la cataracte (Baker, Perez-Terzic et al. 2008).

3.1 Elimination génétique des cellules sénescents

Il a été montré que l'élimination des cellules sénescents permettait de prolonger la durée de vie des souris. Les souris transgéniques p16-ATTAC (ou INK-ATTAC) expriment une protéine de fusion FKBP-Casp8 (FK506-binding-protein-caspase8) et la protéine fluorescente GFP (green fluorescent protein) sous le contrôle du promoteur *Inka* (promoteur de p16). Chez ces souris, l'administration de l'AP20187 active FKBP et Casp8 ce qui induit l'élimination des cellules sénescents positives pour p16 par apoptose dans différents organes exceptés le colon et le foie. Cette élimination des cellules positives pour p16 permet d'augmenter la durée de vie et permet également de diminuer le nombre de glomérules sclérosés améliorant les fonctions rénales et les fonctions cardiaques (Baker, Childs et al. 2016).

Un autre modèle de souris permettant l'élimination des cellules sénescents est le modèle p16-3MR. Ce modèle utilise un vecteur lentiviral qui exprime constitutivement des protéines de fusion « reporter-killer » (3MR) qui sont : la luciférase Renilla, la protéine monomérique de fluorescence rouge et une thymidine kinase tronquée de l'herpès simplex virus sous le contrôle d'un promoteur p16. Dans ce modèle, les cellules qui expriment p16 sont éliminées par le ganciclovir, qui se convertit en chaîne d'ADN terminateur toxique par la thymidine kinase et induit des dommages à l'ADN et ainsi la mort cellulaire par apoptose des cellules sénescents (Laberge, Adler et al. 2013).

3.2 Protection contre la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire est induite dans de nombreuses pathologies liées à l'âge et la sénolyse (élimination des cellules sénescents) augmente la durée de vie chez la souris. C'est pourquoi de nombreuses recherches portent sur l'élimination pharmacologique des cellules sénescents. Éliminer les cellules sénescents ou diminuer le SASP associé est un potentiel stratégique pour traiter les maladies liées à l'âge et de nombreux médicaments candidats sont à l'étude (**Tableaux 1 et 2**).

On distingue deux classes de stratégies thérapeutiques. La première consiste à éliminer sélectivement les cellules sénescents afin de limiter les effets négatifs secondaires, pour cela, des **sénolytiques** sont utilisés. La seconde prévient des effets néfastes des cellules sénescents et du SASP par l'utilisation des **sénomorphiques**.

Compound	Targets	Clinical trial status	Refs
Senolytic			
Dasatinib	Pan-receptor tyrosine kinases (including ephrin B1)	Phase II, (NCT02848131) for chronic kidney disease, phase II (NCT04313634) for skeletal health, phase I/II (NCT04063124) for Alzheimer disease	210
Quercetin	Numerous (including PI3K)	Phase II NCT02848131) for chronic kidney disease, phase II (NCT04313634) for skeletal health, phase I/II (NCT04063124) for Alzheimer disease	210
Fisetin	PI3K/AKT/mTOR	Pphase I/II (NCT04210986) for osteoarthritis of the knee, phase II (NCT04313634) for skeletal health	202
ABT-737	BCL-2, BCL-X _L and BCL-W (prosurvival proteins)	Preclinical animal models	14
ABT-263 (navitoclax)	BCL-2, BCL-X _L and BCL-W (prosurvival proteins)	Phase I/II (NCT00445198), phase II (NCT02591095), phase I (NCT02520778), phase II (NCT02079740) for various cancers	15,265,175, 197,228
A-1331852	BCL-X _L (prosurvival protein)	Preclinical models of senescence in vitro	202
A-1155463	BCL-X _L (prosurvival protein)	Preclinical models of senescence in vitro	202
EF24	Proteosomal degradation of BCL-2 family proteins (prosurvival proteins)	Preclinical models of senescence in vitro	205
Cardiac glycosides (including ouabain and digoxin)	BCL-2, BCL-X _L and BCL-W (prosurvival proteins)	Preclinical animal models	203,204
Azithromycin	Autophagy, metabolic changes	Preclinical models of senescence in vitro	217
Roxithromycin	Autophagy, metabolic changes	Preclinical models of senescence in vitro	217
Proxifim	p53	Preclinical animal models	206
UBX0101	MDM2 and p32	Phase II (NCT04129944) for osteoarthritis of the knee	201
Panobinostat	HDAC	Approved for multiple myeloma	55
Geldanamycin	HSP90	Preclinical models of senescence in vitro	214
Tanespimycin	HSP90	Preclinical models of senescence in vitro	214
Alevspimycin (17-DMAG)	HSP90	Preclinical models of senescence in vitro	214
Piperlongumine (and analogues)	OXR1 (unknown)	Preclinical models of senescence in vitro	215,216
Galactose-conjugated nanoparticles	Lysosomal activity of senescent cells	Preclinical animal models	218
Galactose-modified cytotoxic agents	Lysosomal activity of senescent cells	Preclinical animal models	216,220
BET protein degrader	Bromodomain and extraterminal domain family protein	Preclinical animal models	104
Senomorphic			
Metformin	IKK and/or NF-κB	Approved for type 2 diabetes	137,235–237
Apigenin	NF-κB p65 subunit and IκB	Naturally occurring flavonoid	238
Kaempferol	NF-κB p65 subunit and IκB	Naturally occurring flavonoid	238
BAY 11-7082	NF-κB p65 subunit and IκB	Preclinical models of senescence in vitro	118
Rapamycin	mTOR	Approved for immunosuppression	230,231, 233,234
RAD001	mTOR	Approved for tuberous sclerosis complex-associated diseases	232
SB203580	p38 MAPK	Preclinical models of senescence in vitro	88
(5Z)-7-Oxozeaenol	TAK1	Preclinical models of senescence in vitro	232
Ruxolitinib	JAK	Approved for graft-versus-host disease	99

Tableau 1: Composés sénolytiques et sénomorphiques en cours d'essais cliniques ou approuvés (Childs, Gluscevic et al. 2017)

Compound	Targets	Clinical trial status	Refs
Senomorphic (cont.)			
KU-60019	ATM	Preclinical animal models	234
NDGA	HSP90	Naturally occurring antioxidant	240
Loperamide	HSP90	Approved for treatment of diarrhoea	234
Simvastatin	IL-6, IL-8, MCP1	Preclinical models of senescence in vitro	240
Cortisol	IL-6 secretion	Steroid hormone	241
Anakinra	IL-1R	Approved for rheumatoid arthritis	242
Canakinumab	IL-1 β	Approved for cryopyrin-associated periodic syndromes	243
Rilonacept	IL-1 α and IL-1 β	Approved for cryopyrin-associated periodic syndromes	244
Etanercept	TNF	Approved for autoimmune diseases	245
Infliximab	TNF	Approved for autoimmune diseases	246
Tocilizumab	IL-6R	Approved for autoimmune diseases	247
Siltuximab	IL-6	Approved for multicentric Castlemann disease	248
Telomeric antisense oligonucleotides	Telomeric non-coding RNA fuelling DDR	Preclinical animal models	251

ATM, ataxia telangiectasia mutated; DDR, DNA damage response; HDAC histone deacetylase; IL, interleukin; IL-1R, interleukin-1 receptor; IL-6R, interleukin-6 receptor; I κ B, inhibitor of nuclear factor- κ B; IKK, inhibitor of nuclear factor- κ B kinase; JAK, Janus kinase; MCP1, monocyte chemoattractant protein 1; mTOR, mammalian target of rapamycin; nuclear factor- κ B; NF- κ B; NDGA, nordihydroguaiaretic acid; TNF, tumour necrosis factor.

Tableau 2: Sénomorphiques utilisés ou à l'étude à ce jour (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).

3.2.1 Utilisations de sénolytiques

Les premières molécules rapportées pour avoir un effet sénolytique font partie de la famille des inhibiteurs de BCL-2 (B cell lymphoma 2 – BCL-2, BCL-X_L et BCL-W). Ces inhibiteurs se lient et neutralisent les membres de la famille des BCL-2 anti-apoptotiques. Le navitoclax (aussi appelé ABT-263), membre de la famille des inhibiteurs de BCL-2 (**Figure 12**), a montré un effet thérapeutique dans des modèles d'athérosclérose avec une élimination sélective des cellules sénescents. Comme décrit en première partie, les membres de la famille BCL-2 sont surexprimés dans les cellules sénescents les rendant plus susceptibles aux inhibiteurs de BCL-2.

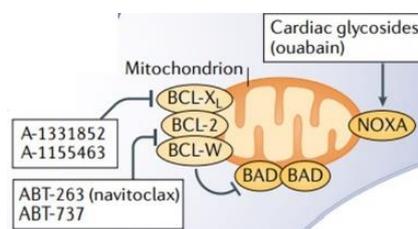


Figure 12 Schéma montrant le mécanisme des inhibiteurs de BCL-2 (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021)

D'autres sénolytiques bien connus sont le dasatinib couplé à la quercétine. L'utilisation de ces derniers se base sur l'observation de six protéines induisant la survie de pré-adipocytes irradiés : les ephrins (EFNB1, EFNB3), la kinase PI3K δ , la Serpine (ou PAI-1), BCL-X_L et p21.

Le dasatinib bloque la signalisation des récepteurs dépendants des ephrines, et la quercétine issue des plantes flavonoïdes inhibe les serpinines. Ces deux molécules ont une activité sénolytique dans le tissu gras de souris âgées. Leur administration permet une réduction de l'expression de p16 et de l'activité β -galactosidase en essai clinique de phase I sur des patients atteints de maladie rénale diabétique et de maladie idiopathique pulmonaire.

Par ailleurs, le peptide FOXO4-DRI bloque la liaison de FOXO4 avec p53 (**Figure 13**), excluant p53 du noyau. Cela conduit à l'apoptose par relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme.

Chez des souris âgées, le FOXO4-DRI semble avoir des effets rajeunissants avec une amélioration des fonctions rénales et des capacités physiques (course) (Childs, Gluscevic et al. 2017, Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).

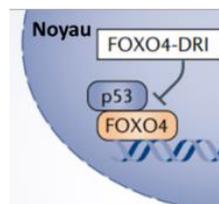


Figure 13: Schéma montrant le mécanisme d'action du FOXO4-DRI (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).

3.2.2 Diminution du SASP : utilisation des sénomorphiques

Les différentes molécules du SASP sont retrouvées dans les maladies liées à l'âge. Cibler le SASP représente des stratégies thérapeutiques pour diminuer le sécrétome produit par les cellules sénescents (**Figure 14**). De plus cela permet de ne pas éliminer les cellules sénescents en gardant le bénéfice de l'arrêt du cycle cellulaire. Trois approches sont évaluées pour cibler les SASP : bloquer les voies de signalisation conduisant au SASP, perturber la sécrétion du SASP ou inhiber l'activité des composants du SASP. La première approche doit prendre en compte le fait que le SASP est aussi suppresseur de tumeur et que son maintien peut être bénéfique dans le cancer.

La voie mTOR est connue pour induire la production du SASP. La rapamycine, qui inhibe la voie mTOR, atténue le SASP pro-tumorigène, prévient de la sénescence et améliore les fonctions du foie chez des souris âgées. De plus, le traitement à la rapamycine permet d'augmenter la durée de vie et de retarder des dysfonctions liées à l'âge chez la souris (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021). De même, l'inhibition de la voie NF- κ B par différents composés comme la metformine permet de diminuer la production du SASP.

Cibler spécifiquement les éléments du SASP ou leur récepteur peut être bénéfique car cela permet de cibler une molécule spécifique et donc de diminuer les effets secondaires. Les anticorps siltuximab (anti IL-6) et tocilizumab (anti récepteur à l'IL-6) sont des médicaments anti-inflammatoires approuvés. Cependant l'avantage de la spécificité peut devenir un inconvénient car il ne permet de cibler qu'une cible à la fois et donc d'avoir moins d'effet sur les cellules sénescents.

Une manière moins spécifique d'inhiber la voie de l'IL-6 est l'utilisation du ruxolitinib, inhibiteur de JAK1 et JAK2 (Childs, Gluscevic et al. 2017). D'autres anticorps neutralisants dirigés contre les composants du SASP ou de leur récepteur ont des propriétés sénomorphiques comme des inhibiteurs de l'IL-1 ou du TNF- α .

Un autre moyen pour réduire l'établissement de la sénescence est de cibler les voies de signalisation de dommage à l'ADN télomériques. Récemment, une séquence spécifique d'oligonucléotides anti-sens (ASOs) a montré inhiber les dommages à l'ADN télomériques (**Figure 14**) dans des cellules en culture et dans des modèles de souris (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).

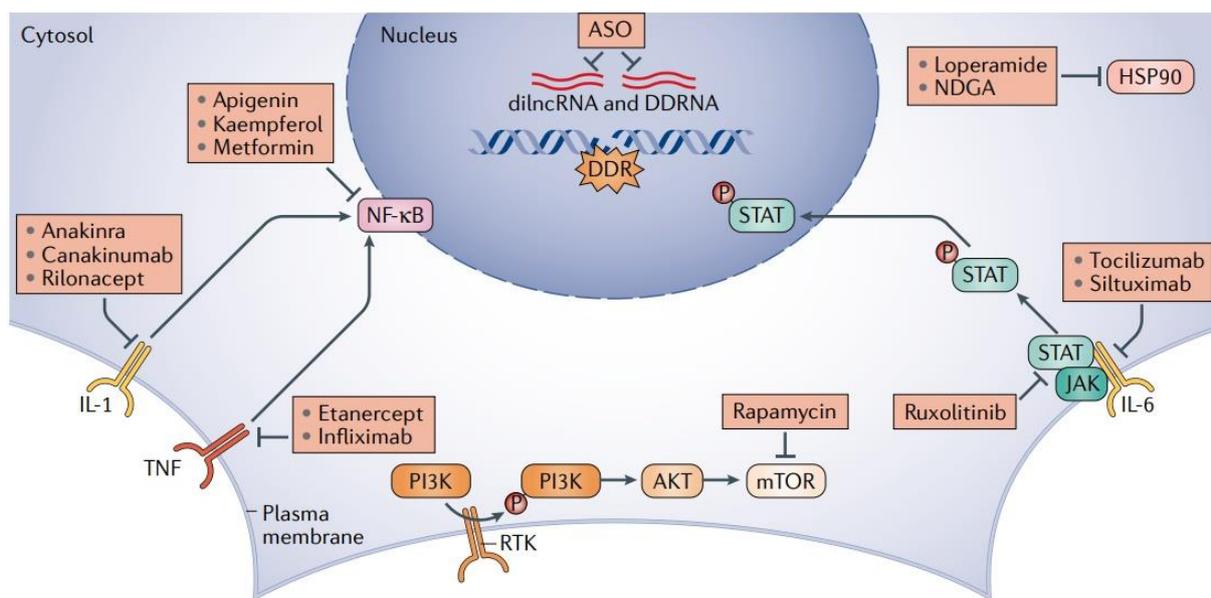


Figure 14: Schéma récapitulant les différents moyens d'inhiber le SASP (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).

ASO, antisense oligonucleotides; DDR, DNA damage response; DDRNA, DNA damage response RNA; *dilncRNA*, damage-induced long non-coding RNA; NDGA, nordihydroguaiaretic acid; RTK, receptor.

CHAPITRE 2 : La sénescence cellulaire dans la bronchopneumopathie chronique obstructive et la fibrose pulmonaire

I/ Le poumon

1. Structure

Le poumon se situe dans la cage thoracique au niveau du thorax. Il est relié au système respiratoire supérieur par la trachée elle-même connectée au larynx dans sa partie supérieure.

Chez l'homme, le poumon se divise en deux : le poumon gauche constitué de deux lobes (supérieur, inférieur) et le poumon droit constitué de trois lobes (supérieur, moyen, inférieur). La trachée se divise en deux bronches principales, une dans chaque poumon. Ces bronches principales vont se diviser en bronches secondaires (ou lobaires) qui vont chacune dans un lobe. Elles se divisent ensuite en bronches tertiaires (ou segmentaires) puis en bronchioles aboutissant aux alvéoles pulmonaires. On retrouve environ 25 divisions des bronches principales aux alvéoles. De la première à la seizième division, se trouve les bronches dites de conduction qui permettent le transport de l'air au poumon. De la seizième à la vingtième division, on trouve les bronches de transition, dans cette zone, la propagation des gaz respiratoires est mixte, à la fois par convection et par diffusion.

Les unités terminales respiratoires (aussi appelée acinus) se composent des bronchioles respiratoires, des conduits alvéolaires et des alvéoles, elles représentent le site des échanges gazeux et la partie terminale du poumon. Les bronchioles (ou petites voies respiratoires) font moins de 2 mm de diamètre. Chez l'humain, les bronchioles ont une fonction de conduction et d'échange gazeux, chacune devient progressivement plus alvéolée par la succession de branches (**Figure 15**), de la vingt-et-unième à la vingt-cinquième division se trouve la zone de diffusion. A la fin, les bronchioles respiratoires évoluent vers des canaux alvéolaires qui sont entourés d'alvéoles (**Figure 16**), séparées par de minces cloisons (Murray 2010). Les alvéoles sont au nombre de 600 à 800 millions dans le poumon et sont recouvertes de capillaires sanguins. La surface de contact entre les alvéoles et le sang représente environ 100 m².

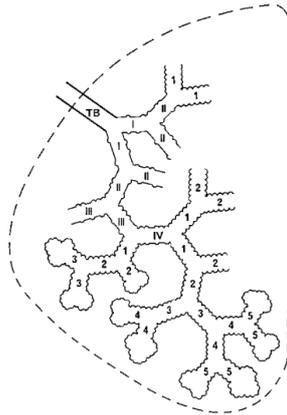


Figure 15: Représentation schématique d'une unité terminale respiratoire.

Les chiffres romains représentent les bronchioles respiratoires suivies des conduits alvéolaires en chiffres arabes. (TB = bronche terminale). (Murray 2010)

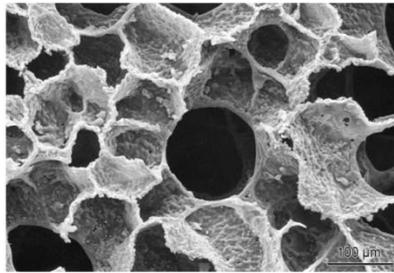


Figure 16: Micrographie électronique à balayage du parenchyme pulmonaire humain (Murray 2010)

2. Fonction de l'organe

C'est au niveau des alvéoles que se déroule la fonction première du poumon : les échanges gazeux par diffusion. En effet, le rôle de l'organe pulmonaire est d'enrichir le sang en dioxygène (O_2) et d'éliminer le dioxyde de carbone (CO_2). Cet échange gazeux est possible par la proximité du système sanguin, sous forme de capillaires, au niveau des alvéoles pulmonaires, cette zone est appelée la **paroi alvéolocapillaire**.

Le sang riche en CO_2 arrivant des organes passe par l'oreillette droite, par le ventricule droit du cœur puis par l'artère pulmonaire qui délivre le sang dans le poumon. Arrivé au niveau des capillaires de la paroi alvéolocapillaire, le CO_2 est libéré des globules rouges dans les alvéoles. L' O_2 est récupéré de l'air à l'inspiration et va à l'inverse du CO_2 , passe dans les capillaires depuis les alvéoles. Le sang riche en O_2 passe par la veine pulmonaire pour arriver dans le cœur par l'oreillette gauche puis le ventricule gauche et sort par l'aorte afin d'être acheminé dans les organes du corps.

3. L'épithélium respiratoire : des voies aériennes supérieures aux alvéoles.

Le poumon permettant les échanges gazeux du corps humain, se trouve en contact avec l'air inspiré du milieu extérieur. Comme tout organe du corps humain ayant un contact avec le milieu extérieur (appareil digestif, peau), il est constitué d'une muqueuse. La **muqueuse respiratoire** est présente sur l'ensemble du système respiratoire. Elle se constitue d'une membrane basale continue et épaisse qui repose la lamina propria qui représente le tissu conjonctif ou **le chorion**, richement vascularisé permettant la thermorégulation et qui possède des fonctions glandulaires. **Le mucus** présent sur toutes les voies de conduction provient essentiellement des glandes du chorion. Il est important dans le piège des particules inhalées, dans l'humidification de l'air inspiré et dans la protection de l'épithélium. Il contient des antibactériens et majoritairement des mucines qui établissent des liaisons covalentes pour augmenter la viscosité du gel.

L'épithélium pseudostratifié qui repose sur la membrane basale est constitué de plusieurs types cellulaires. D'abord les **cellules ciliées**, ce sont des cellules prismatiques avec des noyaux à différents niveaux donnant un effet pseudostratifié. Ces cellules ont une bordure ciliaire permettant le mouvement du mucus. L'épithélium contient également des **cellules caliciformes** spécialisées dans la synthèse et la sécrétion du mucus. La muqueuse respiratoire qui évolue en progressant vers les alvéoles, change principalement par la disparition de ces cellules caliciformes à partir des bronchioles, dans la zone de transition. Enfin, les cellules triangulaires qui sont collées à la lamina propria sont aussi appelées **cellules basales**. Ce sont des cellules de remplacement qui sont à l'origine du renouvellement des cellules épithéliales ciliées ou caliciformes, elles vont se différencier en progressant vers l'épithélium.

Tout au long des voies de conduction, l'épaisseur de l'épithélium diminue, ce qui explique que l'on passe d'un épithélium prismatique pseudostratifié, haut, à un épithélium prismatique simple, puis cubique simple, prépondérant au niveau des bronchioles respiratoires.

Dans la partie la plus distale, les cellules ciliées sont remplacées progressivement par les **cellules de Clara**. Lors de la progression dans l'arbre bronchique vers sa partie distale, la nécessité de produire du mucus est remplacée par celle de produire du **surfactant alvéolaire**. Ce film liquidien, aussi appelé **substance tensio-active**, permet pendant les mouvements respiratoires de maintenir la structure de l'alvéole en réduisant la tension superficielle air/liquide. Le surfactant est indispensable à l'expansion des alvéoles lors de l'inspiration et il évite également que les alvéoles se collapsent lors de l'expiration. L'épithélium alvéolaire est simple. Il est constitué de **pneumocytes de type I** qui sont de grande taille et recouvrent 90% de la surface alvéolaire, ils sont aussi appelés pneumocytes membraneux ou cellules épithéliales alvéolaires de type I. Les **pneumocytes de type II**, aussi appelés

pneumocytes granuleux ou cellules épithéliales alvéolaires de type 2, sont de plus petite taille. Leur activité sécrétrice du surfactant alvéolaire leur donne un aspect granuleux avec un cytoplasme riche en organites : un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi particulièrement développés ainsi que le corps lamellaire, granule de sécrétion du surfactant. En plus de leur fonction sécrétrice, les pneumocytes de type II ont une fonction de cellules souches lors de la ré-épithélisation avec une prolifération de pneumocytes de type II et une différenciation en pneumocytes de type I.

L'épithélium alvéolaire se termine par l'**interstitium** qui est majoritairement constitué de fibres de collagènes et élastiques assurant le maintien de la structure des alvéoles. Il est connecté à la plèvre et aux vaisseaux sanguins.

Directement après l'interstitium vient l'**endothélium** capillaire constitué des cellules endothéliales, il appartient aux capillaires qui sont en contacte directe avec les alvéoles.

La plèvre est une membrane séreuse qui vient recouvrir l'ensemble du poumon. Elle est constituée de deux couches. La première extérieure, appelée plèvre pariétale, est collée au thorax. La seconde intérieure, la plèvre viscérale est collée au poumon. Entre les deux couches se trouve un espace dit virtuel appelé ainsi car il n'y a aucun liquide entre ces deux couches. Si du liquide venait à s'y trouver cela serait une situation pathologique que l'on nomme épanchement pleural.

Comme dans de nombreux organes, on retrouve une accumulation de cellules sénescentes dans le poumon. En effet, le poumon étant constamment exposé à l'environnement extérieur il existe un fort impact des facteurs environnementaux sur la structure et la fonction du poumon. Ces expositions environnementales sont multiples : la fumée de cigarette (passive ou active), l'exposition professionnelle ou l'exposition à domicile (par exemple les fumées de cuisson ou de chauffage), les pollens, les pathogènes comme les bactéries ou les virus. La plupart du temps, le système immunitaire du poumon permet d'éliminer l'effet de ces facteurs environnementaux et le stress qu'ils induisent. Les cellules immunes spécialisées du poumon, les macrophages alvéolaires, les neutrophiles ou les cellules dendritiques résidentes du poumon participent à la dégradation de ces polluants et pathogènes. Ensuite les cellules pulmonaires, vasculaires et épithéliales bronchiques ou alvéolaires permettent une réparation du tissu pulmonaire.

Le vieillissement normal d'un individu, des prédispositions génétiques ou des modifications épigénétiques, ainsi que des expositions environnementales induisent une diminution de la capacité du système immunitaire et des cellules vasculaires et épithéliales à réparer le poumon. C'est notamment ce qui se passe dans deux pathologies pulmonaires liées à l'âge qui seront décrite ci-dessous : la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI). Ces deux maladies pulmonaires partagent des marques du vieillissement qui contribuent à la progression de la maladie.

II/ La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)

1. Caractéristiques de la BPCO

Cette pathologie est caractérisée par le GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) comme « une maladie courante, évitable et traitable caractérisée par une limitation persistante du débit d'air due à des anomalies des voies respiratoires et/ou des alvéoles, généralement causées par une exposition importante aux particules ou gaz nocifs. Les exacerbations et les comorbidités contribuent à la sévérité pour chaque individu » (Barnes, Burney et al. 2015, Brandsma, Van den Berge et al. 2020). La limitation du débit d'air est définie par le ratio du volume expiratoire forcé en une seconde (VEMS, en anglais forced expiratory volume in 1 second, FEV₁) sur la capacité vitale forcée (CVF, en anglais forced vital capacity, FVC). Les patients atteints de BPCO ont un VEMS/CVF inférieur à 70%. La BPCO est dite légère ou GOLD1 (VEMS supérieure à 80% de la normale prédite), modérée ou GOLD2 (entre 79 et 50% de la normale prédite), sévère ou GOLD3 (entre 49 et 30%) et très sévère ou GOLD4 (si inférieure à 30%) (Barnes, Burney et al. 2015).

Chez les patients BPCO, on observe une bronchiolite chronique obstructive des petites voies aériennes induite par une hypersécrétion du mucus, une inflammation chronique et une fibrose. L'obstruction progressive des voies respiratoires conduit à une dyspnée (essoufflement à l'effort) et par conséquent, à une limitation de l'exercice physique. L'autre caractéristique de la BPCO est un emphysème visible au scanne CT (computed tomography), il est dû à un élargissement des alvéoles et à la destruction des parois (ou septa) alvéolaires (**Figure 17**) (Barnes, Burney et al. 2015).

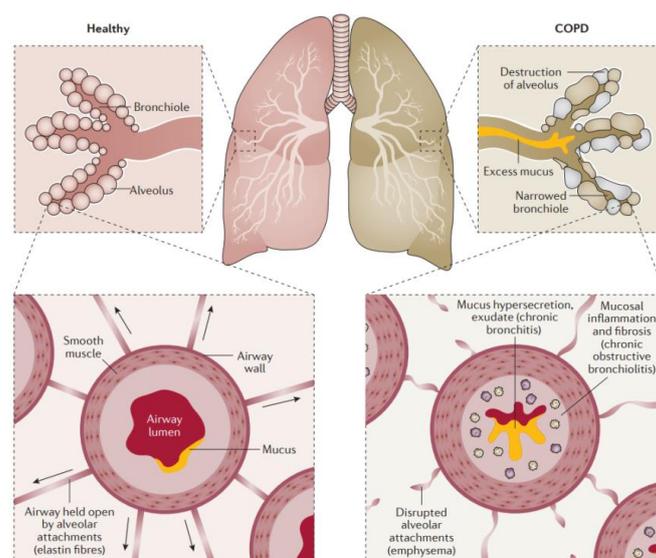


Figure 17: Schéma comparant les petites voies respiratoires d'un sujet sain (à gauche) à un sujet atteint de la BPCO (à droite) (Barnes, Burney et al. 2015).

2. Causes de la BPCO

La BPCO représente aujourd'hui la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde. C'est une maladie qui est exponentielle avec l'âge c'est pourquoi elle touche de plus en plus de personnes à cause du vieillissement de la population. Le pic de prévalence de la BPCO est à un âge de 65 ans.

2.1. Les facteurs environnementaux

Dans les pays à revenus élevés, l'exposition à la fumée de cigarette est le principal facteur de risque mais d'autres facteurs sont reconnus dans les pays à faible revenus. Le deuxième facteur le plus important pour la BPCO est la tuberculose. La plupart des décès des patients BPCO sont dans l'Est et l'Asie du Sud. Dans ces régions, l'exposition au tabac ne serait pas la première cause de la BPCO mais ce serait l'exposition à un environnement pollué, professionnel et/ou domestique qui induirait la pathologie. Un lien a été démontré entre la réduction de la pollution de l'air intérieure et l'amélioration des fonctions respiratoires. Des niveaux élevés de pollution au charbon ont également été montrés pour induire la BPCO (Barnes, Burney et al. 2015).

2.2. Les facteurs génétiques

En plus des expositions environnementales, des facteurs génétiques ont été mis en évidence dans la BPCO. Comparativement aux fumeurs de la population générale, les fumeurs avec une parenté de premier degré (parents, frères et sœurs et enfants) de personnes atteintes d'une BPCO sévère à début précoce ont un risque environ trois fois plus élevé de souffrir de troubles respiratoires. Cependant les non-fumeurs avec une parenté de premier degré de personnes atteintes d'une BPCO sévère à début précoce n'ont pas de risque augmenté par rapport aux non-fumeurs de la population générale (Silverman, Chapman et al. 1998). Une étude de vrais et faux-jumeaux a montré une hérédité de la BPCO d'environ 60 % (Ingebrigtsen, Thomsen et al. 2010). D'autres études ont montré que l'hérédité de la VEMS est d'environ 40% et que celle de l'emphysème est d'environ 30% (Zhou, Cho et al. 2013).

Le premier déterminant génétique de la BPCO est le déficit en alpha-1 antitrypsine (AAT). La protéine AAT est codée par le gène *SerpinA1* et est le principal inhibiteur de protéase plasmatique de l'élastase leucocytaire, une enzyme située dans les granules des neutrophiles. La cause la plus commune des déficiences en AAT sévère est l'homozygotie pour l'allèle **serpinA1*Z**. Cet allèle résulte d'une seule paire de base modifiée conduisant à une substitution d'acide aminé qui induit la formation de polymères d'AAT dans les hépatocytes, producteurs majoritaires de l'AAT. Cette

production anormale de protéine AAT conduit à une réduction du niveau d'AAT circulant. Des déficiences sévères d'AAT peuvent également être induite par l'hétérozygotie d'un allèle *Serpina1*Z* et d'un allèle nul (absence totale de production d'AAT par l'allèle nul). Les individus ayant une homozygotie pour l'allèle *Serpina1*Z* (ZZ) ou les hétérozygotes Znul sont regroupés dans les individus appelés **PI Z**. Aux États-Unis, environ 1 personne sur 3 000 a hérité d'un grave déficit en AAT, ce qui augmente le risque de BPCO et des maladies hépatiques (hépatite, cirrhose et carcinome hépatocellulaire). Des essais contrôlés randomisés ont montré une réduction du niveau de développement d'emphysème en réponse à un traitement augmentant l'AAT (Chapman, Burdon et al. 2015). D'autres études portant sur les individus ayant un **allèle normal SerpinA1 M** et un allèle *Serpina1 Z* (individus **PI MZ**), montrent que les fumeurs PI MZ ont un risque augmenté pour la BPCO comparés aux fumeurs PI MM. De plus, les anciens fumeurs PI MZ présentent une fonction pulmonaire réduite et un risque accru de BPCO par rapport aux anciens fumeurs du groupe des PI MM (Sørheim, Bakke et al. 2010, Molloy, Hersh et al. 2014, Silverman 2020).

Plusieurs études GWAS (génotypage de polymorphismes mononucléotidiques à l'échelle du génome) ont montré le lien entre la BPCO et certains SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Par exemple, l'association entre la BPCO et les régions *CHRNA3/CHRNA5/IREB2* sur le chromosome 15q25 à été montré. Dans cette région, les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (*CHRNA3* et *CHRNA5*) sont liés à la dépendance à la nicotine alors que *IREB2* (codant pour *iron-responsive element-binding protein 2*) ne l'est pas (Siedlinski, Tingley et al. 2013, Barnes, Burney et al. 2015, Silverman 2020).

D'autres études ont mis en évidence l'association de 27 locus avec le ratio VEMS/CVF ou la VEMS. Parmi ces 27 locus, certains sont plus associés à l'emphysème et d'autres sont plus associés aux phénotypes des voies respiratoires. D'autres études GWAS ont été effectuées sur des modèles animaux de BPCO exposés à la fumée de cigarette. Ces études ont montré que 8 gènes, HHIP (codant pour *Hedgehog-interacting protein*), FAM13A (codant pour *family with sequence similarity 13 member A*), IREB2, AGER (codant pour *Advanced Glycosylation End-Product Specific Receptor*), MMP1 (codant pour la métalloprotéinase 1), MMP12, SFTPD (codant pour la protéine D du surfactant), et FBLN5 (codant pour la fibuline 5) étaient associés à la fois aux modèles de souris d'emphysème et à la fois aux régions GWAS retrouvées dans la BPCO et l'emphysème (Silverman 2020).

3. Pathogenèse de la BPCO

3.1 L'inflammation dans la BPCO

Une grande composante de la BPCO est l'inflammation chronique qui affecte les voies respiratoires périphériques et larges ainsi que le parenchyme pulmonaire. L'inflammation est associée à un niveau élevé de médiateurs inflammatoires comme des lipides, cytokines et chimiokines qui maintiennent le niveau d'inflammation. L'inflammation induite par la fumée de cigarette est toujours retrouvée chez un fumeur ayant des fonctions respiratoires normales, mais chez les patients BPCO elle est plus prononcée et persiste même après l'arrêt du tabagisme (Barnes, Burney et al. 2015, Brandsma, Van den Berge et al. 2020).

L'exposition à la fumée de cigarette ou d'autres polluants de l'air, induit une activation des macrophages et des neutrophiles notamment par les Toll-like récepteurs. Une augmentation des macrophages est retrouvée dans les voies respiratoires, le parenchyme pulmonaire, les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et les expectorations chez les patients BPCO. Cela induit l'activation des cellules épithéliales et une forte sécrétion de mucus qui participe à l'obstruction chronique rencontrée dans la BPCO. Dans les voies aériennes, l'élastase des neutrophiles peut être un stimulateur important de l'hypersécrétion de mucus.

L'activation des neutrophiles, macrophages et cellules épithéliales participe également à la destruction du parenchyme pulmonaire par la sécrétion des protéases qui dégradent les fibres d'élastine. Les principales protéases inflammatoires qui conduisent à la destruction du tissu pulmonaire sont les MMP-2, MMP-9 et MMP-12 qui dégradent principalement l'élastine (Merrilees, Ching et al. 2008, Deslee, Woods et al. 2009). Les macrophages qui sécrètent MMP-9 et MMP-12, induisent la destruction du parenchyme pulmonaire et joue un rôle important dans l'élastolyse observée chez les patients emphysémateux.

Les macrophages activés participent à l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Ils sécrètent davantage de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α ...), des ROS et relarguent des chimioattractants qui attirent les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et les lymphocytes T Helper1 CD4+. Les cellules dendritiques de patients emphysémateux stimulent les réponses T Helper 1 et T Helper 17 (Barnes 2017). La persistance des lymphocytes T CD8+ reste pendant une longue période et jusqu'à 3 ans après l'arrêt du tabagisme. Chez les patients BPCO on retrouve dans les parties basses du tractus respiratoire une colonisation permanente de bactéries comme *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* à cause d'une diminution de l'activité de phagocytose des macrophages (Taylor, Finney-Hayward et al. 2010). Le nombre de follicules lymphoïdes associés aux bronchioles augmente avec la sévérité de la BPCO. Ces follicules contiennent des centres germinatifs

de maturation des lymphocytes B. On leur donne généralement le nom de BALT pour « bronchiolar-associated lymphoid tissue » (Higham, Quinn et al. 2019).

3.2 Le remodelage des voies respiratoires dans la BPCO

Les bronchioles (ou petites voies respiratoires) sont le lieu de la bronchite chronique, elles sont fortement remodelées chez les patients BPCO (**Figure 18**). L'épaisseur globale de la paroi des voies respiratoires est augmentée par rapport aux fumeurs qui n'ont pas de limitation du débit d'air. Dans la BPCO, ce remodelage est causé par une cicatrisation induite en réponse à l'exposition à la fumée de cigarette ou aux infections virales et bactériennes. La perturbation de la matrice extracellulaire (MEC) contribue au relâchement des parois des voies respiratoires entraînant des voies aériennes collabées et une limitation du débit d'air pendant l'expiration des patients BPCO. Les principaux compartiments de la matrice extracellulaire (MEC) dans le poumon sont la membrane basale, la lamina propria des voies respiratoires et l'interstitium alvéolaire. Dans la membrane basale, le collagène IV et la laminine sont les principaux composants de la MEC et on retrouve des collagènes fibrillaires, l'élastine, la fibronectine, les glycosaminoglycanes et protéoglycanes dans la lamina propria et l'interstitium. Le contrôle de l'homéostasie de la MEC se fait par l'équilibre entre les métalloprotéinases (les MMPs) qui dégradent la MEC et les inhibiteurs de métalloprotéinases (les TIMPs). Dans le poumon, les principaux producteurs de protéines de la MEC sont les fibroblastes et myofibroblastes. Ces derniers sont en grande partie dérivés des fibroblastes circulants et des fibroblastes sous-épithéliaux, entourant des cellules épithéliales qui subissent une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Pour contrer une cicatrisation excessive et un remodelage fibrotique, les myofibroblastes entrent en apoptose. Cependant, chez les patients BPCO, le remodelage épithélial est anormal par rapport à des témoins fumeurs. Normalement, les cellules basales sont les précurseurs des cellules ciliées et sécrétoires pendant la ré-épithélisation mais le tabagisme induit une déprogrammation des cellules basales induisant des défauts de réparation (Staudt, Buro-Auriemma et al. 2014). Par rapport à des contrôles non-fumeurs, la TEM persiste dans l'épithélium des petites voies aériennes des patients BPCO ainsi que les marqueurs de myofibroblastes comme l' α -SMA (alpha-smooth muscle actin) et la vimentine et cela corrèle avec la limitation du débit d'air (Milara, Peiró et al. 2013, Gohy, Hupin et al. 2015, Berg and Wright 2016, Higham, Quinn et al. 2019).

Un autre changement de la MEC dans la BPCO est l'augmentation du dépôt de collagène dans les parois des voies respiratoires et une désorganisation des fibrilles de collagène. La décorine qui est un protéoglycane liant les fibrilles de collagène joue un rôle dans cette désorganisation et est diminuée chez les patients BPCO. Des études GWAS de cohorte de patients montrent que la diminution du

ratio VEMS/CVF résulte d'un enrichissement de gènes impliqués dans le remodelage de la MEC incluant les voies de signalisation des intégrines et des collagènes. D'autres études GWAS ont montré une association entre la BPCO et des gènes codant pour des protéines de liaison à la laminine, l'intégrine, les protéines d'adhésion de la matrice cellulaire et des faisceaux de filaments d'actine (Brandsma, Van den Berge et al. 2020).

Souvent, l'obstruction des petites voies respiratoires précède le développement de l'emphysème.

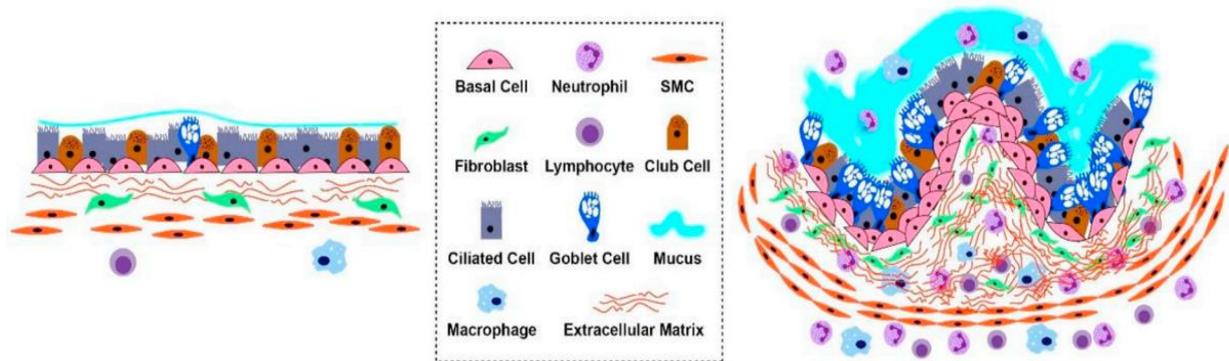


Figure 18: Schéma expliquant le remodelage des petites voies respiratoires. A gauche, la structure de l'épithélium chez un individu sain, à droite, le remodelage induit chez un patient BPCO (Hadzic, Wu et al. 2020)

3.3 L'emphysème pulmonaire

L'emphysème se définit comme un élargissement anormal des espaces respiratoires accompagné d'une destruction des parois alvéolaires (**Figure 19**). Selon que l'emphysème touche le centre du lobule ou la totalité du lobule, il est appelé respectivement centro-acinaire (ou centro-lobulaire) ou pan-acinaire (ou pan-lobulaire).

Il existe 3 principaux types d'emphysème (Berg and Wright 2016, Higham, Quinn et al. 2019).

- L'emphysème acinaire proximal inclut l'emphysème centro-acinaire que l'on observe chez des fumeurs de cigarettes et l'emphysème centro-acinaire focal observé dans les pneumoconioses. L'emphysème centro-acinaire concerne 90% des emphysèmes. Comme vu précédemment, chaque acinus inclut les bronchioles respiratoires, les conduits alvéolaires et les espaces alvéolaires. Ce sont les bronchioles respiratoires qui sont principalement touchées dans l'emphysème centro-acinaire (Leopold and Gough 1957).
- L'emphysème pan-acinaire (ou pan-lobulaire) est caractéristique des déficients en α 1-antitrypsine (AAT). A la différence de l'emphysème centro-lobulaire, l'emphysème pan-lobulaire affecte toutes les structures depuis les alvéoles distales jusqu'aux bronchioles respiratoires.

- L'emphysème acinaire distal (para-septal), retrouvé chez les jeunes adultes avec un pneumothorax spontané ou en association avec un emphysème centro-lobulaire. Dans ce cas presque toute la partie proximale de l'acinus est normale mais les conduits alvéolaires distaux et les sacs alvéolaires sont affectés.

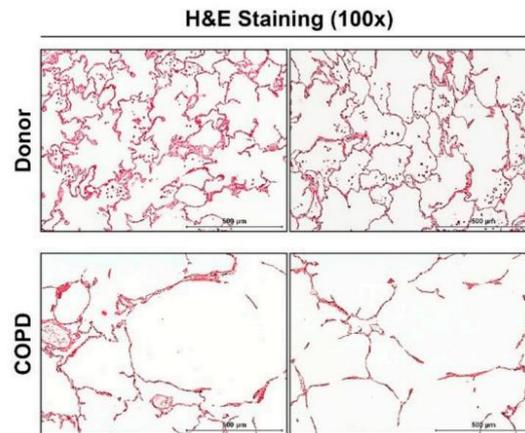


Figure 19: Destruction du parenchyme pulmonaire observée chez les patients BPCO (en bas) représentée sur des coupes Hematoxiline Eosine (Hadzic, Wu et al. 2020)

3.4 Exacerbations dans la BPCO

Les exacerbations de la BPCO sont des épisodes d'aggravation des symptômes. La plupart d'entre elles sont induites par des infections virales. On retrouve dans près de 60% des exacerbations des virus dans les voies respiratoires quantifiés par PCR comparé à 20% chez les patients BPCO sans exacerbations (Rohde, Wiethage et al. 2003). Ces infections conduisent à une inflammation des voies respiratoires et systémique ce qui participe au déclenchement des exacerbations. Dans des régions où l'air est particulièrement pollué, les exacerbations peuvent être induites par la pollution (Li, Sun et al. 2016). Les infections bactériennes sont retrouvées chez les patients qui déclenchent des exacerbations, il semblerait que les colonisations ne soit pas la cause des exacerbations mais plutôt une conséquence. Le rôle des bactéries dans l'induction des exacerbations est encore débattu aujourd'hui. Les patients qui ont des exacerbations fréquentes ont un pronostic défavorable avec un plus grand nombre d'hospitalisations et une progression de la maladie plus rapide. Les comorbidités qui sont les plus fréquentes chez les patients BPCO sont l'hyperglycémie, l'athérosclérose, l'hypertension, la dyslipidémie et l'ostéoporose. Ces comorbidités peuvent être à l'origine des exacerbations (Barnes, Burney et al. 2015, Viniol and Vogelmeier 2018).

3.5 Les modèles animaux de la BPCO

3.5.1 Animaux exposés à la fumée de cigarette

L'exposition à la fumée de cigarette étant la principale cause d'induction de la BPCO dans les pays à hauts revenus, des modèles animaux exposés à la fumée de cigarette sont étudiés en recherche préclinique pour évaluer l'efficacité de certains traitements et pour comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la BPCO. Plusieurs animaux ont été étudiés avec ce modèle comme les primates non-humains et les chiens mais le modèle le plus couramment utilisé est la souris. Il existe deux types d'exposition, seulement par le nez ou l'exposition du corps entier (Barreiro, Wang et al. 2019). De nombreux protocoles existent et varient par les différents types de cigarettes utilisées, les doses, les instruments et les temps d'exposition. Ce modèle permet de reproduire les caractéristiques de la BPCO comme l'inflammation chronique pulmonaire, une altération des fonctions respiratoires, un emphysème, une hypersécrétion de mucus, un épaissement et remodelage de la paroi des petites voies respiratoires, un remodelage vasculaire et des agrégats lymphoïdes (Vlahos and Bozinovski 2014).

Les souris déficientes pour l'élastase des neutrophiles sont protégées à 60% du développement de l'emphysème induit par une longue exposition à la fumée de cigarette, cela est dû en partie par la diminution d'accumulation de macrophages dans ce modèle (Shapiro 2000, Shapiro, Goldstein et al. 2003). L'administration orale d'un inhibiteur d'élastase neutrophile, le AZD9668, chez la souris exposée à la fumée de cigarette (4 jours), réduit l'inflammation avec une réduction des neutrophiles dans les LBA et une diminution d'IL-1 β . De plus, chez des cochons d'Inde exposés chroniquement à la fumée de cigarette (24 semaines), cet inhibiteur permet de diminuer l'emphysème et le remodelage des petites voies respiratoires (Stevens, Ekholm et al. 2011).

L'emphysème induit par l'exposition à la fumée de cigarette est réduit chez des souris MMP-12 déficientes (Hautamaki, Kobayashi et al. 1997). L'exposition à la fumée de cigarette durant 6 mois induit chez la souris une augmentation d'expression des MMP-2, MMP-9 et MMP-13. Les souris déficientes pour le récepteur du TNF- α n'ont pas cette augmentation des MMPs suggérant que le TNF- α a un rôle dans la production des MMPs après exposition à la cigarette (Churg, Wang et al. 2004).

Dans un autre modèle d'exposition à la fumée de cigarette, la déficience en FOXO3 induit une inflammation exagérée et un emphysème plus important comparé à des souris WT. La fumée de

cigarette dans ce modèle induit la translocation de FOXO3 dans le noyau où il interagit avec NF- κ B, l'empêchant ainsi de se lier à l'ADN et d'être actif (Hwang, Rajendrasozhan et al. 2011, Jones, Donovan et al. 2017).

Les inconvénients de ce modèle sont que le phénotype BPCO est atteint 6 mois après exposition à la fumée de cigarette, ce qui est relativement long pour un modèle expérimental murin et que l'emphysème induit n'est pas très important. C'est pourquoi d'autres modèles induisant un phénotype plus rapidement ont été développés tels que l'injection d'élastase.

3.5.2 L'emphysème induit par l'élastase

En plus du modèle d'exposition à la fumée de cigarette, l'induction d'emphysème par administration directe d'élastase est utilisée comme modèle animal. Ce modèle d'emphysème est intéressant dans l'étude de l'évolution du changement structurel et fonctionnel du tissu pulmonaire et dans le test d'efficacité de médicaments. L'avantage de ce modèle est qu'il induit le développement d'un emphysème rapidement après injection d'une ou plusieurs doses d'élastase. L'élastase utilisée est l'élastase pancréatique de porc.

Deux méthodes sont proposées par Béla Suki et al. La première consiste en une injection oropharyngée unique d'élastase à une dose de 6 IU par animal dans 100 μ L de PBS. Après 3 semaines, un emphysème est induit avec dépôt de collagène et une diminution de l'élastance. Dans le second modèle, des injections intratrachéales d'élastase sont effectuées une fois par semaine pendant 4 semaines à des doses de 0,1 à 0,2 IU dans 50 μ L de PBS par animal. Une semaine après la dernière injection, l'élastance est réduite et associée à un élargissement de l'espace alvéolaire (Suki, Bartolák-Suki et al. 2017).

Comme pour le modèle d'exposition à la fumée de cigarette, plusieurs méthodes différentes sont utilisées avec une large variété de choix de la dose d'élastase et du nombre d'injection. Par exemple on retrouve jusqu'à cinq injections d'élastase par semaine pour induire un emphysème sévère. Le modèle d'injection d'élastase est préféré au modèle d'exposition à la fumée de cigarette car il induit un phénotype rapidement mais le modèle de choix qui reproduit le mieux le phénotype des patients BPCO reste l'exposition à la fumée de cigarette. De plus, l'élastase induit un emphysème panlobulaire caractéristiques des personnes déficientes pour l' α 1 anti-trypsine et non un emphysème centro-lobulaire induit par le tabagisme.

4. La BPCO : une pathologie liée à l'âge

4.1 Vieillessement et BPCO

Le vieillissement normal du poumon est associé à un élargissement progressif des espaces alvéolaires et une perte de surface d'échanges gazeux. Cette perte de fonction pulmonaire est accélérée chez les patients BPCO. On retrouve chez ces patients, plusieurs marqueurs d'un vieillissement prématuré comme l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, les altérations épigénétiques, des troubles métaboliques, un déficit d'élasticité, une inflammation exacerbée, une augmentation du stress oxydatif avec une dysfonction mitochondriale, une sénescence cellulaire pulmonaire augmentée, une altération des communications entre cellules et un épuisement des cellules souches (Chilosi, Carloni et al. 2013, Barnes, Burney et al. 2015, Rutten, Gopal et al. 2016, Brandsma, de Vries et al. 2017, Russo, Lamonaca et al. 2019, Easter, Bollenbecker et al. 2020). Le vieillissement accéléré est donc associé à la pathologie BPCO.

Le vieillissement conduit à une augmentation de la susceptibilité aux maladies à cause du dommage à l'ADN à travers le stress oxydatif (sénescence prématurée) ou à cause du raccourcissement des télomères (sénescence répllicative). Les facteurs environnementaux tels que l'exposition à la fumée de cigarette conduisent à un stress oxydatif qui accélère la progression de la BPCO chez certains patients. La cigarette est un facteur de risque important dans beaucoup de maladies liées à l'âge par l'induction de l'inflammation systémique et du stress oxydatif. La perte d'élasticité associée à l'âge est une des causes principales de la diminution des fonctions respiratoires. La cigarette conduit à une perte d'élasticité accélérée conduisant à un vieillissement accéléré du poumon (Kumar, Seeger et al. 2014, Barnes 2017).

Michihiro Hashimoto et al ont montré dans un modèle murin transgénique que l'élimination des cellules exprimant p19^{ARF} permettait de diminuer l'expression des marqueurs de sénescences (p16 et p21). P19^{ARF} (ou p14^{ARF} chez l'humain) augmente avec l'âge chez la souris. L'élimination des cellules exprimant p19^{ARF} dans le poumon de souris de 12 mois améliore la perte d'élasticité induite avec l'âge. Les auteurs proposent que l'élimination des cellules p19^{ARF}+ permet de réduire le vieillissement du poumon (Hashimoto, Asai et al. 2016).

4.2 Raccourcissement des télomères

La diminution de la taille des télomères est accélérée dans les lymphocytes circulants avec la durée d'exposition à la fumée de cigarette. Les patients fumeurs ont un raccourcissement des télomères accélérés en fonction de leur durée de tabagisme (Morlá, Busquets et al. 2006).

Il a été démontré que les patients BPCO ont des télomères plus courts que les sujets témoins et que les sujets non-fumeurs (Savale, Chaouat et al. 2009). De plus, il existe une corrélation positive entre l'obstruction des voies respiratoires mesurées par le ratio VEMS/CVF et la longueur des télomères. Les patients BPCO qui ont le plus d'obstruction des voies respiratoires ont des télomères plus courts dans leurs leucocytes circulants par rapport aux patients ayant une plus faible obstruction des voies respiratoires (Houben, Mercken et al. 2009, Mui, Man et al. 2009). Le raccourcissement des télomères chez les patients BPCO est accentué avec le temps et donc avec l'âge comparé à des sujets contrôles fumeurs (Córdoba-Lanús, Cazorla-Rivero et al. 2017).

La diminution de la taille des télomères, chez les patients BPCO, est corrélée à l'augmentation de la mortalité (Lee, Sandford et al. 2012, Jin, Lee et al. 2018). Les souris déficientes pour la télomérase avec des télomères courts ne développent pas d'emphysème plus important que les souris témoins. En revanche, à la suite d'une exposition à la fumée de cigarette, les souris avec des télomères courts vont développer un emphysème plus important que les souris WT. Cet emphysème accentué chez ces souris est en partie la cause d'une augmentation de marqueurs de cassures double brin d'ADN (53BP1) dans les cellules épithéliales pulmonaires (Alder, Guo et al. 2011).

Une étude a montré le rôle de la protéine TPP1 (telomere protection protein 1), du complexe Shelterin, dans l'induction de la sénescence cellulaire dans la BPCO. La protéine TPP1 est réduite dans les poumons de souris exposées à la fumée de cigarette et chez les patients fumeurs et les patients BPCO. La fumée de cigarette qui induit du dommage à l'ADN télomérique, réduit la liaison de la protéine TPP1 à l'ADN conduisant à une augmentation de la sénescence cellulaire. La fumée de cigarette induit l'acétylation et ainsi la dégradation de TPP1. Cette étude montre que l'induction de la sénescence cellulaire par l'exposition à la fumée de cigarette est médiée en partie par l'attrition des télomères et que la protéine TPP1 joue un rôle important dans ce processus (Ahmad, Sundar et al. 2017).

4.3 La sénescence cellulaire induite dans la BPCO

Comme nous l'avons vu précédemment, le défaut de régénération de la MEC est essentiel dans la BPCO, c'est pourquoi, beaucoup de recherches se sont axées sur le rôle des fibroblastes dans l'emphysème et le maintien de la structure du parenchyme. Une étude a démontré que les fibroblastes issus de patients emphysémateux avaient des signes de vieillissement prématuré indépendamment de la longueur des télomères. Les fibroblastes issus de ces patients sont positifs pour le marquage à la β -galactosidase et ont un niveau plus élevé d'expression d'IGFBP-3 que les fibroblastes issus de patients témoins (Müller, Welker et al. 2006).

Des fibroblastes pulmonaires humains normaux exposés à la fumée de cigarette perdent leur capacité de prolifération et entrent en sénescence. Une seule exposition à la fumée de cigarette conduit à une diminution de la prolifération et une augmentation des protéines ATM, p53 et p21. Après des expositions multiples à la fumée de cigarette, les fibroblastes entrent dans un arrêt permanent de la prolifération avec une augmentation de p53, p16 et du nombre de fibroblastes positifs pour la β -galactosidase (Nyunoya, Monick et al. 2006). Un moyen de réduire la sénescence des fibroblastes issus de patients BPCO est de les traiter à l'hémiperméabilisant permettant d'atténuer les dysfonctions mitochondriales retrouvées dans ces fibroblastes (Even, Fayad-Kobeissi et al. 2018).

L'expression de la décorine, protéine de la matrice extracellulaire, est diminuée dans les fibroblastes de patients BPCO comparé aux sujets témoins et cette expression est corrélée positivement avec les paramètres pulmonaires VEMS et VEMS/CVF et négativement corrélée avec les marqueurs de sénescence p16 et p21. Le traitement des fibroblastes primaires humains au paraquat (PQ) induit la sénescence cellulaire (augmentation de p16, p21, SA- β -galactosidase, IL-6, IL-8). Cette augmentation de la sénescence cellulaire est associée à une diminution d'expression de gènes de la matrice extracellulaire comme la décorine, *Col1A1*, *Fibuline-5*, *élastine*, *fibronectine-1* et *Acta2*. Dans les fibroblastes issus de poumons de patients BPCO, l'expression de la décorine est plus faible par rapport aux fibroblastes issus de poumons de sujets témoins et une faible expression de la décorine corrèle avec des forts niveaux de marqueurs de sénescence cellulaire. Les auteurs concluent qu'il existe un lien entre la sénescence cellulaire et une dérégulation des gènes de la matrice extracellulaire chez les patients BPCO (Woldhuis, de Vries et al. 2020).

D'autres études ont montré le rôle de la sénescence dans les cellules épithéliales alvéolaires dans l'emphysème induit dans la BPCO. Les cellules épithéliales alvéolaires exposées à la fumée de cigarette deviennent sénescentes avec une augmentation de la protéine p21, du nombre de cellules positives à la β -galactosidase. L'exposition de deux semaines à la fumée de cigarette induit dans les poumons de souris une augmentation de cellules alvéolaires épithéliales positives à la β -galactosidase. Chez ces souris, les cellules épithéliales alvéolaires de type II ont une augmentation du marquage à la lipofuscine et à p21 (Tsuji, Aoshiba et al. 2004).

Dans les échantillons de poumon de patients emphysémateux, les cellules alvéolaires de type II positives pour p16 et p21 sont plus nombreuses par rapport aux poumons de patients asymptomatiques fumeurs et non-fumeurs. Les patients avec un emphysème ont également plus de cellules endothéliales positives pour p16 que les patients asymptomatiques fumeurs et non-fumeurs et de cellules endothéliales positives pour p21 que les patients asymptomatiques fumeurs. De plus, le niveau de sénescence dans les cellules alvéolaires corrèle avec la limitation du débit d'air des

patients (Tsuji, Aoshiba et al. 2006). Chez les patients BPCO, on retrouve une augmentation des cellules épithéliales alvéolaires de type II positives pour p16 et une augmentation de l'activation de NF- κ B par rapport aux patients fumeurs et non-fumeurs. Le pourcentage de cellules épithéliales alvéolaires de type II positives pour p16 corrèle avec le pourcentage de phosphorylation de NF- κ B (Tsuji, Aoshiba et al. 2010).

La sénescence cellulaire est également retrouvée dans les cellules endothéliales des patients BPCO. Une étude a montré que les cellules endothéliales cultivées à partir du sang (en anglais expanded blood outgrowth endothelial cells ou BOEC aussi appelées cellules endothéliales formant des colonies) sont plus sénescentes chez les patients BPCO et les fumeurs sains que chez les sains non-fumeurs (augmentation de cellules positives pour la β -galactosidase et de l'expression de p16 et p21). Cette sénescence est associée à une augmentation des marqueurs de cassures double brin d'ADN (γ H2AX et 53BP1). Dans les BOEC, l'inhibition d'expression de SIRT1 induit l'augmentation de cellules positives pour la β -galactosidase. La protéine SIRT1 est réduite dans les BOEC de fumeurs sains et de patients BPCO comparé à des sujets sains non-fumeurs. Ces résultats suggèrent que la diminution de la protéine SIRT1 est associée à une augmentation de sénescence chez les fumeurs sains et les patients BPCO. L'inhibition d'ATM dans les cellules HUVEC induit une forte augmentation de SIRT1 et une diminution du marquage β -galactosidase. Les auteurs suggèrent que l'inhibition d'ATM en augmentant SIRT1 diminue la sénescence des cellules endothéliales chez les patients BPCO (Paschalaki, Starke et al. 2013).

Aoshiba et al ont montré que le marquage de γ H2AX est augmenté dans les poumons de patients BPCO comparés aux témoins et qu'il est co-localisé avec d'autres marqueurs de cassures double brin d'ADN comme le phospho-53BP1 et le phospho-ATM. Ce marquage γ H2AX est augmenté dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II, épithéliales alvéolaires de type I et les cellules endothéliales. Dans les poumons de patients BPCO, on retrouve plus de cellules épithéliales alvéolaires de type II exprimant la caspase-3 (marqueur d'apoptose), phospho-53BP1, phospho-ATM, p16, NF- κ B, IL-6 et 8-OHdG (8-oxo-guanine, marqueurs de stress oxydatif) que chez les patients fumeurs non-BPCO et les non-fumeurs. La sévérité des dommages à l'ADN dans le poumon est associée à l'augmentation de l'oxydation de l'ADN et de la sénescence dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II. Dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II, l'augmentation des foci de γ H2AX est associée à l'augmentation du 8-OHdG montrant que le stress oxydatif joue un rôle dans les cassures double brin retrouvées dans le parenchyme des poumons de patients BPCO. *In vivo*, l'exposition à la fumée de cigarette des cochons d'Inde pendant 10 semaines induit un emphysème et une augmentation du marquage γ H2AX dans les cellules alvéolaires.

Ces résultats montrent que dans les poumons de patients BPCO, les cassures d'ADN double brin causées par la fumée de cigarette sont induites dans les cellules épithéliales de type I, de type II et dans les cellules endothéliales et que cela induit un phénotype sénescence (Aoshiba, Zhou et al. 2012).

4.4 La sénescence cellulaire dans les modèles animaux BPCO

Isaac K. Sundar et al ont montré que chez les souris WT, l'exposition chronique à la fumée de cigarette induit une augmentation de p16, p21, le nombre de cellules positives à la β -galactosidase et l'augmentation de la production de médiateurs pro-inflammatoires. Cependant la délétion de p16 (souris p16KO) n'a pas d'effet protecteur sur ces effets ni sur l'élargissement des espaces alvéolaires. L'instillation d'élastase augmente l'élargissement des espaces alvéolaires et la production de cytokines dans les LBA des souris p16KO et des souris p16^{CreCC10} (déficientes pour p16 spécifiquement dans les cellules épithéliales) par rapport aux souris contrôles exposées au PBS. Les auteurs concluent que la délétion de p16 peut atténuer les réponses inflammatoires induites par l'exposition aiguë à la fumée de cigarette mais n'est pas associée à l'élimination des cellules sénescence ou au blocage de la progression du phénotype pulmonaire induit dans les modèles d'emphysème (Sundar, Rashid et al. 2018).

Comme vu précédemment, SIRT1 est une protéine anti-âge qui est réduite dans les poumons de patients BPCO et impliquée dans la sénescence cellulaire en réponse à la fumée de cigarette. En effet, SIRT1 est réduite dans les poumons de souris exposées à la fumée de cigarette ou à l'élastase. Les souris Sirt1^{+/-} (hétérozygotes/haplosuffisantes) développent un élargissement des espaces alvéolaires dès l'âge de 1 an et ont une capacité à l'exercice diminuée. Chez ces souris, l'exposition à la fumée de cigarette durant 6 mois induit un emphysème plus important et plus précoce comparées aux WT. La déficience en Sirt1 spécifiquement dans les cellules épithéliales alvéolaires aggrave l'emphysème. A l'inverse, les souris surexprimant Sirt1 (Sirt1 Tg), sont protégées de l'emphysème induit par la fumée de cigarette. La sénescence cellulaire induite dans les poumons de souris exposées à la fumée de cigarette est diminuée chez les souris Sirt1 Tg. SIRT1 protège de l'induction de la sénescence cellulaire et de l'emphysème induits par la fumée de cigarette. L'exposition à la fumée de cigarette pendant 6 mois induit une réduction de la protéine FOXO3 dans les poumons de souris. Tous les marqueurs de sénescence mesurés sont augmentés dans les souris Foxo3^{-/-} en réponse à la fumée de cigarette ou à l'élastase. FOXO3 semble être requis pour l'effet protecteur de SIRT1 sur l'induction de la sénescence cellulaire et contre l'emphysème. L'élargissement des espaces alvéolaires, l'augmentation de la compliance et l'activité β -galactosidase sont améliorés dans les souris déficientes pour p21 (p21^{-/-}) comparées aux WT.

Le traitement par un inhibiteur de SIRT1 augmente l'activité β -galactosidase dans les poumons de souris WT et n'a pas d'effet sur les souris p21^{-/-} après exposition à la fumée de cigarette. SIRT1 régule donc la sénescence des cellules pulmonaires médiée par p21 et protège de l'emphysème à travers FOXO3 (Yao, Chung et al. 2012).

Une étude a montré que l'âge ne contribuait pas à l'induction de la sénescence cellulaire induit par l'exposition la fumée de cigarette dans des modèles de souris. Les souris âgées (17 mois) exposées à l'air ont une augmentation de l'activité β -galactosidase dans leur poumon par rapport aux jeunes (8 mois). L'exposition à la fumée de cigarette durant 6 mois induit une augmentation de l'activité β -galactosidase et de la protéine p16 autant chez les jeunes que chez les âgées. La compliance pulmonaire et le mean linear intercept (MLI) sont augmentés chez les âgées exposées à l'air comparé aux jeunes. Cependant l'exposition à la fumée de cigarette augmente la compliance et le MLI uniquement chez les jeunes.

Les auteurs concluent que l'âge contribue à la régulation de certains gènes clefs de la sénescence cellulaire dans les modèles d'emphysème murins et l'exposition chronique à la fumée de cigarette augmente l'expression de certains gènes de la sénescence cellulaire dans les poumons. L'exposition chronique à la fumée de cigarette et l'âge causent une sénescence cellulaire dans le poumon associée à la diminution des fonctions respiratoires et que le vieillissement augmente la réponse inflammatoire induite par la fumée de cigarette. L'âge influence l'activité β -galactosidase mais n'affecte pas les gènes associés à la sénescence par l'exposition à la fumée de cigarette (Rashid, Sundar et al. 2018).

4.5 Le rôle du SASP chez les patients BPCO

Plusieurs études décrivent que ce n'est pas la sénescence cellulaire seule qui joue un rôle dans la BPCO mais que la part du SASP est très importante notamment dans l'inflammation chronique caractéristique des patients BPCO.

Le stress oxydatif via l'exposition à la fumée de cigarette ou à d'autres gaz nocifs peut contribuer à un dommage à l'ADN persistant dans les cellules alvéolaires conduisant à une sénescence prématurée dans le poumon. Les facteurs sécrétés augmentés chez les patients BPCO sont communs aux éléments du SASP. Les facteurs de croissance, comme les facteurs de croissance endothéliaux, le facteur de croissance basique des fibroblastes, le facteur de croissance endothélial vasculaire, et l'angiogénine sont augmentés dans le milieu des cellules sénescents, dans les tissus des voies respiratoires et les cellules épithéliales des patients BPCO. Les IGFBP (insulin-like growth factor binding protein) sont fortement exprimées dans les cellules épithéliales, endothéliales et fibroblastes

sénescents (IGFBP-2, -3, -4, -5 et -6) et on retrouve une augmentation de l'IGFBP-3 dans les fibroblastes pulmonaires de patients emphysémateux. Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs), sont fortement augmentées dans les fibroblastes humains et murins sénescents (MMP-3, MMP-10, MMP-1). Dans les LBA des patients BPCO, MMP-1 est fortement augmenté et MMP-9 chez les patients emphysémateux. Les macrophages alvéolaires des fumeurs expriment plus de MMP-9 que les sujets normaux et cette augmentation est encore plus importante chez les patients BPCO. PAI-1 est aussi augmenté dans les cellules endothéliales et fibroblastes de donneurs âgés, comme chez les patients BPCO comparés à des sujets contrôles (Kumar, Seeger et al. 2014).

Dans notre laboratoire, Valerie Amsellem et al ont démontré que dans les poumons de patients BPCO, les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires étaient plus marquées pour p16 et p21 par rapport aux patients contrôles. Ces cellules de patients BPCO mises en culture entrent rapidement en sénescence répllicative avec une diminution de la capacité de doublement de la population, une augmentation de cellules positives à la β -galactosidase, une diminution de l'activité télomérase, des télomères plus courts et une augmentation des ARNm de p16 et p21 à passage précoce comparés aux cellules issues de sujets contrôles. Ces cellules endothéliales sénescentes de patients BPCO sécrètent d'avantage d'IL-6, IL-8, MCP-1, Hu-GRO et sICAM-1 (ICAM1-soluble) par rapport aux sujets contrôles à des passages précoces. La production de MCP-1, IL-8, Hu-GRO α et ICAM-1 corrèle avec le raccourcissement des télomères. Dans les poumons de souris déficientes pour TERC (Terc $^{-/-}$), une augmentation de l'IL-6, MCP-1, MIP-2, CXCL1, et ICAM-1 est mesurée par rapport aux souris WT. Cette étude suggère une contribution de la dysfonction de la télomérase dans l'inflammation du poumon et dans l'inflammation systémique des patients BPCO (Amsellem, Gary-Bobo et al. 2011).

Fang Zhou et al ont montré *in vivo* que l'exposition au naphthalene est toxique pour les cellules épithéliales Clara et induit des lésions des voies respiratoires. Dans ce modèle, l'injection de BrDu par des stress genotoxiques induit une sénescence prématurée dans les cellules Clara associée d'une activation de la voie p38MAPK. Cette sénescence induite empêche le processus de réparation et exacerbe l'inflammation après lésions des voies respiratoires. Les auteurs montrent que la sénescence des cellules Clara est accélérée chez les patients BPCO et accompagnée de l'activation de la voie p38MAPK. Ces résultats suggèrent que les cellules épithéliales sénescentes contribuent à l'inflammation des voies respiratoires des patients BPCO (Zhou, Onizawa et al. 2011).

PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) est fortement augmenté dans l'expectoration de patients BPCO comparés à des fumeurs de même âge non-BPCO et non-fumeurs sains. De plus, l'activité de NF- κ B dans les macrophages de l'expectoration corrèle significativement avec le niveau de PAI-1 mesuré. *In vitro*, le peroxyde d'hydrogène et la fumée de cigarette induisent la production de PAI-1

par les cellules épithéliales basales alvéolaires humaines d'adénocarcinome (cellules A549) et cette production est réduite par le traitement à un inhibiteur de la voie NF- κ B. La production de PAI-1 chez les patients BPCO est liée à l'activation de la voie NF- κ B et PAI-1 peut être considéré comme un biomarqueur de la pathogenèse de la BPCO (To, Takagi et al. 2013).

La protéine kinase AMPK (AMP-activated protein kinase) est importante dans le contrôle du métabolisme. Elle a montré jouer un rôle dans la régulation de la sénescence cellulaire et dans le vieillissement prématuré. Des chercheurs ont montré le rôle d'AMPK dans des cellules épithéliales des petites voies respiratoires. Ces cellules soumises à l'exposition à la fumée de cigarette ont une augmentation d'IL-6 et IL-8. L'activation d'AMPK réduit cette production et son inhibition l'augmente. Dans les cellules épithéliales de poumons humains, le traitement à la fumée de cigarette induit une augmentation d'expression de p16 et p21 et l'activation d'AMPK réduit cette expression. AMPK réduit donc la sénescence et la réponse inflammatoire induite par l'exposition à la fumée de cigarette. *In vivo*, dans un modèle d'emphysème induit par l'élastase, le traitement des animaux par un activateur d'AMPK, la metformine, atténue l'élargissement des espaces alvéolaires induit par l'élastase. Une augmentation des cytokines KC (keratinocytes-derived chemokine), MCP-1 et des protéines p21 et p16 est induite par l'élastase par rapport au groupe contrôle et le traitement à la metformine diminue cette augmentation. Ce traitement permet également d'inhiber la diminution des protéines mitochondriales SOD2 et SIRT3 induite par l'élastase. L'effet protecteur de l'AMPK sur l'emphysème est associé à une augmentation des protéines mitochondriales. L'activation de l'AMPK par la metformine permet d'atténuer l'élargissement des espaces alvéolaires, des réponses inflammatoires et de la sénescence cellulaire induits par l'élastase (Cheng, Li et al. 2017).

Une étude récente a montré que les fibroblastes issus de patients BPCO sécrètent des hauts niveaux d'éléments du SASP. Les auteurs ont étudié des fibroblastes issus de poumon de patients BPCO jeunes et âgés et de gravité légère à modérée comparés à des fibroblastes de patients contrôles non-BPCO. Le traitement des fibroblastes au paraquat (via la production de ROS mitochondriaux) induit une augmentation de 40% de cellules positives pour la β -galactosidase et une augmentation d'expression de p21 de 7 fois. Les surnageants récoltés 4 jours après l'induction de la sénescence montrent une augmentation de la sécrétion de 124 protéines du SASP multipliée par trois. Dans le surnageants des fibroblastes non traités au paraquat, une augmentation du niveau de 42 protéines du SASP est mesurée chez les fibroblastes issus de patients BPCO comparé à leurs contrôles. Ces protéines du SASP sécrétées à un fort niveau par les fibroblastes des patients BPCO peuvent être impliquées dans l'inflammation chronique liée à la BPCO (Woldhuis, Heijink et al. 2021).

La voie mTOR est très étudiée pour son rôle dans le vieillissement. L'inhibiteur de la voie mTOR, la rapamycine, est la seule substance pharmacologique connue à ce jour qui permet de prolonger la durée de vie dans tous les organismes étudiés. L'inhibition de mTOR induit l'autophagie, régule les fonctions mitochondriales, préserve les fonctions des cellules souches adultes et est utilisée comme thérapie immunosuppressive en limitant l'activation des lymphocytes T.

L'activation de mTOR active la kinase Akt et induit la sénescence et régule le SASP. La rapamycine atténue le phénotype pro-inflammatoire des cellules sénescents en supprimant spécifiquement la traduction de la cytokine IL-1 α . La réduction d'IL-1 α diminue la transcription des gènes inflammatoires régulés par le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B (Weichhart 2018).

Houssaini et al ont démontré que la voie mTOR est activée dans les poumons et les cellules de poumons de patients BPCO comparés aux sujets contrôles. Chez les patients BPCO cette activation est associée à une augmentation des protéines p16 et p21 et l'expression de p16 corrèle positivement avec le niveau de phospho-Akt, phospho-GSK3, phospho-4E-BP1. Les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales issues de poumons de patients BPCO entrent en sénescence et l'activation de la voie mTOR est augmentée par rapport aux cellules issues de patients contrôles. L'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine, permet de diminuer la sénescence cellulaire et les niveaux des effecteurs de la voie.

Les niveaux des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et CCL2 mesurés par ELISA sont augmentés dans les cellules issues de patients BPCO comparées aux cellules issues de contrôles et la rapamycine permet de réduire ces niveaux. L'inhibition de la voie NF- κ B par la transduction du gène I κ B α dans les cellules musculaires lisses, réduit l'expression d'IL-6, IL-8 et CCL2 par rapport à la transduction du vecteur contrôle mais n'a pas d'effet sur le PDL et le pourcentage de cellules positives pour la β -galactosidase.

L'effet de la surexpression de mTOR sur la sénescence cellulaire est évalué dans des modèles de souris déficientes pour TSC1 (régulateur négatif de mTORC1) de façon cellules spécifiques. La délétion de TSC1 spécifiquement dans les cellules musculaires lisses induit le développement d'une hypertension pulmonaire et une augmentation de p16 dans les cellules musculaires lisses. Ces cellules mises en culture entrent rapidement en sénescence cellulaire avec une augmentation des effecteurs de la voie mTOR et le traitement par la rapamycine permet de diminuer ces effets. La délétion conditionnelle de TSC1 dans les cellules endothéliales (PDGF-TSC1-/-) ou dans les cellules épithéliales alvéolaires (SPC-TSC1-/-) induit une augmentation de phospho-Akt^{Ser473}, phospho-GSK3, phospho-S6K et phospho-4EBP1, une augmentation des niveaux des protéines p16 et p21, un emphysème pulmonaire et une hypertension pulmonaire associés à une augmentation du niveau des cytokines et de l'infiltration des macrophages.

Le traitement à la rapamycine prévient le développement de l'emphysème et de l'hypertension pulmonaire et inhibe l'augmentation des cytokines. L'activation de mTOR conduit donc à la sénescence cellulaire et aux altérations pulmonaires de la BPCO et le traitement à la rapamycine permet de diminuer l'induction de la sénescence et le SASP. Cibler la voie mTOR pour inhiber la sénescence cellulaire et éliminer le SASP pourrait donc être prometteur sur le plan thérapeutique dans la BPCO (Houssaini, Breau et al. 2018).

III/ La fibrose pulmonaire

La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) est la plus commune des maladies interstitielles idiopathiques pulmonaires. Son incidence est en augmentation en Europe et en Amérique du Nord avec 2 à 9 nouveaux cas pour 100 000 personnes, son incidence est moindre en Asie et Amérique du Sud (0.5 à 4 pour 100 000). C'est une pathologie qui touche plus largement les hommes que les femmes et qui est rare chez les individus de moins de 50 ans. La médiane de l'âge du diagnostic étant de 65 ans. La médiane du temps de survie suivant le diagnostic est de 3 à 5 ans (Richeldi, Collard et al. 2017).

1. Les causes de la FPI

A l'origine, la FPI était considérée comme une maladie inflammatoire chronique qui progressivement conduisait à l'établissement d'une fibrose. Les effets des thérapies anti-inflammatoires montrent peu d'amélioration de la pathologie et les deux solutions thérapeutiques immunosuppressives utilisant le prednisolone et l'azathioprine montrent une forte mortalité. Il est donc important aujourd'hui de définir les différentes causes de cette pathologie qui résultent de multiples facteurs génétiques et environnementaux. Les lésions portent sur l'épithélium alvéolaire et sont induites initialement par un défaut de communication entre les cellules épithéliales et les fibroblastes, par la production et l'accumulation de matrice extracellulaire par les myofibroblastes et le remodelage de l'interstitium pulmonaire.

1.1 Les facteurs environnementaux

La plupart des patients ont été fumeurs au cours de leur vie (Baumgartner, Samet et al. 1997). Mais chez certains patients la cause est due à l'exposition aux particules de métaux, de bois, de silice, aux produits de synthèse utilisés en agriculture ou encore à la suite d'une infection virale (Taskar and Coultas 2006).

1.2 Les facteurs génétiques

Dans 25% des cas, la FPI est due à des facteurs génétiques. Les études d'association à l'échelle du génome (études GWAS) de cas familiaux affectant deux ou plus de membres de la famille de maladies pulmonaires interstitielles ont permis d'identifier des variants génétiques induisant un risque de développement de la maladie.

Ces variants incluent des gènes de dysfonction du surfactant comme *SFTPC*, *SFTPA1* et *SFTPA2*, des gènes impliqués dans la biologie des télomères comme *TERT*, *TERC*, des gènes impliqués dans la défense de l'hôte (*MUC5B*, *ATP11A*, *TOLLIP*), et dans les fonctions de barrière épithéliale (*DSP*, *DPP9*). Le variant de risque le plus largement répliqué (rs35705950) se trouve dans le promoteur du gène *MUC5B*, il représente un risque de 30% de développer la FPI. C'est un variant gain de fonction du gène *MUC5B* qui est retrouvé dans les formes familiales et sporadiques de FPI. *MUC5B* code pour la protéine précurseur mucine-5B qui contribue à la production du mucus des voies respiratoires et de ce fait joue un rôle dans la défense du poumon. Ces mutations peuvent conduire à une augmentation de mucine et une réduction du nettoyage muco-ciliaire ce qui empêche la réparation normale du poumon (Kaur, Mathai et al. 2017, Richeldi, Collard et al. 2017).

Les protéines du surfactant sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique des cellules épithéliales alvéolaires de type II puis stockées dans les corps lamellaires jusqu'à sécrétion dans les espaces alvéolaires. Les rares variants identifiés dans les gènes codant pour les protéines de surfactant A et C sont associés à la fibrose pulmonaire (*SFTPC*, *SFTPA1* et *SFTPA2*). Les variants *SFTPC* sont mutés dans le domaine BRICHOS qui est critique pour le repliement et le transport de la protéine. L'accumulation de protéines mal repliées augmente le stress du réticulum endoplasmique et conduit à une activation de la réponse UPR (Unfolded protein response). Les mutations du gène *SFTPA2* conduisent également à une augmentation du stress du RE.

Le lien entre les gènes du maintien de la télomérase et les maladies pulmonaires interstitielles a également été mis en évidence. Les variants *TERT* sont les plus représentés et sont retrouvés dans 15% des cas de maladies pulmonaires interstitielles. Le défaut du maintien des télomères peut être lié à la sénescence des cellules épithéliales et au défaut de réponse épithéliale face aux lésions.

Les analyses GWAS ont permis d'identifier des locus susceptibles à la FPI comme les molécules d'adhésion cellule-cellule : *DSP* et *DPP9*. *DSP* code pour la desmoplakine, un composant de la structure des desmosomes importants dans l'adhésion cellule-cellule. Les desmosomes ont des rôles dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration et l'apoptose. Dans les poumons des patients FPI on retrouve une forte expression de *DSP* (Kaur, Mathai et al. 2017).

2. Caractéristiques cliniques, diagnostiques et traitement de la FPI

Les symptômes de cette pathologie sont généralement un essoufflement inhabituel au cours d'un effort physique qui devient permanent et une toux sèche. A l'examen physique, on entend généralement des crépitements inspiratoires bibasilaires, fins et aigus qui sont présents chez environ 30 % des patients.

Les tests des fonctions respiratoires montrent une réduction de la capacité totale pulmonaire et des échanges gazeux anormaux (réduction de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone) (Richeldi, Collard et al. 2017).

L'identification de pneumonie interstitielle habituelle est basée sur les critères radiologiques ou histologiques chez des patients. L'examen au CT scanne permet le diagnostic mais parfois, une biopsie du poumon peut être nécessaire. Les résultats histopathologiques montrent que le profil habituel d'une pneumonie interstitielle est caractérisé par une fibrose interstitielle avec une hétérogénéité spatiale et une implication du parenchyme pulmonaire locale, des zones de fibrose marquées et une distorsion architecturale des alvéoles (Richeldi, Collard et al. 2017).

Il existe aujourd'hui deux médicaments approuvés dans le traitement de la FPI, le nintedanib et la pirfenidone. Le nintedanib est un inhibiteur tyrosine kinase qui supprime de nombreuses voies impliquées dans la pathogenèse de la fibrose comme l'inhibition du récepteur aux facteurs de croissance des fibroblastes, le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes, et le récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire. L'étude de phase 2 chez des patients atteints de FPI montre qu'il diminue le déclin des fonctions respiratoires et réduit l'incidence des exacerbations aiguës. En phase 3, après 52 semaines le nintedanib diminue le déclin de la capacité vitale forcée. En 2019, la FDA approuve le nintedanib pour le traitement de la sclérose systémique associée à une maladie pulmonaire interstitielle. La pirfenidone est une pyridine administrée oralement qui permet une action anti-inflammatoire, antioxydante et anti-fibrotique mais avec des mécanismes d'action inconnus. Dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire, on observe une inhibition de fibroblastes et de synthèse des collagènes par le traitement à la pirfenidone. Les essais cliniques de phase 3 semblent montrer un effet sur la diminution du déclin de la capacité vitale forcée. Ces traitements ne montrent pas d'effets bénéfiques sur la survie. Pour certains patients, la transplantation pulmonaire est envisagée. Celle-ci est rare car la chirurgie est complexe et les dons d'organes rares (Richeldi, Collard et al. 2017).

3. Pathogenèse de la FPI

La fibrose se décrit de manière générale par un dépôt excessif des composants du tissu conjonctif à la suite d'une lésion tissulaire. L'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) conduit à une désorganisation de l'architecture du tissu pouvant conduire à son dysfonctionnement. La lésion initiale conduit à une cascade de réponse pour restaurer le tissu ou l'organe. La première réponse est une réponse immunitaire pour recruter les leucocytes. La réponse des lymphocytes T helper de type 2 TH2 et des macrophages de type 2 induit un relargage de médiateurs profibrotiques. Ces médiateurs vont contribuer à l'activation et l'accumulation de myofibroblastes.

Les myofibroblastes sont définis par l'expression de protéines contractiles et par leur forte sécrétion de protéines de la MEC. Différentes sources peuvent conduire au phénotype de myofibroblaste : les cellules mésenchymateuses, les péricytes de l'interstitium pulmonaire, les fibrocytes circulants, la transition épithélio-mésenchymateuse. (Rock, Barkauskas et al. 2011, Hung, Linn et al. 2013). Dans un cas normal, les myofibroblastes sont éliminés par apoptose à la suite de la réparation tissulaire. Dans le cas pathologique, le remodelage du tissu et l'activation des fibroblastes persistent et deviennent chronique. Le défaut de remodelage du poumon conduit à une bronchiolisation du tissu alvéolaire. L'activation de ces myofibroblastes conduit à la production de composants de la MEC qui détruisent la structure normale des alvéoles et ainsi à un défaut d'échange gazeux.

L'activation anormale des cellules basales des voies respiratoires contribue à la régénération des épithéliums alvéolaires endommagés conduisant à la bronchiolisation des espaces alvéolaires (Richeldi, Collard et al. 2017).

Beaucoup de recherche sont en cours pour comprendre quels sont les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la fibrogenèse et la FPI. La dérégulation chronique des cellules épithéliales alvéolaires de type II (ACE2 pour alveolar epithelial cells) joue un rôle central dans le processus fibrosant. Normalement, les ACE2 permettent le renouvellement des cellules épithéliales alvéolaires de type I (AEC1) durant l'homéostasie ou lors de lésions pulmonaires. Chez les patients atteints de FPI on retrouve une perte anormale des cellules ACE1 et des cellules ACE2. Les AEC1 et AEC2 anormaux sont localisées à côté de cellules épithéliales alvéolaires hyperplasiques ou apoptotiques. Dans ce cas, les cellules ACE2 ont un raccourcissement des télomères prématurés et ont une capacité de renouvellement diminuée (Naikawadi, Disayabutr et al. 2016). Des télomères courts peuvent être facteurs de risque dans la FPI (Alder, Chen et al. 2008, Richeldi, Collard et al. 2017). Les cellules épithéliales alvéolaires activées sécrètent de nombreux facteurs fibrotiques et cytokines comme le TGF- β (transforming growth factor- β). Les mécanismes de l'impact des éléments de la MEC dans la genèse de la fibrose sont encore mal connus.

Les voies du développement embryonnaire du poumon comme les voies TGF- β (Transforming growth factor), Wnt, SHH (Sonic hedgehog), Notch, et FGF (Fibroblast growth factors) sont des voies dérégulées durant la fibrose pulmonaire (**Figure 20**). (Chanda, Otoupalova et al. 2019)

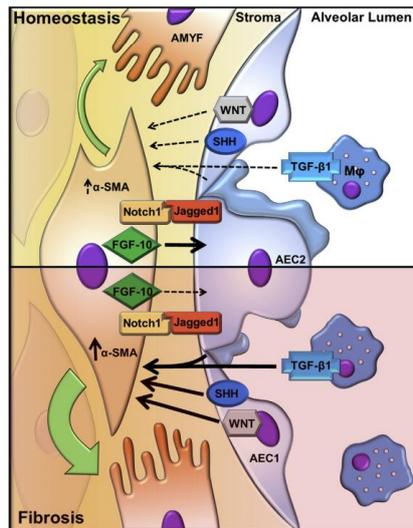


Figure 20 : Schéma représentant les voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire (Chanda, Otoupalova et al. 2019)

Par exemple, une étude a montré que la voie WNT/ β caténine est activée dans l'épithélium au cours de la fibrose pulmonaire. L'expression de l'ARN et de la protéine WISP1 (WNT1-inducible signaling protein 1) est fortement augmentée dans la fibrose pulmonaire expérimentale et idiopathique. Le traitement par WISP1 des cellules primaires épithéliales alvéolaires de type II induit l'augmentation de la prolifération des cellules, de l'expression des marqueurs profibrotiques et de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Le traitement des fibroblastes primaires par WISP1 entraîne une augmentation du dépôt de MEC. Enfin, la déplétion de WISP1 (à l'aide d'anticorps neutralisants) permet une atténuation marquée de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine et une amélioration de la survie *in vivo* (Königshoff, Kramer et al. 2009).

4. La sénescence cellulaire dans la fibrose pulmonaire

La bléomycine est un membre de la famille des antibiotiques glycopeptides qui ont une activité antitumorale. Les effets cytotoxiques de la bléomycine seraient liés à la capacité du médicament à provoquer des lésions de l'ADN en présence de co-facteurs spécifiques comme le Fe II, le Cu II et l'oxygène. Le modèle de bléomycine chez la souris a permis de montrer une induction de la sénescence cellulaire. Le dommage à l'ADN engendré conduit à la réparation de l'ADN ou à la sénescence cellulaire (Chen and Stubbe 2005). La bléomycine est utilisée pour induire le modèle de fibrose pulmonaire chez la souris. Au septième jour après l'instillation intratrachéale de bléomycine, on observe un épaissement des septums alvéolaires résultant d'un œdème et d'une infiltration des lymphocytes et de quelques neutrophiles, ainsi qu'un effondrement des espaces aériens alvéolaires.

Au 14e jour, un épaississement des septa alvéolaires par prolifération de fibroblastes et dépôt de collagène est observé. Au 21e jour, l'épaississement des septa alvéolaires par la fibrose est plus intense et est associé à un remodelage important de la structure alvéolaire.

Le traitement de cellules épithéliales alvéolaires de type II, A549, à la bléomycine, induit une sénescence cellulaire de façon dose dépendante. Les A549 traitées ont un marquage à la β -galactosidase, une augmentation de la taille des cellules et du nombre de lysosomes, un arrêt de croissance cellulaire et une augmentation du niveau de la protéine p21. L'injection intratrachéale de bléomycine (5 U/kg) chez les souris C57Bl6 induit dès 4 jours une augmentation des cellules positives pour la β -galactosidase dans le poumon, principalement des cellules épithéliales alvéolaires et des macrophages. Le marquage à la β -galactosidase atteint son maximum à 7 jours et une augmentation est maintenue jusqu'à 21 jours. De plus, ce marquage est plus important dans les zones fibrotiques que non fibrotiques (Aoshiba, Tsuji et al. 2003).

L'effet de l'âge sur l'induction de la fibrose pulmonaire est également montré par l'étude des souris à sénescence accélérée. Les souris SAMP8 (souris à sénescence accélérée) de 12 mois, développent plus de fibrose pulmonaire que les souris SAMR1 (souris résistante à la sénescence accélérée) 14 jours après l'injection de la bléomycine (3,6 U/kg). Cette fibrose plus importante est associée à une augmentation de collagène 1 et 4, du TGF- β 1 et de fibrocytes circulants dans le sang. Ces résultats montrent que les souris âgées sont plus susceptibles de développer la fibrose pulmonaire et que cela est lié à la capacité de recrutement de plusieurs types cellulaires au niveau de la lésion pulmonaire (Xu, Gonzalez et al. 2009).

Les marqueurs de sénescence cellulaire sont retrouvés dans les échantillons de patients FPI. Par exemple, p16 est augmenté avec α -SMA, collagène 1 et TGF- β dans les cellules alvéolaires de type II et dans les zones fibrotiques de poumons de patients FPI comparés à des poumons de patients contrôles (Lomas, Watts et al. 2012). Les fibroblastes issus de poumons de patients FPI entre rapidement en sénescence et ont une augmentation d'expression d' α -SMA, montrant leur différenciation en myofibroblastes (Yanai, Shteinberg et al. 2015).

Dans un modèle de fibroblastes humains traités à la bléomycine, la sénescence est induite avec une augmentation de l'activité β -galactosidase, et une augmentation des niveaux d'IL-6. Le traitement par des flavonoïdes (anti-inflammatoires) de ces fibroblastes permet d'inhiber la production d'IL-6 mais également d'autres éléments du SASP comme IL-1 α , IL-1 β , IL-8 et MMP-3. Les flavonoïdes inhibent le SASP en inhibant NF κ B via les voies IRAK1/I κ Ba (Lim, Park et al. 2015).

En 2017, l'équipe de Schafer et al montre également la présence de marqueurs de sénescence cellulaire dans les poumons de patients FPI. P16 augmente dans les poumons de patient et son niveau corrèle avec la sévérité de la maladie. Les cellules p16 positives sont autant des cellules épithéliales que des fibroblastes. Chez ces patients, les éléments du SASP sont retrouvés augmentés.

Dans le modèle de fibrose pulmonaire induit par l'injection de bléomycine (2 U/kg), p16 est augmenté dans les poumons et plus particulièrement dans les cellules épithéliales et fibroblastes. Dans ces cellules, des éléments du SASP et de la matrice extracellulaire sont augmentés comme MCP-1, PAI-1, TNF- α , MMP10, MMP12, Col1a1 et TGF- β . Les auteurs montrent le pouvoir fibrogenique du SASP en traitant des fibroblastes IMR90 par du milieu de fibroblastes préalablement exposés aux radiations et rendu sénescents avec un fort niveau de protéine du SASP. Le milieu des fibroblastes sénescents induit chez les fibroblastes naïfs une augmentation de la protéine α -SMA et l'expression des gènes *Acta-2*, *Col1A1*, *Col1A2* et *Fn1* (fibronectine 1). Le SASP des cellules sénescents permet donc d'induire un profil fibrosant (Schafer, White et al. 2017).

Aoshiba et al, en 2013, ont montré l'impact du SASP dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris. L'injection de la bléomycine (2,5 mg/kg) induit après 7 jours une forte augmentation de γ H2AX et de phospho-ATM/ATR nucléaires, ces marqueurs diminuent à 14 jours puis encore à 21 jours. p21 apparait dès 7 jours et est à son maximum à 14 jours puis rediminue à 21 jours. Par immunohistochimie, les auteurs montrent que 90% des cellules positives pour γ H2AX co-expriment l'E-cadherine, un marqueur épithélial. Le marqueur β 4 intégrine (marqueur de cellules progénitrices épithéliales alvéolaires) est colocalisé avec 63% et 91% des cellules positives pour γ H2AX respectivement 7 jours et 14 jours après l'injection de bléomycine. Le marquage γ H2AX est observé dans 2,7 % des cellules épithéliales alvéolaires des poumons de souris 7 jours après l'instillation de bléomycine versus 0,01 % dans les poumons de souris instillées au PBS. L'injection de bléomycine induit une augmentation d'expression de l'IL-6, TNF- α , TGF- β , MMP-2 et MMP-9. Dans les cellules positives pour γ H2AX, 17% expriment l'IL-6, 44% le TNF α et 25% les MMPs. De plus, 12 et 27% des cellules positives pour γ H2AX sont marquées respectivement pour IKK α/β et p38MAPK phosphorylées. Les auteurs concluent qu'à la suite d'une injection de bléomycine, les cellules épithéliales alvéolaires ont du dommage à l'ADN et que cela conduit à la surexpression d'éléments du SASP (IL-6, TNF- α , TGF- β , MMP-2 et MMP-9) activés par les voies NF κ B et p38MAPK (Aoshiba, Tsuji et al. 2013).

Un élément du SASP qui semble très important dans la fibrose pulmonaire est PAI-1. Une étude a démontré que PAI-1 est un médiateur de la sénescence des cellules épithéliales alvéolaires de type II (ATII) induite par la bléomycine à travers l'activation de la voie p53-p21-pRb. En effet PAI-1 est augmenté dans les cellules ATII des poumons de patients FPI et dans les poumons de modèles murins de fibrose induit à la bléomycine. La délétion de PAI-1 dans les cellules ATII de ces souris atténue la sénescence des ATII et la fibrose pulmonaire (Jiang, Liu et al. 2017). Une autre étude de cette même équipe a ensuite confirmé le rôle de PAI-1 dans l'induction de la sénescence dans le contexte de fibrose. En effet, les cellules primaires ATII de souris exposées au TGF- β 1 deviennent sénescents avec une augmentation de cellules positives pour la β -galactosidase et du niveau des protéines p16,

PAI-1, IL-6, PDGF et IGFBP3. Les cellules ATII extraites des poumons de souris PAI-1 déficientes (PAI-1^{-/-}) ne sont pas sénescentes même après stimulation au TGF- β 1. Ces résultats montrent que le TGF- β 1 induit la sénescence des cellules ATII par induction de PAI-1 et par activation de p16. Les cellules ATII sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques comme IL-4 et IL-13, deux cytokines impliquées dans l'activation des macrophages. De plus l'inhibition de PAI-1 abolit la production de ces médiateurs induits par TGF- β 1. Les cellules ATII facilitent donc la fibrose par la sécrétion de ces médiateurs pro-fibrotiques. Le traitement de cellules ATII de rat par TGF- β 1 induit aussi une augmentation de cellules positives pour la β -galactosidase et une augmentation d'expression de PAI-1 et p16. Le traitement de ces cellules par un inhibiteur de PAI-1 bloque complètement l'effet du TGF- β 1. PAI-1 médie donc la sénescence induite dans les cellules ATII par le TGF- β 1. Cet effet de PAI-1 est dépendant de p16 car la réduction d'expression de p16 par un siRNA bloque l'augmentation de cellules positives pour la β -galactosidase ainsi que la sécrétion de d'IL-4, IL-6 et IL-13 induit par la protéine PAI-1. PAI-1 joue donc un rôle dans l'induction de la sénescence des cellules ATII et la sécrétion de médiateurs fibrotiques en induisant p16. Les auteurs suggèrent que PAI-1 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de la FPI (Rana, Jiang et al. 2020).

L'élimination des cellules sénescentes est étudiée pour diminuer la fibrose pulmonaire. L'élimination des cellules sénescentes par le traitement à l'AP20187 ou par le dasatinib-quercetin des souris p16-ATTAC traitées à la bléomycine réduit fortement les transcrits de p16, MCP-1, IL-6, MMP-12, COL1A1 et TGF- β qui étaient augmentés par l'instillation à la bléomycine. De plus les fonctions respiratoires et la capacité à l'exercice détériorées par la bléomycine sont améliorées par le traitement à l'AP20187 et par le dasatinib-quercetin avec une augmentation de la compliance et du temps de course. En revanche la réduction de la fibrose mesurée en histologie n'est pas significativement démontrée. L'élimination des cellules sénescentes permet d'améliorer la fibrose pulmonaire lorsque que le traitement est donné en préventif. Pour évaluer l'effet thérapeutique, les souris p16-ATTAC sont traitées à la bléomycine puis les traitements à l'AP20187 ou au dasatinib-quercetin sont administrés deux semaines plus tard pendant deux semaines. Les groupes recevant la bléomycine sans traitement ont une rémission de la fibrose en quatre semaines. Les auteurs montrent une corrélation dans ce groupe entre le niveau d'expression de p16 et MCP-1, MMP-10, PAI-1 et COL1A1. Ils suggèrent que la réparation après quatre semaines peut être associée à la présence de cellules sénescentes. L'élimination des cellules sénescentes peut donc être efficace pour améliorer la fibrose pulmonaire mais lorsqu'elle est traitée dès l'établissement de la maladie, cet effet est principalement dû à la réduction des éléments du SASP produits par les cellules sénescentes (Schafer, White et al. 2017).

D'autres études ont montré l'intérêt d'utiliser des sénolytiques dans la fibrose pulmonaire. Le niveau de p16 est augmenté dans les poumons de patients FPI comparés aux contrôles. De plus, la protéine p21 est augmentée chez ces patients (ARNm inchangé). Un co-marquage avec les marqueurs de cellules épithéliales montrent que p16 et p21 sont retrouvées dans l'épithélium alvéolaire et largement dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II (ATII) dans les poumons de patients FPI. *In vivo*, dans un modèle de souris injectées à la bléomycine (2U/kg), les transcrits de p16 et de p21 sont augmentés. Le transcrit de p21 augmente dès 7 jours post-injection de bléomycine et diminue progressivement jusqu'à retrouver son niveau de base à 21 jours, tandis que p16 augmente après 14 jours et reste stable jusqu'à 21 jours. La protéine p21 est augmentée à 7 jours puis diminue dès 14 jours. Dans un modèle de tissu 3D issu de poumon de souris, la bléomycine induit une augmentation du nombre de cellules positives pour la β -galactosidase et cette activité est particulièrement augmentée dans les cellules épithéliales. L'analyse d'enrichissement de gènes dans les cellules issues de poumons de souris montre que la bléomycine induit une augmentation des gènes de la sénescence cellulaire dans les ATII mais pas dans les fibroblastes. Dans les ATII issues de poumons de souris traitées à la bléomycine, les cellules positives à la β -galactosidase, l'ARNm de p16 et p21, le marqueur d'hétérochromatine H3K9me3, les protéines du SASP (Spp1 [secreted phosphoprotein 1], MMP-2, 3, 12, 14 et IGFBP 3, 4, 7) sont augmentés par rapport aux ATII issues des poumons de souris traitées au PBS. Le traitement par les sénolytiques dasatinib-quercetin des ces cellules ATII « fibrotiques » permet de diminuer le nombre de cellules sénescents, le transcrit de p16, les transcrits des éléments du SASP (Mmp-12, Serpine1, Spp1, IL-6), les protéines de la matrice extracellulaire (Col1a1, Col5a3, Fn1) et d'augmenter des marqueurs d'apoptose et de cellules épithéliales (E-cadherine). Des effets similaires du traitement au dasatinib-quercitine sont retrouvés dans un modèle de fibrose 3D issus de poumons de souris traitées à la bléomycine (Lehmann, Korfei et al. 2017).

En 2018, est réalisée la première étude pilote pour tester l'effet du traitement dasatinib-quercitine sur 14 patients FPI par l'équipe de James L. Kirkland. Le traitement était administré 3 fois par jour pendant 3 semaines. Les patients choisis ont une FPI modérée ou sévère. Après ces 3 semaines il n'y a pas de différence de poids. Les principaux effets secondaires sont la toux, l'irritation de la peau, des nausées et maux de tête. Les améliorations des fonctions physiques sont retrouvées à la suite du traitement : amélioration du 6MWD (distance en six minutes de marche), du 4-m gait speed (vitesse de marche), du chair-stands (s'asseoir et se lever 5 fois d'une chaise le plus vite possible). Les améliorations persistent plusieurs jours après l'administration de la dernière dose ce qui suggère que le mécanisme continue en absence du médicament. Une corrélation est trouvée entre l'expression de certains éléments du SASP et l'amélioration des fonctions physiques. Une hospitalisation a été rapporté mais généralement les effets cliniques sont modérés, réversibles et sans séquelles.

Les auteurs précisent que des études sur du plus long terme doivent être effectuées pour observer des améliorations des fonctions respiratoires dans la FPI. Si diminution de fibrose pulmonaire il y a, cela se produirait bien après l'élimination des cellules sénescences du poumon. De plus ces études doivent être réalisées avec un groupe traité avec un placebo et avec un plus grand nombre de patients (Justice, Nambiar et al. 2019).

CHAPITRE 3 : Les voies PLA2R1 et JAK/STAT

I/ La voie du récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1)

1. Les phospholipases : généralités

La superfamille des enzymes phospholipases (PLA2s) est composée de 15 groupes comprenant quatre types principaux : les PLA2s sécrétées (sPLA2s), les PLA2s cytosoliques (cPLA2s), les PLA2s indépendantes du calcium, et l'acétyl hydrolase du facteur d'activation des plaquettes (PAF) associée à la lipoprotéine oxydée (Lp) PLA2. Ces quatre types sont impliqués dans le métabolisme des lipides et sont étudiés dans plusieurs pathologies pour développer des inhibiteurs spécifiques. Les PLA2s hydrolysent l'acide gras en position sn-2 des phospholipides membranaires pour libérer de l'acide arachidonique, un précurseur des eicosanoïdes, notamment des prostaglandines (PGs) et des leucotriènes (LTs). *In vivo*, la position sn-2 des phospholipides contient fréquemment des acides gras polyinsaturés qui, lorsqu'ils sont libérés, peuvent être métabolisés pour former divers eicosanoïdes et médiateurs lipidiques bioactifs. Dans les années 1990, les PLA2s sont découvertes comme les composants majeurs des venins de serpent, plus tard on les découvre chez l'humain et comme enzymes digestives chez les mammifères, les PLA2s pancréatiques (Burke and Dennis 2009).

1.1 Groupes des PLA2s

Les PLA2 sécrétées (sPLA2s) appartiennent au premier type des PLA2s qui ont été découverts dans les venins de scorpions et de serpents, dans les jus pancréatiques et le liquide synovial arthritique chez les mammiphères. Le premier groupe IB a été découvert en 1986, le second groupe IIA induit dans les sites inflammatoires a été découvert en 1989. En 1994, d'autres groupes des sPLA2s ont été clonés : les groupes IIC et V puis plus tard, les groupes X, IID, IIE, IIF, III, et XII. Les sPLA2s sont de petite taille, entre 13 et 15 kDa et possèdent un site catalytique hautement conservé qui se lie au Ca^{2+} .

Les PLA2 cytosoliques (cPLA2s) ont été identifiés dans les plaquettes humaines et appartiennent au groupe GIV. L'activation des cPLA2s requière de manière générale, la phosphorylation de leur sérine par les protéines MAPK (mitogen-activated protein kinases).

En 1994, le premier membre des PLA2 indépendants du Ca^{2+} (iPLA2s) a été purifié dans les macrophages. Les iPLA2s appartiennent au groupe de famille GVI. La PAF, acétyl hydrolase/lipide oxydé LpPLA2 est un membre de la famille GVII des enzymes PLA2s (Burke and Dennis 2009).

Les sections suivantes décriront plus précisément les sPLA2s qui sont les PLA2s les plus décrites.

1.2 Expression et fonctions des sPLA2s

Les phospholipases jouent un rôle antibactérien contre les bactéries Gram-positives en dégradant la membrane bactérienne (Foreman-Wykert, Weinrauch et al. 1999). Les effets des sPLA2s sont associés au relargage des cytokines, des métalloprotéinases et à la génération d'oxyde nitrique (Granata, Nardicchi et al. 2009, Segelmark 2011).

La **sPLA2-IB** est sécrétée par le pancréas et devient une enzyme active dans le duodenum. Sa fonction est de digérer les phospholipides alimentaires. Elle est aussi exprimée dans d'autres organes comme le poumon, le rein et la rate.

Le niveau du groupe des **sPLA2-IIA** dans le sérum est corrélé à la sévérité des maladies inflammatoires. L'expression de sPLA2-IIA est induite par un stimulus pro-inflammatoire et sa diminution d'expression par des cytokines anti-inflammatoires. Chez la souris son expression est limitée aux intestins. La sPLA2-IIA a également des propriétés anti-bactériennes.

L'enzyme **sPLA2-IIC** est exprimée dans les testicules des rongeurs. Dans le génome humain, l'absence d'une portion d'un exon fait qu'il n'y a pas d'expression d'une protéine fonctionnelle chez l'humain.

Les **sPLA2-IID** et **sPLA2-IIE** ont une structure similaire à la sPLA2-IIA et sont surexprimées dans certains tissus à la suite d'un stimulus pro-inflammatoire. La **sPLA2-IID** est constitutivement exprimée dans les organes immuns et digestifs et la **sPLA2-IIE** est exprimée constitutivement à de faibles niveaux dans plusieurs tissus. La **sPLA2-IIF** est exprimée uniquement dans les testicules chez la souris adulte mais est détectée dans différents organes chez l'humain à des niveaux très faibles. La **sPLA2-V** chez la souris est exprimée à de fort niveau dans de nombreux tissus et dans des cellules immunitaires. Elle est aussi largement exprimée chez l'homme, principalement dans le cœur. Son expression est induite par un stimulus pro-inflammatoire. La **sPLA2-X** est exprimée principalement dans les organes immuns et digestifs et dans les testicules. La **sPLA2-III** est une protéine large de 55kDa qui est exprimée dans le rein, cœur, foie et les muscles squelettiques. La **sPLA2-XII**, enzyme de 19kDa, est retrouvée dans le cœur, les muscles squelettiques, le rein et le pancréas (Murakami and Kudo 2002).

1.3 Les PLA2s dans le poumon

Les sPLA2s peuvent affecter les fonctions pulmonaires directement par la modification de la composition en lipides des membranes cellulaires ou du surfactant pulmonaire ou indirectement à travers la génération de médiateurs lipidiques.

Les sPLA2s sont significativement surexprimées chez les patients SDRA (syndrome de détresse respiratoire aiguë, en anglais acute respiratory distress syndrome ARDS).

Le SDRA est une forme grave de lésion pulmonaire aiguë causée par des lésions pulmonaires directes comme la pneumonie, mais aussi par des lésions indirectes comme la septicémie. Dans les deux cas cela conduit à la perturbation de la perméabilité alvéolo-capillaire, le dysfonctionnement du surfactant pulmonaire et l'infiltration des neutrophiles.

La sPLA2-IIA joue un rôle crucial dans l'hydrolyse des phospholipides du surfactant pulmonaire pendant la progression de lésions pulmonaires aiguës chez le lapin (Furue, Kuwabara et al. 1999). La sPLA2-IIA est exprimée à des niveaux faibles chez un sujet sain mais est très augmentée pendant l'inflammation et les infections, elle représente un biomarqueur dans la septicémie et plusieurs infections. Des études ont montré une augmentation d'expression de sPLA2-IIA dans les liquides broncho-alvéolaires et le plasma de patients avec un SDRA. Les niveaux de sPLA2-IIA sont retrouvés élevés dans le plasma des patients COVID-19 et corrélerent avec la sévérité de la maladie. Des études précliniques ont démontré que l'inhibition de sPLA2-IIA par une petite molécule LY315920Na/S-5920 est efficace pour atténuer les lésions pulmonaires chez des modèles animaux de septicémie et de lésions pulmonaires aiguës (Furue, Mikawa et al. 2001).

La sPLA2-V semble aussi jouer un rôle important dans le poumon où son rôle majeur est l'hydrolyse du surfactant pulmonaire composé de phospholipides et protéines. La délétion génétique de sPLA2-V chez la souris conduit à une diminution significative de l'œdème pulmonaire et de l'inflammation induits par le LPS. (Muñoz, Meliton et al. 2009, Letsiou, Htwe et al. 2021).

Le groupe X des sPLAs est connu pour être impliqué dans la pathogenèse de l'asthme et des réactions allergiques. sPLA2-X joue un rôle central dans la biosynthèse des eicosanoïdes dans le poumon et est un candidat en thérapie pour l'asthme. La biosynthèse des eicosanoïdes en particulier les cysteinyl leukotriènes (CysLT), est exagérée dans l'asthme. Les patients asthmatiques avec des hyperréactivités des voies respiratoires ont une augmentation des CysLT. Dans des modèles murins d'asthme, les CysLT jouent un rôle important dans l'inflammation et le remodelage. L'enzyme sPLA2-X est exprimée dans les cellules épithéliales, les macrophages et les éosinophiles des voies respiratoires. Elle est significativement élevée dans le liquide des voies respiratoires de patients asthmatiques et est liée à un certain nombre de caractéristiques de l'asthme, notamment l'hyperréactivité des voies respiratoires et la sévérité de l'asthme. L'exposition à des allergènes induit une augmentation de sPLA2-X dans les voies respiratoires humaines et murines. sPLA2-X a une forte affinité pour le récepteur PLA2R1. Une étude de l'expression du génome entier de cellules épithéliales prélevées chez des enfants souffrant d'asthme atopique comparés à un groupe de témoins sains montre que le récepteur PLA2R1 est fortement surexprimé dans l'asthme. L'expression de PLA2R1 est fortement corrélée avec l'expression de sPLA2-IB, sPLA2-IIF, sPLA2-V et sPLA2-XIIIA mais est inversement corrélée avec l'expression de sPLA2-X. Dans un modèle d'asthme induit par sensibilisation à l'ovalbumine en présence d'un adjuvant Alum exogène chez des souris PLA2R1 KO,

la clairance de sPLA2-IB est réduite et le niveau de sPLA2-X est fortement augmenté. De plus les souris PLA2R1 KO ont une inflammation accentuée. L'augmentation d'expression de PLA2R1 dans l'épithélium respiratoire peut être un mécanisme protecteur en réponse à une inflammation des voies respiratoires (Nolin, Murphy et al. 2019).

Les cPLA2s ont montré jouer un rôle dans la génération des eicosanoïdes pro inflammatoires. La déplétion des cPLA2s atténue la fibrose dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine et l'inflammation par la réduction de production des leucotriènes et des thromboxanes. L'inhibiteur spécifique de cPLA2s, l'AK106-001616, réduit le score de maladie de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez le rat mais son efficacité clinique dans la fibrose pulmonaire idiopathique n'est pas encore montrée (Nagase, Uozumi et al. 2002, Shimizu, Ito et al. 2019, Suryadevara, Ramchandran et al. 2020).

2. Le récepteur PLA2R1

2.1 Découverte de PLA2R1

Le récepteur 1 à la phospholipase A2, PLA2R1, fait partie de la famille des récepteurs au mannose composé également du récepteur mannose du macrophage, du récepteur DEC-205 des cellules dendritiques et du récepteur Endo-180 (MRC2). La similarité de séquence entre ces quatre récepteurs n'est que de 29%.

PLA2R1 a été cloné pour la première fois par Lambeau et al en 1993 grâce à sa forte affinité pour les sPLA2s produits du venin de serpent dans le muscle squelettique de lapin. Dans un premier temps, il est appelé récepteur M-type pour « muscle-type » afin de le différencier d'un autre site de liaison des sPLA2s neurotoxiques (récepteur N-type). Les sPLA2s des mammifères peuvent se lier à PLA2R1 dont l'expression est retrouvée dans divers tissus. La séquence d'acides aminés de PLA2R1 chez le bovin, le lapin, la souris et l'humain est identique à plus de 70% et le gène PLA2R1 humain est localisé sur le chromosome 2 (Hanasaki and Arita 1999). En 1995, il est cloné chez l'humain pour la première fois. Deux transcrits sont alors détectés, l'un code pour une forme transmembranaire et l'autre code pour une forme sécrétée raccourcie de son segment transmembranaire. Le ratio de ces deux transcrits est respectivement de 1,6 :1 (Ancian, Lambeau et al. 1995).

2.2 Expression et structure de PLA2R1

Le récepteur membranaire PLA2R1 appartient à la superfamille des lectines de type C de 180kDa. Il possède un large domaine extracellulaire contenant un domaine N-terminal riche en cystéine (Cys-R), un domaine fibronectine de type II (FNII), huit répétitions d'un domaine de reconnaissance des glucides aussi appelées domaines de type C (CTLD), un domaine transmembranaire et un domaine C terminal intracellulaire (**Figure 21**) (Lambeau, Schmid-Alliana et al. 1990, Lambeau, Ancian et al. 1994).

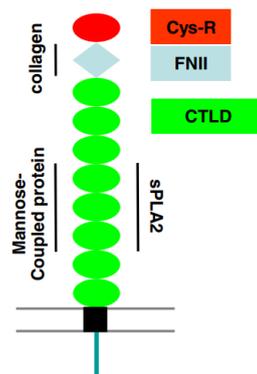


Figure 21: Schéma représentant les différents domaines du récepteur PLA2R1. Issu de (Bernard and Vindrieux 2014).

Le domaine de PLA2R1 responsable de la liaison des sPLA2s se trouve dans sa partie extracellulaire au niveau des CTLD. Nicolas et al ont montré l'importance des domaines CTLD en étudiant le sPLA2 OS1 du venin de serpent qui se lie à PLA2R1 grâce à ses domaines CTLD. La délétion du domaine CTLD 5 abolit la liaison des sPLA2s à PLA2R1. Le domaine CTLD 5 est le plus important dans cette liaison aux sPLA2s, suivi des CTLD 4 et 6. La liaison des sPLA2s et des sucres à PLA2R1 est complètement indépendante du Ca^{2+} (Nicolas, Lambeau et al. 1995).

Par son domaine FNII, PLA2R1 peut promouvoir l'adhésion cellulaire aux collagènes de type I et IV (Ancian, Lambeau et al. 1995). Les domaines CTLD1-2 et le domaine FNII génère des signaux prolifératifs, ils sont responsables de la liaison au collagène I. En réponse au sPLA2-IB, PLA2R1 médie une prolifération dépendante du collagène et la migration à travers des interactions avec l'intégrine $\beta 1$ en présence de collagène de type I. Ces effets sont indépendants de l'activité catalytique de sPLA2-IB. (Takahashi, Watanabe et al. 2015).

La partie intracellulaire de PLA2R1 est constituée d'environ 40 acides aminés incluant un site de séquence consensus pour la phosphorylation de la caséine-kinase II (CK2) avec une sérine-36. La phosphorylation de la Sérine-36 par CK2 a suggérée réguler l'activité de PLA2R1 (Sukocheva, Menschikowski et al. 2019).

Le domaine cytoplasmique contient un motif de séquence consensus (Asn-Pro-Xxx-Tyr ; le motif NPXY) de l'endocytose médiée par les puits enrobés, identifié à l'origine dans le récepteur LDL et également retrouvé dans le récepteur du mannose.

Chez la souris, l'ARNm de PLA2R1 est détecté dans plusieurs tissus comme le poumon, la rate et le rein. Chez l'homme, il est détecté dans le poumon, le rein et le pancréas. A noté que la spécificité de liaison des ligands sPLA2s à PLA2R1 est particulière pour chaque espèce. Par exemple l'affinité de liaison du sPLA2-IB humain a été calculée comme étant d'environ 400 nM contre approximativement 1 nM chez la souris. Cela montre un mode de liaison des sPLA2s à PLA2R1 différent chez l'humain par rapport à d'autres espèces animales.

2.3 Régulation transcriptionnelle et épigénétique de PLA2R1

La modulation d'expression de PLA2R1 par hyper-méthylation de son promoteur a été mise en évidence dans un premier temps dans les cellules leucémiques. PLA2R1 est sous-exprimé dans les cellules Jurkat et U937 par la méthylation de son promoteur. Le traitement à la 5-aza-2'-deoxycytidine (inhibiteur d'ADN méthyltransférase) permet la ré-expression de PLA2R1. La méthylation du locus PLA2R1 est plus importante chez les patients atteints de différents types de leucémies que chez les sujets contrôles. Cette méthylation de PLA2R1 augmente le risque de décès (Menschikowski, Platzbecker et al. 2012). Dans des lignées de cellules mammaires cancéreuses, une hyperméthylation du promoteur de PLA2R1 est augmentée par rapport à des cellules épithéliales mammaires normales. Une corrélation positive est montrée entre l'expression de DNMT1 (ADN méthyltransférase) et la méthylation du gène PLA2R1. Une corrélation négative est montrée entre les niveaux de microARN hsa-mir-141, -181b, et -181d-1 (régulateurs négatifs) et l'expression de PLA2R1. A l'inverse une corrélation positive est montrée entre les niveaux des microARN (régulateurs positifs) miR-23b, -154 et -302d et l'expression de PLA2R1 (Menschikowski, Hagelgans et al. 2015).

2.4 Fonction de PLA2R1

2.4.1 Rôle dans la régulation de sPLA2s

La sPLA2-IB a des effets inducteurs de croissance cellulaire à de faible concentration (1–10 nM) dans de nombreux types cellulaires comme dans les cellules Swiss 3T3, les cellules musculaires lisses d'aorte du rat, les chondrocytes et les cellules synoviales. Dans les cellules humaines MIAPaCa-2, sPLA2-IB active la voie des MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) pour induire la prolifération cellulaire.

Dans les cellules musculaires lisses vasculaires du rat A7r5, sPLA2-IB induit la migration par chimiotactisme. Dans les cellules NIH3T3, les cellules de fibrosarcome de souris et cellules de sarcome de souris sPLA2-IB stimule l'invasion cellulaire dans la matrice extracellulaire. Le blocage du récepteur PLA2R1 par un oligonucléotide antisens spécifique supprime ces réponses (Sukocheva, Menschikowski et al. 2019).

Chez la souris, la sPLA2-IB est un ligand du récepteur PLA2R1 et cette liaison à un rôle dans la production du TNF- α en réponse au choc endotoxique (induit par le LPS). Chez les souris PLA2R1KO la production de TNF- α et IL-1 β induite par le LPS est fortement réduite par rapport aux souris WT. PLA2R1 est exprimé dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II dans le poumon et dans la rate. Le traitement au LPS induit un fort niveau de PLA2R1 soluble circulant qui pourrait jouer un rôle dans la production des médiateurs pro-inflammatoires (Yokota, Ikeda et al. 2000).

En 2005, Granata et al montrent que les groupes sPLA2-IB et -X exprimés dans le poumon, induisent une augmentation de sécrétion des cytokines TNF- α et IL-6 par les macrophages primaires pulmonaires humains. Cette sécrétion induite est indépendante de l'activité enzymatique de ces sPLA2s et passe par l'activation d'ERK1/2. Le me-indoxam qui inhibe la liaison des sPLA2 au récepteur PLA2R1, bloque la production des cytokines induite par les sPLA2-IB et -X mais n'interfère pas avec la production basale de TNF- α et IL-6. Les auteurs proposent que la production des cytokines induites par les sPLA2-IB et -X peut impliquer le récepteur PLA2R1 mais également d'autres récepteurs à la membrane des macrophages (Granata, Petraroli et al. 2005).

PLA2R1 joue aussi un rôle dans l'endocytose des sPLA2s. Cela permet la clairance des sPLA2s extracellulaires pour se protéger de leur fonction enzymatique. Par exemple la sPLA2-X de la souris est internalisée et dégradée après sa liaison à PLA2R1.

La régulation négative des fonctions de la sPLA2 se produit également avec la forme soluble circulante de PLA2R1 (sPLA2R1) qui conserve tous les domaines extracellulaires du récepteur membranaire. Elle conserve ses propriétés de liaison aux sPLA2s et bloque leur activité enzymatique (Hanasaki and Arita 2002).

PLA2R1 joue un rôle dans les réactions auto-immunitaires. La protéine PLA2R1 est retrouvée dans les extraits glomérulaires des patients atteints de glomérulopathie et est la principale cause de la glomérulonephrite extra-membraneuse.

2.4.2 Rôle de PLA2R1 dans la sénescence cellulaire

L'implication de PLA2R1 dans l'induction de la sénescence a été mise en évidence en 2009 par l'équipe de David Bernard en cherchant des récepteurs susceptibles d'induire la sénescence cellulaire. L'utilisation d'une librairie rétrovirale de petit ARN en épingle à cheveux (short hairpin RNA ou shRNA) ciblant environ 8000 gènes humains a permis de mettre en évidence que cibler certains de ces gènes prolonge la durée de vie de fibroblastes humains primaires. L'ADN génomique des colonies qui continuaient leur croissance a été isolé pour séquencer les shRNA insérés. Le shRNA dirigé contre le récepteur PLA2R1 (shPLA2R1), introduit dans un vecteur viral a été identifié comme prolongeant la durée de vie des cellules WI38 (fibroblastes primaires humains). En effet, la diminution d'expression de PLA2R1, induit chez les fibroblastes une augmentation de leur capacité de doublement de population et une diminution de cellules positives pour la β -galactosidase (**Figure 22**). Cet effet est confirmé dans d'autres types cellulaires : cellules épithéliales mammaires humaines et dans d'autres fibroblastes primaires humains (IMR90).

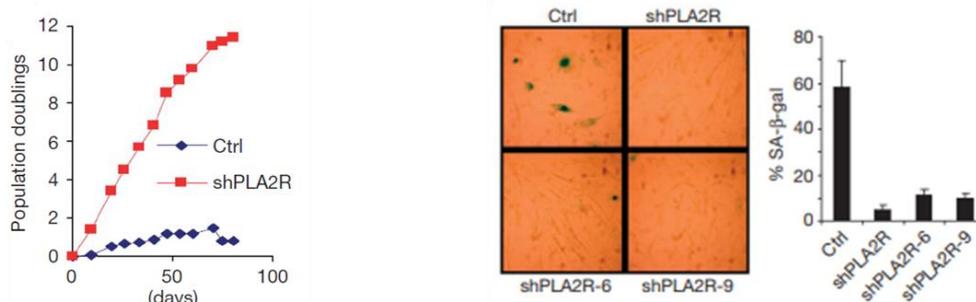


Figure 22: Le blocage d'expression de PLA2R1 augmente la capacité de doublement de population et diminue le nombre de cellule positives à la Béta-galactosidase

Ces trois types cellulaires ont une expression de la hTERT (human TERT) en présence de shPLA2R1, la sénescence induite par les télomères (sénescence répliquative) est donc affectée par la diminution d'expression de PLA2R1. La croissance des cellules WI38 prolongée à la suite de l'exposition au H_2O_2 et en présence de shPLA2R1 montre que l'expression de PLA2R1 joue également un rôle dans la sénescence induite par le stress (sénescence prématurée). L'expression ectopique de PLA2R1 (PLA2R1 OE) induite dans les WI38 jeunes par l'utilisation de vecteur rétroviral, induit un arrêt de la croissance cellulaire associé à une augmentation du nombre de cellules positives à la β -galactosidase comparé à la transduction par un vecteur contrôle. PLA2R1 OE induit la production de ROS et le traitement par l'antioxydant NAC leur permet de continuer leur croissance et diminuer le nombre de cellules positives à la β -galactosidase. Les auteurs suggèrent que la sénescence induite par PLA2R1 peut être due à l'augmentation des ROS qui induisent des dommages à l'ADN.

Dans les cellules WI38, la diminution de PLA2R1 induite par le shPLA2R1 induit une diminution de marquage γ H2AX, des protéines p53 et p21 et une augmentation de phospho-Rb. L'inhibition de p53 permet aux cellules d'échapper à l'arrêt de la croissance cellulaire induit par PLA2R1 alors que l'inhibition de Rb ne le permet pas. La double inhibition de p53 et Rb permet de reverser complètement l'arrêt de croissance cellulaire induit par PLA2R1. Ces résultats montrent que PLA2R1 induit une sénescence par la production de ROS principalement à travers la voie p53 (Augert, Payré et al. 2009).

Le rôle de PLA2R1 a été montré dans l'induction de la sénescence cellulaire également dans un modèle de vieillissement. La mutation du gène *Lmna* codant pour les lamines A et C est retrouvée dans le syndrome de progéria de Hutchinson-Gilford (SPHG). Cette mutation conduit à une protéine tronquée, la progérine A qui ne peut se transformer en lamine A mature et conduit à la sénescence prématurée.

L'expression constitutive de la progérine dans des fibroblastes humains conduit à l'arrêt de la croissance cellulaire, une augmentation des cellules positives pour la β -galactosidase et une augmentation de p21 et IL-8. La diminution de PLA2R1 par deux shPLA2R1 permet d'abolir ces effets. PLA2R1 médie la sénescence prématurée induite par l'expression constitutive de la progérine. Ces shPLA2R1 permettent aux fibroblastes dermiques primaires dérivés de patients SPHG de continuer leur prolifération avec une diminution des cellules positives pour la β -galactosidase et une diminution de p21 et IL-8. PLA2R1 contribue à la réduction du potentiel répliatif des cellules dérivées de ces patients.

Le rôle de PLA2R1 est évalué dans un modèle de souris progéria (déficientes pour *Zmpste24*), avec des altérations osseuses conduisant à de nombreuses fractures des côtes et une réduction du contenu minéral osseux. Ces souris sont croisées avec des souris PLA2R1KO. La perte de PLA2R1 dans le modèle de progéria permet de réduire les altérations osseuses et l'expression de p21 et IL-8. L'expression de la farnesyl diphosphate synthase (FDPS) est augmentée dans les cellules exprimant la progérine et dans les cellules de patients SPHG et la perte de PLA2R1 permet de normaliser cette expression. Le pamidronate (inhibiteur de la FDPS) permet de réduire l'activité β -galactosidase et l'expression de p21 et de l'IL-8 dans les cellules exprimant la progérine. Les augmentations de p-ATM, γ H2AX, phospho-p53, p21 et FDPS induites par la progérine, sont abolies par la délétion de PLA2R1KO.

L'inhibition de p53 par l'expression d'un p53 dominant négatif permet d'augmenter la prolifération et de réduire p21, IL-8 et FDPS et l'activation de p53 par la nutlin-3 induit une augmentation de FDPS et p21. P53 contribue donc à la sénescence et au phénotype progérine induits par PLA2R1 en augmentant l'expression de la FDPS (Griveau, Wiel et al. 2018).

La même équipe a montré que l'inhibition de JAK1/2 par le ruxolitinib permet de retarder l'arrêt du cycle cellulaire induit par la progérine, de diminuer la sénescence cellulaire et les noyaux difformes dans les fibroblastes humains normaux exprimant la progérine. De plus, l'administration de ruxolitinib réduit plusieurs phénotypes de vieillissement prématuré comme les fractures osseuses, le contenu minéral osseux, la force de préhension, et une tendance à augmenter la survie dans un modèle murin de progéria (Griveau, Wiel et al. 2020).

2.4.3 Rôle de PLA2R1 dans la sénescence cellulaire : suppresseur de tumeur

L'expression de PLA2R1 est diminuée dans les cellules de cancer du sein par rapport aux cellules non transformées. La surexpression de PLA2R1 dans certaines lignées de cancer du sein induit un arrêt de la croissance cellulaire due à une mort cellulaire par apoptose. En revanche dans des cellules primaires normales HMECs (Human Mammary Epithelial Cells), la surexpression de PLA2R1 n'induit pas l'apoptose mais une sénescence cellulaire par l'arrêt de la prolifération et une augmentation du nombre de cellules positives pour la β -galactosidase. L'utilisation d'inhibiteurs chimiques ciblant différents types de ligands de PLA2R1 comme des sPLA2s ou des cPLA2s, ne prévient pas de la mort cellulaire induite par PLA2R1. De plus, différents mutants de PLA2R1 délétés pour différents domaines de liaison aux ligands sont générés. Les mutants de PLA2R1 dépourvus de CTLD1 et au-delà ont montré une capacité considérablement réduite à induire la mort cellulaire. Et aucune différence n'a été observée entre PLA2R1 dépourvus ou non des domaines CTLDs 4 à 6 (domaines de liaison aux sPLA2s), suggérant l'absence de rôle des domaines de liaison sPLA2. PLA2R1 induit l'apoptose indépendamment des sPLA2s. Comme dans les fibroblastes normaux, l'expression ectopique de PLA2R1 induit une production de ROS dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses et cette production a lieu avant l'augmentation des marqueurs apoptotiques. L'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale prévient de la mort cellulaire induite par PLA2R1 suggérant que la chaîne respiratoire mitochondriale est essentielle dans l'induction de la mort cellulaire induite par PLA2R1. L'induction de la mort cellulaire par PLA2R1 dans les cellules cancéreuses est donc liée à la production de ROS comme dans le cas de l'induction de la sénescence dans les cellules normales (Augert, Vindrieux et al. 2013).

Le rôle suppresseur de tumeur de PLA2R1 passe par l'activation de JAK2. Le modèle de sénescence induite par oncogène est utilisé grâce à l'infection de cellules HMEC par un vecteur rétroviral codant pour H-RAS^{G12V}ER en présence de 4-OHT. Dans ce modèle, la co-infection avec différents shRNA dirigés contre PLA2R1 (shPLA2R1) inhibe la sénescence induite. L'expression ectopique de PLA2R1

dans deux lignées de cellules épithéliales de cancer du sein bloque la croissance de colonies et inversement, la transduction avec un vecteur viral codant pour un shPLA2R1 induit une augmentation du phénotype transformé de ces cellules. Un modèle de carcinogenèse de la peau dépendant de RAS est évalué dans des souris WT et des souris PLA2R1KO. Dans les souris WT, p16 diminue 10 semaines après induction du modèle, quand apparaît les papillomes. Dans les PLA2R1 KO, p16 est diminué comparé aux WT. De plus, les papillomes apparaissent plus rapidement dans les souris PLA2R1KO que dans les souris WT et en plus grand nombre. Ces résultats montrent que la perte de PLA2R1 favorise un échappement à la sénescence induite par oncogène conduisant à la transformation. Différentes voies de signalisation sont inhibées pour comprendre l'effet de PLA2R1 (Rac1, JNK, MEK-1, p38 MAPK, PI3K, JAK3), seule l'inhibition de JAK2 permet de réverser le phénotype de mort cellulaire induit par PLA2R1. L'expression ectopique de PLA2R1 dans les cellules cancéreuses induit une augmentation de phospho-JAK2, phospho-STAT3 et des transcrits des gènes cibles de JAK2. Une diminution de JAK2 est mesurée dans les papillomes des souris PLA2R1KO comparées aux souris WT. La forme mutante de PLA2R1, déplétée de sa région cytoplasmique, et la forme complète induisent une activation de phospho-JAK2 et l'inhibition de la transformation cellulaire des cellules cancéreuses. L'activation de JAK2 par PLA2R1 n'est donc pas dépendante de la région cytoplasmique de PLA2R1. PLA2R1 et JAK2 sont colocalisés ce qui suggère l'intervention d'un partenaire à la membrane. Enfin, la diminution de transformation induite par PLA2R1 est inhibée dans des cellules cancéreuses infectées par un shRNA anti JAK2 ou dans des cellules déficientes pour JAK2. La fonction suppresseur de tumeur de PLA2R1 est donc bien dépendante de l'activation de JAK2. Les auteurs soulignent que les souris PLA2R1KO et JAK2KO ont des phénotypes communs par exemple, elles sont résistantes au choc endotoxique induit par le LPS (Vindrieux, Augert et al. 2013).

Le mécanisme onco-suppresseur de la voie PLA2R1/JAK2 est lié au récepteur aux œstrogènes $ERR\alpha$. Une étude quantitative protéomique dans les cellules WI-38 a permis d'identifier des protéines qui sont augmentées à la suite de l'expression ectopique de PLA2R1. L'analyse de cette base de données a montré que les protéines fortement enrichies sont des protéines mitochondriales. Dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-453 qui n'expriment pas PLA2R1 de façon endogène, l'expression ectopique de PLA2R1 induit l'augmentation de composants mitochondriaux et d' $ERR\alpha$.

L'inhibition pharmacologique de JAK2 ou génétique par l'expression constitutive de SOCS3 (inhibiteur de la voie JAK/STAT) dans ces cellules induit l'inhibition d' $ERR\alpha$ induit par PLA2R1. JAK2 joue un rôle dans l'induction d' $ERR\alpha$ médiée par PLA2R1. L'analyse d'une base de données de résultats de ChIP-seq montre dans les cellules HeLa que les facteurs STATs se lient en amont des régions codantes d' $ERR\alpha$. La ChIP-qPCR réalisée dans les cellules MDA-MB-453 qui expriment constitutivement PLA2R1 montre que STAT5 se lie sur les régions du promoteur d' $ERR\alpha$. L'activation de l'expression d' $ERR\alpha$

passé donc par la voie PLA2R1/JAK2/STAT5. Dans les cellules MDA-MB-436, la diminution d'expression de PLA2R1 induit la diminution d'ERR α , des cibles mitochondriales d'ERR α codées dans le noyau et des ROS. Dans les cellules cancéreuses MDA-MB-453 exprimant constitutivement PLA2R1, l'inhibition génétique ou pharmacologique (XCT-790) d'ERR α , induit une inhibition de la diminution de la densité cellulaire et augmente la mort cellulaire induite par PLA2R1. L'inhibition d'ERR α diminue également les ROS induits par PLA2R1. Ces résultats montrent le rôle d'ERR α dans le programme mitochondrial médié par les effets de JAK2 dans le cancer et dans les réponses inflammatoires et immunitaires (Griveau, Devailly et al. 2016).

En 2014, l'analyse d'une database de cancers majeurs et de tissus normaux, a permis de montrer que l'ARNm de PLA2R1 est faible dans la plupart des cancers et au plus bas dans le cancer du rein. Les auteurs s'intéressent donc au carcinome des cellules rénales (CCR) associé à une inactivation du gène suppresseur de tumeur, Von Hippel-Lindau (*VHL*). La protéine VHL est une ubiquitine ligase qui conduit à la dégradation protéosomale des sous unités des HIFs (Hypoxia Inductible Factors). La perte de VHL dans les CCR induit une augmentation de la stabilité de HIF α .

L'ARNm de PLA2R1 et son niveau de protéine est très bas dans les CCR. La diminution d'expression de PLA2R1 utilisant des shPLA2R1 dans des cellules ACHN (cellules humaines d'adénocarcinome rénal) induit une augmentation de leur capacité transformante avec l'augmentation du nombre de colonies, de la taille des tumeurs et du marquage Ki67. A l'inverse l'induction d'une expression ectopique de PLA2R1 (PLA2R1OE) dans des cellules ACHN et 786-O induit une inhibition de leur capacité à former des colonies. Les cellules ACHN sont infectées par le vecteur conduisant à la surexpression de PLA2R1 ou par le vecteur contrôle. Elles sont ensuite injectées dans les souris *nude* pour former un modèle de xénogreffe. La surexpression de PLA2R1 conduit à la réduction de la taille des tumeurs et à l'augmentation de la mort cellulaire comparé au contrôle. PLA2R1 joue un rôle suppresseur de tumeur dans le CCR. L'expression de PLA2R1 est régulée par VHL et la perte de VHL dans les CCR induit la diminution de PLA2R1 et l'expression constitutive de HIF2 α réduit l'ARNm de PLA2R1.

Des analyses de CHIP (Chromatin immunoprecipitation) montrent que HIF2 α ne se lie pas directement sur les régions génomiques de PLA2R1. Dans les cellules surexprimant HIF2 α pour lesquelles PLA2R1 est réprimé, c-MYC se lie sur les régions génomiques de PLA2R1 proche du site de départ de la transcription et la surexpression de c-MYC inhibe l'expression de PLA2R1. Le traitement des cellules négatives pour VHL par l'inhibiteur d'ADN méthyltransférase, le 5-azadeoxycytidine induit fortement PLA2R1. La régulation de PLA2R1 par la voie VHL/HIF2 α /c-MYC passe donc par la méthylation de son ADN. Les séquences méthylés de l'ADN de PLA2R1 sont dans la région où se lie c-MYC. Dans le CCR l'expression de PLA2R1 corrèle avec la perte des fonctions tumeur-suppresseur de VHL. HIF2 α se lie indirectement aux régions génomiques de PLA2R1 et c-MYC s'y lie directement

réprimant l'expression de PLA2R1 par le recrutement de DNMT induisant la méthylation et la répression du gène de PLA2R1 (Vindrieux, Devailly et al. 2014).

2.4.4 Lien entre la voie PLA2R1 et d'autres voies de signalisation

PLA2R1 joue aussi un rôle dans l'activation de la voie des MAPK. La liaison de sPLA2-IB a PLA2R1 active la voie p38MAPK ce qui induit la stimulation du relargage d'élastase et l'adhésion des neutrophiles polymorphonucléaires (Silliman, Moore et al. 2002).

La voie PI3K/Akt/mTOR est identifiée comme régulatrice négative de l'expression de PLA2R1. Le traitement par des inhibiteurs de cette voie (rapamycine, wortannine) induit une forte induction de PLA2R1 dans les cellules de cancer de la prostate PC-3. La sous ou la surexpression de PLA2R1 ne modifie pas les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 et ou de p38 MAPK.

Le promoteur de PLA2R1 contient des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription comme NF- κ B, SP1, c-Jun, c-Fos, p53, and PU.1. L'inhibition pharmacologique de NF- κ B et SP1 induit une diminution d'expression de PLA2R1 dans des études pilotes dans les cellules de cancer de la prostate PC-3. NF- κ B et SP1 sont connu pour être pro-oncogénique et jouent un rôle dans l'initiation et la progression des cancers (Sukocheva, Menschikowski et al. 2019).

II/ La voie des JAK/STAT

1. Découverte de la voie JAK/STAT

1.1 Voie induite par les cytokines

1.1.1 Les cytokines

Les cytokines sont des protéines qui jouent un rôle dans la communication cellule-cellule. Ce sont des protéines régulatrices de faible masse moléculaire (souvent inférieure à 30kDa) sécrétées par une variété de cellules de l'organisme en réponse à plusieurs types de stimulus. La découverte des cytokines date des années 1960, on a retrouvé des facteurs régulant la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules du système immunitaire dans les surnageants de lymphocytes en culture. Les cytokines se lient à des récepteurs spécifiques à la membrane des cellules cibles ce qui active certaines voies de signalisation conduisant à l'expression de gènes cibles. Les principales réponses biologiques impliquant les cytokines sont le développement de réponses immunitaires, l'induction de la réponse inflammatoire, la régulation de l'hématopoïèse, la cicatrisation, le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire.

Les cytokines peuvent avoir un effet autocrine (effet sur la cellule sécrétrice), paracrine (effet sur une cellule voisine) ou endocrine (passage par la circulation pour un effet sur une cellule éloignée dans l'organisme). Une cytokine peut avoir différents effets biologiques sur différents types cellulaires et plusieurs cytokines peuvent avoir les mêmes fonctions. Les cytokines partagent plusieurs propriétés similaires à d'autres médiateurs : les hormones et les facteurs de croissance, ils représentent tous des facteurs sécrétés solubles qui ont un effet biologique à de faibles concentrations. Les cytokines sont produites pendant un court temps (de quelques heures à quelques jours) et ont souvent un effet autocrine et paracrine à la différence des hormones qui sont produites sur de longue période et possèdent le plus souvent une action endocrine. Les cytokines auront un effet sur n'importe quelle cellule cible qui aura sur sa membrane plasmique son récepteur. *In vivo*, les cytokines n'agissent pas seules, une cellule peut être la cible d'une variété de cytokines avec des effets synergiques ou antagonistes ce qui induit des conséquences biologiques différentes.

Dans le tableau ci-dessous sont répertoriées quelques cytokines communes associées à leur source et leurs effets. L'activation de production de cytokine par une autre cytokine induit des cascades d'activation dans lesquelles une cytokine activée en fin de cascade peut avoir un effet régulateur de celle produite en début de cascade. Les cytokines peuvent être sécrétées par un grand nombre de type cellulaire mais les principales cellules productrices sont les lymphocytes T Helper, les cellules

dendritiques et les macrophages. Immunologie - 6ème édition - Le cours de Janis Kuby avec questions de révision. Kindt, Thomas J.; Goldsby, Richard; Osborne, Barbara).

Cytokines	Source	Cibles et effets
IL-1 (Interleukin-1)	Monocytes, macrophages, cellules endothéliales, cellules épithéliales	Endothélium vasculaire (inflammation), hypothalamus (fièvre)
TNF-α (Facteur de nécrose des tumeurs-α)	Macrophages	Endothélium vasculaire (inflammation), perte musculaire et grasseuse (cachexie), induction d'apoptose (nombreux types cellulaires), activation des neutrophiles
IL-6	Macrophages, cellules endothéliales	Influence l'immunité adaptative (prolifération et sécrétion d'anticorps par la lignée B)
TGF-β (Facteur de croissance des tumeurs)	Lymphocytes T, macrophages et autres cellules	Inhibe la prolifération et la fonction effectrice des lymphocytes T, inhibe la prolifération des lymphocytes B, inhibe les macrophages
IFN-α (Interferon-α)	Macrophages	Activité antivirale dans la plupart des cellules nucléées, augmente l'expression du CMH de classe I, activation des cellules NK
IFN-β (Interferon-β)	Fibroblastes	Activité antivirale dans la plupart des cellules nucléées, augmente l'expression du CMH de classe I, activation des cellules NK
IFN-γ (Interferon-γ)	Lymphocytes T _H 1, CD8 ⁺ , cellules NK	Activation des macrophages, augmentation de l'expression du CMH de classe I et II, augmente la présentation antigénique

1.1.2 Les récepteurs des cytokines

On différencie quatre familles de cytokines par leur structure. Les cytokines appartiennent soit à la famille des hématopoïétines, la famille des chémokines, la famille des interférons et la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF, tumor necrosis factor).

Les récepteurs aux cytokines sont classés en cinq familles : (a) les récepteurs de la superfamille des Immunoglobulines, (b) la famille des récepteurs des cytokines de classe I (ou récepteurs des hématopoïétines), (c) la famille des récepteurs des cytokines de classe II (ou récepteurs des interférons), (d) la famille des récepteurs des TNF, (e) la famille des récepteurs des chémokines.

- a) Les **récepteurs de la superfamille des Immunoglobulines** inclut les récepteurs de l'IL-1. Il existe deux formes d'IL-1, IL-1 α et IL-1 β qui n'ont que 30% de séquence identique mais qui semblent avoir une fonction commune car se lient au même récepteur et induisent des réponses communes. Il existe deux récepteurs pour l'IL-1, IL-1R de type 1 qui est exprimé dans plusieurs types cellulaires et IL-1R de type 2 qui n'est exprimé que sur les lymphocytes B. À la suite de la liaison au récepteur de type 2, IL-1 n'induit pas la même réponse qu'après liaison au récepteur de type 1, on suggère qu'IL-1R de type 2 empêche la liaison à l'IL-1R de type 1. L'IL-1 joue un rôle clef dans l'inflammation.
- b) Les membres de la famille des **récepteurs des cytokines de classe I** ont dans leur domaine extracellulaire des motifs de séquence d'acides aminés conservés, constitués de quatre résidus cystéine (CCCC) et d'une séquence conservée tryptophane-sérine-acide aminé non conservé (X)-tryptophane-sérine (WSXWS). La famille des hématopoïétines (ou des cytokines de classe I) est constituée de l'IL-2 et l'IL-4 qui ont un fort degré de structure α -hélicoïdale et peu de feuillets β .
- c) Les **récepteurs des cytokines de classe II** possèdent aussi les motifs conservés CCCC mais pas le motif WSXWS des récepteurs des cytokines de classe I. Les ligands de ces récepteurs sont les interférons α , β , γ et vingt-sept cytokines différentes dont l'IL-10.

Les récepteurs des cytokines de classe I et de classe II possèdent des sous unités spécifiques des cytokines et une sous-unité de transduction du signal. La liaison d'une cytokine à ces récepteurs de type I ou II induit une phosphorylation des tyrosines du récepteur par l'intermédiaire de protéines kinases associées au domaine cytosolique des chaînes du récepteur.

Il existe des sous-familles de récepteurs des cytokines de classe I : les sous-familles du GM-CSF, de l'IL-2 et de l'IL-6, chaque sous-famille possède une sous-unité de transduction du signal.

- Les récepteurs de la **sous-famille du GM-CSF** contenant les récepteurs à l'IL-3 et l'IL-5, ont en commun une sous-unité β .
- Les récepteurs de la **sous-famille de l'IL-6**, composée des récepteurs à IL-6, IL-11, CNTF (ciliary neutrophic factor), LIF (leukaemia inhibition factor) /OSM (oncostatin M), possèdent une sous-unité de transduction du signal commune, la gp130.
- La **sous-famille de l'IL-2**, constituée des récepteurs de l'IL-2, IL-15, IL-7, IL-9 et IL-4, possède la sous-unité commune, la chaîne γ .

Pour toutes ces sous-familles de récepteurs, chacune de ces sous-unités de transduction de signal se dimérise avec une sous-unité spécifique de la cytokine.

La majorité des récepteurs des cytokines appartiennent aux récepteurs de la classe I et II. L'interaction d'une cytokine à l'un de ces récepteurs induit une succession de phosphorylation des tyrosines. La première mise en évidence de ce processus a été démontrée lors de l'étude de la liaison de l'IFN- γ à son récepteur membre de la famille de classe II. L'IFN- γ permet aux cellules de bloquer la réplication virale lors d'infection. L'IFN- α et l'IFN- β ont également cette propriété antivirale. La description de la voie déclenchée par l'IFN- γ a servi de modèle à la signalisation induite par les récepteurs de classe I et II (Immunologie - 6ème édition - Le cours de Janis Kuby avec questions de révision. Kindt, Thomas J.; Goldsby, Richard; Osborne, Barbara).

1.2 Découvertes des protéines kinases JAK

Nom inspiré du dieu Janus qui avait deux faces, les membres de la famille des *Janus kinases* possèdent deux sites. Un site de liaison à la sous unité du récepteur des cytokines en N-terminale et un site qui possède une activité tyrosine kinase lorsqu'il est activé. Cette famille est composée de JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2.

Dans les années 1990, c'est en étudiant la réponse antivirale aux interférons, que sont découvertes les protéines JAK1 et JAK2. Andrew F. Wilks et al ont découvert la protéine JAK1 en amplifiant par PCR des sondes d'ADNc spécifiques des protéines tyrosine kinases. La séquence du gène *JAK1* de 3426 paires de base code une protéine de 1142 acides aminés d'une masse moléculaire de 132kDa. JAK1 possède une tyrosine en position 1022 et le domaine catalytique commun aux protéines tyrosine kinases, domaine PTK, de 255 acides aminés. Le domaine 1 de la protéine JAK1 placé en N-terminal du domaine PTK est spécifique à JAK1 et est commun chez l'humain et la souris. Les auteurs ont également mis en évidence la protéine JAK2 qui possède 53% et 51% de similitude dans son domaine 1 et son domaine PTK respectivement à ceux de JAK1. Les souris déficientes pour JAK2 meurent à l'état d'embryon car elles n'ont pas d'érythropoïèse définitive (Wilks, Harpur et al. 1991). Une autre protéine tyrosine kinase est mise en évidence, Tyk2, une protéine de 134 kDa composée de 1187 acides aminés avec un motif conservé PTK en C-terminal. En 1992, L. Velarquez et al montrent que Tyk2 joue un rôle dans la réponse aux interférons IFN- α et IFN- β (Velarquez, Fellous et al. 1992). JAK3 est essentiel dans le développement des lymphocytes T et B. Le tableau suivant résume le rôle des protéines JAK mis en évidence par leur délétion dans des modèles murins, selon (Levy and Darnell 2002).

JAK	Phénotype dans les souris déficientes
JAK1	Léthal en périnatal probablement à cause du défaut de signalisation des cytokines de la neurogenèse ; immunologiquement déficientes à cause de nombreuses défaillances en cytokines hématopoïétiques.
JAK2	Léthal à l'état d'embryon à cause d'un défaut d'érythropoïèse ; défauts immunologiques additionnels causés par un défaut de signalisation des cytokines.
JAK3	Déficit immunitaire combiné sévère (SCID) causé par un défaut de signalisation des récepteurs contenant γc .
Tyk2	Augmentation de la susceptibilité aux pathogènes à cause d'un défaut de réponse aux interférons et à l'IL-12

1.3 Découvertes des protéines Signal Transducers and Activators of Transcription (STATs)

Les gènes induits par la réponse aux l'IFN- α et IFN- β contiennent une séquence hautement conservée appelée ISRE (interferon-stimulated response element) qui se situent généralement à 200 paires de base du site de transcription. Le complexe de protéines se liant sur l'ISRE des gènes cibles est appelé ISGF3. Il a été purifié par électrophorèse et se compose de quatre protéines de tailles différentes : 113, 91, 84 et 48 kDa (**Figure 23**). Ces protéines seront appelées plus tard les *Signal Transducers and Activators of Transcription* ou STATs. En effet, elles permettent la transduction du signal de la liaison du ligand à son récepteur, au noyau pour activer la transcription des gènes cibles. Les STATs sont latentes dans le cytoplasme et sont ensuite phosphorylées sur leur résidu tyrosine après liaison du ligand. Cette phosphorylation induit la dimérisation puis la translocation des STATs vers le noyau. STAT1 α (91 kDa) et STAT1 β (84 kDa) sont identiques sauf sur l'acide aminé 38 en C-terminal qui est absent dans STAT1 β . La protéine STAT2 (113 kDa) est identique à 40% à STAT1 α et STAT1 β avec 700 acides aminés en plus. Avec STAT1 et STAT2, la protéine de 48 kDa, IRF9 complète la formation du complexe ISGF3 qui se lie sur la séquence ISRE des gènes cibles aux IFN- α et IFN- β . STAT 1 et 2 sont phosphorylées par la stimulation à IFN- α sur leur résidu tyrosine. Le traitement à l'IFN- γ ne permet pas la formation de ce complexe protéique ISGF3. IFN- γ induit directement la transcription de protéine GBP (guanylate binding protein) qui possèdent une séquence conservée : l'élément GAS (gamma-activated sequence). La purification des protéines se liant liées à GAS, a montré que STAT1 α et Stat1 β sont phosphorylées et activées en réponse à l'IFN- γ (Darnell, Kerr et al. 1994).

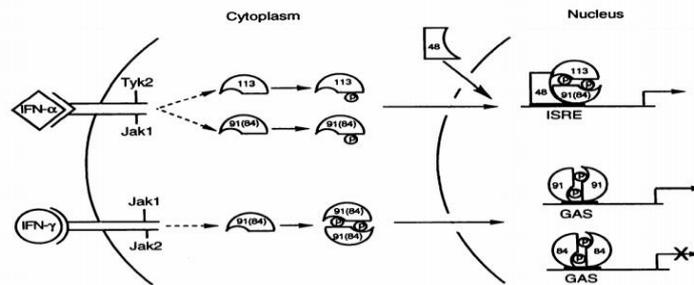


Figure 23: Schéma explicatif de la découverte des protéines STATs activées en réponse aux $INF-\alpha$ et $INF-\gamma$ (Darnell, Kerr et al. 1994)

La **figure 24** résume les activations spécifiques des JAK et des STAT par les interférons. En 1993, Ke Shuai et al montrent qu'en réponse aux $INF-\alpha$, $INF-\gamma$ et à l'EGF (epidermal growth factor), JAK1 et STAT1 sont activées et induisent la phosphorylation du même résidu tyrosine 701 de STAT1 et d'une même tyrosine sur JAK1. JAK2 est phosphorylé après stimulation par l'EPO (érythropoïétine) et l' $INF-\gamma$. Après stimulation par l'EPO et l'IL-3, seul JAK2 est phosphorylé. Et l' $INF-\alpha$ et le EGF induisent la phosphorylation de STAT1 et JAK1 mais pas de JAK2 (Shuai, Ziemiecki et al. 1993). Ces études ont montré que l' $INF-\gamma$ active JAK1 et JAK2 et que l' $INF-\alpha$ active Tyk2 et JAK1.

CNTF (ciliary neurotrophic factor) et IL-6 induisent la phosphorylation de JAK1 et JAK2 mais pas de TYK2, le profil de phosphorylation de ces trois tyrosines kinases est cependant dépendant du type cellulaire. EPO, GH (growth hormone) et IL-3 activent seulement JAK2. IL-6 induit l'homodimérisation de gp130 et CNTF, LIF (leukemia inhibitory factor) et OSM (oncostatin M) requiert l'hétérodimérisation de gp130 et LIFR β (LIF receptor β). JAK1 et JAK2 sont associés à LIFR β ou à gp130 en absence de ligand. De plus, après activation par IL-6, gp130 est phosphorylée sur sa tyrosine et cette phosphorylation est accentuée en présence de JAK1, JAK2 et TYK2. Les protéines JAK-TYK sont donc constitutivement associées aux récepteurs β mais sont activées par la liaison des ligands aux récepteurs (Stahl, Boulton et al. 1994).

En 1994, Zhong Zhong et al montrent que *Stat3* code la protéine STAT3 de 770 acides aminés et de 92kDa. Elle appartient à la famille des STATs et est phosphorylée par l'activation à l'EGF et l'IL-6 mais pas par l' $INF-\gamma$. La séquence codante de STAT3 a 40 à 50% d'acides aminés identiques à STAT1 ou STAT2. L'anticorps anti-STAT3 met en évidence une bande à 92 kDa et une autre moins prédominante à 89 kDa. La protéine STAT3 se lie aux régions contenant les SIE (sis-incuctible element) dans le promoteur de *c-fos* qui ressemble à l'élément GAS présent dans les gènes induits par l' $INF-\gamma$. Les complexes protéiques se liant aux régions SIE sont les hétérodimères de STAT1 α et STAT3 et les homodimères de STAT3 (**Figure 24**). STAT3 est phosphorylé sur la Tyr705 (Zhong, Wen et al. 1994, Zhong, Wen et al. 1994). STAT3 existe sous deux isoformes STAT3 α et une forme tronquée en C-terminal STAT3 β . Chez la souris, la délétion de STAT3 β induit un défaut du profil de

transcription induit par STAT3. En plus de son activation par des cytokines, STAT3 peut être activé par des récepteurs tyrosine kinase (EGF, PDGF, FGF et IGF) et par plusieurs récepteurs oncogènes non-tyrosine-kinases (Src et ABL). Il peut également être activé à travers les Toll-like récepteurs et en réponse à une protéine G hétérotrimérique oncogène par l'activation de récepteurs non-tyrosine kinase c-Src (Levy and Darnell 2002).

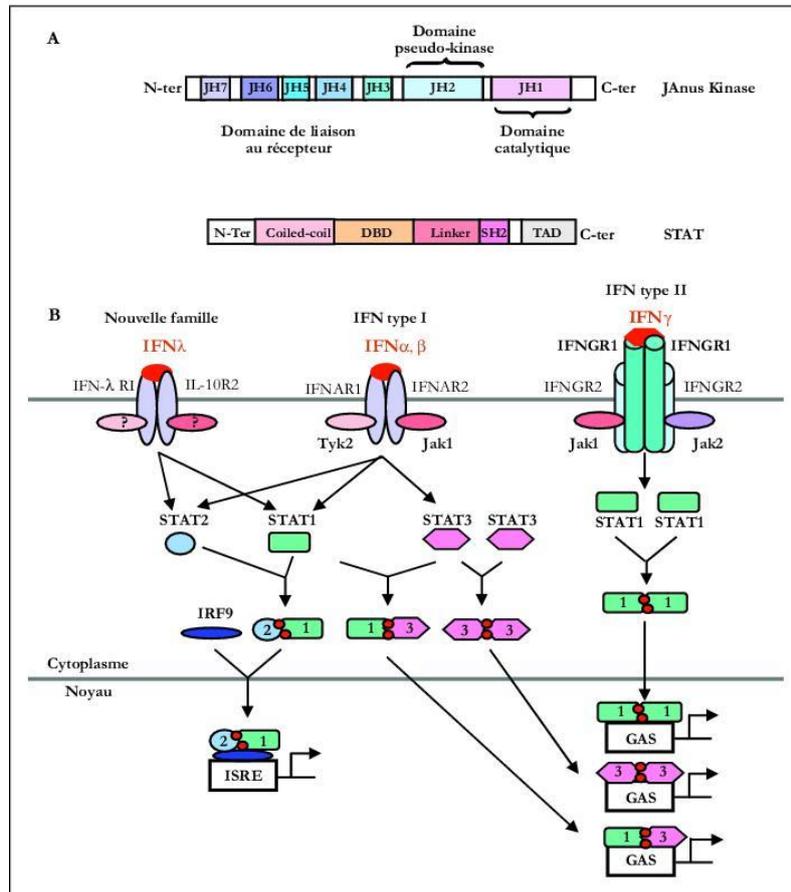


Figure 24: Schéma résumant les différentes activations des JAK/STAT par les interférons (Espert, Dusanter-Fourt et al. 2005).

Un autre clone a été identifié, *Stat4* qui code pour une protéine de 749 acides aminés de 89 kDa, la protéine STAT4. Les gènes *Stat1* et *Stat4* sont dans la même région du chromosome 1 chez la souris, et en position 2q32-q34 chez l'humain. La tyrosine de STAT3 et STAT4 dans la région des 710 aa est phosphorylée. Les protéines STAT4 et STAT5 sont décrites en réponse à l'activation par MGF (mammary gland factor). STAT5 existe sous deux formes STAT5a et STAT5b, la dernière étant la forme tronquée en C-terminal. Les deux formes de STAT5 partagent 94% d'homologie structurale mais sont transcrites par deux gènes différents. STAT5a et STAT5b sont activés par de nombreuses cytokines et hormones comme GH (growth hormone), PRL (prolactine) et plusieurs interleukines. La protéine STAT6 est purifiée en 1994 par Jinzhao Hou et al à la suite d'une réponse à l'IL-4. STAT6 induit une réponse immune à travers IL4- et IL-13 (Hou, Schindler et al. 1994).

Au total, sept protéines STATs sont identifiées dans le génome humain : STAT1 (localisé sur le chromosome 2q32.2), STAT2 (12q13.3), STAT3 (17q21.2), STAT4 (2q32.2), STAT5a (17q21.2), STAT5b (17q21.2) et STAT6 (12q13.3). Leur signalisation est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, différenciation, apoptose, angiogénèse et la régulation du système immunitaire (Verhoeven, Tilborghs et al. 2020).

Pour chaque cytokine, il y a une dimérisation de récepteur spécifique, c'est cette variabilité de combinaison du récepteur puis de la dimérisation des composants de la famille des JAK et des STATs qui conduit à une grande variété de réponses biologiques (**Tableau 3**).

Tableau I		
PROTÉINES JAK ET STAT ACTIVÉES PAR LES DIFFÉRENTS RÉCEPTEURS		
Récepteurs de cytokines	JAK activées	STAT activées
EPO	JAK2	STAT5
G-CSF	JAK1, JAK2	STAT3
GH	JAK1, JAK2	STAT1, STAT3, STAT5
PRL	JAK1, JAK2	STAT1, STAT5
LIF	JAK1, JAK2	STAT3
GM-CSF	JAK2	STAT1, STAT3
IL-2	JAK1, JAK3	STAT3, STAT5
IL-3	JAK2	STAT5, STAT6
IL-4	JAK1, JAK3	STAT6
IL-5	JAK2	STAT1, STAT3, STAT5
IL-6	Tyk2, JAK1, JAK2	STAT1, STAT3
IL-7	JAK1, JAK3	STAT1, STAT3, STAT5
IL-9	JAK1, JAK3	STAT1, STAT3, STAT5
IL-10	Tyk2, JAK1	STAT1, STAT3
IL-12	Tyk2, JAK2	STAT4
IL-13	JAK1	STAT6
IL-15	JAK1, JAK2, JAK3	STAT3, STAT5
IFN α/β	Tyk2, JAK1	STAT1, STAT2, STAT3
IFN γ	JAK1, JAK2	STAT1
Récepteurs tyrosine-kinases		
EGF	JAK1	STAT1, STAT3, STAT5
PDGF	Tyk2, JAK1, JAK2, JAK3	STAT1, STAT3, STAT5
CSF-1	Tyk2, JAK1	STAT1, STAT3

Tableau 3 : Récapitulatif des voies des JAK/STAT activées par chacune des cytokines. Vignais, ML, Protéines JAK et STAT dans la signalisation cellulaire, Med Sci (Paris), 1997, Vol. 13, N° 11; p.1277-84

La spécificité des effets des cytokines va dépendre de trois facteurs. Tout d'abord, les récepteurs de cytokines vont activer différents voies JAK-STAT. Ensuite, l'activité transcriptionnelle des STATs sera différente selon l'homodimère ou l'hétérodimère qu'ils formeront et ainsi reconnaîtront différentes séquences régulatrices de gènes. Enfin, les STATs vont induire l'expression de gènes qui seront différents dans chaque type cellulaire, autrement dit, dans un type de cellule donné, seul un sous-groupe de gènes cibles des STATs pourra être exprimé.

2. Description de la voie JAK/STAT

Des protéines tyrosines kinases JAK inactives sont associées à différentes sous-unités des récepteurs aux cytokines. La liaison de JAK à la sous-unité du récepteur ne nécessite pas la liaison de la cytokine mais cette liaison va induire l'activité tyrosine kinase des JAK et permettre l'association des deux sous-unités du récepteur (**Figure 25**).

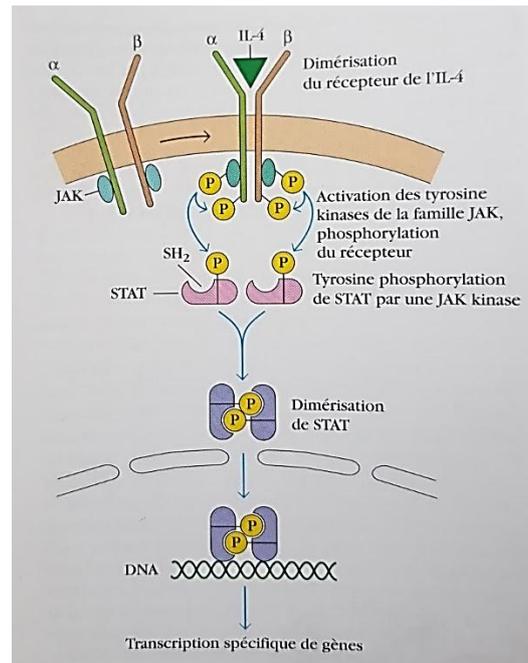


Figure 25: Schéma expliquant l'activation des voies JAK/STAT par la liaison d'une cytokine à son récepteur spécifique.

Immunologie - 6ème édition - Le cours de Janis Kuby avec questions de révision. Kindt, Thomas J.; Goldsby, Richard; Osborne, Barbara)

Une fois les JAK activées, elles phosphorylent les tyrosines spécifiques des sous-unités du récepteur. Les protéines STATs se lient par leur domaine SH2 (Src-homology-2) aux résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs transmembranaires, qui ont été phosphorylés par JAK. Ce domaine SH2 est localisé entre les acides aminés 580 et 680 des STATs. A partir de l'acide aminé 130, se trouve une région hélicoïdale qui permet l'interaction avec différentes protéines. Durant cette liaison à la sous-unité du récepteur, la protéine JAK associée aux récepteurs, phosphoryle le résidu tyrosine situé en C-terminal du domaine SH2 des STATs (**Figure 25**). Le changement de cette tyrosine en phénylalanine rend les STATs non fonctionnelles.

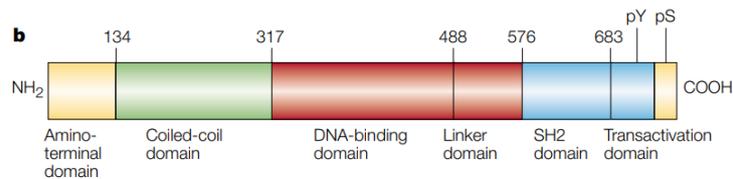


Figure 26: Structure de la protéine STAT. Figure extraite de (Levy and Darnell 2002)

Les STATs se dissocient alors du récepteur et se dimérisent via leur domaine SH2- phospho-tyrosine situé en N-terminal. Les dimères de STATs phosphorylés sont ensuite transloqués dans le noyau via des importines où ils induisent l'expression de gènes cibles en se liant aux séquences régulatrices des promoteurs. Les dimères de STATs se lient à l'ADN grâce à leur région située entre les acides aminés 320 et 490 au centre de la protéine. Le domaine TAD (C-terminal transcriptional activation domain) subit une phosphorylation sur la sérine ce qui induit le recrutement d'activateurs transcriptionnels additionnels (**Figure 26**).

Les STATs sont classiquement activées par la voie des JAK à la suite de la liaison d'une cytokine. Mais elles peuvent également être activées par d'autres voies. (i) La voie des récepteurs à activité kinase comme EGFR (epidermal growth factor receptor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor). (ii) La voie des récepteurs couplés aux protéines G, par exemple les récepteurs pour MIP-1 et RANTES qui dans les cellules T activent STAT1 et STAT3. (iii) La voie des récepteurs non-tyrosine kinases comme v-Src, v-Fps, v-Sis, v-Abl et diverses protéines kinases comme les MAPKs qui induisent une activation constitutive des STATs (Verhoeven, Tilborghs et al. 2020).

2.1 Rôles des STATs

Le rôle primaire des protéines STATs a été défini en délétant chacune de ces protéines chez la souris. Les souris déficientes pour *Stat1* ne répondent pas ou peu aux virus et pathogènes mais répondent à d'autres cytokines et n'ont pas de problème de développement. STAT1 est impliquée dans les réponses antivirales et bactériennes, l'inhibition de croissance, la stimulation de l'apoptose et la suppression de la croissance tumorale. STAT2 est indispensable à la réponse antivirale, elle est également immunomodulatrice, anti-apoptotique et antiproliférative. Une mutation de *STAT2* augmente la susceptibilité des infections virales. La délétion de *Stat1* comme de *Stat2* empêche la réponse aux interférons.

Stat3 est le seul gène des membres de la famille pour lequel la délétion conduit à une mort à l'état embryonnaire. Des études de délétion de *Stat3* de façon cellules spécifiques montrent que la protéine STAT3 joue un rôle majeur dans la réponse à l'IL-2, l'IL-6 et l'IL-10 dans une variété de tissus.

La perte de STAT3 dans les tissus adultes conduit à un défaut de survie cellulaire, d'apoptose et une perte du rétrocontrôle négatif régulant la migration cellulaire (Imada and Leonard 2000).

STAT4 est spécifique de la signalisation de l'IL-12 et affecte les cellules immunes. Elle est requise pour le développement des cellules T CD4⁺ et pour la production d'INF- γ . L'expression de STAT4 est restreinte aux cellules myéloïdes, au thymus et testicules.

Comme vu précédemment, la protéine STAT5 existe sous deux isoformes : STAT5a et STAT5b. Les souris déficientes pour *Stat5a* ont un déficit de prolifération de l'épithélium mammaire avec une perte de réponse à la prolactine et ont moins de réponse des cellules T à l'IL-2. Les souris déficientes pour *Stat5b* ont une perte de croissance sexuelle dimorphique car ne répondent plus aux hormones de croissance. Les protéines STAT5 sont associées à la différenciation cellulaire, la mobilisation lipidique et au développement des lymphocytes.

STAT6 conduit à la prolifération des cellules B et T, la différenciation des macrophages activés et la régulation des IgE dans les cellules B. La délétion de *Stat6* engendre un défaut dans le développement des cellules Th2 et dans la production des immunoglobulines IgE. STAT6 joue un rôle dans l'induction des molécules de surface comme le complexe majeur histocompatibilité CMH II dans les cellules B et macrophages activés et a un effet anti-apoptotique par l'induction de gènes comme *Bcl-XL* (Imada and Leonard 2000, Levy and Darnell 2002, Verhoeven, Tilborghs et al. 2020).

2.2 Régulation des voies JAK/STAT

2.2.1 Les tyrosine phosphatases

Dans le cytoplasme, les protéines tyrosine phosphatases déphosphorylent les tyrosines des récepteurs membranaires kinases. Les protéines SHP1, SHP2 ou PTP1B limitent la phosphorylation de la tyrosine des STATs. Dans le noyau, elles peuvent déphosphoryler les dimères de STATs activés (Levy and Darnell 2002).

2.2.2 Les SOCS (Suppressor of cytokine signalling)

Les protéines SOCS régulent négativement la voie JAK/STAT par rétrocontrôle négatif. Ces inhibiteurs de kinases sont induits par les cytokines et sont capables d'inhiber plusieurs complexes de récepteurs-kinases. Elles peuvent se lier aux sites de liaison des récepteurs aux cytokines ou aux sites catalytiques des JAK empêchant ainsi l'activation des STATs. Les SOCS peuvent également induire un turnover des récepteurs en induisant leur dégradation par un processus d'ubiquitine-protéasome.

Les souris délétées pour *Socs1* ont une mort périnatale. La délétion du gène *Socs2* conduit à la dérégulation de l'IGF-1 (insulin-like-growth-factor 1) une voie de signalisation qui touche le gigantisme. La perte de *Socs3* conduit à une mort à l'état embryonnaire à cause d'un défaut dans l'hématopoïèse et d'un défaut placentaire. La perte de *Socs6* cause un retard de croissance (Levy and Darnell 2002).

2.2.3 Les PIAS (protein inhibitors of activated STAT)

La perte de la déphosphorylation des STATs peut conduire à une activation prolongée des STATs. Les protéines PIAS inhibent les STATs activées dans le noyau. PIAS1 et PIAS3 interagissent avec les tyrosines phosphorylées de STAT1 et STAT3 respectivement dans des cultures de cellules mammaires. *In vitro*, les PIAS empêchent les STATs de se lier à l'ADN. *In vivo*, des études chez la drosophile ont montré que la voie JAK/STAT est indispensable dans le développement des yeux et que la surexpression des PIAS diminuait la taille des yeux (Levy and Darnell 2002).

2.3 Les mutations affectant la voie JAK/STAT

Les mutations des membres de la voie JAK/STAT sont cruciales dans de nombreuses maladies. La plupart sont dues à des mutations des membres de la famille JAK mais aussi à des mutations des STATs. Souvent ces mutations sont impliquées dans les syndromes d'immunodéficience et dans la susceptibilité aux infections. La mutation de *JAK3* conduit à une immunodéficience sévère dans laquelle les lymphocytes sont incapables de répondre aux interleukines. Une mutation de *JAK3* est également retrouvée dans les cellules T et NK (natural killer) dans les lymphomes. Une mutation de *STAT1* est reconnue dans la candidose cutanéomuqueuse chronique et dans des infections récurrentes aux mycobactéries. La mutation de *STAT3* est reconnue dans le syndrome de l'hyperglobulie E, la mutation de *STAT5* dans le syndrome d'insensibilité aux hormones de croissance. Il y a également une fréquence élevée des mutations dans les hémopathies malignes pour lesquelles il est reporté une mutation gain de fonction de *Stat5b*. Un fort niveau de STAT5 phosphorylée est associé à un diagnostic négatif dans les néoplasmes myéloïdes (Verhoeven, Tilborghs et al. 2020).

3. Implications de la voie JAK/STAT dans les cancers

Certains membres de la famille des STATs sont souvent considérés comme oncogènes. Dans plusieurs tumeurs humaines, les STATs sont constitutivement activées. Les cancers humains ont souvent une

perte de réponse des STATs aux interférons qui normalement permettent le contrôle de la croissance cellulaire. Dans les leucémies myéloïdes aiguës, STAT1, STAT3 et STAT5 sont activés et plus particulièrement STAT1 et STAT5 dans les leucémies lymphatiques (Imada and Leonard 2000, Levy and Darnell 2002).

STAT1 peut avoir un effet pro et anti-tumoral. STAT1 est suppresseur de tumeur dans les cellules cancéreuses où il est diminué par différents mécanismes comme la dégradation de la protéine ou la méthylation de son promoteur. Les souris délétées pour *Stat1* augmentent leur susceptibilité aux tumeurs induites expérimentalement et développent spontanément des adénocarcinomes mammaires et des tératomes ovariens. La suractivation de STAT1 peut être détectée dans le cancer du sein. STAT1 induit la production de cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et enzymes comme TNF- α ou iNOS qui peuvent contribuer à la tumorigenèse. L'augmentation d'expression de STAT1 β peut expliquer l'effet pro-tumoral de STAT1. En effet STAT1 α et STAT1 β ont différentes propriétés biologiques. STAT1 α est la forme active et l'isoforme β est considéré comme l'inhibiteur de STAT1. La surexpression de STAT1 β réprime l'activation de STAT1 α en inhibant la phosphorylation de la tyrosine Tyr701 et la liaison à l'ADN. Ce mécanisme d'inhibition de STAT1 α par STAT1 β peut être expliqué par leur compétition de liaison aux mêmes sites d'ADN. Le ratio de STAT1 α et STAT1 β pourrait expliquer le rôle suppresseur de tumeur et activateur de tumeur de STAT1 (Verhoeven, Tilborghs et al. 2020).

STAT3 est reconnu comme activateur de tumeur, des niveaux élevés d'activité de STAT3 sont retrouvés dans plus de 70% des cancers humains. STAT3 est constitutivement activée dans les cellules transformées par la tyrosine kinase Src et hyperactivée dans la leucémie myéloïde aigue, plusieurs myélomes et tumeurs solides comme dans les tumeurs de la vessie, os, sein, cerveau, œsophage, foie, poumon, ovaire et de la prostate. L'activation persistante de STAT3 induit la mitogenèse, la survie, les métastases, l'oncogenèse et est anti-apoptotique notamment en induisant des protéines de la prolifération tumorale comme la cycline D1, c-Myc, Bcl-2 et Bcl-XL. IL-6 est l'activateur le plus important de STAT3 et STAT3 lie les régions promotrices de l'IL-6 conduisant à une augmentation d'expression d'IL-6 ce qui crée une boucle de rétrocontrôle positif de la voie IL-6/JAK/STAT3. L'hyperactivation de la voie IL-6/JAK/STAT3 est retrouvée dans les tumeurs hématopoïétiques malignes et tumeurs solides. STAT3 est également activée à la suite d'infections virales à HTLV-1, v-Abl et au virus Epstein-Barr. Dans le carcinome hépatocellulaire, la diminution d'expression du gène *Socs3* par méthylation est associée à l'activation persistante de STAT3 (Levy and Darnell 2002, Verhoeven, Tilborghs et al. 2020).

STAT3 peut également avoir des fonctions suppresseur de tumeur. STAT3 régule négativement le développement du cancer du poumon induit par *KRAS* dans des souris mutantes *APC*. Des niveaux

élevés de STAT3 activée conduisent à un meilleur pronostic des patients de cancer du côlon et du carcinome nasopharyngé.

STAT4 est impliquée dans les métastases du cancer gastrique, sa délétion induit la suppression de la migration cellulaire et l'invasion des métastases. L'augmentation d'expression de STAT4 est corrélée à la profondeur de l'invasion chez des patients atteints de cancer du côlon.

De nombreux mécanismes contribuent à l'activation de STAT5 dans les cancers humains comme des modifications épigénétiques, une régulation par des miARN (micro-ARN), une amplification d'expression de gène ou une altération des voies de facteurs de croissance. STAT5 induit une activité oncogène par des altérations transcriptionnelles et des interactions protéines-protéines induisant un effet anti-apoptotique, un défaut de réponse au dommage à l'ADN, une invasion et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). STAT5 régule directement les voies TGF- β , PI3K/PTEN, les voies anti-apoptotiques en augmentant l'expression de Bcl-2, MCL-1 et Bcl-XL. Il régule également directement les voies de transition de phase G1/S, en augmentant l'expression des cyclines D1, D2, D3 et c-myc. La protéine STAT5 peut aussi avoir une activité suppresseur de tumeur. En effet, STAT5 activée est un indicateur de bon pronostic chez les patients atteints de cancer du sein ou du cancer nasopharyngé.

STAT6 a montré être essentielle dans l'induction d'IL-4 et IL-13 qui jouent un rôle dans le caractère agressif des cellules du cancer du côlon. Cibler la voie STAT6 réduit la croissance tumorale et les métastases dans le cancer gastrique, du sein et de la prostate et devient une nouvelle cible thérapeutique pour ces cancers (Verhoeven, Tilborghs et al. 2020).

4. La voie JAK/STAT comme cible thérapeutique

La voie des STATs peut être directement ou indirectement ciblée dans différentes pathologies comme les cancers. Une stratégie indirecte est de cibler les acteurs en amont des STATs, les protéines JAK. Les mutations gain de fonction des gènes JAK/STAT sont rarement retrouvées dans les tumeurs solides mais peuvent être fréquentes dans certains types de cancers du sang appelés désordres myéloprolifératifs. Le ruxolitinib, inhibiteur de JAK1/2, est utilisé dans le traitement des néoplasmes myéloprolifératifs comme la *polycythemia vera* et la myélofibrose primitive. La myélofibrose se caractérise par une fibrose de la moelle osseuse, une splénomégalie, des cellules myéloïdes immatures dans le sang périphérique, l'hyperprolifération de plusieurs types cellulaires myéloïdes ce qui peut conduire à une anémie, cytopénie, aboutissant à une insuffisance médullaire (Vainchenker and Kralovics 2017, Fisher, Miner et al. 2019). Pendant longtemps, le seul traitement utilisé dans la myélofibrose était la transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

On décrit trois différentes mutations chez les patients atteints de la myélofibrose qui induisent une activation de JAK2. Dans 50 à 60 % des cas, les patients ont la mutation gain de fonction, *JAK2V617F*, sur le gène codant pour JAK2.

Le ruxolitinib (ou INCB018424, **Figure 27**) est le premier inhibiteur de JAK 1 et 2 de classe I (non sélectif pour JAK2) qui a montré un effet clinique sur les patients atteints de myélofibrose. Il agit comme un inhibiteur compétitif de l'ATP principalement contre JAK1 et JAK2. Le ruxolitinib est un inhibiteur efficace sur la forme mutée ou non mutée de JAK2, d'où son efficacité chez les patients ayant ou non une mutation de JAK2. Il induit une inhibition de la voie JAK1/2 ce qui module la production de cytokines dépendantes de cette voie de signalisation. Il a été développé par Incyte Corporation (Wilmington, DE, USA) et est commercialisé sous le nom de JAKAVI sous la forme de comprimé disponible sous 3 dosages : 5 mg, 15 mg et 20 mg. La posologie de ce médicament est de 15 mg deux fois par jour chez les patients ayant un taux de plaquettes compris entre 100 000/mm³ et 200 000/mm³ et de 20 mg 2 fois par jour chez les patients ayant un taux de plaquettes supérieur à 200 000/mm³ (Ostojic, Vrhovac et al. 2011).

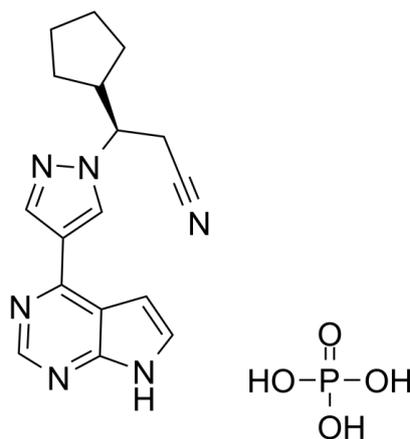


Figure 27: Représentation de la molécule du ruxolitinib ou INCB018424

Depuis 2017 en France, le tofacitinib, inhibiteur de JAK1/JAK3, est utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde puis élargit au traitement du psoriasis. L'anticorps anti-IL-6, le siltuximab est utilisé dans le traitement des maladies de Castleman. L'anticorps tocilizumab dirigé contre le récepteur- α de l'IL-6 est utilisé dans le traitement des arthrites juvéniles idiopathiques systémiques et des polyarthrites rhumatoïdes. Les traitements qui inhibent directement les STATs peuvent agir à différents niveaux, en inhibant leur ARNm, en empêchant la dimérisation des STATs ou en interférant leur liaison avec l'ADN. Les recherches d'inhibiteurs portent principalement sur les inhibiteurs de STAT3. L'intérêt d'utiliser en thérapie l'inhibition de STAT3 est qu'il ne semble pas être indispensable dans les cellules et tissus normaux non-transformés à la différence des cellules embryonnaires. Le

blochage de STAT3 induit l'apoptose des cellules tumorales médiée par p53 cela permet d'envisager la possibilité de cibler STAT3 dans les cancers non-mutants pour p53. STAT3 peut induire une résistance aux chimio- et radiothérapies. Des études précliniques utilisent le blocage de l'activité de STAT3 dans des cellules tumorales, ce qui pourrait avoir des effets bénéfiques dans la prévention de la résistance aux médicaments anticancéreux.

L'inhibition de STAT6 est étudiée pour son rôle sur les voies de l'IL-4 et IL-13 impliquées dans les allergies. L'inhibition de STAT6 réduit la sévérité de ces pathologies comme pour les allergies alimentaires (Verhoeven, Tilborghs et al. 2020).

5. La voie JAK/STAT dans la sénescence cellulaire

Des traitements génotoxiques induisent la sénescence cellulaire associée à l'activation persistante de la voie JAK/STAT et des gènes stimulés par les interférons comme ISG15, STAT1, PML, IRF1 et IRF7. L'inhibition de JAK1 par un ARN interférent abolit l'expression de ces gènes stimulés mais pas la sénescence cellulaire ou le dommage à l'ADN. La sénescence induite par les génotoxiques semble plutôt induire la voie IFN- β /STAT1. Alors que la voie IL-6/JAK/STAT semble plutôt induite lors d'une sénescence induite par oncogènes ou dans la sénescence répliquative (Novakova, Hubackova et al. 2010).

Le suppresseur de tumeur PML (Promyelocytic leukemia protein) est un composant des compartiments nucléaires appelés corps nucléaires PML (NBs PML). Les NBs PML sont diminués dans les cancers mais augmentés dans des cellules rendues sénescents par différents génotoxiques. Il a été démontré que la protéine PML, augmentée dans la sénescence prématurée, co-localise avec les foci de dommage à l'ADN persistants. Le traitement par les génotoxiques induit une sécrétion d'IFN- β , l'activation de la voie JAK/STAT1-3 et de la voie ATM/Chk2/p53/p21. L'inhibition des quatre JAK empêche la formation des NBs PML et l'inhibition de JAK1 induit une diminution de PML associée à une diminution de STAT1 phosphorylée. La voie JAK/STAT semble contrôler transcriptionnellement PML dans les conditions de stress génotoxiques par l'élément ISRE contenu dans la région proximale régulatrice du gène de PML (Hubackova, Novakova et al. 2010).

Hirota Kojima et al ont montré que l'IL-6 et son récepteur soluble sIL-6R induisent la sénescence prématurée dans les fibroblastes humains normaux impliquant les protéines STAT3 et IGFBP5. La stimulation des fibroblastes TIG3 par l'IL-6/sIL-6R induit une augmentation des ROS puis une réponse au dommage à l'ADN avec l'accumulation de p53 et une sénescence à 10 jours. L'activité de STAT3 semble requise pour conduire à la sénescence avec une réponse initiale précoce d'élévation des ROS et l'induction des ARNm d'IL-1 α/β , IL-6 et CXCL8 5 jours après la stimulation à l'IL-6. IGFBP5 semble

être induit en phase précoce de façon dépendante de STAT3. La diminution d'expression d'IGFBP5 inhibe les ROS et la sénescence prématurée induite par l'IL-6/sIL-6R (Kojima, Kunimoto et al. 2012).

Dans des pré-adipocytes primaires de sujets âgés, γ H2AX et les cellules positives à la β -galactosidase sont augmentés par rapport au contrôle. Dans les tissus adipeux de rats âgés de 30 mois, γ H2AX, p21 et JAK1 et JAK2 phosphorylées sont augmentées par rapport aux tissus de rats âgés de 3 mois. La sénescence induite par irradiation ou par passages répétés induit une augmentation des cellules positives à la β -galactosidase, des transcrits de p16 et 21 et des cytokines mesurées dans les pré-adipocytes de donneurs humains sains. Le traitement des pré-adipocytes sénescents irradiés par un inhibiteur des quatre JAK permet de réduire 16 des 32 cytokines testées et la phosphorylation de STAT3. L'inhibition spécifique de JAK1 ou de JAK2 par des siRNA ou l'inhibition de JAK1/JAK2 (ruxolitinib) conduit également à l'inhibition du SASP. JAK1 et JAK2 semblent donc jouer un rôle dans la régulation du SASP. *In vivo*, les cytokines IL-6, G-CSF, IP-10, CXCL1, MIP-1 β , IL-17, et CCL-11 mesurées dans le sérum sont augmentées chez les souris âgées (24 mois) comparées aux souris jeunes (6 mois) et le traitement par le ruxolitinib diminue la plupart de ces cytokines. Dans le tissu adipeux des souris âgées, JAK2 et STAT3 phosphorylées et p21 sont augmentées. Le traitement par le ruxolitinib permet de diminuer significativement la protéine STAT3 phosphorylée. Et un traitement de 10 semaines par le ruxolitinib permet d'augmenter les capacités physiques des souris âgées. Ces études montrent que la sénescence cellulaire peut contribuer à l'inflammation liée à l'âge et que l'inhibition de la voie JAK1/JAK2 diminue cette inflammation et pourrait être une intervention thérapeutique dans les dysfonctions liées à l'âge (Xu, Tchkonja et al. 2015).

6. La voie JAK/STAT dans les maladies pulmonaires

Simon et al ont montré que STAT1 et STAT3 sont activés dans les fibroblastes et les cellules de carcinome A-431, dans les 5 minutes qui suivent une exposition au H₂O₂. Dans ce cas, l'activation de STATs est induite par le PDGF et est inhibée par les antioxydants comme le NAC. La production des ROS induites par PDGF active STAT1 et STAT3 en stimulant l'activation de JAK2 et TYK2 (Simon, Rai et al. 1998). Le traitement de cellules musculaires lisses des voies respiratoires humaines par le PDGF induit une phosphorylation de STAT1 et STAT3 qui est rapidement bloquée par l'inhibition des kinases Src et JAK2. L'inhibition de ces kinases bloque l'expression des gènes cibles des STATs, *cycline D1* et *c-myc*, stimulée par le PDGF (Simon, Takahashi et al. 2002).

6.1 La voie JAK/STAT dans la BPCO et l'emphysème

Des analyses par Western blot ont montré une augmentation de STAT1 et STAT3 phosphorylée sur la tyrosine dans les poumons de patients fumeurs et significative dans les poumons de patients BPCO sévères comparés à des non-fumeurs (aucune différence pour les protéines phosphorylées STAT2, STAT4, STAT5 et STAT6). En immunohistochimie, une augmentation non significative de phospho-STAT1 est retrouvée chez les fumeurs et les patients atteints de BPCO par rapport aux non-fumeurs. Dans les trois groupes, le marquage est plus fort dans les macrophages que dans les cellules épithéliales. Contrairement aux données en Western blot, aucune augmentation du marquage de phospho-STAT3 n'est observée chez les patients BPCO par rapport aux non-fumeurs. Il y a une augmentation non significative de phospho-STAT3 dans les macrophages des fumeurs par rapport aux non-fumeurs. Une augmentation significative de phospho-STAT2 a été observée dans les macrophages des fumeurs par rapport à ceux des non-fumeurs (aucune différence pour les protéines phosphorylées STAT4, STAT5 et STAT6) (Yew-Booth, Birrell et al. 2015).

L'IL-6 est un important immunomodulateur associé à l'emphysème chez les patients BPCO. Des chercheurs se sont intéressés au rôle de la voie IL-6/gp130/STAT3 dans l'emphysème. La réduction génétique de STAT3 dans des souris emphysémateuses prévient l'inflammation pulmonaire et l'activité excessive des protéases mais n'empêche pas le développement de l'emphysème. Les niveaux d'activation de STAT3 dans les tissus de poumons humains corrént avec l'inflammation pulmonaire mais pas avec l'obstruction des voies aériennes dans la BPCO. L'IL-6 peut induire l'emphysème en contribuant à l'apoptose des cellules alvéolaires indépendamment de STAT3. Les auteurs concluent que l'hyperactivation de STAT3 endogène dépendante de la gp130 n'induit pas d'emphysème mais favorise plutôt l'inflammation pulmonaire (Ruwanpura, McLeod et al. 2012).

L'acide rétinoïque all-trans (ATRA) a été décrit pour diminuer l'emphysème induit par l'élastase chez les rats. ATRA est impliqué dans une variété de processus comme la prolifération, la différenciation, la survie et l'apoptose. Des analyses *in silico* ont été effectuées pour trouver une liaison efficace entre ATRA avec des récepteurs et des ligands des voies ERK et JAK/STAT. Ces analyses ont montré que ATRA se lie aux ligands TNF- α et IL-6 et à leur récepteur. Dans un modèle d'emphysème induit par l'élastase, le traitement à l'ATRA permet de réduire les gènes des voies ERK (TNFR1, RAS, ERK1, ERK2, ELK1 et c-MYC) et JAK/STAT (IL6, IL6ST, JAK2, PTK2B, ABL1, et STAT3). L'ATRA permet de réduire les protéases qui sont augmentées par l'élastase et d'augmenter les anti-protéases diminuées par l'élastase. Cela permet de maintenir la structure du tissu et de régénérer l'épithélium et ainsi de diminuer l'emphysème (Uniyal, Dhasmana et al. 2018).

6.2 La voie JAK/STAT dans la fibrose pulmonaire

La voie JAK-STAT est activée dans un modèle de fibrose pulmonaire chez la souris induit par l'injection intratrachéale de bléomycine. Les niveaux d'ARNm de STAT1 et STAT3 sont augmentés dès 7 jours post-injection comparés au groupe contrôle avec un pic à 14 jours post-injection. Les niveaux de ces ARNm restent supérieurs dans le groupe bléomycine après 21 et 28 jours post-injection (Ma, Chen et al. 2013). Dans ce même modèle de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine, les marquages de TGF- β 1 et de Smad3 (molécule sous-jacente de la voie de TGF- β 1) sont augmentés par rapport au groupe contrôle. L'augmentation de TGF- β 1 et Smad3 est accompagnée d'une augmentation d'ARNm de STAT1 avec un pic à 14 jours qui diminue ensuite à 21 et 28 jours post-injection de bléomycine. Dans le groupe bléomycine traité par le dexaméthasone, les niveaux de TGF- β 1, Smad3 et de STAT1 diminuent. Les auteurs proposent le dexaméthasone pour diminuer les effets de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine dans le modèle souris (Shi, Jiang et al. 2014).

L'ARNm de l'IL-31, membre de la famille des cytokines IL-6, est augmenté également par la bléomycine. Il a été montré par co-immunoprécipitation que le promoteur du gène *IL-31* est une cible de Smad3 dans le groupe bléomycine. L'inhibition d'IL-31 par siRNA dans des fibroblastes primaires en culture empêche l'expression de la protéine STAT1.

Les auteurs proposent que la voie TGF- β induit la phosphorylation de Smad2/3 et active l'IL-31 dans la fibrose chez la souris (Shi, Jiang et al. 2014).

La voie de l'IL-6 et STAT3 est impliquée dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) mais les mécanismes de régulation de STAT3 sont mal connus. Dans une récente étude, des faibles niveaux de SOCS1 (inhibiteur de STAT3) sont retrouvés dans les fibroblastes de patients FPI. La régulation de SOCS1 a été évaluée dans ces fibroblastes et la méthylation de SOCS1 est identique chez les patients FPI ou contrôles et le traitement par des inhibiteurs d'ADN méthyltransférases n'a aucun effet. SOCS1 est la cible d'un microARN, microRNA-155 mais les niveaux de celui-ci ne sont pas modifiés dans de patients FPI. Les auteurs concluent que SOCS1 est bien diminué chez les patients FPI mais que le mécanisme de régulation reste à déterminer (Prêle, Iosifidis et al. 2021).

7. La voie JAK/STAT dans la fibrose

Comme dans plusieurs maladies fibrotiques, la voie de TGF- β qui est impliquée dans l'activation des fibroblastes, est augmentée dans la sclérose systémique. Cette pathologie chronique rare est une maladie rhumatismale auto-immune, caractérisée par des anomalies dégénératives et une fibrose de la peau, des articulations et des organes internes. Dans les fibroblastes issus de patients atteints de

sclérose systémique, JAK2 est un effecteur sous-jacent de TGF- β . L'inhibition spécifique de JAK2 bloque l'activation des fibroblastes induite par TGF- β *in vitro*. Dans les cellules tumorales, les inhibiteurs spécifiques de JAK2 conduisent à une compensation avec une hétéro-dimérisation de JAK1 et JAK2 et une phosphorylation de JAK2 sur ses tyrosines Tyr1007/Tyr1008 par JAK1.

Des fibroblastes de patients atteints de sclérose systémique sont traités avec le TGF- β induisant une augmentation de COL1A1 et COL1A2, l'inhibition spécifique de JAK2 diminue COL1A1 et COL1A2 après 1 jour de traitement puis n'a plus d'effet dès 7 jours. L'augmentation de phospho-JAK2 induite par le TGF- β est diminuée dans un premier temps par l'inhibiteur spécifique de JAK2. Dès 3 jours, cet inhibiteur n'a plus d'effet sur la diminution de phospho-JAK2. Avec la double inhibition de JAK1 et JAK2 par le ruxolitinib, la diminution de pJAK1 et pJAK2 après stimulation au TGF- β se prolonge dans le temps après 7 jours de traitement. Les mêmes effets sont observés avec un co-traitement par l'inhibiteur spécifique de JAK2 couplé à l'inhibiteur de HSP90, le 17-DMAG, qui induit la dégradation de JAK2. Ce co-traitement inhibe la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes avec une diminution des protéines de collagène et de l'ARNm ACTA2 (codant pour α -SMA). JAK1 et pJAK1 co-précipitent avec JAK2 et encore plus après stimulation des fibroblastes au TGF- β . Le traitement par l'inhibiteur spécifique de JAK2 ne permet pas de prévenir cette interaction mais le traitement par le ruxolitinib le permet et le co-traitement avec l'inhibiteur spécifique de JAK2 couplé au 17-DMAG l'accentue.

In vitro, dans les fibroblastes, l'exposition au TGF- β induit une transphosphorylation de JAK2 par JAK1. *In vivo*, dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine, le traitement par l'inhibiteur spécifique de JAK2, le 17-DMAG ou le ruxolitinib réduit le nombre de fibroblastes et l'Ashcroft score, utilisé pour quantifier la fibrose à partir des coupes de poumon colorées au rouge sirius (**Figure 28**). La combinaison des traitements de l'inhibiteur spécifique de JAK2 avec le 17-DMAG est plus efficace pour réduire les aires fibrotiques et le nombre de myofibroblastes comparé à l'inhibition unique de JAK 1 ou JAK 2.

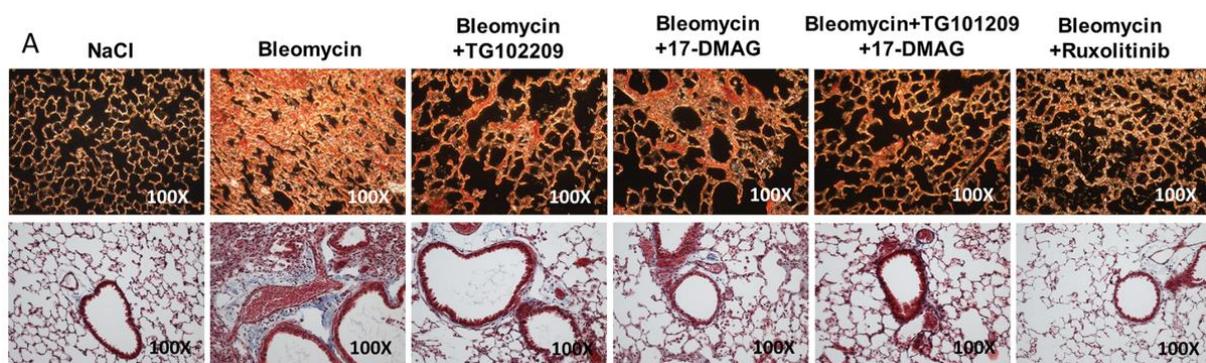


Figure 28: Figure issue de Zhang, Liang et al 2017 montrant la réduction de la fibrose pulmonaire par l'inhibition de JAK1/2 par le traitement au ruxolitinib

Le ruxolitinib diminue le nombre de myofibroblastes de façon plus importante que l'inhibiteur spécifique de JAK2. Les mêmes effets sont retrouvés dans un modèle de fibrose de derme murin induit par activation constitutive de TGF- β par injection d'adénovirus. Les auteurs proposent ainsi un traitement contre la fibrose soit par une double inhibition de JAK1 et JAK2 par le ruxolitinib, soit l'ajout de l'inhibiteur de HSP90 qui déstabilise la protéine JAK2 dans le cas d'un co-traitement avec un inhibiteur spécifique de JAK2 (Zhang, Liang et al. 2017).

Le même groupe a montré le rôle de la protéine STAT3 dans les signaux pro-fibrotiques. La protéine STAT3 phosphorylée est augmentée dans les fibroblastes de la peau de patients atteints de sclérose systémique comparés à la peau de sujets sains. *In vitro*, l'ajout de TGF- β sur les fibroblastes, induit la phosphorylation de STAT3. L'inhibition de TGF- β permet de diminuer l'accumulation de pSTAT3 qui avait été induite dans les souris traitées à la bléomycine. L'activation des kinases qui activent STAT3, JNK, JAK, SRC et c-ABL est augmentée dans les fibroblastes de peau de patients atteints de sclérose systémique comparés aux sujets sains. L'augmentation de ces kinases activées est également retrouvée dans des fibroblastes de derme humain traités par le TGF- β et dans la peau de souris traitée à la bléomycine. *In vitro*, l'inhibition spécifique de chacune de ces kinases permet de diminuer la protéine phospho-STAT3 induite par le TGF- β . Il en est de même *in vivo* sur de la peau induite à la bléomycine mais aucune de ces inhibitions spécifiques ne permettent d'éliminer complètement l'activation de phospho-STAT3. Ceci montre que l'activation de STAT3 dans les fibroblastes résulte d'une activation combinée des kinases JAK2, JNK, SRC et c-ABL.

Dans les fibroblastes stimulés au TGF- β , l'activation de SMAD3 précède l'activation de STAT3 et SMAD3 se lie à la protéine STAT3 non phosphorylée. L'inhibition de SMAD3 induit une augmentation de phospho-STAT3. L'inhibition de l'activation de STAT3 par un petit inhibiteur ou la délétion génétique de STAT3 inhibe la transcription des gènes cibles de TGF- β , réduit la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la synthèse des collagènes. Les souris conditionnellement délétées pour STAT3 dans les fibroblastes sont protégées de la fibrose induite expérimentalement. Les auteurs concluent que STAT3 pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement de la fibrose (Chakraborty, Šumová et al. 2017).

Récemment, le même groupe a démontré que dans la peau fibrotique de patients atteints de sclérose systémique, et dans des modèles de fibrose de la peau chez la souris, la voie TGF- β induit une diminution d'expression de SOCS3. TGF- β réduit l'expression de SOCS3 par l'induction des ADN méthyltransferase DNMT3A et DNMT1 qui répriment l'expression de SOCS3 par hyperméthylation de son promoteur. L'inactivation de SOCS3 induit l'activation prolongée de STAT3 qui contribue directement à l'activation des fibroblastes dans la sclérose systémique. L'inactivation de SOCS3 amplifie la réponse des fibroblastes au TGF- β et la délétion spécifique de SOCS3 dans les fibroblastes

in vivo aggrave la fibrose de la peau. A l'inverse, l'expression forcée de SOCS3, la délétion de DNMT3A ou le traitement par un inhibiteur des DNMT inhibe la différenciation en myofibroblastes induite par le TGF- β , la production de collagènes et la fibrose de la peau.

Les auteurs proposent que la restauration du contrôle épigénétique de la voie de STAT3 par l'utilisation d'inhibiteur d'ADN méthyltransférase puisse être une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement de maladies fibrotiques comme la sclérose systémique (Dees, Pötter et al. 2020).

Problématique

Comme nous avons pu le voir dans la partie Introduction de ce manuscrit, le processus de sénescence cellulaire est associé à de nombreuses pathologies pulmonaires liées à l'âge notamment la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la fibrose pulmonaire (Childs, Gluscevic et al. 2017). La BPCO est caractérisée par une obstruction des voies aériennes avec un emphysème et une inflammation chronique. La fibrose pulmonaire se caractérise par un excès de dépôts des éléments de la matrice extracellulaire produits par les myofibroblastes et de la différenciation dérégulée de plusieurs types cellulaires en myofibroblastes. Une accumulation de cellules sénescents est observée dans ces deux pathologies pulmonaires et contribue à un défaut de renouvellement tissulaire notamment à cause des composants du SASP « sécrétome associé à la sénescence » (Tsuji, Aoshiba et al. 2006, Amsellem, Gary-Bobo et al. 2011, Nouredine, Gary-Bobo et al. 2011, Lomas, Watts et al. 2012, Lehmann, Korfei et al. 2017). Limiter la sénescence cellulaire et le SASP représente donc un objectif thérapeutique majeur dans les maladies pulmonaires liées à l'âge. Le récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1) a montré être impliqué dans l'induction de la sénescence cellulaire (Augert, Payré et al. 2009). De plus, son rôle suppresseur de tumeur passe par l'activation de la voie JAK2/STAT3 dans les cellules cancéreuses et cela indépendamment de la liaison de ses ligands sPLA2 (Vindrieux, Augert et al. 2013). Il est possible d'inhiber cette voie JAK/STAT par l'inhibiteur de JAK1/JAK2, le ruxolitinib. Ce médicament a déjà montré avoir des effets intéressants dans la diminution du SASP dans le tissu adipeux de souris âgées, pour lesquelles le SASP était augmenté comparé à des souris jeunes (Xu, Tchkonja et al. 2015). Comme décrit dans la partie Introduction, les cellules sénescents peuvent être bénéfiques dans la protection contre l'échappement tumoral. L'élimination des cellules sénescents en thérapie, par l'utilisation de sénolytiques, pourrait être néfaste sur le long terme. Il est intéressant de cibler le SASP pour neutraliser certains effets délétères des cellules sénescents, notamment l'inflammation. En effet, la BPCO est caractérisée par une inflammation chronique qui pourrait participer au développement de l'emphysème. La voie JAK/STAT étant impliquée dans les processus inflammatoires, cibler cette voie pourrait être intéressant dans l'inhibition des composants du SASP.

Les précédents résultats obtenus par l'équipe de David Bernard sur le rôle de PLA2R1 dans la sénescence cellulaire, nous ont conduit à nous demander quel était son rôle dans la sénescence cellulaire dans les pathologies pulmonaires obstructives et notamment la BPCO (**Figure 29**).

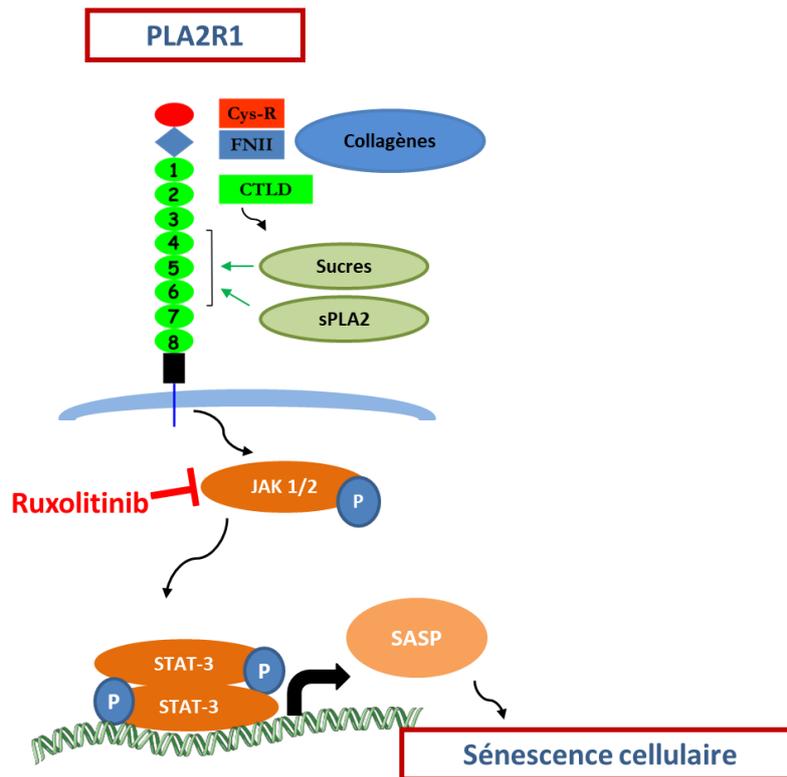


Figure 29: Schéma représentant le rôle du récepteur PLA2R1 dans l'induction de la sénescence cellulaire par l'activation de la voie JAK/STAT

Nous nous sommes intéressés dans la première étude de cette thèse au rôle de PLA2R1 sur la sénescence cellulaire dans les poumons de patients atteints de BPCO. Nous avons souhaité vérifier son rôle sur la sénescence cellulaire et son expression dans les poumons et cellules de patients atteints de BPCO. Ensuite, nous nous sommes demandé si le blocage de son expression pouvait réduire la sénescence cellulaire et le SASP dans les cellules issues de patients atteints de BPCO. L'effet de l'inhibition de JAK1/JAK2 par le ruxolitinib sur la sénescence cellulaire et sur les composants du SASP a ensuite été évalué sur les cellules de patients. Enfin, nous avons évalué l'effet de la surexpression de PLA2R1 chez la souris sur l'induction d'altérations pulmonaires observées chez les patients atteints de BPCO et ainsi évaluer l'effet protecteur du ruxolitinib contre celles-ci.

Dans une seconde étude, nous nous sommes particulièrement intéressé à l'emphysème et la fibrose pulmonaires qui étaient induits par la surexpression de PLA2R1 chez la souris. Nous avons donc cherché à évaluer l'effet protecteur d'un traitement préventif et/ou curatif par le ruxolitinib dans un modèle d'emphysème pulmonaire induit par l'élastase et un modèle de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine. Nous avons cherché à savoir si le ruxolitinib pouvait avoir des effets protecteurs contre ces altérations pulmonaires en diminuant la sénescence cellulaire et/ou le SASP de façon indépendante de PLA2R1.

Résultats

Etude 1 : Le récepteur 1 de la phospholipase A2 favorise la sénescence des cellules pulmonaires et l'emphysème dans les maladies pulmonaires obstructives.

Delphine Beaulieu^{1,6}, Aya Attwe^{1,2,6}, Marielle Breau¹, Larissa Lipskaia¹, Elisabeth Marcos¹, Emmanuelle Born¹, Jin Huang¹, Shariq Abid¹, Geneviève Derumeaux¹, Amal Houssaini¹, Bernard Maitre¹, Marine Lefevre³, Nora Vienney¹, Philippe Bertolino⁴, Sara Jaber⁴, Hiba Noureddine², Delphine Goehrig⁴, David Vindrieux⁴, David Bernard^{4,7} and Serge Adnot^{1,5,7}

¹ INSERM U955, Département de Physiologie-Explorations Fonctionnelles and DHU A-TVB Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France. ² Environmental Health Research Laboratory (EHRL), Faculty of Sciences V, Lebanese University, Nabatieh, Lebanon. ³ Département Anatomopathologie, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France. ⁴ Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR INSERM U1052/CNRS 5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ⁵ Institute for Lung Health, University of Giessen, Giessen, Germany. ⁶ These two authors contributed equally. ⁷ These two authors are joint senior authors.

Introduction étude 1 :

L'accumulation de cellules sénescents est un processus clé dans la physiopathologie de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Amsellem, Gary-Bobo et al. 2011, Nouredine, Gary-Bobo et al. 2011, Childs, Gluscevic et al. 2017). Cela diminue le potentiel de renouvellement du tissu pulmonaire et contribue à une inflammation chronique via la sécrétion du SASP (phénotype sécrétoire associé à la sénescence). La sénescence cellulaire exagérée dans les poumons de patients BPCO résulte de la combinaison d'une sénescence répllicative induite par un raccourcissement des télomères et d'une sénescence prématurée induite par l'exposition à des stress comme le stress oxydant et les médiateurs de l'inflammation. Ces processus induisent une réponse aux dommages à l'ADN dépendante de p53 et augmente l'expression de p21 et p16. La relation entre la sénescence cellulaire et les manifestations pulmonaires de la BPCO est bien démontrée. Mais il y est nécessaire d'identifier les voies moléculaires qui participent à cette sénescence cellulaire dans la BPCO afin de les cibler pharmacologiquement.

L'équipe de David Bernard avait déjà identifié le récepteur 1 de la phospholipase A2 (PLA2R1) comme régulateur crucial de la sénescence répllicative et de la sénescence prématurée (Augert, Payré et al. 2009). PLA2R1 est une protéine transmembranaire qui lie des phospholipases sécrétées (sPLA2s), des collagènes et des sucres. Une récente étude indique que PLA2R1 joue un rôle pro-sénescence de façon indépendante des sPLA2s et implique la voie JAK/STAT (Vindrieux, Augert et al. 2013). Dans cette étude nous avons exploré l'importance des voies PLA2R1 et JAK/STAT dans la sénescence cellulaire pulmonaire chez les patients atteints de BPCO.

Résultats étude 1 :

Nous avons observé que la surexpression de PLA2R1 était un mécanisme majeur conduisant à la sénescence cellulaire dans la BPCO et que la surexpression de PLA2R1 chez la souris induisait la sénescence cellulaire associée à des altérations pulmonaires telles que l'emphysème et la fibrose pulmonaires ainsi que l'hypertension pulmonaire. Le traitement par le ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1 et JAK2 a ralenti le processus de sénescence cellulaire dans les cellules issues de patients BPCO, inhibé le SASP et atténué les altérations pulmonaires pathologiques résultant de la surexpression de PLA2R1 chez la souris.

Discussion étude 1 :

Nos résultats obtenus dans cette première étude montrent un rôle majeur de l'activation de PLA2R1 dans l'induction de la sénescence cellulaire et des altérations pulmonaires retrouvées dans la BPCO. La surexpression de PLA2R1 est fortement impliquée dans la sénescence cellulaire exagérée de la BPCO et la surexpression de PLA2R1 chez la souris conduit à une sénescence cellulaire et aux altérations pulmonaires de la BPCO. Dans l'activation de la voie PLA2R1, JAK2 semble être un important effecteur notamment dans la production du SASP. L'inhibiteur de JAK1/JAK2, le ruxolitinib, retarde l'entrée en sénescence cellulaire, inhibant le SASP dans les cellules de patients BPCO et atténuant les altérations pulmonaires résultant de la surexpression de PLA2R1 chez la souris. Ces éléments montrent que cibler PLA2R1 ou JAK2 peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique en s'opposant à la sénescence cellulaire dans la BPCO.

PLA2R1 est inducteur de sénescence cellulaire et joue un rôle surpresseur de tumeur (Bernard and Vindrieux 2014, Griveau, Devailly et al. 2016). Nous avons montré un nouveau rôle pathogénique de PLA2R1 par sa surexpression dans les poumons de patients atteints de la BPCO. PLA2R1 est surexprimé dans plusieurs types cellulaires de poumons issus de patients BPCO et très faiblement exprimé dans les poumons de sujets témoins. Les cellules marquées pour PLA2R1 sont aussi marquées pour p16, un majeur onco-suppresseur exprimé dans les cellules sénescents (Childs, Baker et al. 2016) et également pour 53BP1 et γ -H2AX deux marqueurs de dommages à l'ADN. Le rôle de PLA2R1 dans le processus de sénescence de la BPCO est montré *in vitro* par le retard de l'entrée en sénescence induit par une sous-régulation de PLA2R1 dans les cellules de patients BPCO mises en culture.

Il avait précédemment été démontré dans le laboratoire que les cellules issues de patients atteints de BPCO comparées aux cellules issues de sujets témoins étaient caractérisées par une réduction de la capacité de doublement de population et par la sécrétion de facteurs inflammatoires et cytokines appartenant au SASP (Amsellem, Gary-Bobo et al. 2011, Houssaini, Breau et al. 2018). Ici nous avons pu montrer que l'inactivation de PLA2R1 améliore la capacité de doublement de population et supprime également le SASP. Le fait que la sénescence cellulaire dépende de p53 dans la BPCO n'est pas surprenant, étant donné que les dommages à l'ADN et le dysfonctionnement des télomères, qui engagent la voie p53, sont parmi les principaux processus responsables de la sénescence cellulaire dans la BPCO (Savale, Chaouat et al. 2009, Nouredine, Gary-Bobo et al. 2011, Adcock, Mumby et al. 2018). De plus, les travaux de l'équipe de David Bernard ont montré que PLA2R1 régulait la sénescence à travers la voie p53 (Augert, Payré et al. 2009). Des études antérieures du groupe de

David Bernard ont également montré que PLA2R1 activait la voie JAK2 et que cette activation médiait au moins une partie de l'effet pro-sénescence de PLA2R1 (Vindrieux, Augert et al. 2013). De plus, l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib de même que l'inactivation de PLA2R1, induisait un retard de l'entrée en sénescence et améliorait le vieillissement prématuré (Griveau, Wiel et al. 2020). Les résultats de notre étude vont dans le même sens, puisque les poumons des patients atteints de BPCO qui présentaient un fort marquage pour PLA2R1 présentaient également un fort marquage pour JAK2 et p-STAT3. Une augmentation de JAK/STAT a déjà été mesurée dans les poumons de patients atteints de BPCO, bien que son rôle n'ait pas été étudié (Yew-Booth, Birrell et al. 2015). Ici, nous avons constaté que les cellules transduites avec le gène PLA2R1 et subissant une sénescence devenaient positives pour p-JAK2 et p-STAT3. De plus, l'inhibition pharmacologique de JAK2 avec le ruxolitinib a complètement inversé l'induction de la sénescence cellulaire induite par la transduction *in vitro* de PLA2R1. Ces résultats indiquent qu'un mécanisme majeur responsable de l'activation de JAK/STAT dans la BPCO est lié au processus de sénescence cellulaire induit par PLA2R1. Nos résultats confirment l'effet majeur de la voie JAK/STAT dans la promotion du SASP dans les cellules sénescences. Le traitement au ruxolitinib a retardé l'entrée en sénescence cellulaire des cellules de patients BPCO. Nos résultats indiquent donc que la voie JAK2 est le médiateur d'une partie des effets pro-sénescence de PLA2R1 dans la BPCO, avec une atténuation importante du SASP. Cependant, il est probable que les effets de PLA2R1 ne soient pas tous médiés par la voie JAK/STAT et que certains des effets de l'inhibition de JAK/STAT sur la sénescence cellulaire peuvent reposer sur des mécanismes autres que l'activation de PLA2R1.

Pour évaluer si la sénescence cellulaire induite par PLA2R1 joue un rôle causal dans la BPCO, les souris surexprimant PLA2R1 ont été générées. Ces souris ont développé des altérations pulmonaires majeures, un emphysème et des lésions fibrotiques à un jeune âge, concomitamment avec l'accumulation de cellules pulmonaires sénescences, une augmentation de l'expression des gènes cibles de JAK/ STAT, et une augmentation de l'expression des membres du SASP.

Chez les jeunes souris, l'activation de la voie PLA2R1 est suffisante pour entraîner la sénescence cellulaire et le développement concomitant de l'emphysème pulmonaire et de la fibrose. Les mécanismes qui peuvent favoriser le développement de l'emphysème pulmonaire, de la fibrose pulmonaire ou des deux, en réponse à la sénescence cellulaire, ne sont pas encore élucidés, bien qu'il soit probable que différents types de cellules sénescences soient à l'origine de ces différents phénotypes. Dans cette optique, nous avons constaté que les souris auxquelles on a injecté par voie intratrachéale un vecteur lentiviral codant pour le gène PLA2R1 (LV-PLA2R1) ont rapidement développé un emphysème pulmonaire sévère, mais sans développement de fibrose pulmonaire.

Dans le modèle de souris PLA2R1-TG, un traitement de courte durée par le ruxolitinib a permis de réduire de manière significative les lésions de fibrose et d'emphysème pulmonaires, les niveaux de p16 dans les poumons, les membres du SASP et l'expression des gènes en aval de JAK/STAT. De plus, chez les souris auxquelles on a injecté par voie intratrachéale le vecteur LV-PLA2R1, le traitement par le ruxolitinib, commencé au moment de l'administration lentivirale a empêché l'induction de la sénescence dans les cellules pulmonaires et le développement de l'emphysème pulmonaire. Ces résultats sont cohérents avec un effet inhibiteur du ruxolitinib sur la sénescence des cellules pulmonaires induite par PLA2R1, soit par un effet direct, soit par un effet médié par l'inhibition du SASP.

Conclusion étude 1 :

Les résultats de cette première étude ont confirmé le rôle de la sénescence cellulaire induite par l'activation de PLA2R1 dans la BPCO et soutiennent l'idée que le ciblage de la voie PLA2R1-JAK2 représente une option thérapeutique pour inhiber la sénescence cellulaire ou éliminer le SASP chez les patients atteints de BPCO. Contrairement aux interventions ciblant les principales voies de sénescence telles que la voie p53, le fait de cibler PLA2R1 et/ou la voie JAK ne devrait pas avoir d'impact radical sur le développement tumoral. Les agents anti-JAK sont actuellement utilisés dans le traitement du cancer. On a récemment découvert qu'ils reprogramment le SASP dans les cellules tumorales sénescents, ce qui contribue à améliorer leur effet antitumoral. Cette première étude ne permet pas de tirer des conclusions définitives sur le mécanisme d'action du ruxolitinib et d'autres études sont nécessaires pour évaluer les effets protecteurs potentiels de ce médicament sur les altérations pulmonaires. Cependant ces résultats montrent que cibler la voie PLA2R1 et/ou la voie JAK/STAT peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour inhiber la sénescence cellulaire dans la BPCO.



Phospholipase A2 receptor 1 promotes lung cell senescence and emphysema in obstructive lung disease

Delphine Beaulieu^{1,6}, Aya Attwe^{1,2,6}, Marielle Breau¹, Larissa Lipskaia¹, Elisabeth Marcos¹, Emmanuelle Born¹, Jin Huang¹, Shariq Abid¹, Geneviève Derumeaux¹, Amal Houssaini¹, Bernard Maitre¹, Marine Lefevre³, Nora Vienney¹, Philippe Bertolino⁴, Sara Jaber⁴, Hiba Noureddine², Delphine Goehrig⁴, David Vindrieux⁴, David Bernard^{4,7} and Serge Adnot^{1,5,7}

¹INSERM U955, Département de Physiologie-Explorations Fonctionnelles and DHU A-TVH Hôpital Henri Mondor, AP-HP, Créteil, France. ²Environmental Health Research Laboratory (EHRL), Faculty of Sciences V, Lebanese University, Nabatieh, Lebanon. ³Département Anatomopathologie, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France. ⁴Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR INSERM U1052/CNRS 5286, Université de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon, France. ⁵Institute for Lung Health, University of Giessen, Giessen, Germany. ⁶These two authors contributed equally. ⁷These two authors are joint senior authors.

Corresponding author: Serge Adnot (serge.adnot@inserm.fr)



Shareable abstract (@ERSpublications)

PLA2R1 is a potent regulator of lung cell senescence in COPD, with JAK/STAT signalling as a major effector. Inhibition of JAK1/2 attenuates PLA2R1-induced lung alterations in murine models and so may represent a promising therapeutic approach for COPD. <http://bit.ly/3i7y13H>

Cite this article as: Beaulieu D, Attwe A, Breau M, *et al.* Phospholipase A2 receptor 1 promotes lung cell senescence and emphysema in obstructive lung disease. *Eur Respir J* 2021; 58: 2000752 [DOI: 10.1183/13993003.00752-2020].

Copyright ©The authors 2021. For reproduction rights and permissions contact permissions@ersnet.org

This article has supplementary material available from erj.ersjournals.com

Received: 18 March 2020
Accepted: 28 Dec 2020

Abstract

Background Cell senescence is a key process in age-associated dysfunction and diseases, notably chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We previously identified phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1) as a positive regulator of cell senescence acting via Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling. Its role in pathology, however, remains unknown. Here, we assessed PLA2R1-induced senescence in COPD and lung emphysema pathogenesis.

Methods We assessed cell senescence in lungs and cultured lung cells from patients with COPD and controls subjected to *PLA2R1* knockdown, *PLA2R1* gene transduction and treatment with the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib. To assess whether *PLA2R1* upregulation caused lung lesions, we developed transgenic mice overexpressing *PLA2R1* (*PLA2R1*-TG) and intratracheally injected wild-type mice with a lentiviral vector carrying the *Pla2r1* gene (LV-*PLA2R1* mice).

Results We found that *PLA2R1* was overexpressed in various cell types exhibiting senescence characteristics in COPD lungs. *PLA2R1* knockdown extended the population doubling capacity of these cells and inhibited their pro-inflammatory senescence-associated secretory phenotype (SASP). *PLA2R1*-mediated cell senescence in COPD was largely reversed by treatment with the potent JAK1/2 inhibitor ruxolitinib. Five-month-old *PLA2R1*-TG mice exhibited lung cell senescence, and developed lung emphysema and lung fibrosis together with pulmonary hypertension. Treatment with ruxolitinib induced reversal of lung emphysema and fibrosis. LV-*PLA2R1*-treated mice developed lung emphysema within 4 weeks and this was markedly attenuated by concomitant ruxolitinib treatment.

Conclusions Our data support a major role for *PLA2R1* activation in driving lung cell senescence and lung alterations in COPD. Targeting JAK1/2 may represent a promising therapeutic approach for COPD.

Introduction

Exaggerated lung cell senescence is now emerging as a key pathogenic factor in several chronic respiratory diseases [1], notably chronic obstructive pulmonary disease (COPD), a major cause of morbidity and mortality in most countries for which no curative treatment is available [2–4]. COPD is characterised by slowly progressive airflow obstruction and emphysema due to lung parenchyma destruction developing in association with chronic lung inflammation [5]. We previously reported that a characteristic feature of COPD is the accumulation of senescent cells in the lung, which limits the potential for tissue renewal and

contributes to chronic inflammation through the senescence-associated secretory phenotype (SASP) [4, 6, 7]. In COPD, exaggerated lung cell senescence may result from a combination of replicative cell senescence due to telomere shortening and of premature cell senescence caused by various stress stimuli, such as oxidative stress and inflammatory mediators [8–10]. These processes engage a DNA damage response with p53-dependent upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and expression of p16^{INK4A} [10, 11].

A causal relationship between cell senescence and the lung manifestations of COPD is now supported by several studies. Some cases of familial lung emphysema are related to a loss-of-function mutation in the telomerase *TERT* gene and are therefore classified as telomere disorders [12]. Moreover, individuals with short telomeres experience an accelerated decline in lung function [13]. In mouse models, interventions that delay or inhibit cell senescence protect against cigarette smoke-induced lung emphysema, bronchial remodelling and inflammation [14, 15], whereas accelerated lung cell senescence promotes some of the lung alterations seen in COPD [7]. Consequently, there is an urgent need to identify molecular pathways that are relevant to the lung cell senescence programme in COPD and that could be targeted pharmacologically.

In previous studies, we identified phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1) as a crucial regulator of both replicative- and stress-induced cell senescence [16]. PLA2R1, a transmembrane protein belonging to the C-type lectin receptor superfamily and the mannose receptor family, binds a few secreted phospholipase A2s (sPLA2s), various collagen types and carbohydrate [17]. Recent studies by our groups indicate that an important function of PLA2R1 is related to its pro-senescent effect, which seems to be sPLA2 independent [18] and involves the Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling pathway [19–23].

Here, we explored the potential importance of PLA2R1 and JAK/STAT signalling in lung cell senescence and COPD. We observed that PLA2R1 overexpression was a major mechanism leading to lung cell senescence in COPD, and that lung PLA2R1 overexpression in mice induced lung cell senescence and lung alterations, including lung emphysema, lung fibrosis and pulmonary hypertension. Treatment with the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib delayed the senescence process in cells from patients with COPD, inhibited the SASP and attenuated the pathological lung alterations resulting from PLA2R1 overexpression in mice. Targeting PLA2R1 and/or the JAK/STAT pathway may represent a new therapeutic strategy for inhibiting lung cell senescence in COPD.

Methods

Patients and controls

Lung tissue samples were obtained from 46 patients who underwent lung resection surgery at the Institut Mutualiste Montsouris (Paris, France). Among them, 23 had COPD and 23 were control smokers matched to the COPD patients on age and sex (supplementary table S1). Inclusion criteria for the patients with COPD were ≥ 10 pack-years smoking history and forced expiratory volume in 1 s (FEV₁)/forced vital capacity (FVC) <70%. The controls had to have a smoking history >5 pack-years, FEV₁/FVC >70% and no evidence of chronic cardiovascular, hepatic or renal disease.

The study was approved by the Institutional Review Board of the Henri Mondor Teaching Hospital (Créteil, France). All patients and controls signed an informed consent document before study inclusion.

Animal studies

Adult male mice (C57BL/6J) were used according to institutional guidelines, which complied with national and international regulations (agreement 94-28245). Pulmonary arterial hypertension, lung emphysema and lung tissue analyses were performed according to the standard techniques detailed in the supplementary material.

The supplementary material provides details of the studies performed on lung samples and cultured cells from patients and controls, on animal studies, and on the statistical analysis.

Results

PLA2R1 is overexpressed in lungs and derived cultured cells from patients with COPD

To investigate PLA2R1 expression and lung cell senescence in COPD, we studied lung tissues from 23 patients with COPD and 23 controls, as well as derived lung cells from a subset of eight patients and 10 controls (supplementary tables S1 and S2). Compared with control lungs, lungs from patients with COPD had higher protein levels of PLA2R1, p21 and p16 (figure 1a). Immunofluorescence studies of

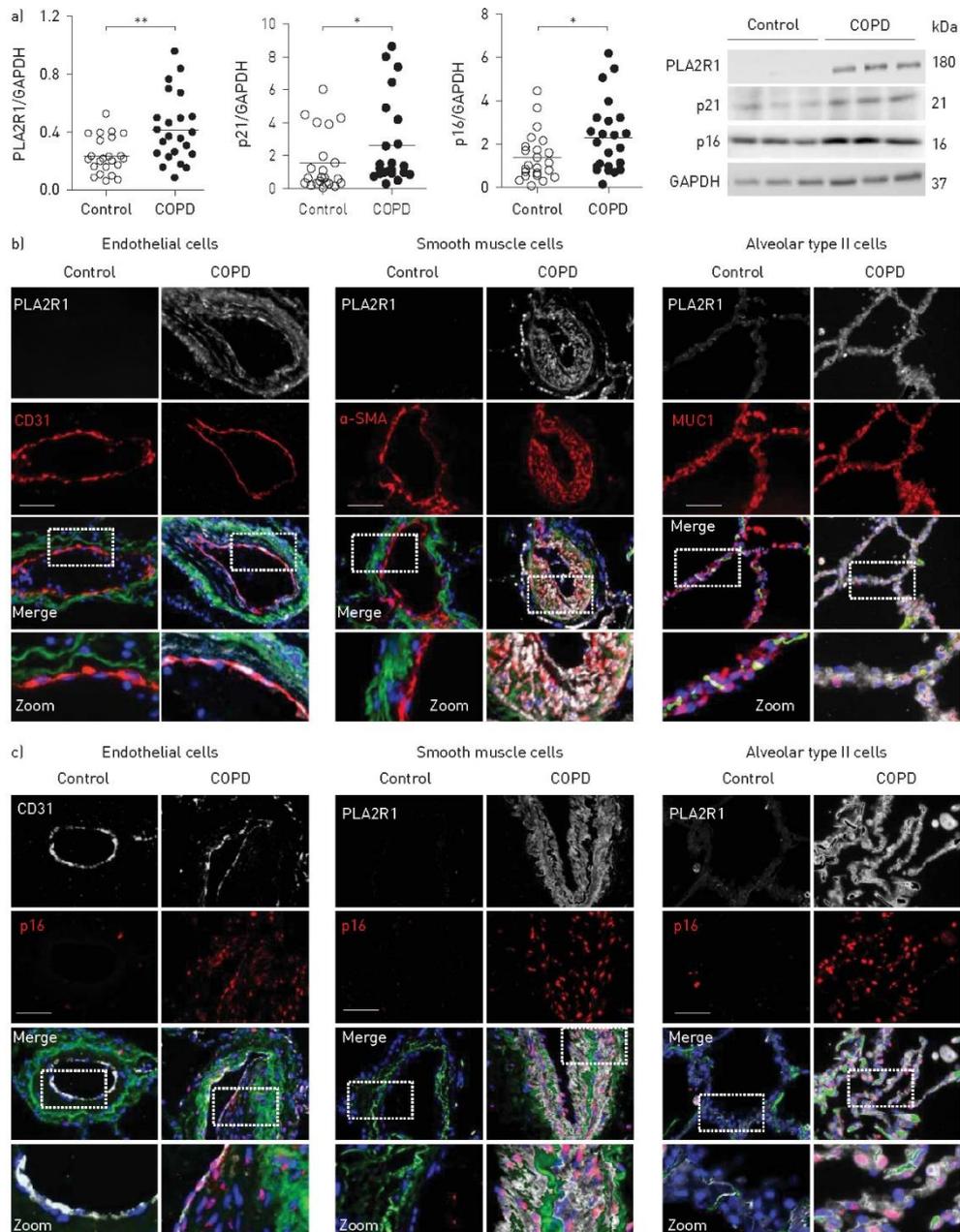


FIGURE 1 Analysis of lung samples from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and controls. PLA2R1: phospholipase A2 receptor 1; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; SMA: smooth muscle actin; MUC1: mucin 1. a) Protein levels of PLA2R1, p21 and p16 measured in the lungs of 23 patients with COPD and 23 controls. Representative immunoblots are shown on the right. Data are presented as

<https://doi.org/10.1183/13993003.00752-2020>

3

individual values with the mean. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ versus control. Two-tailed unpaired t-test. b) From left to right, representative micrographs of lung tissue from controls and patients with COPD showing immunofluorescence of PLA2R1 (white) in pulmonary vascular endothelial cells identified by CD31 (red), pulmonary artery smooth muscle cells identified by α -SMA (red) and alveolar epithelial type II cells identified by MUC1 (red). Elastin autofluorescence (green). Nuclei were labelled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue). c) Representative micrographs of PLA2R1-positive vascular cells and alveolar epithelial type II cells also stained for p16. The zoomed areas are indicated. Scale bar: 50 μ m.

lungs from patients with COPD revealed prominent PLA2R1 staining in pulmonary vascular endothelial cells (P-ECs), pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) and alveolar epithelial type II cells (AECs), all of which also stained for p16 (figure 1b and c, and supplementary figure S1) and for the DNA damage markers 53BP1 and phosphorylated (p)- γ H2AX (figure 2a and b). In contrast, PLA2R1 immunofluorescence was weak in lungs from controls. PLA2R1 mRNA levels were also higher in cultured PA-SMCs and P-ECs from patients with COPD, which exhibited early-onset cell senescence manifesting as fewer population doublings and higher β -galactosidase-positive cell counts compared with those from controls (figure 3a and b). PLA2R1 mRNA levels increased in both PA-SMCs and P-ECs from patients and controls during repeated passages (figure 3a and b).

Downregulation of PLA2R1 inhibits cell senescence in COPD

To investigate the effect of PLA2R1 knockdown on cellular senescence in COPD, we infected cultured PA-SMCs with a retroviral vector encoding a short hairpin RNA that targeted PLA2R1 (shPLA2R1) [16]. PLA2R1 mRNA levels were decreased by ~80% in cells stably infected with the shPLA2R1-encoding vector compared with cells infected with the control vector (supplementary figure S2). PLA2R1 knockdown consistently decreased the number of β -galactosidase-positive cells and increased the population doubling to a greater extent in cells from patients with COPD (9-fold increase) than in those from controls (2-fold increase) (figure 4a and b). In addition, p16 and p21 protein levels were decreased in cells from both patients with COPD and controls (figure 4c). PLA2R1 knockdown reduced the levels of the SASP components tested, notably in cells from patients with COPD, which released large amounts of interleukin (IL)-8, IL-6 and plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 (figure 4d).

To better assess the effect of PLA2R1 knockdown on cell senescence in COPD, we then compared the effects of PLA2R1 versus p53 knockdown in PA-SMCs from a subset of five patients and five controls. Compared with cells infected with the vector encoding shPLA2R1, cells infected with the shp53 vector exhibited a similar population doubling increase and a similar decrease in the percentage of β -galactosidase-positive cells (supplementary figure S3a). The levels of p16 and p21 proteins and of SASP components were reduced to a similar extent by both vectors (supplementary figure S3b and c).

JAK inhibition by ruxolitinib reverts PLA2R1-induced cell senescence

To explore the potential role for JAK1/2 on PLA2R1-induced cell senescence in primary lung cell cultures, we examined the effect of ectopic PLA2R1 expression on cell senescence by using a retroviral vector encoding the PLA2R1 gene [19]. PA-SMCs from controls with <55% β -galactosidase-positive cells were used. Immunofluorescence studies revealed that cells transduced with the retroviral vector and positive for PLA2R1 stained also for p-JAK2 and p-STAT3 (figure 5a). These cells became rapidly senescent, as shown by strong p16 immunofluorescence and β -galactosidase staining activity and an inability to divide, with a low population doubling and weak proliferating cell nuclear antigen (PCNA) staining (figure 5b and c). Cells infected with the control vector were not stained for p-JAK2 and p-STAT3 (figure 5a). We then investigated whether inhibition of JAK2 by the potent JAK1/2 inhibitor ruxolitinib altered PLA2R1-induced cell senescence. In cells undergoing cell senescence induced by PLA2R1 gene transduction, ruxolitinib treatment almost fully inhibited the response, increasing the population doubling, decreasing the percentage of β -galactosidase-positive cells, and returning the levels of p16 and PCNA staining and of the SASP components IL-8, IL-6 and PAI-1 to basal values (figure 5b-d).

Treatment with ruxolitinib attenuates cell senescence and suppresses the SASP in cells from patients with COPD

We then investigated the link between PLA2R1 expression, cell senescence and JAK/STAT in lungs and cells from patients with COPD. Immunofluorescence studies revealed strong PLA2R1 and JAK2 staining that co-localised in various cell types from COPD lungs, contrasting with weak JAK2 staining in control lungs (figure 6a). Strong immunostaining for p-STAT3 was also found in lungs from patients with COPD (figure 6b). JAK1 staining was undetectable. Ruxolitinib treatment of PA-SMCs from patients with COPD and controls increased the population doubling and decreased the percentage of β -galactosidase-positive cells, although these

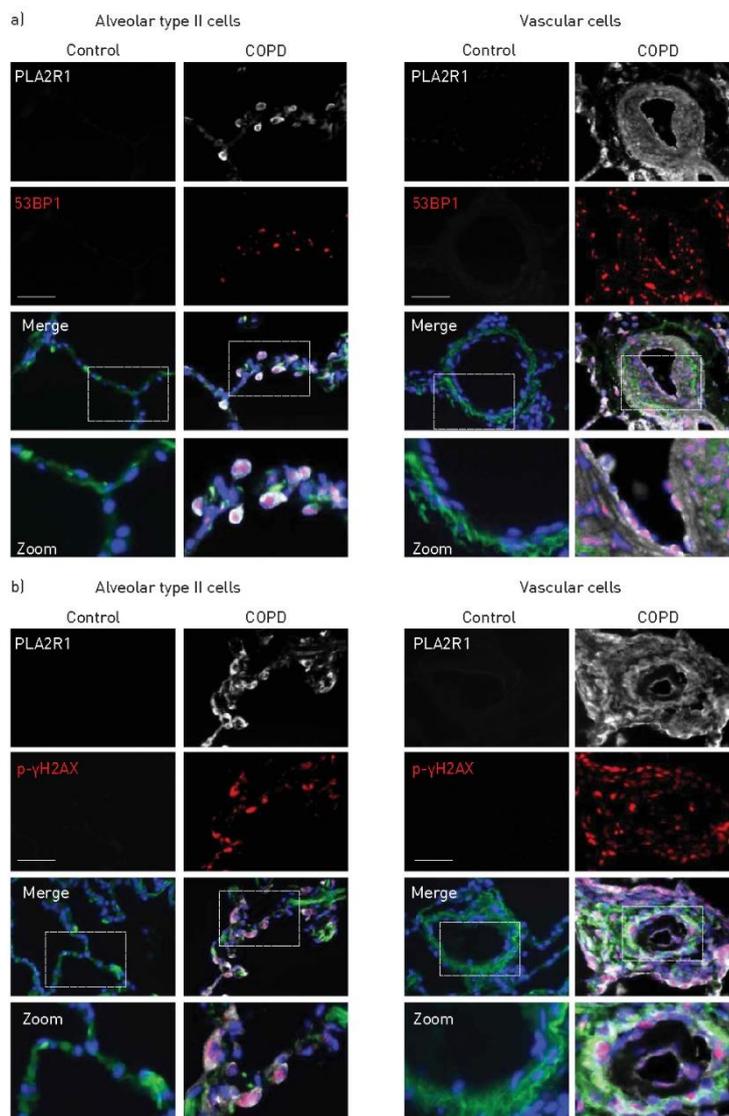


FIGURE 2 Co-localisation of phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1) and DNA damage markers (53BP1 and phosphorylated (p)- γ H2AX) in lung samples from controls and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). a) Representative micrographs of PLA2R1-positive alveolar epithelial type II cells and vascular cells also stained for 53BP1 (red). b) Similar representation showing PLA2R1-positive cells also stained for p- γ H2AX (red). Nuclei were labelled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue). The zoomed areas are indicated. Scale bar: 50 μ m.

effects were weaker than those produced by *PLA2R1* knockdown (figure 6c). Strikingly, ruxolitinib potently suppressed the SASP of senescent cells from patients with COPD, as shown by decreases in the release of IL-8, IL-6 and PAI-1, which returned to the basal levels measured in cells from controls (figure 6d).

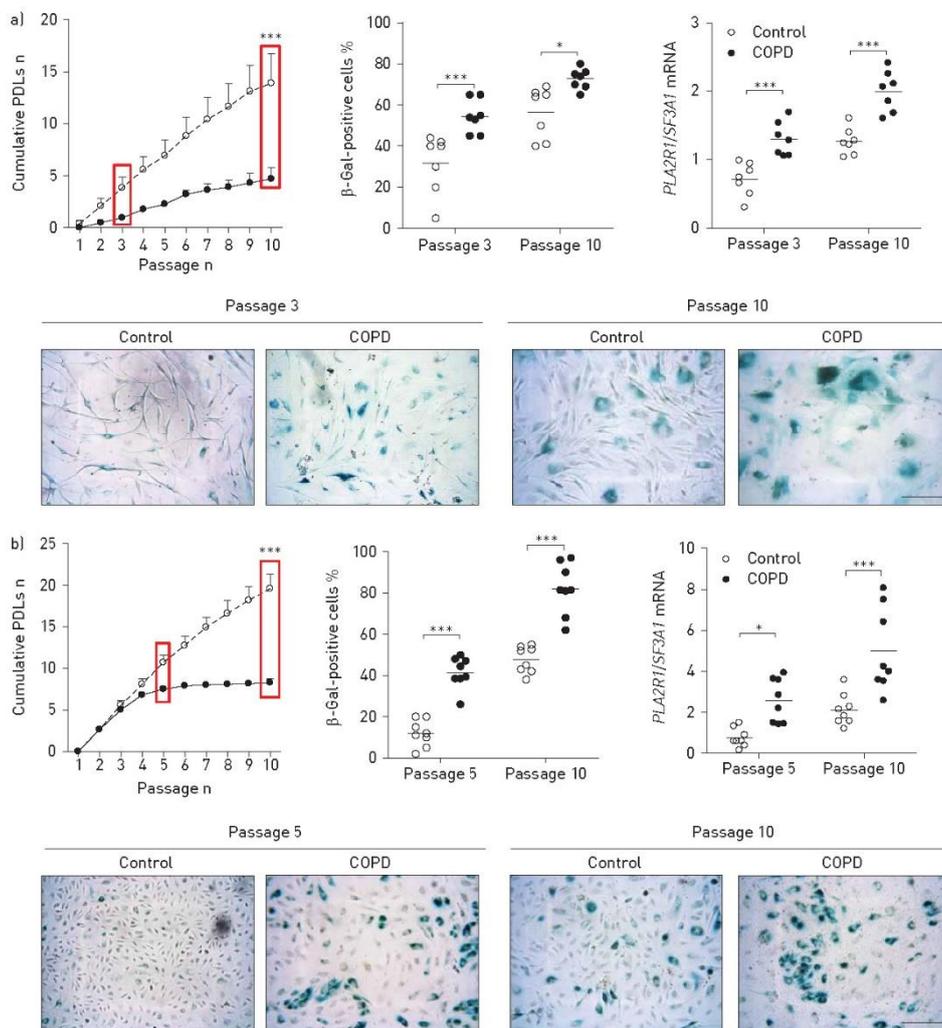


FIGURE 3 Analysis of primary pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) and pulmonary vascular endothelial cells (P-ECs) isolated from pulmonary arteries of controls and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). PDL: population doubling; β -Gal: β -galactosidase. From left to right, graphs show cumulative PDLs, percentage of β -Gal-positive cells and *PLA2R1* mRNA levels shown at the corresponding cell passage in cultured a) PA-SMCs (n=7 in each group) and b) P-ECs (n=8 in each group) from patients with COPD and controls. Data are presented as mean \pm SEM or individual values with the mean. *: p<0.05; ***: p<0.001 versus control cells. Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. Representative micrographs of cultured β -Gal-stained a) PA-SMCs and b) P-ECs at the indicated cell passages (red boxes) are shown below the graphs. Scale bar: 100 μ m.

***PLA2R1* overexpression in transgenic mice induces lung cell senescence and structural lung alterations, which can be reversed by ruxolitinib**

To assess whether lung overexpression of *PLA2R1* replicated some of the lung alterations seen in COPD, we generated transgenic mice that constitutively expressed the human *PLA2R1* gene (*PLA2R1*-TG mice).

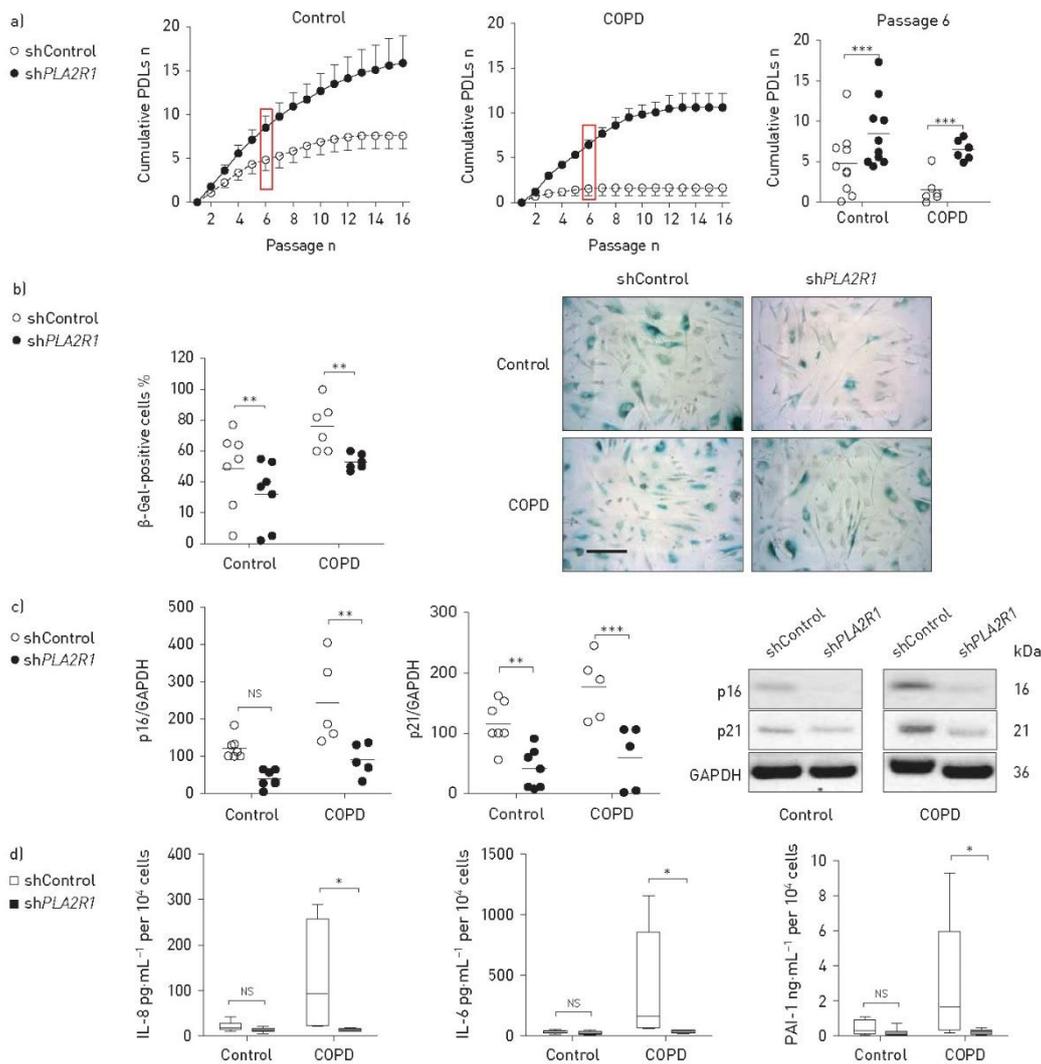


FIGURE 4 Effect of *PLA2R1* knockdown on senescence of pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) from controls and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). sh: small hairpin; PDL: population doubling; β -Gal: β -galactosidase; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; IL: interleukin; PAI: plasminogen activator inhibitor. Cells were infected with a retroviral vector encoding a shRNA that targeted *PLA2R1* (sh*PLA2R1*) or with a control vector (shControl) and then subjected to successive cell passages. **a)** Graphs showing mean \pm SEM of PDLs at successive cell passages of PA-SMCs from n=10 controls (left) and n=6 COPD patients (middle). PDLs at passage 6 are shown as individual values with the mean (right). **b)** Graph showing the percentage of β -Gal-positive cells at passage 6, with representative micrographs of cells stained for β -Gal. Scale bar: 100 μ m. **c)** Graphs showing the cell protein levels of p16 and p21 with representative immunoblots in PA-SMCs from n=7 controls and n=5 COPD patients at passage 6. Data are presented as individual values with the mean. NS: nonsignificant; **: p<0.01; ***: p<0.001. Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. **d)** Protein levels of IL-8, IL-6 and PAI-1 in PA-SMC-conditioned media at passage 6. Box plots show median (interquartile range) of n=5 (COPD patients) and n=10 (controls) values per group. Whiskers represent extreme values. NS: nonsignificant; *: p<0.05. Kruskal-Wallis and Dunn tests.

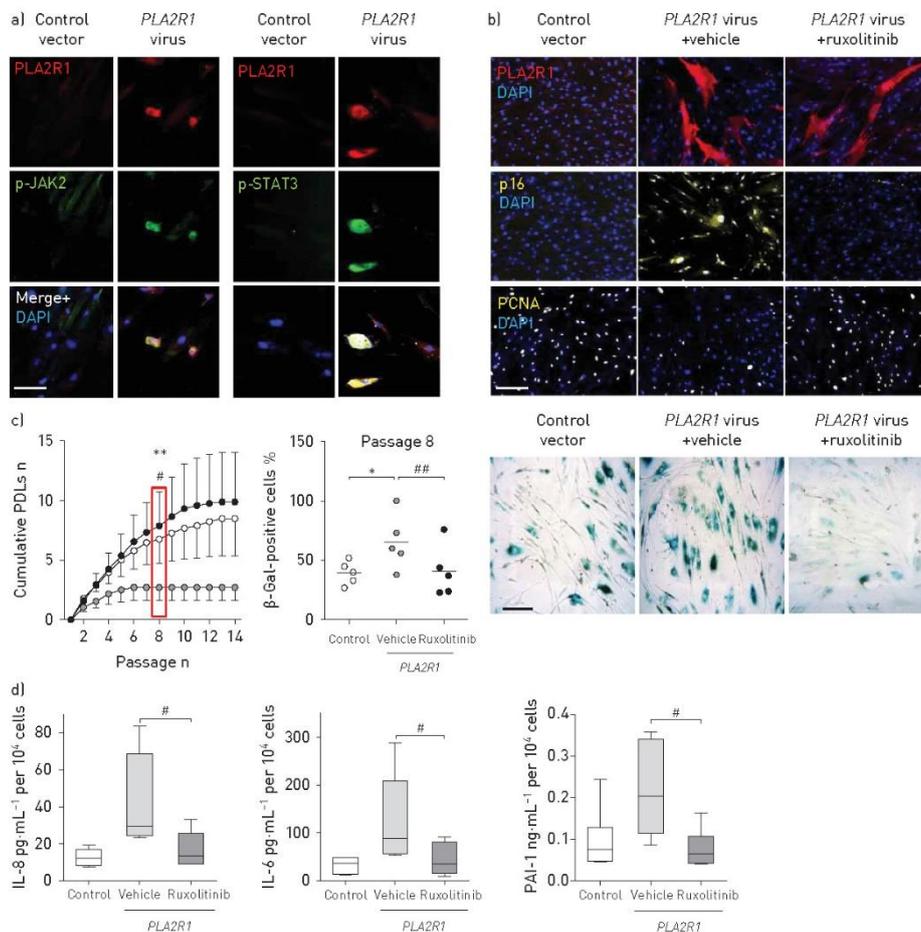


FIGURE 5 Effect of ectopic *PLA2R1* expression on senescence of pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) treated with the Janus kinase (JAK) 1/2 inhibitor ruxolitinib or its vehicle. p: phosphorylated; STAT: signal transducer and activator of transcription; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; PDL: population doubling; β -Gal: β -galactosidase; IL: interleukin; PAI: plasminogen activator inhibitor. PA-SMCs were infected with a retrovirus encoding the human *PLA2R1* gene (*PLA2R1* virus) or with a control vector and then subjected to successive passages in the presence of ruxolitinib (0.5 μ M) or its vehicle. **a**) Representative micrographs of cells co-stained for *PLA2R1* (red) and for p-JAK2 or p-STAT3 (green). Scale bar: 50 μ m. **b**) Cells stained for *PLA2R1* (red) were positive for p16 and negative for PCNA (yellow) when treated with the vehicle but not when treated with ruxolitinib. Scale bar: 200 μ m. **c**) Graph showing mean \pm SEM of cumulative PDLs of cells infected with the control vector or with the *PLA2R1* virus and treated with vehicle or ruxolitinib (0.5 μ M); n=5 in each group (left). Graph showing the percentage of β -Gal-positive cells at passage 8 (middle), with representative micrographs of cells stained for β -Gal (right). Data are presented as individual values with the mean. Scale bar: 100 μ m. #: p<0.05; ##: p<0.01 comparison values from vehicle versus ruxolitinib; *: p<0.05; **: p<0.01 comparison values from control vector versus *PLA2R1* virus. One-tailed paired t-test. **d**) Protein levels of IL-8, IL-6 and PAI-1 in conditioned media from the indicated cultures at passage 8. Box plots show median (interquartile range) of n=5 values per group. Whiskers represent extreme values. #: p<0.05. Kruskal-Wallis followed by Wilcoxon's test.

Five-month-old *PLA2R1*-TG mice displayed an apparently normal phenotype but overexpressed lung human *PLA2R1* and p16 protein compared with control mice (figure 7a). Lungs from *PLA2R1*-TG mice exhibited strong *PLA2R1* and p16 immunofluorescence (figure 7a) with increased lung mRNA levels of the JAK/STAT target genes *Tap1*, *Socs1* and *Irf7* (figure 7b). These changes were associated with diffuse

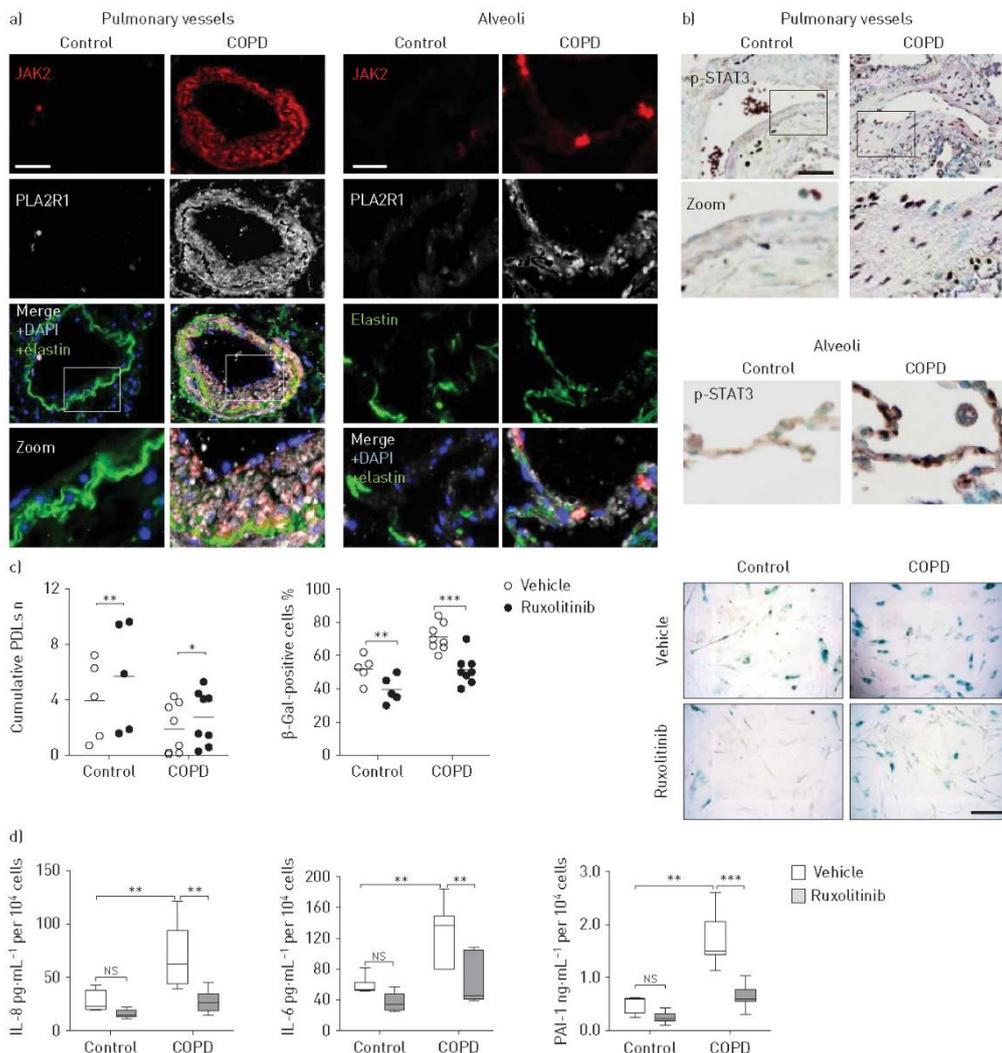


FIGURE 6 Effects of treatment with ruxolitinib on senescence of cultured pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) from controls and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). JAK: Janus kinase; PLA2R1: phospholipase A2 receptor 1; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; p: phosphorylated; STAT: signal transducer and activator of transcription; PDL: population doubling; β-Gal: β-galactosidase; IL: interleukin; PAI: plasminogen activator inhibitor. **a)** Representative micrographs of lung tissue from controls and patients with COPD showing immunofluorescence of JAK2 (red) and PLA2R1 (white) in pulmonary vessels and alveoli. Elastin autofluorescence (green). Nuclei were labelled with DAPI (blue). The zoomed areas are indicated. Scale bars: 50 μm (left) and 25 μm (right). **b)** Representative micrographs showing p-STAT3-positive cells (brown) in vessels and alveoli. Scale bar: 50 μm. **c)** Effect of continuous ruxolitinib treatment on senescence of PA-SMCs from patients with COPD (n=8) and controls (n=5) as assessed by the number of PDLs and the percentage of β-Gal-positive cells at passage 6. Data are presented as individual values with the mean. Typical cells stained for β-Gal are shown on the right. Scale bar: 100 μm. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. **d)** Protein levels of IL-8, IL-6, and PAI-1 in conditioned media of cells from controls and patients with COPD treated with ruxolitinib or its vehicle. Box plots show median (interquartile range) of n=5 values per group. Whiskers represent extreme values. ns: nonsignificant; **: p<0.01; ***: p<0.001 versus control. Two-tailed Mann-Whitney test.

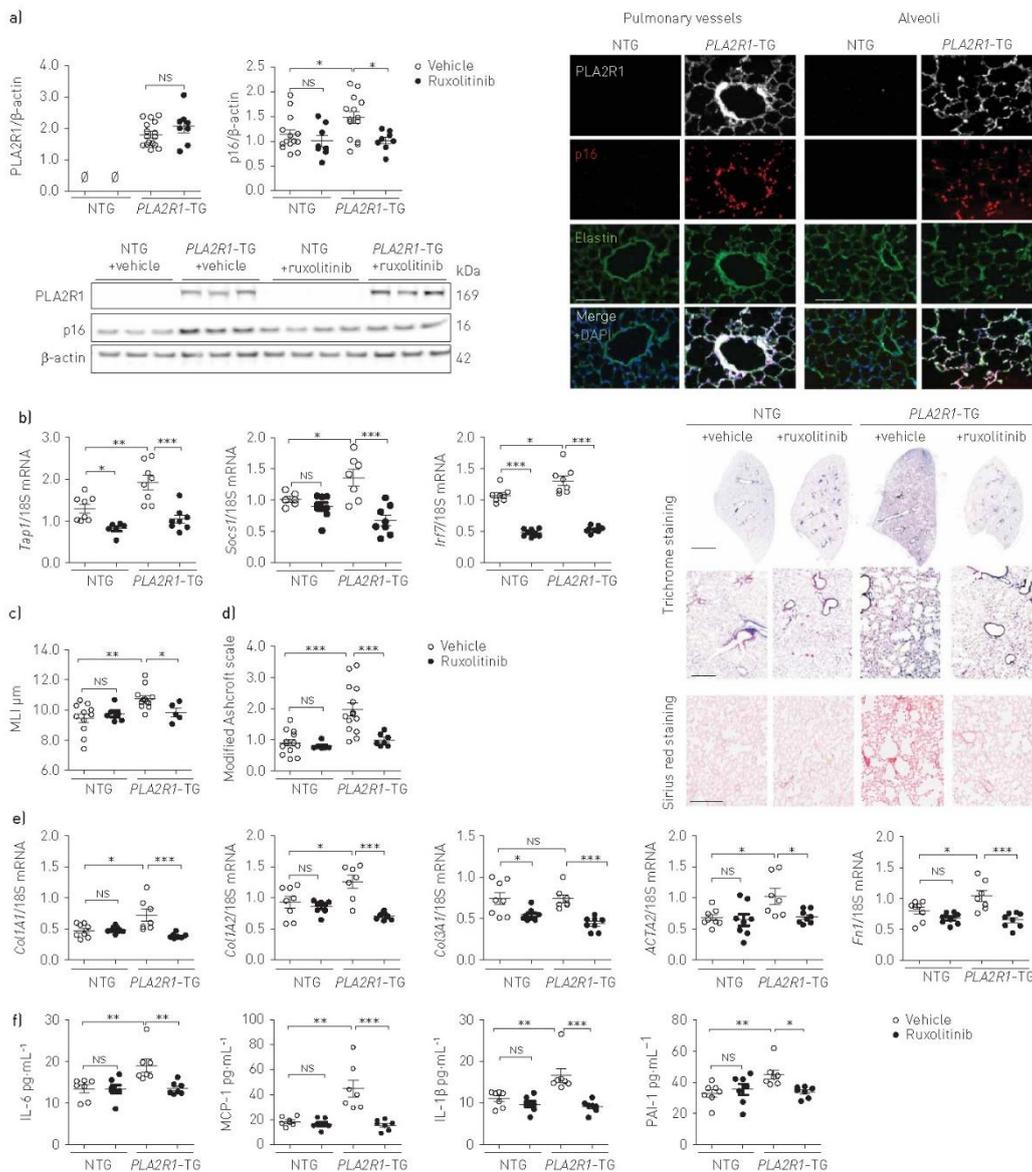


FIGURE 7 Lung characteristics of transgenic mice constitutively expressing the human phospholipase A2 receptor 1 gene (*PLA2R1-TG*) and their nontransgenic (NTG) littermates subjected to 15 days of ruxolitinib treatment. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; MLI: mean linear intercept; IL: interleukin; MCP: monocyte chemoattractant protein; PAI: plasminogen activator inhibitor. **a)** Lung protein levels of PLA2R1 and p16 in *PLA2R1-TG* (n=16) and NTG (n=15) mice treated with ruxolitinib ($75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) or its vehicle, with their representative immunoblots below. Representative micrographs of lung tissue from *PLA2R1-TG* and NTG showing co-localisation of PLA2R1 (white) and p16 (red) in pulmonary vessels and alveoli shown on the right. Scale bar: 50 μm. **b)** Lung mRNA levels of the Janus kinase 2 signalling target genes *Tap1*, *Socs1* and *Ifi7* in each condition. **c)** Lung emphysema as assessed by measurement of the MLI and **d)** lung fibrosis as assessed by the modified Ashcroft score. Representative

images of lungs from the four groups of mice stained with Masson's trichrome (top and middle panels, in blue; scale bars: 2 and 0.5 mm, respectively) and Sirius red (bottom panel, in red; scale bar: 0.2 mm). e) Lung mRNA levels of collagen 1A1, collagen 1A2, collagen 3A1, actin $\alpha 2$ and fibronectin. f) Lung protein levels of IL-6, MCP-1, IL-1 β and PAI-1. Data are presented as individual values with the mean. ns: nonsignificant; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test.

lung emphysema, as quantified by the mean distance separating alveolar septa (mean linear intercept) (figure 7c), and with fibrotic lung lesions, as quantified by the Ashcroft score of Sirius red-stained lung sections (figure 7d) and by lung mRNA levels of collagen 1A1, collagen 1A2, collagen 3A1, actin- $\alpha 2$ and

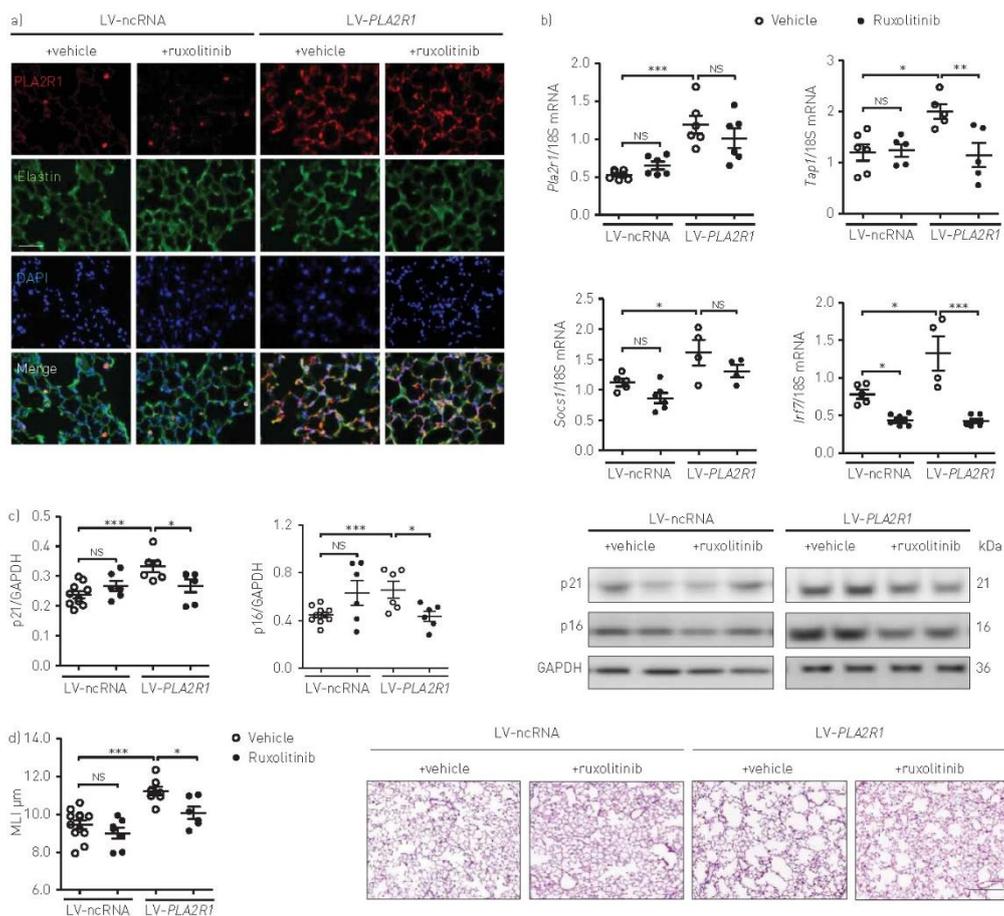


FIGURE 8 Lung characteristics of mice subjected to intratracheal injection of a lentivirus encoding the murine *Pla2r1* gene (LV-PLA2R1) and concomitantly treated with ruxolitinib. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; MLI: mean linear intercept. Mice treated with LV-PLA2R1 or a noncoding control vector (LV-ncRNA) and simultaneously treated with ruxolitinib ($75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) or vehicle were studied 30 days after the injection. **a)** Representative micrographs showing PLA2R1 immunofluorescence (red) in mouse lung sections. Scale bar: 50 μm . **b)** Lung mRNA levels of *Pla2r1* and of the Janus kinase 2 signalling target genes *Tsp1*, *Socs1* and *Irf7*. **c)** Lung protein levels of p21 and p16 with representative immunoblots in the indicated groups. **d)** Lung emphysema as assessed by measurement of the MLI in haematoxylin and eosin-stained lung sections. Scale bar: 200 μm . Data are presented as individual values with the mean. ns: nonsignificant; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. t-test; two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test.

fibronectin (figure 7e). Lung fibrosis in *PLA2R1*-TG mice was also illustrated by increases in Masson trichrome staining (figure 7d) and in vimentin and fibroblast-specific protein immunostaining (supplementary figure S4a and b). *PLA2R1*-TG mice also developed pulmonary hypertension, with increases in right ventricular systolic pressure, right heart hypertrophy and pulmonary vessel muscularisation (supplementary figure S5). Other abnormalities consisted of increased lung levels of IL-6, monocyte chemoattractant protein-1, IL-1 β and PAI-1 in lungs from *PLA2R1*-TG mice but not in control mice (figure 7f). We then investigated the effect of ruxolitinib treatment at a dose of 75 mg·kg⁻¹·day⁻¹ for 15 consecutive days. This short-term ruxolitinib treatment reduced lung emphysema and fibrosis parameters, inducing marked reductions in lung p16 protein, JAK/STAT target genes and SASP members (figure 7a–f).

Ruxolitinib treatment prevents lung cell senescence and lung alterations induced by intratracheal delivery of the *PLA2R1* gene

To further investigate the effect of ruxolitinib on lung alterations induced by *PLA2R1* overexpression, we studied mice injected intratracheally with a lentiviral vector encoding the murine *Pla2r1* gene (*LV-PLA2R1*) and given concomitant continuous ruxolitinib treatment (75 mg·kg⁻¹·day⁻¹). Preparatory experiments performed with a lentiviral vector encoding the reporter *mCherry* gene under the control of the cytomegalovirus promoter (*LV-mCherry*) revealed that ~15% of lung cells were transduced by this procedure, including alveolar epithelial cells (supplementary figure S6). Gene transfer was efficient, as shown by diffuse *PLA2R1* staining activity throughout the lung structures 4 weeks after *LV-PLA2R1* injection (figure 8a). At this time, the mice exhibited marked increases in lung mRNA levels of *Pla2r1*, *p21* and the JAK/STAT target genes *Tap1*, *Socs1* and *Irf7* (figure 8b and supplementary figure S7a), as well as in lung p21 and p16 protein levels, compared with mice injected with the noncoding control vector (*LV-ncRNA*) (figure 8c). Most importantly, *LV-PLA2R1* mice developed lung emphysema (figure 8d), increases in right ventricular systolic pressure and hypertrophy index, and pulmonary vessel remodelling (supplementary figure S7b–d). Ruxolitinib treatment started at the time of *LV-PLA2R1* administration markedly reduced the development of lung emphysema and pulmonary vascular remodelling (figure 8d and supplementary figure S7b–d), while also decreasing JAK/STAT downstream genes and p21 mRNA levels (figure 8b and supplementary figure S7a) and p21 and p16 protein levels (figure 8c). No consistent changes were seen in lung cytokine levels 4 weeks after *LV-PLA2R1* injection.

Discussion

Our data support a major role for *PLA2R1* activation in driving lung cell senescence and lung alterations in COPD. Here, we showed that *PLA2R1* overexpression was strongly involved in the exaggerated lung cell senescence seen in COPD, and that *PLA2R1* overexpression in mice induced lung cell senescence and pathology. JAK2 activation emerged as an important downstream event to *PLA2R1* signalling, notably as a SASP activator. The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib delayed the senescence process, inhibiting the SASP in cells from patients with COPD, and also attenuated the pathological lung alterations resulting from *PLA2R1* overexpression in mice. Thus, targeting *PLA2R1* and/or the JAK2 pathway may represent a new therapeutic strategy for counteracting lung cell senescence in COPD.

The potential role for *PLA2R1* in pathology remains poorly understood. Until recently, efforts focused on the ability of *PLA2R1* to bind soluble PLA2s, which catalyse phospholipid hydrolysis and generate inflammatory lipid mediators [17]. However, the physiological consequences of soluble PLA2s binding to *PLA2R1* remain unclear [24] and accumulating evidence now supports an intrinsic role for *PLA2R1* in several pathological conditions [20]. We have reported that *PLA2R1* can act as a tumour suppressor and that its decreased expression in various cancers promotes tumour progression [20, 21] or can promote some progeroid hallmarks [22]. Structure–function studies and chemical inhibition of sh*PLA2*-related signalling pathways revealed that the ability of *PLA2R1* to exert its tumour-suppressive effect was independent of s*PLA2* [18]. Here, we provide evidence for a new pathogenic role for *PLA2R1* due to *PLA2R1* overexpression in the lung in the context of COPD.

PLA2R1 was overexpressed in several cell types from lungs from COPD patients, but was only very weakly expressed in lungs from controls. *PLA2R1*-stained cells were senescent, as they also stained for p16, a major onco-suppressor expressed in senescent cells [25], and for 53BP1 and γ -H2AX, two well-established DNA damage markers. The prominent and intrinsic role for *PLA2R1* in the senescence process in COPD was further demonstrated by the ability of its knockdown to delay cell senescence in primary cultured cells from patients with COPD, independently of the pathological environment. We previously showed that cells from patients with COPD, compared with control cells, were characterised by a marked reduction in their population doubling and by the release of various inflammatory factors and

cytokines as part of the SASP [6, 7]. We show here that *PLA2R1* inactivation not only markedly improved the population doubling, but also completely suppressed the SASP.

An interesting point is that *PLA2R1* knockdown was almost as potent as *p53* neutralisation in inhibiting cell senescence and suppressing the SASP in cells from patients with COPD. That cell senescence was *p53* dependent in COPD was not surprising, given that DNA damage and telomere dysfunction, both of which engage the *p53* pathway, are among the main processes responsible for cell senescence in COPD [8, 26, 27]. Moreover, our previous studies suggest that *p53* may be downstream of *PLA2R1* [16]. Previous studies from our groups also showed that *PLA2R1* activated the JAK2 pathway and that this activation mediated at least part of the pro-senescent effect of *PLA2R1* [19]. Indeed, we showed that inhibition of JAK/STAT signalling by genetic or pharmacological tools reverted *PLA2R1* effects [19], whereas inhibition by ruxolitinib phenocopied *PLA2R1* loss, delaying senescence and improving premature ageing [22, 23]. Our present results are consistent with this finding since lungs from patients with COPD that stained for *PLA2R1* also stained strongly for JAK2 and p-STAT3. A JAK/STAT increase was previously reported in lungs from patients with COPD, although its role was not investigated [28]. The JAK2 pathway has been associated with oncogenic effects, but its potential pathogenic role in COPD remained unclear. Here, we found that cells transduced with the *PLA2R1* gene and undergoing senescence became positive for p-JAK2 and p-STAT3. Moreover, pharmacological inhibition of JAK2 with ruxolitinib fully reversed the induction of cell senescence induced by *in vitro* *PLA2R1* transduction. These results indicate that one major mechanism responsible for JAK/STAT activation in COPD is linked to the senescence process driven by *PLA2R1*.

Previous studies established that JAK activation mediated the SASP in senescent cells from adipose tissue during ageing [29]. JAK1/2 inhibitors reduced inflammation and alleviated frailty in aged mice [29]. Similarly, our results support a major effect of the JAK/STAT pathway in promoting the SASP in senescent cells. Moreover, ruxolitinib treatment reversed *PLA2R1*-induced cell senescence and slightly but significantly delayed the onset of cell senescence in cells from patients with COPD. It is unlikely that the ability of ruxolitinib to decrease cell senescence was due to inhibition of the SASP. Indeed, in previous work by our groups, selectively suppressing the inflammatory arm of the SASP, *e.g.* via NF- κ B inactivation, did not affect lung cell senescence in COPD [7]. Our results thus indicate that the JAK2 pathway mediates part of the pro-senescent effects of *PLA2R1* in COPD, with prominent blunting of the SASP by inhibition of the pathway. However, it is likely that not all the effects of *PLA2R1* are mediated via JAK/STAT and also that some of the effects of JAK/STAT inhibition on cell senescence may rely on mechanisms beyond *PLA2R1* activation.

To assess whether *PLA2R1*-induced cell senescence played a causal role in COPD, we developed mice overexpressing *PLA2R1*. Although these mice had an apparently normal phenotype, they developed major lung alterations consisting of emphysema and fibrotic lesions at a young age, concomitantly with the accumulation of senescent lung cells stained for both p16 and *PLA2R1*, increased expression of lung JAK/STAT target genes, and increased expression of SASP members. These mice also developed pulmonary hypertension, a finding consistent with the reported association between pulmonary hypertension and the development of lung emphysema in mouse models [30]. Taken together, these results in mice show that, even in young mice, *PLA2R1* pathway activation is sufficient to drive cell senescence with the concomitant development of lung emphysema and fibrosis. These findings are consistent with recent evidence of a pathogenic role for senescent cells in a murine lung fibrosis model [31] and with the accumulation of senescent cells in lungs from patients with idiopathic lung fibrosis [32, 33]. The pathogenic role for lung cell senescence in mediating either lung fibrosis or lung emphysema is further illustrated by reports of lung fibrosis, lung emphysema or both in individuals carrying a mutation in the telomerase *TERT* gene [14, 34]. The mechanisms that may favour development of lung emphysema, lung fibrosis or both in response to cell senescence still remain unclarified, although it is likely that different senescent cell types drive these different phenotypes. Consistent with this, we found that mice injected intratracheally with a LV-*PLA2R1* vector rapidly developed severe lung emphysema and some degree of pulmonary hypertension, but without significant lung fibrosis. It is therefore possible that the relatively small number of transduced cells, although sufficient to induce lung emphysema, was probably insufficient to induce lung fibrosis as seen with *PLA2R1*-TG mice.

In the *PLA2R1*-TG mouse model, short-term ruxolitinib treatment markedly diminished the lung fibrotic and emphysema lesions, lung p16 levels, SASP members, and JAK/STAT downstream gene expression. Moreover, in mice injected intratracheally with the LV-*PLA2R1* vector, ruxolitinib treatment started at the time of lentiviral administration prevented lung cell senescence and lung emphysema development. These results are consistent with an inhibitory effect of ruxolitinib on *PLA2R1*-induced lung cell senescence,

either by a direct effect or by an effect mediated by inhibition of the SASP. Inhibitors of the JAK/STAT pathways may have complex actions since they have also been shown to inhibit transforming growth factor- β signalling in lung cells. Our results therefore do not allow us to draw definitive conclusions about the mechanism of action of ruxolitinib and further studies are needed to assess the potential protective effects of this drug on lung alterations in other models.

Taken together, our findings support a causal role for *PLA2R1* activation-induced cell senescence in lung pathology and support the view that targeting the *PLA2R1*–JAK2 pathway represents a therapeutic option for inhibiting cell senescence or eliminating the SASP in patients with COPD. In contrast to interventions targeting major senescence pathways such as the p53 pathway, targeting *PLA2R1* and/or the JAK pathway should not drastically impact tumour development. Anti-JAK agents are currently used to treat cancer and were recently found to reprogramme the SASP in senescent tumour cells, an effect that contributes to improve their antitumor effect. Further studies are needed to evaluate the potential of this approach as a new therapeutic option in COPD.

Acknowledgements: We are grateful to A. Lalot, D. Gelperowic, A. Ribeiro Da Silva, A. Da Silva and F. Weber from the Plateforme de Physiologie et Physiopathologie Expérimentale, as well as to X. Decrouy, and C. Micheli from the imaging platform facility at IMRB INSERM, Créteil, France; and to Thomas Lilin at the Centre de Recherche Biomédicale d'Alfort (CRBM), École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France.

Data availability: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Author contributions: D. Beaulieu, A. Attwe and S. Abid: conception and design, acquisition, analysis and interpretation of data, and drafting of the manuscript. M. Breau, E. Marcos, E. Born, J. Huang, A. Houssaini, N. Vienney, P. Bertolino, S. Jaber, D. Goehrig and D. Vindrieux: acquisition, analysis and interpretation of data. L. Lipskaia: conception and design, and acquisition, analysis and interpretation of data. G. Derumeaux, B. Maitre, M. Lefevre and H. Nouredine: analysis and interpretation of data, and revision of the manuscript. D. Bernard and S. Adnot: conception and design, analysis and interpretation of data, and drafting of the manuscript.

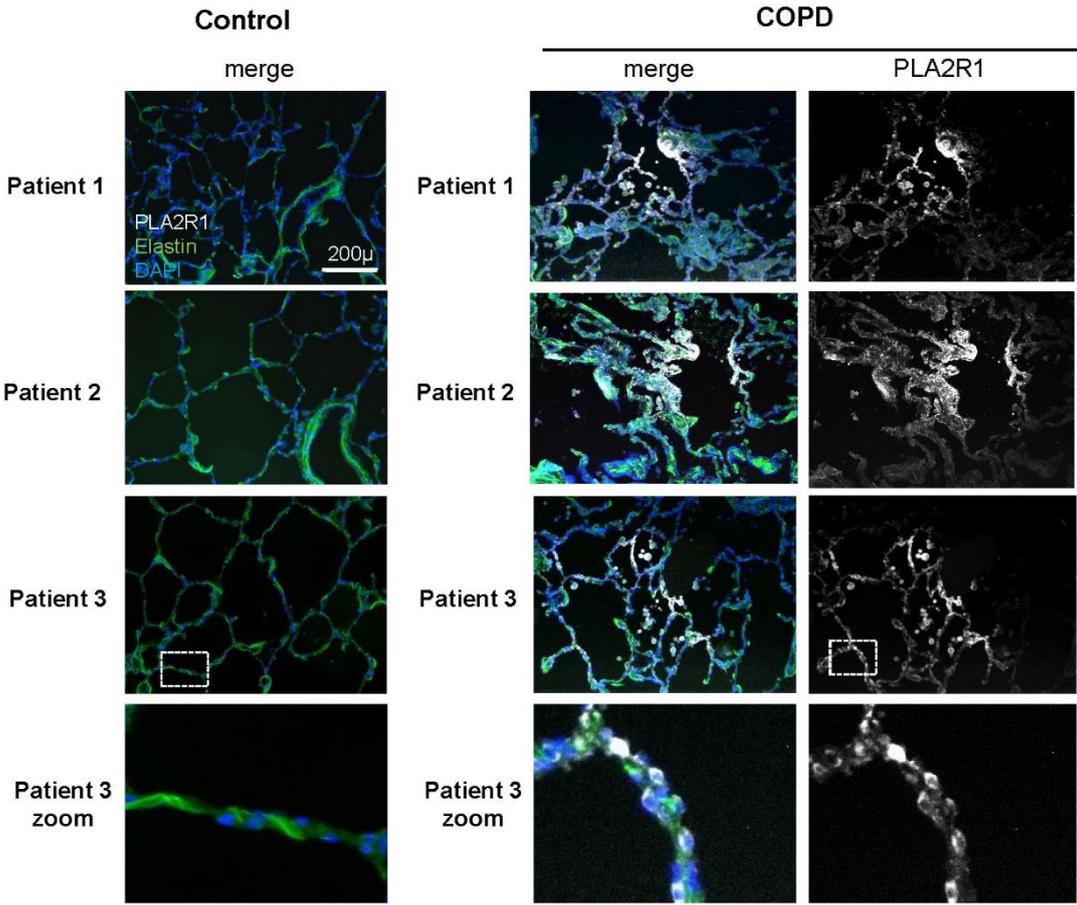
Conflict of interest: None declared.

Support statement: This study was supported by grants from the INSERM, Délégation à la Recherche Clinique de l'AP-HP–FHU SENECS, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Legs Poix, Agence Nationale pour la Recherche (ANR) and Institut National Du Cancer (INCA). Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

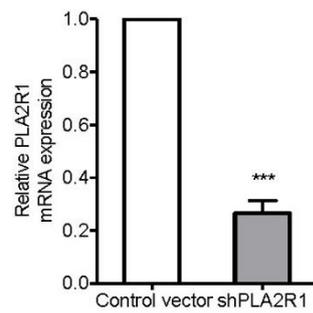
References

- Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, *et al.* Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16: 718–735.
- Gershon AS, Warner L, Cascagnette P, *et al.* Lifetime risk of developing chronic obstructive pulmonary disease: a longitudinal population study. *Lancet* 2011; 378: 991–996.
- Han MK, Agusti A, Calverley PM, *et al.* Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182: 598–604.
- Adnot S, Amsellem V, Boyer L, *et al.* Telomere dysfunction and cell senescence in chronic lung diseases: therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2015; 153: 125–134.
- Vanfleteren LE, Spruit MA, Groenen M, *et al.* Clusters of comorbidities based on validated objective measurements and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: 728–735.
- Amsellem V, Gary-Bobo G, Marcos E, *et al.* Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 1358–1366.
- Houssaini A, Breau M, Kebe K, *et al.* mTOR pathway activation drives lung cell senescence and emphysema. *JCI Insight* 2018; 3: e93203.
- Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, *et al.* Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 566–571.
- Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 31: 643–649.
- Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, *et al.* Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med* 2010; 16: 238–246.

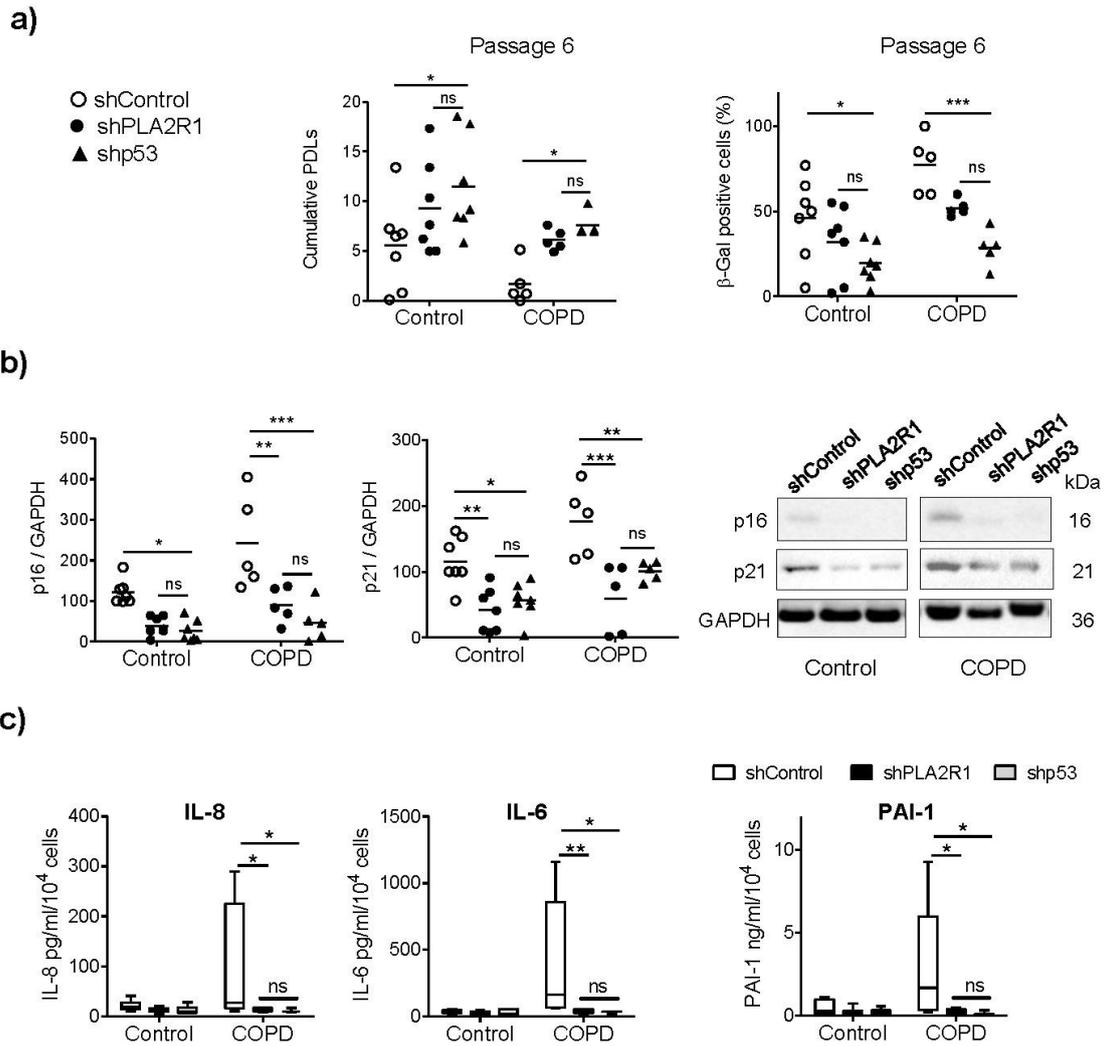
- 11 Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 482–496.
- 12 Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 693–704.
- 13 Andujar P, Courbon D, Bizard E, et al. Smoking, telomere length and lung function decline: a longitudinal population-based study. *Thorax* 2018; 73: 283–285.
- 14 Alder JK, Guo N, Kembou F, et al. Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 904–912.
- 15 Yao H, Chung S, Hwang JW, et al. SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice. *J Clin Invest* 2012; 122: 2032–2045.
- 16 Augert A, Payre C, de Launoit Y, et al. The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep* 2009; 10: 271–277.
- 17 Ancian P, Lambeau G, Lazdunski M. Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2. *Biochemistry* 1995; 34: 13146–13151.
- 18 Augert A, Vindrieux D, Girard CA, et al. PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 969–977.
- 19 Vindrieux D, Augert A, Girard CA, et al. PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2. *Cancer Res* 2013; 73: 6334–6345.
- 20 Bernard D, Vindrieux D. PLA2R1: expression and function in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1846: 40–44.
- 21 Griveau A, Devally G, Eberst L, et al. The PLA2R1–JAK2 pathway upregulates ERRalpha and its mitochondrial program to exert tumor-suppressive action. *Oncogene* 2016; 35: 5033–5042.
- 22 Griveau A, Wiel C, Le Calve B, et al. Targeting the phospholipase A2 receptor ameliorates premature aging phenotypes. *Aging Cell* 2018; 17: e12835.
- 23 Griveau A, Wiel C, Ziegler DV, et al. The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib delays premature aging phenotypes. *Aging Cell* 2020; 19: e13122.
- 24 Murakami M, Lambeau G. Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: an update. *Biochimie* 2013; 95: 43–50.
- 25 Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, et al. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* 2016; 354: 472–477.
- 26 Adcock IM, Mumbly S, Caramori G. Breaking news: DNA damage and repair pathways in COPD and implications for pathogenesis and treatment. *Eur Respir J* 2018; 52: 1801718.
- 27 Noureddine H, Gary-Bobo G, Alifano M, et al. Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circ Res* 2011; 109: 543–553.
- 28 Yew-Booth L, Birrell MA, Lau MS, et al. JAK–STAT pathway activation in COPD. *Eur Respir J* 2015; 46: 843–845.
- 29 Xu M, Tchkonja T, Ding H, et al. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: E6301–E6310.
- 30 Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, et al. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 2011; 147: 293–305.
- 31 Schafer MJ, White TA, Iijima K, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 2017; 8: 14532.
- 32 Jiang C, Liu G, Luckhardt T, et al. Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53–p21–Rb pathway in fibrotic lung disease. *Aging Cell* 2017; 16: 1114–1124.
- 33 Barkauskas CE, Noble PW. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 306: C987–C996.
- 34 Stanley SE, Chen JJ, Podlevsky JD, et al. Telomerase mutations in smokers with severe emphysema. *J Clin Invest* 2015; 125: 563–570.



Supplemental Figure 1
Distribution of PLA2R1 immunofluorescence activity in lungs from patients with COPD and controls
Representative micrographs of lung tissue from 3 patients with COPD and 3 controls showing PLA2R1 expression (white), and merge with elastin autofluorescence (green) and nuclear DAPI staining (blue). The zoom area is indicated by a square.



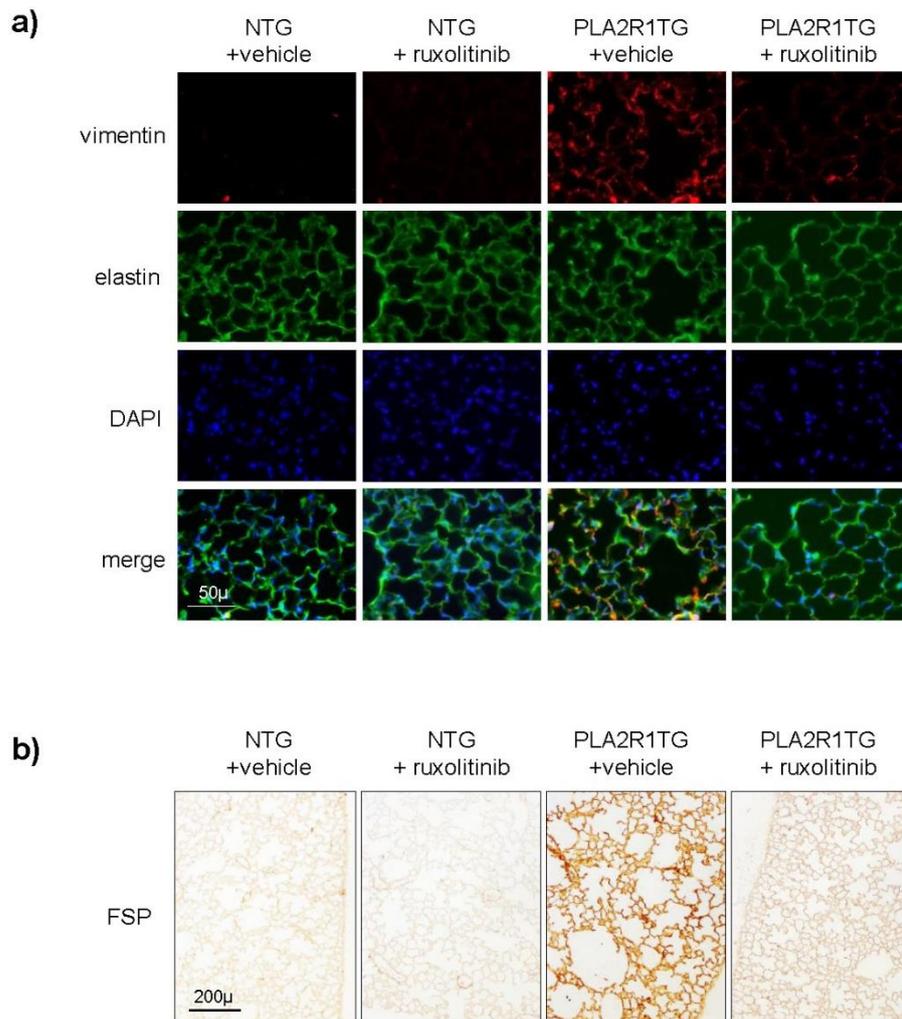
Supplemental Figure 2: *PLA2R1* mRNA levels measured in cells stably infected with the sh*PLA2R1*-encoding retroviral vector, compared to cells infected with the control vector. *** $P < 0.001$ for comparison between groups, Student's *t*-test



Supplemental Figure 3

Comparison between inactivation of *PLA2R1* and *p53* in cells from patients with COPD and controls

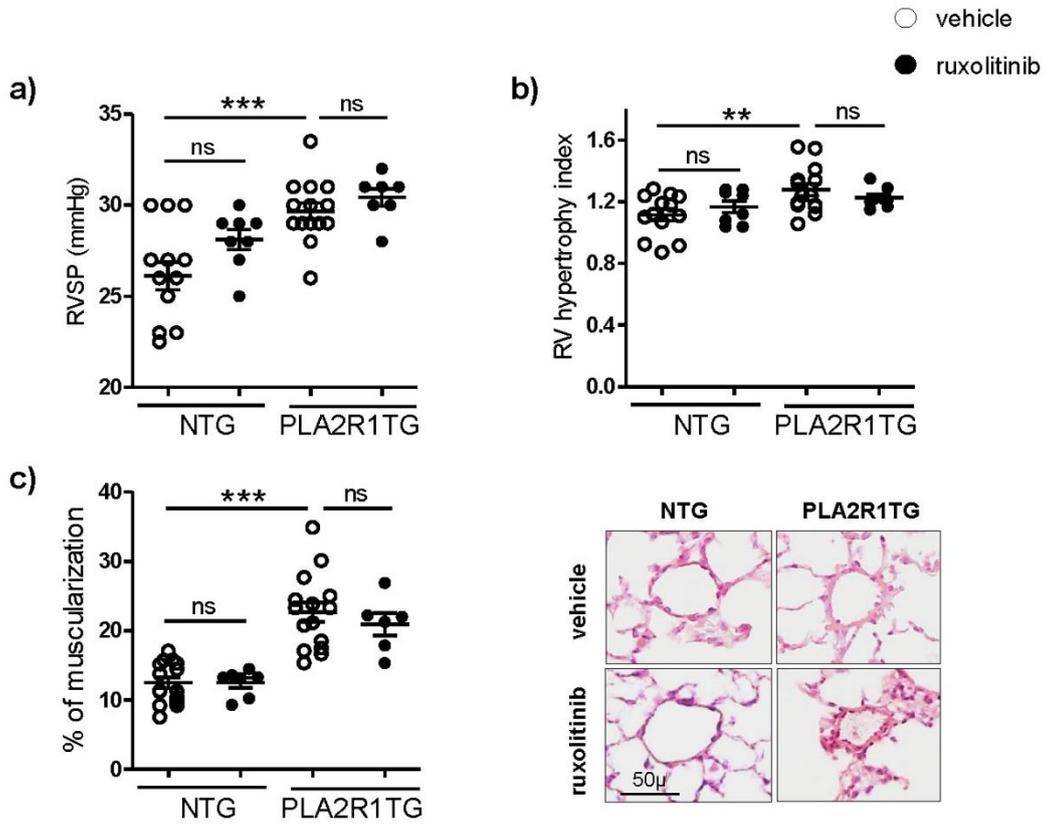
Cells from patients with COPD (n=5) and controls (n=5) were infected either with a retroviral vector encoding an shRNA that targeted *PLA2R1* (shPLA2R1) or *p53* (shp53) or with a control vector encoding a scramble sequence (shControl). The cells were then subjected to successive passages. (a, b) Graphs showing cumulative numbers of PDLs, percentage of β-Gal-positive cells, and p16 and p21 protein levels as assessed by Western blotting, all determined at passage 6 are shown as individual values with the mean. Representative immunoblots are shown on the right. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. shControl, two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test. (c) Protein levels of IL-8, IL-6, and PAI-1 in PA-SMC-conditioned media at passage 6. Data are shown as median (interquartile range) of 5 values per group. Bars represent extreme values. There were no significant differences between values recorded in cells treated with the shPLA2R1 or the shp53 vectors. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. shControl one-tailed Mann Whitney test.



Supplemental Figure 4

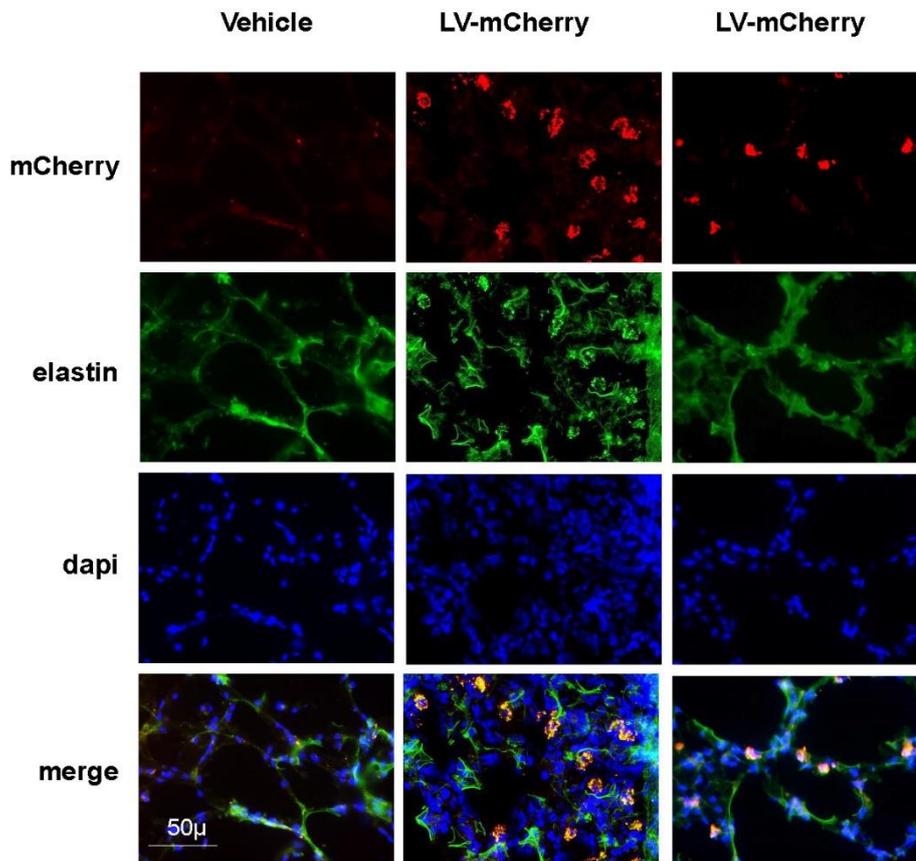
Lung vimentin and fibroblast-specific protein (FSP) immunostaining in *PLA2R1TG* mice and littermate controls subjected to 15 days of treatment with ruxolitinib or vehicle.

(a) Representative micrographs showing lung sections stained for vimentin (red), a lung alveolar fibroblast marker, in *PLA2R1-TG* and control mice treated with ruxolitinib or vehicle. Elastin autofluorescence (green); the nuclei were stained with DAPI (blue). **(b)** Representative micrographs showing lung sections stained for fibroblast-specific protein (FSP, brown), a lung alveolar fibroblast marker, in the same groups of mice.



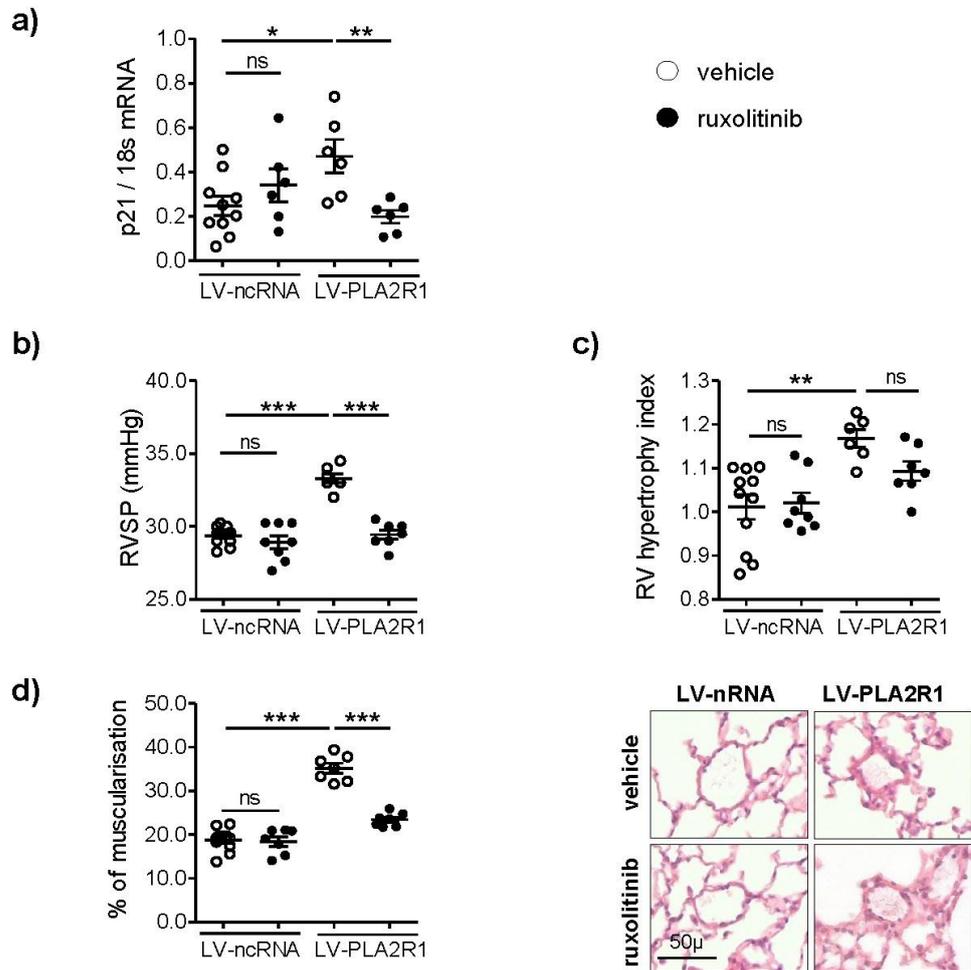
Supplemental Figure 5. Pulmonary hemodynamic parameters in *PLA2R1TG* and littermate control (NTG) mice subjected to 15 days of treatment with ruxolitinib or vehicle

(a) Right ventricular systolic pressure (RVSP) (b) Right ventricular hypertrophy index (Fulton's index) (c) Muscularization of pulmonary vessels (percent of muscularized vessels over the total number of pulmonary vessels) and representative images of pulmonary vessels. Graphs represent individual values with the mean \pm SEM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for comparisons between groups as indicated. Unpaired Student's *t*-test and two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test.



Supplemental figure 6. Identification of lentivirus-transduced cells in the mouse lung.

A lentiviral vector encoding the mCherry gene under the control of the CMV promoter (LV-mCherry) was injected intratracheally to mice (109 TU/ml diluted in DPBS with 5% of Lipofectamine 2000) in comparison with vehicle (DPBS with 5% of Lipofectamine 2000). Mice were sacrificed on day 9 post-infection, and lung cryosections were assessed by fluorescence microscopy for mCherry reporter gene expression (red). Green – elastin autofluorescence, nuclei were stained with DAPI (blue). Bar – 50µm.



Supplemental Figure 6

Pulmonary hemodynamic parameters in mice subjected to an intratracheal injection of a lentivirus encoding the mouse *Pla2r1* gene (LV-PLA2R1) and concomitantly treated with ruxolitinib

Mice treated with the LV-PLA2R1 or a control vector (LV-ncRNA) and simultaneously treated with ruxolitinib (75 mg/kg/day) or vehicle were studied 30 days after the injection. **(a)** Lung mRNA level of p21 **(b)** Right ventricular systolic pressure (RVSP) **(c)** Right ventricular hypertrophy index (Fulton's index) **(d)** Muscularization of pulmonary vessels (percent of muscularized vessels over the total number of pulmonary vessels) and representative images of pulmonary vessels. Graphs represent individual values with the mean \pm SEM. ** P < 0.01, *** P < 0.001 for comparisons between groups as indicated. Student's t -test and two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparisons test.

Table S1

	Control		COPD	
	Mean	<i>sem</i>	Mean	<i>sem</i>
n	23		23	
Age, yr	65,17	±2,60	59,83	±1,27
FEV %	92,39	±2,20	77,78	±3,43
FVC%	96,23	±2,98	88,73	±5,10
FEV /FVC, %	82,74	±1,89	66,05	±1,13
Pack-years	25,74	±4,76	44,76	±5,23

Table S2

	Control		COPD	
	Mean	<i>sem</i>	Mean	<i>sem</i>
n	10		8	
Age, yr	62,72	±4,27	64,7	±2,32
FEV %	94,38	±2,73	69,78*	±3,23
FVC%	101,17	±1,69	80,67	±5,97
FEV/FVC,%	83,85	±3,30	62,2**	±2,25
Pack-years	19	±5,39	52,78*	±6,67

Supplemental Tables S1 and S2

Clinical features and pathological variables of patients with COPD and control smokers. Table S1 describes all patients and controls from whom lung samples were obtained. Cells were collected from a subset of 8 patients and 10 controls, whose characteristics are described in Table S2.

Abbreviations: FEV₁, forced expiratory volume in 1 second; FEV₁%, percentage of the predicted FEV₁ value; FVC, forced vital capacity; FVC%, percentage of the predicted FVC value.

Table S3 : TaqMan Gene Expression assays

Target Gene	Assay ID
hPLA2R1	Hs01073364_m1
mPLA2R1	Mm0476896_m1
p21	Mm04205640_g1
Tap1	Mm00443188_m1
SOCS1	Mm00782550_s1
Irf7	Mm00516793_g1
Col1a1	Mm00801666_g1
Col1a2	Mm00483888_m1
Col3a1	Mm00802300_m1
Acta2	Mm00725412_s1
Fibronectin	Mm01256744_m1

Reference Gene	Assay ID
hSF3A1	Hs01066327_m1
m18s	Mm03928990_g1

METHODS

Study design

The global objectives of the present study were to demonstrate that PLA2R1 is a major player in the process of lung-cell senescence in COPD, to assess JAK/STAT inhibition as a strategy to counteract PLA2R1 effects on cell senescence, and then to validate these findings in preclinical mouse models. To this end, we first assessed PLA2R1 expression in lungs and cells from 23 patients with COPD and 23 controls and investigated whether PLA2R1 colocalized with senescence and DNA-damage markers. We then evaluated the effects of PLA2R1 on replicative cell senescence in several cell types -- pulmonary endothelial cells (P-ECs) and smooth muscle cells (SMCs) -- from 8 patients with COPD and 10 controls. The cells were infected either by retroviral vectors encoding *PLA2R1*, shRNA against *PLA2R1*, or shRNA against *p53*; or by control vectors. Because we previously demonstrated that the pro-senescent effects of PLA2R1 involved JAK2, we then tested whether pharmacological JAK1/2 inhibition (by ruxolitinib) induced *in vitro* inhibition of cell senescence and of the senescence-associated secretory phenotype (SASP), using cells transduced with the retroviral vector encoding *PLA2R1* gene. Finally, we assessed the lung phenotypes of mice expressing the human *PLA2R1* gene (*PLA2R1*-TG mice) under the control of the CMV promoter (40 mice) and of mice injected intratracheally with a mouse *PLA2R1*-encoding lentiviral vector (40 mice), with both mouse models being subjected to *in vivo* ruxolitinib treatment.

Patients and controls

The study was approved by the institutional review board of the Henri Mondor Teaching Hospital, Créteil, France. All patients and controls signed an informed consent document before study inclusion.

Lung tissue samples were obtained from 46 patients who underwent lung resection surgery at the *Institut Mutualiste Montsouris*, Paris, France. Among them, 23 had COPD and 23 were control smokers matched to the COPD patients on age and sex (Table 1). Inclusion criteria for the patients with COPD were an at least 10 pack-year smoking history and a ratio of forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) over forced vital capacity (FVC) <70%. The controls had to have a smoking history greater than 5 pack-years; an FEV₁/FVC ratio greater than 70%; and no evidence of chronic cardiovascular, hepatic, or renal disease. None of the patients had a history of cancer chemotherapy. Lung tissue samples collected during surgery were either immediately immersed in DMEM medium then either used for primary cultures of pulmonary artery smooth muscle cells (PA-SMCs) and pulmonary artery endothelial cells (PA-ECs) or immediately snap-frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C until protein extraction. In addition, a fragment of lung tissue was fixed in 4% paraformaldehyde aqueous solution (Sigma Aldrich, St Louis, MI) and used for paraffin embedding. Cells were cultured from a subset of 8 patients and 10 controls.

Mice

Adult male mice (C57Bl/6j) were used according to institutional guidelines, which complied with national and international regulations. All animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM)–Unit 955, Créteil, France. To study the effects of *PLA2R1* overexpression, we generated mice with constitutive expression of the human *PLA2R1* gene placed under the control of the CMV promoter. Their wild-type littermates served as controls (non transgenic mice, NTG). To investigate the effect of lung *PLA2R1* overexpression, mice were injected intratracheally with a lentiviral vector encoding the murine *PLA2R1* gene under the control of the CMV promoter (LV-*PLA2R1*, Vector ID:

3

VB180531-1152skr; VectorBuilder Inc., Chicago, IL) or with a control lentiviral non-coding RNA expression vector (LV ncRNA, Vector ID: VB180531-1150skr, VectorBuilder Inc.). Each mouse was injected with 50 μ L of lentivirus solution (10^9 TU/ml diluted in DPBS with 5% of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). In preparatory experiments, we identified lung lentivirus-transduced cells by using a lentiviral vector encoding the mCherry reporter gene under the control of the CMV promoter (LV-mCherry). To assess the *in vivo* effect of the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib, mice were treated with 75 mg/kg/day of ruxolitinib or vehicle (5% N,N-Dimethylacetamide, 0.5% methyl cellulose from Sigma-Aldrich) given by gavage. Ruxolitinib used for the animal studies was purchased from Clinisciences (Med Chem Express, Monmouth Junction, NJ).

Animal studies, lung tissue analysis

Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Right ventricular systolic pressure (RVSP) was measured as described previously. The RV was dissected from the left ventricle (LV) plus septum (LV+S), and these dissected samples were weighed to determine the Fulton index (RV/ [LV+S]). The right lung was quickly removed and divided into two parts, which were immediately snap-frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C until total RNA and protein extraction for real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), Western blot, and ELISA. The left lungs were fixed by intratracheal infusion of 4% paraformaldehyde aqueous solution (Sigma Aldrich) at a transpleural pressure of 30 cmH₂O and processed for paraffin embedding. For morphometry studies, 5 μ m-thick sagittal sections along the greatest axis of the left lung were cut in a systematic manner and stained with hematoxylin and eosin. Alveolar and vascular morphometry studies were performed by an observer blinded to treatment and genotype, as described elsewhere.

4

Lung emphysema was assessed on hematoxylin and eosin sections using the mean-linear-intercept (MLI) method described by Knudsen L et al [1]. Light microscope fields were quantified at an overall magnification of 400, using a 42-point and 21-line grid. We examined 20 fields/animal using a systematic sampling method from a random starting point. To correct area values for shrinkage associated with fixation and paraffin processing, we multiplied them by 1.22, as calculated during a previous study.

Lung fibrosis was evidenced on lung sections stained with Masson's trichrome (HT15-1KT, Sigma-Aldrich) and quantified on lung sections stained with Sirius Red (Picro Sirius Red Stain Kit, ab150681, Abcam, Cambridge, UK) using the modified Ashcroft scale [2]. Briefly, the lungs were scanned microscopically with a 20-fold objective, which allowed the evaluation of fine structures while also providing a sufficiently broad view. The entire section was examined by inspecting each field in a raster pattern. Areas with dominating tracheal or bronchial tissue were omitted. The grades were summarized and divided by the number of fields to obtain a fibrotic index for the lung.

For vascular morphometry, each vessel was categorized as non-muscular (no evidence of vessel wall muscularization), partially muscular, or fully muscular. The percentage of muscular pulmonary vessels was determined by dividing the sum of partially and fully muscular vessels by the total number of vessels in the relevant group of animals, as described previously [3].

To measure the release of cytokines IL-6, MCP-1, IL-1 β , and PAI-1 from the lung, we used the Quantikine ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

Cultured cells from patients and controls

P-ECs and PA-SMCs were collected from the lung samples of 8 patients with COPD and 10 controls and cultured as described previously [4, 5]. The cells were then subjected to repeated passages to determine their replicative senescence threshold and population doubling level (PDL). At each passage, cells at 80%-90% confluence were counted in a hemocytometer using trypan blue. The onset of replicative senescence was defined as cessation of cell division, labeling for senescence-associated *beta*-galactosidase, and cell morphology criteria. PDL was computed as follows: $PDL = (\log_{10}Y - \log_{10}X)/\log_{10}2$, where X was the initial number of seeded cells and Y the final number of cells [5, 6].

To assess the effect of JAK/STAT inhibition by ruxolitinib, cells from patients with COPD and controls were continuously cultured in medium containing either vehicle or ruxolitinib (0.5 μ M). The effects of ruxolitinib on cell senescence were evaluated comparatively with those of the vehicle.

We specifically designed experiments to assess the effects of *PLA2R1* inhibition on replicative cell senescence. Cells from patients with COPD and controls were infected with either a retroviral vector encoding short hairpin RNAs targeting *PLA2R1* (shPLA2R1) or a control vector (shControl), as previously described [7]. We then compared the effects of *PLA2R1* knockdown to those of the control vector [8]. The infection protocols were designed to infect nearly all the cells, as demonstrated by fluorescence observed with a GFP-expressing retroviral vector (not shown).

In further specific experiments, cells from patients were infected with a retroviral vector encoding human *PLA2R1* (PLA2R1 virus) or with a control vector as previously described [7, 8]. We then compared the effects of *PLA2R1 overexpression* to those of the control vector. In these experiments, cells were continuously cultured in a medium containing either vehicle or the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib (0.5 μ M).

For analysis of cultured cells at early and late passages, cells were placed in reduced media containing 0.2% FBS for 24 h for P-ECs or 48 h for PA-SMCs, as previously described [4, 5]. Then, the cells were collected for further RNA and proteins analysis and to determine the percentage of *beta*-galactose-positive cells. The conditioned media were collected and used to quantify IL-8, IL-6, and PAI-1 using Quantikine ELISA kits (R&D systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

Senescence-associated beta-galactosidase staining

At each passage, cells at 60% confluence were fixed with 2% formaldehyde and 0.2% glutaraldehyde for 10 minutes. Then, the cells were washed with PBS and stained in a titrated pH6 solution containing 40 mM citric acid, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM potassium ferrocyanide, and 1 mg/mL X-Gal.

Immunofluorescence

For immunofluorescence, cells were fixed for 10 minutes in methanol. Paraffin-embedded sections of lung were deparaffinized using xylene and a graded series of ethanol dilutions then processed for epitope retrieval using citrate buffer (0.01 M, pH 6; 90°C, 20 min). For PLA2R1 epitope retrieval, we used NeoUltra retrieval solution (NB-23-00178-4, NeoBiotech, Nanterre, France) according to the manufacturer's instructions. For nuclear immunolabeling, tissues were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes.

Saturation was achieved using Dako antibody diluents with 10% goat serum. For double staining, first and second primary antibodies were diluted in Dako antibody diluents with 3% goat serum then incubated for 1 hour at 37°C in a humidified chamber. After PBS washes, the sections were covered with secondary antibody (mixed with mouse, rabbit, rat, or chicken Alexa Fluor[®] 480, Alexa Fluor[®] 555, or Alexa Fluor[®] 660 [Abcam]) for 40 minutes at 37°C in

a humidified chamber. After 5 minutes of staining with DAPI, the sections were protected with coverslips secured with fluorescent mounting medium.

Fluorescence was recorded using an Axio Imager M2 imaging microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and analysed on digital photographs using Image J software (imagej.nih.gov/ij/).

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry on paraffin-embedded sections, after deparaffinization and antigen retrieval, the endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ and 10% methanol in PBS for 10 minutes. Permeabilization was done using 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 minutes. Saturation was achieved by incubation for 30 minutes at 37°C in antibody diluent (ref.NB-23-00171-1, NeoBiotech) supplemented with 12% of goat serum. The slides were then incubated for 60 minutes at 37°C with primary antibody. The secondary antibody consisted of Sav-HRP conjugates. DAB substrate solution was used to reveal the color of the antibody staining. Nuclear counterstaining was achieved with methyl green.

Protein extraction and immunoblotting

Total proteins were extracted using RIPA lysis buffer (10 mM sodium phosphate pH 8, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP40, 0.5% SDS, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail [Roche, Meylan, France]). Immunoblots were carried out using the indicated antibodies and detected using an enhanced chemiluminescence detection system (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Densitometric quantification was normalized for the *beta*-actin or GAPDH level using GeneTools software (Ozyme, Montigny le Bretonneux, France).

Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA from tissues and cells was extracted with the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration was assessed using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France), and RNA integrity was confirmed by electrophoresis. One μg of total RNA was used for cDNA synthesis using SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). The quantitative PCR was performed in triplicate with TaqMan Probes (TaqMan Gene Expression assays, Applied Biosystems, Illkirch, France) and TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) in the QS6, QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Illkirch, France). All data were analysed using QuantStudio Real-Time PCR software (Applied Biosystems). The relative expression level of target genes was calculated by the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method and normalized to the reference genes 18s and SF3A1. The TaqMan Gene Expression assays used for human and mouse cells are described in supplemental Table S3.

Materials

The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib used for animal studies was purchased from Clinisciences (Med Chem Express).

The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-PLA2R1 antibody (1:200, ab211490, Abcam); rabbit polyclonal anti-PLA2R1 antibody (1:200, ab194256, Abcam); rabbit polyclonal anti-PLA2R1 antibody (1:200, abx129773, ABBEXA); mouse monoclonal anti-CDK2A/p16INK4a (p16, ab54210, Abcam), polyclonal rabbit anti- α -smooth muscle actin (αSMA) antibody (1:400, ab5694, Abcam), polyclonal rabbit anti-CD31 (PECAM) antibody (1:20, ab28364, Abcam), monoclonal rabbit anti-MUC1 (1:200, ab109185, Abcam antibody); polyclonal rabbit anti-53BP1 antibody (1:200, NB100-304,

9

Novus Biologicals, Littleton, CO); phospho-gamma-H2AX (Ser139) recombinant rabbit monoclonal antibody (RM224) (# MA5-33062, RRID AB_2810155, Thermo Fisher Scientific); polyclonal mouse anti-proliferating cell nuclear antigen antibody, anti-PCNA (1:200, ab29, Abcam); monoclonal mouse anti-JAK1 antibody (1:200; sc-1677, Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit anti-JAK2 antibody (1:200, sc-294, Santa Cruz Biotechnology), goat polyclonal anti-phospho STAT3 (Tyr705) antibody 1:200, sc-7993, Santa Cruz Biotechnology); rabbit polyclonal anti-phospho-Jak2 (Tyr1007/1008) antibody (1:200, y #3771, Cell Signaling), rabbit anti-vimentin antibody (1:500, ab92547, Abcam), rabbit anti-fibroblast-specific protein antibody (1:200, ab27957, Abcam), anti-beta-Actin (β -Act, A5316, Sigma); GAPDH (sc-25778); anti-CDK2A/p16INK4a (p16, 92803, Cell Signaling; p16, PA520379, Thermo Scientific); anti-p21 Waf1/Cip1 (p21, 2946, Cell Signaling Technology)

Statistical analysis

Quantitative variables are expressed as individual values and mean or as median (range). Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7 software following the guidelines in GraphPad Prism. One-way analysis of variance (ANOVA) or two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test were used to compare the means of more than two independent groups. Values represented as medians (interquartile range) were compared by the nonparametric Kruskal-Wallis test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

References

1. Knudsen L, Weibel ER, Gundersen HJ, Weinstein FV, Ochs M. Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach. *J Appl Physiol (1985)* 2010; 108(2): 412-421.
2. Hubner RH, Gitter W, El Mokhtari NE, Mathiak M, Both M, Bolte H, Freitag-Wolf S, Bewig B. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples. *Biotechniques* 2008; 44(4): 507-511, 514-507.
3. Mouraret N, Houssaini A, Abid S, Quarck R, Marcos E, Parpaleix A, Gary-Bobo G, Dubois-Rande JL, Derumeaux G, Boczkowski J, Delcroix M, Blasco MA, Lipskaia L, Amsellem V, Adnot S. Role for telomerase in pulmonary hypertension. *Circulation* 2015; 131(8): 742-755.
4. Noureddine H, Gary-Bobo G, Alifano M, Marcos E, Saker M, Vienney N, Amsellem V, Maitre B, Chaouat A, Chouaid C, Dubois-Rande JL, Damotte D, Adnot S. Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circ Res* 2011; 109(5): 543-553.
5. Amsellem V, Gary-Bobo G, Marcos E, Maitre B, Chaar V, Validire P, Stern JB, Noureddine H, Sapin E, Rideau D, Hue S, Le Corvoisier P, Le Gouvello S, Dubois-Rande JL, Boczkowski J, Adnot S. Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(12): 1358-1366.
6. Nogueira V, Park Y, Chen CC, Xu PZ, Chen ML, Tonic I, Unterman T, Hay N. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 2008; 14(6): 458-470.
7. Augert A, Payre C, de Launoit Y, Gil J, Lambeau G, Bernard D. The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep* 2009; 10(3): 271-277.

8. Vindrieux D, Augert A, Girard CA, Gitenay D, Lallet-Daher H, Wiel C, Le Calve B, Gras B, Ferrand M, Verbeke S, de Launoit Y, Leroy X, Puisieux A, Aubert S, Perrais M, Gelb M, Simonnet H, Lambeau G, Bernard D. PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2. *Cancer Res* 2013; 73(20): 6334-6345.

Etude 2 : Effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT sur la sénescence cellulaire dans des altérations pulmonaires : emphysème et fibrose pulmonaires.

Introduction étude 2 :

La sénescence cellulaire est un processus clé dans la physiopathologie des maladies pulmonaires liées à l'âge, en particulier dans la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la fibrose pulmonaire. L'accumulation de cellules sénescents est retrouvée dans ces deux pathologies pulmonaires et contribue à un défaut de renouvellement tissulaire notamment à cause des composants du SASP. Limiter la sénescence cellulaire et le SASP représente un objectif thérapeutique majeur dans les maladies pulmonaires liées à l'âge. Le ruxolitinib, inhibiteur de JAK1/2 permet de réduire les composants du SASP car la voie JAK/STAT est l'une des voies principales impliquée dans la production du SASP. Cibler la voie JAK/STAT qui est impliquée dans les processus inflammatoires pourrait être intéressant afin de réduire les composants du SASP. La réduction de ces composants par des sénomorphiques sans élimination des cellules sénescents peut représenter une stratégie intéressante pour réduire les effets délétères de ces cellules dans les pathologies liées à l'âge. De plus, nous avons démontré dans l'étude 1, les effets bénéfiques de l'inhibition de la voie JAK/STAT permettant de réduire la sénescence cellulaire, le SASP et les altérations pulmonaires induites par la surexpression de PLA2R1 chez la souris. D'autres études ont montré que l'inhibition de la voie JAK/STAT permettait aussi d'avoir un effet sur la réduction de fibrose.

En effet, si l'importance de la voie JAK/STAT dans l'induction du SASP est bien connue, son importance dans l'induction de la sénescence cellulaire reste à définir. Notre hypothèse est que l'inhibition de la voie JAK/STAT pourrait inhiber certains types de sénescence par un effet direct, en plus de ses effets médiés par le SASP. C'est pourquoi dans cette deuxième étude, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib sur la sénescence cellulaire et le SASP dans deux types d'altérations pulmonaires : l'emphysème induit par l'élastase et la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine de façon indépendante de PLA2R1.

Les objectifs de cette dernière étude étaient les suivants :

Objectif 1 : Evaluer l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib sur la sénescence cellulaire induite par l'injection d'élastase. Pour cela, nous avons étudié des souris p16Luc/+ qui nous permettent de suivre l'induction de la sénescence cellulaire par mesure de bioluminescence.

Objectif 2 : Evaluer l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase. Nous avons évalué si le ruxolitinib permettait de diminuer les altérations pulmonaires en inhibant la sénescence cellulaire, le SASP ou les deux. Pour cela nous avons évalué l'effet du traitement préventif par le ruxolitinib chez les souris C57Bl6/J (WT) après injection d'élastase. Nous avons également testé si l'administration de ruxolitinib pouvait avoir une action curative sur l'emphysème, ce qui correspondrait à une action anti-sénescence.

Objectif 3 : Evaluer l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib dans le modèle de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine. La prévention de la fibrose déjà démontrée dans ce modèle par des interventions anti-sénescentes plaiderait ainsi pour une action anti-sénescente du ruxolitinib.

Objectif 4 : Evaluer si l'action anti-sénescente du ruxolitinib était dépendante de PLA2R1. Pour cela nous avons évalué l'effet du traitement préventif du ruxolitinib dans les modèles d'emphysème et de fibrose pulmonaires chez les souris PLA2R1KO.

Objectif 5 : Cet objectif qui est en cours consiste à évaluer l'action anti-sénescente du ruxolitinib sur des cellules en culture soumises à des stress pro-sénescents tel que le traitement par la bléomycine. L'objectif est d'utiliser des fibroblastes humains primaires et d'évaluer l'effet du ruxolitinib sur la sénescence cellulaire et les composants du SASP.

Cette étude 2 est toujours en cours, les résultats actuels obtenus seront à compléter par de futures expérimentations.

Matériels et méthodes étude 2 :

Induction du modèle emphysème et fibrose pulmonaires chez la souris :

Les souris C57Bl6/J âgées de 10 semaines, les souris p16 Luc/+ de 9 mois, les PLA2R1KO et littermates de 4 mois sont utilisées. Après une semaine de quarantaine dans notre animalerie, elles subissent la chirurgie d'injection intratrachéale d'élastase ou de bléomycine. Pour cela, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de xylazine (10 mg/kg), elles sont ensuite induites sous 4% d'isoflurane en chambre d'induction puis maintenues tout le long de la chirurgie sous 2% d'isoflurane par le nez. Une incision de la peau du cou est réalisée. A l'aide de pinces et sans couper de tissu, la trachée est exposée et les tissus l'entourant sont maintenus à l'aide d'écarteurs. Une aiguille de seringue Hamilton de 26G et de capacité 50 µl est insérée entre deux anneaux de la trachée. La solution d'élastase (2U) ou de bléomycine (2U/kg) ou le sérum physiologique est lentement injectée dans la trachée. Une fois l'instillation terminée, un point de suture à l'aide de fil résorbable est réalisé, puis le réveil des souris sur un tapis chauffant est surveillé. Le traitement préventif par le ruxolitinib se fait par gavage, tous les jours jusqu'au 21^{ème} jour. La dose utilisée de ruxolitinib est de 75 µg/g/jour diluée dans du diméthylacétamide 5% et méthylcellulose 0,5% qsp H₂O. Les animaux sont sacrifiés 21 jours après l'injection intratrachéale. Pour le traitement curatif par le ruxolitinib, le premier jour de traitement correspondant au 21^{ème} jour après chirurgie puis tous les jours pendant 15 jours. Les souris sont sacrifiées le 36^{ème} jour.

Mesure de la bioluminescence :

Les souris p16Luc/+ possèdent un allèle Luc pour lequel le gène p16 est remplacé par le gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur p16. Cette construction permet de mesurer par bioluminescence l'induction de la sénescence cellulaire. Les mesures de bioluminescentes se font sur la plateforme d'imagerie de la faculté de pharmacie de l'université Paris Descartes. La luciférine est injectée aux souris par voie intrapéritonéale à une concentration de 15 mg/ml. 5 minutes après l'injection les souris sont anesthésiées à l'isoflurane (2% pour l'induction, 1,5% pour le maintien). Après 5 minutes d'anesthésie les souris sont placées dans l'imageur (PhotoImager, Optima), avec un masque d'isoflurane et l'acquisition du signal bioluminescent dure 10 minutes. Les images sont analysées à l'aide du logiciel Photo Acquisition (BiospaceLab). Les zones de quantification d'intensité de bioluminescence sont définies pour chaque souris : une zone corps entier et une délimitant le thorax. Le logiciel quantifie l'intensité de bioluminescence pour chacune de ces zones. Les valeurs de

bioluminescence obtenues sont exprimées en photon/seconde/cm²/steradian (ph/s/cm²/sr). Cela nous permet ensuite de mesurer le ratio de bioluminescence thorax/corps entier.

Mesures des propriétés mécaniques pulmonaires :

Les mesures sont faites grâce à un outil de mesure, le FlexiVent. Les données récoltées par cet appareil nous permettent de mesurer la résistance, l'élastance et la compliance. Afin de mesurer les fonctions respiratoires, les souris sont anesthésiées par un mélange de xylazine (10 mg/kg) et kétamine (60 mg/kg). Une incision cervicale est alors réalisée pour exposer la trachée. Une sonde d'intubation oro-trachéale (diamètre externe 1,2mm) est insérée permettant de connecter la souris au système FlexiVent. L'animal est sur un tapis chauffant afin de maintenir une température corporelle normale durant l'anesthésie. La souris est curarisée par Pancuronium (0,8 mg/kg), injecté par voie intrapéritonéale. Le FlexiVent permet une ventilation mécanique, puis plusieurs perturbations sont exercées sur l'animal afin d'évaluer les fonctions respiratoires : Snapshot (compliance dynamique, résistance des voies aériennes), oscillations forcées (élastance, impédance), PVloop-P et PVloop-V (compliance quasi-statique). A la suite de ces mesures pulmonaires, nous prélevons le bloc cœur-poumon de la souris.

Mesure du mean linear intercept (MLI) et Ashcroft score :

Le lobe gauche des poumons de souris est gonflé au formol 4% (Sigma Aldrich) à pression constante grâce à une colonne de 30 cm. Après inclusions, des coupes de 5 µm sont réalisées pour faire des colorations Hematoxiline-Eosine, Rouge Sirius et des coupes sans colorations pour des marquages immuno-histologiques. La distance inter-septale moyenne (Mean Linear Intercept, MLI, en µm) est une mesure métrique stéréologique utilisée couramment pour quantifier l'emphysème sur coupes histologiques, elle est perçue comme un indice de l'espace aérien. Nous mesurons la distance inter-septale moyenne manuellement par une méthode décrite par Weibel : 20 images acquises au grossissement 10X (évitant les voies aériennes et les vaisseaux sanguins musculaires) sur les lames colorées à l'hématoxyline-éosine. Une grille composée de 21 lignes est superposée à ces images. Les intersections entre les lignes et le tissu sont comptés et la moyenne de 20 champs donne le nombre moyen d'intersections. Pour calculer la distance inter-septale moyenne linéaire, la formule suivante est utilisée : $Lm = 2 \times Ltot \times f \times la \times G$. Lm : Distance inter-septale moyenne linéaire (µm) ; Ltot : Longueur totale des segments de la grille de lecture ; f : Facteur linéaire de correction de la rétraction

tissulaire ($f=1,22$ car 1cm de tissu pulmonaire sur lame équivaut à 1,22 cm de tissu pulmonaire frais) ;
la : Nombre moyen d'interceptions avec un septum alvéolaire ; G : Grossissement total sur l'écran.

La fibrose pulmonaire a été mise en évidence sur des sections de poumon colorées au rouge Sirius (Picro Sirius Red Stain Kit, ab150681, Abcam, Cambridge, UK) en utilisant l'échelle d'Ashcroft modifiée (Hübner, Gitter et al. 2008). Les images sont prises au 20X ce qui permet d'évaluer les structures fines tout en offrant une vue suffisamment large. La coupe histologique entière est examinée en inspectant plusieurs champs. Les zones où dominait le tissu bronchique sont omises. Un score est attribué pour chaque image et permet de donner le score moyen de fibrose du poumon de l'animal.

Western blot :

L'extraction des protéines de poumon se fait par ajout de 150 μ l de tampon d'extraction (Cell Lysis Buffer (10X) #9803 Cell Signaling) sur chaque lobe de poumon. Une bille est ajoutée dans chaque tube pour broyer le poumon au Tissuelyser II (Qiagen). L'homogénat est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C et le surnageant est récupéré. La quantité totale de protéines est mesurée par la méthode de Bradford (Biorad, Marne-la-coquette, France) par mesure au spectromètre Tecan. Les protéines sont ensuite séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% puis transférées sur une membrane PVDF de 0,45 μ m (Millipore). La membrane est saturée dans une solution de TBS-Tween 0,1%, BSA 5 %, rincées puis incubées avec l'anticorps primaire. Les anticorps primaires utilisés sont : anti-CDK2A/p16INK4a (p16) (1:1000, ThermoFisher, PA520379), anti-p21 (1 :1000, Abcam, 188224), anti-phospho-Stat3 (Tyr705) (1 :1000, Cell Signaling, 9145), anti-Stat3 (1 :1000, Santa Cruz, sc-482) et anti-GAPDH (1:1000, SIGMA, HPA040067). Après lavage, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire : Anti-lapin HRP (1:1000, Cell Signaling, NA9340V). La détection se fait par chimioluminescence à l'aide d'un système de détection amélioré (G :box, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). La quantification densitométrique a été normalisée par le niveau de GAPDH en utilisant le logiciel GeneTools (Ozyme, Montigny le Bretonneux, France).

PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) :

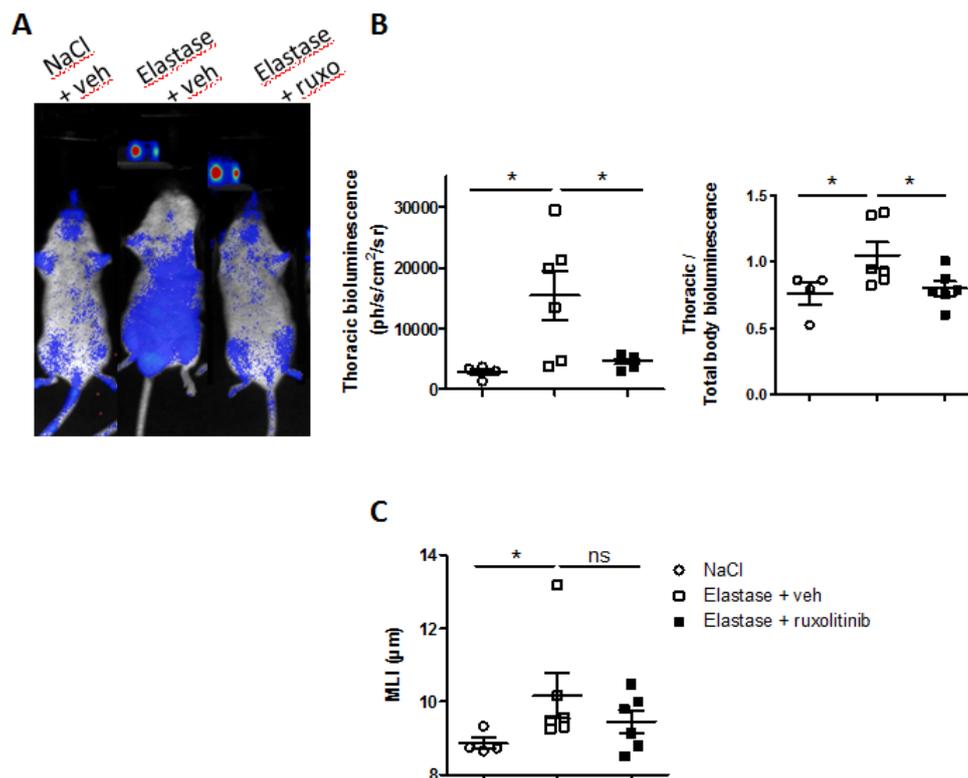
L'ARN total des poumons est extrait avec le RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. La concentration en ARN a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France), et l'intégrité de l'ARN a été confirmée

par électrophorèse. Un μg d'ARN total a été utilisé pour la synthèse d'ADNc en utilisant la transcriptase inverse SuperScript II (Thermo Fisher Scientific). La PCR quantitative a été réalisée en triplicata avec les sondes TaqMan (TaqMan Gene Expression assays, Applied Biosystems, Illkirch, France) et le TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) dans le système QS6, QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems, Illkirch, France). Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel QuantStudio Real-Time PCR (Applied Biosystems). Le niveau d'expression relative des gènes cibles a été calculé par la méthode des $\Delta\Delta\text{Ct}$ et normalisé par rapport aux gènes de référence 18s. Les sondes TaqMan utilisées sont décrites dans le tableau ci-dessous.

Target Gene	Assay ID
mPLA2R1	Mm0476896_m1
p21	Mm04205640_g1
p16	Mm00441263_m1
IL-8 (Cxcl-15)	Mm00441263_m1
PAI-1 (Serpin-1)	Mm00435858_m1
MMP-12	Mm00500554_m1
Tap1	Mm00443188_m1
SOCS1	Mm00782550_s1
Irf7	Mm00516793_g1
Col1a1	Mm00801666_g1
Col1a2	Mm00483888_m1
Col3a1	Mm00802300_m1
Fibronectin	Mm01256744_m1
m18s	Mm03928990_g1

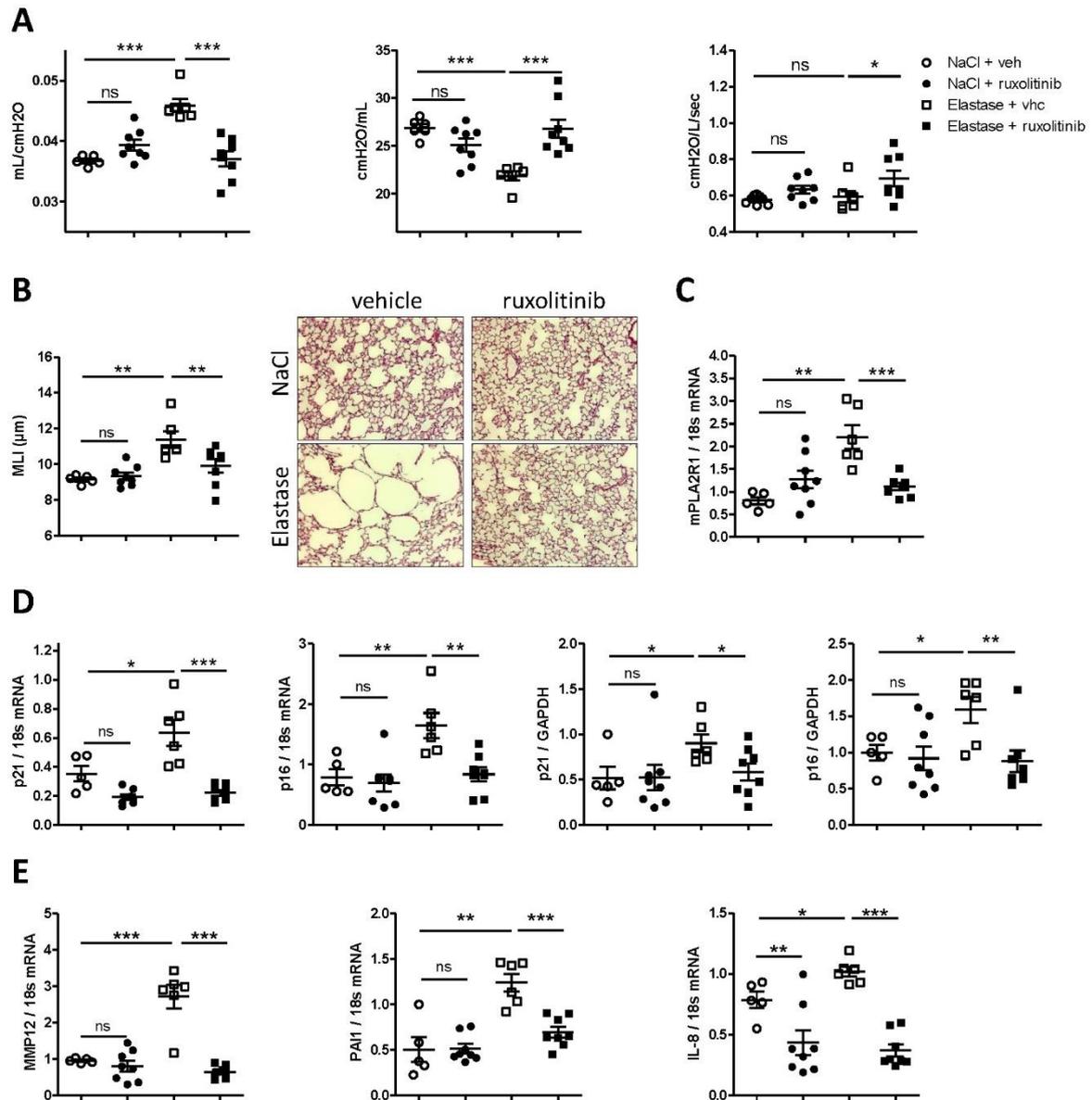
Résultats étude 2 :

Objectif 1 : Pour évaluer l'induction de la sénescence cellulaire dans le poumon dans un modèle d'emphysème induit par l'injection intratrachéale d'élastase, nous avons étudié les souris p16Luc/+ qui permettent de mesurer la sénescence cellulaire par quantification de bioluminescence après injection de luciférine (**Figure 1A**). L'intensité de bioluminescence quantifiée dans le thorax ainsi que le ratio de la bioluminescence du thorax sur la bioluminescence du corps entier sont augmentés 21 jours après l'injection intratrachéale d'élastase par rapport à l'injection de sérum physiologique (**Figure 1B**). Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de diminuer la bioluminescence dans le groupe élastase. La mesure du MLI est faite sur des coupes histologiques de poumon colorées à l'hématoxiline-éosine. Nous avons mesuré le MLI chez ces animaux qui augmente 21 jours après l'injection d'élastase mais qui n'est pas réduit par le traitement préventif par le ruxolitinib (**Figure 1C**). Le traitement préventif par le ruxolitinib permet donc de réduire la sénescence cellulaire induite 21 jours après l'injection intratrachéale d'élastase.



Légende Figure 1 : Les souris p16Luc/+ âgées de 9 mois reçoivent par injection intratrachéale le sérum physiologique (NaCl) ou l'élastase et sont traitées par le ruxolitinib ou par le véhicule pendant 21 jours. **A** : Image représentant la mesure de bioluminescence. **B** : Quantification de la bioluminescence dans le thorax (à gauche) ou le ratio de bioluminescence du thorax sur la bioluminescence du corps entier (à droite). **C** : Quantification du MLI mesuré sur coupes histologiques de poumon colorées à l'hématoxiline-éosine. Tests statistiques : Two-tailed unpaired T test ; ns: non significatif; *: p<0.05.

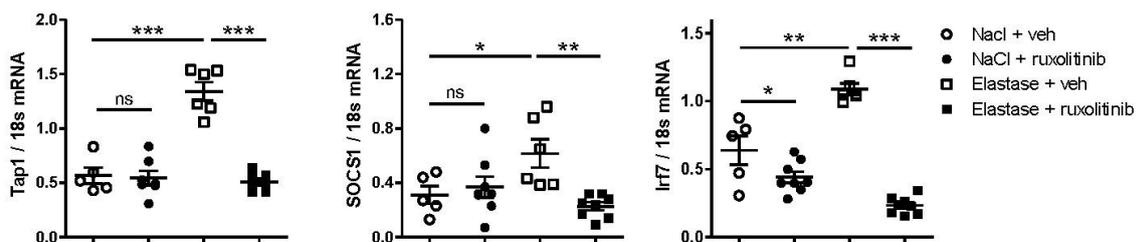
Objectif 2 : Nous avons ensuite évalué l'effet de l'injection intratrachéale d'élastase sur la sénescence cellulaire et le SASP à 21 jours dans un modèle de souris C57Bl6/J (WT). Pour cela, les souris WT ont reçu l'élastase ou le sérum physiologique. Pour évaluer l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT, ces souris sont traitées par le ruxolitinib ou par le véhicule pendant 21 jours. Comme attendu, l'injection d'élastase dans ce modèle induit une augmentation de la compliance, une diminution de l'élastance et n'a pas d'effet sur la résistance montrant une distensibilité pulmonaire exagérée chez ces souris (**Figure 2A**). De plus, ces souris développent un emphysème pulmonaire mesuré par le MLI (**Figure 2B**). Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de réduire les effets induits par l'élastase avec une compliance et une élastance qui reviennent au même niveau que celui mesuré chez les souris ayant reçu le sérum physiologique (**Figure 2A**). Le traitement par le ruxolitinib permet de diminuer l'élargissement des espaces alvéolaires avec une diminution du MLI (**Figure 2B**). Le niveau d'expression des transcrits et le niveau des protéines p21 et p16 sont mesurés dans les broyats de poumons des souris (**Figure 2D**). Ces marqueurs de sénescence cellulaire sont augmentés (niveaux des ARNm et de la protéine) chez les souris ayant reçu l'élastase. De plus, les transcrits de certains éléments du SASP, MMP-12, PAI-1 et IL-8 sont également augmentés dans les poumons de ces souris (**Figure 2E**). Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de diminuer les marqueurs de sénescence p21 et p16 ainsi que les composants du SASP 21 jours après l'injection intratrachéale de l'élastase. L'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib permet de réduire les altérations pulmonaires induites par l'injection d'élastase en diminuant la sénescence cellulaire ainsi que le SASP.



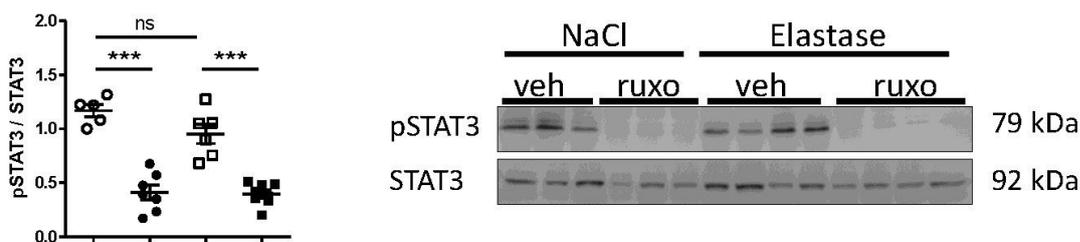
Légende Figure 2 : Les souris C57Bl6/J reçoivent par injection intratrachéale le sérum physiologique (NaCl) ou l'élastase et sont traitées par le ruxolitinib ou par le véhicule pendant 21 jours. **A :** Mesure par le FlexiVent, de gauche à droite, de la compliance, l'élastance et la résistance. **B :** Quantification du MLI (à gauche), mesuré sur les coupes histologiques de poumon colorées à l'hématoxyline-éosine (à droite). **C :** Mesure de l'expression d'ARNm de PLA2R1. **D :** Mesure de l'expression d'ARNm de p21 et p16 (à gauche) et des niveaux de protéines de p21 et p16 par Western blot (à droite). **E :** Mesure de l'expression d'ARNm des composants du SASP : MMP-12, PAI-1, IL-8. Tests statistiques : Two-way ANOVA avec post-test Bonferroni, ns : non significatif ; * : p<0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001

Chez les souris WT qui ont reçu l'élastase, nous avons également mesuré l'activation de la voie JAK/STAT 21 jours après l'injection d'élastase. Les niveaux d'expression des ARNm de gènes cibles de la voie JAK/STAT, Tap1, SOCS1 et Irf7 sont augmentés après injection d'élastase (**Figure 3A**). Cependant, le ratio de la protéine STAT3 phosphorylée (pSTAT3) sur la protéine STAT3 totale (STAT3) est inchangé dans le groupe ayant reçu l'élastase par rapport au groupe ayant reçu le sérum physiologique (**Figure 3B**). L'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib permet de diminuer l'activation des gènes cibles de la voie JAK/STAT induite après injection d'élastase et diminue de la même manière le niveau de p-STAT3 dans les deux groupes. Cela suggère que l'activation de la voie JAK/STAT induite par l'élastase pourrait passer par une voie ne faisant pas intervenir la phosphorylation de STAT3 et que la réduction du développement de l'emphysème dans ce modèle par le traitement au ruxolitinib passe par l'inhibition d'expression des gènes Tap1, SOCS1 et Irf7.

A

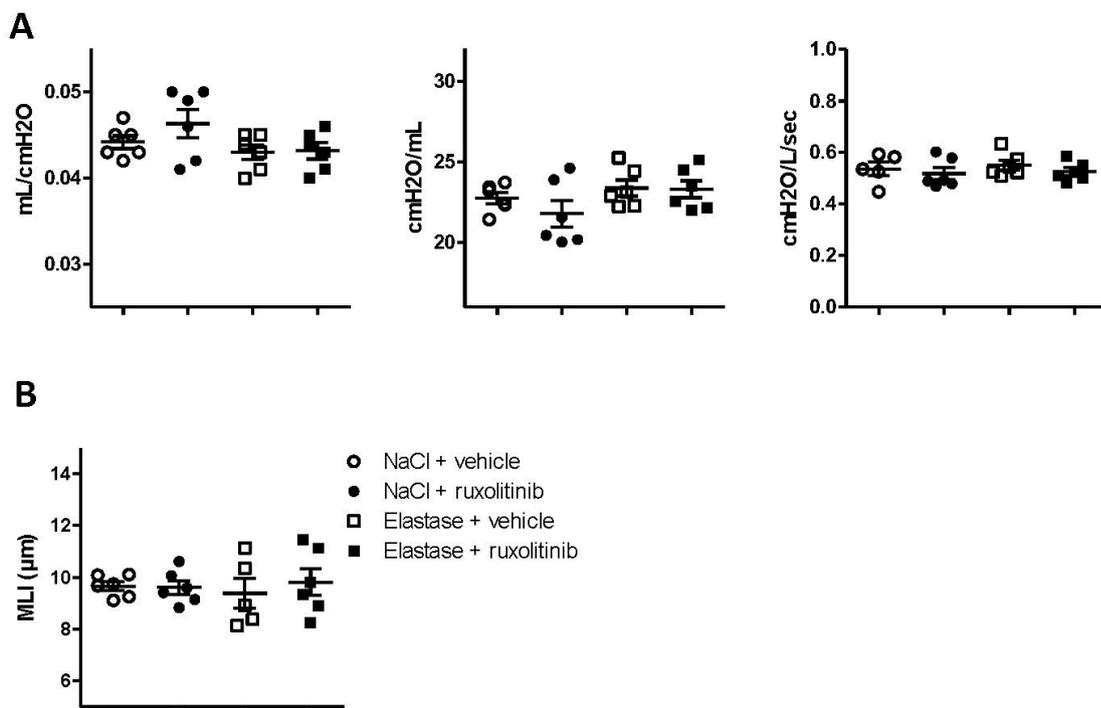


B



Légende Figure 3 : Les souris C57Bl6/J reçoivent par injection intratrachéale le sérum physiologique (NaCl) ou l'élastase et sont traitées par le ruxolitinib ou par le véhicule pendant 21 jours. **A :** Mesure de l'expression d'ARNm des gènes cibles de la voie JAK/STAT, Tap1, Socs1, Irf7. **B :** Quantification du ratio de la protéine phosphorylée pSTAT3(Tyr705) sur la protéine STAT3 totale (à gauche), immunoblot correspondant. Tests statistiques : Two-way ANOVA avec post-test Bonferroni, ns : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$

Pour évaluer l'effet curatif du ruxolitinib sur l'emphysème induit par l'élastase, nous avons initié le traitement par le ruxolitinib 21 jours après l'injection intratrachéale de l'élastase et traité les souris pendant 15 jours. La compliance, l'élastance, la résistance et le MLI mesurés sont au même niveau dans les groupes ayant reçu le sérum physiologique ou l'élastase 36 jours après l'injection intratrachéale (**Figure 4 A et B**). Ces résultats pourraient suggérer une réparation spontanée de l'emphysème induit par l'élastase 36 jours après l'injection et ne nous permettent pas de conclure sur l'effet curatif du ruxolitinib dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase.



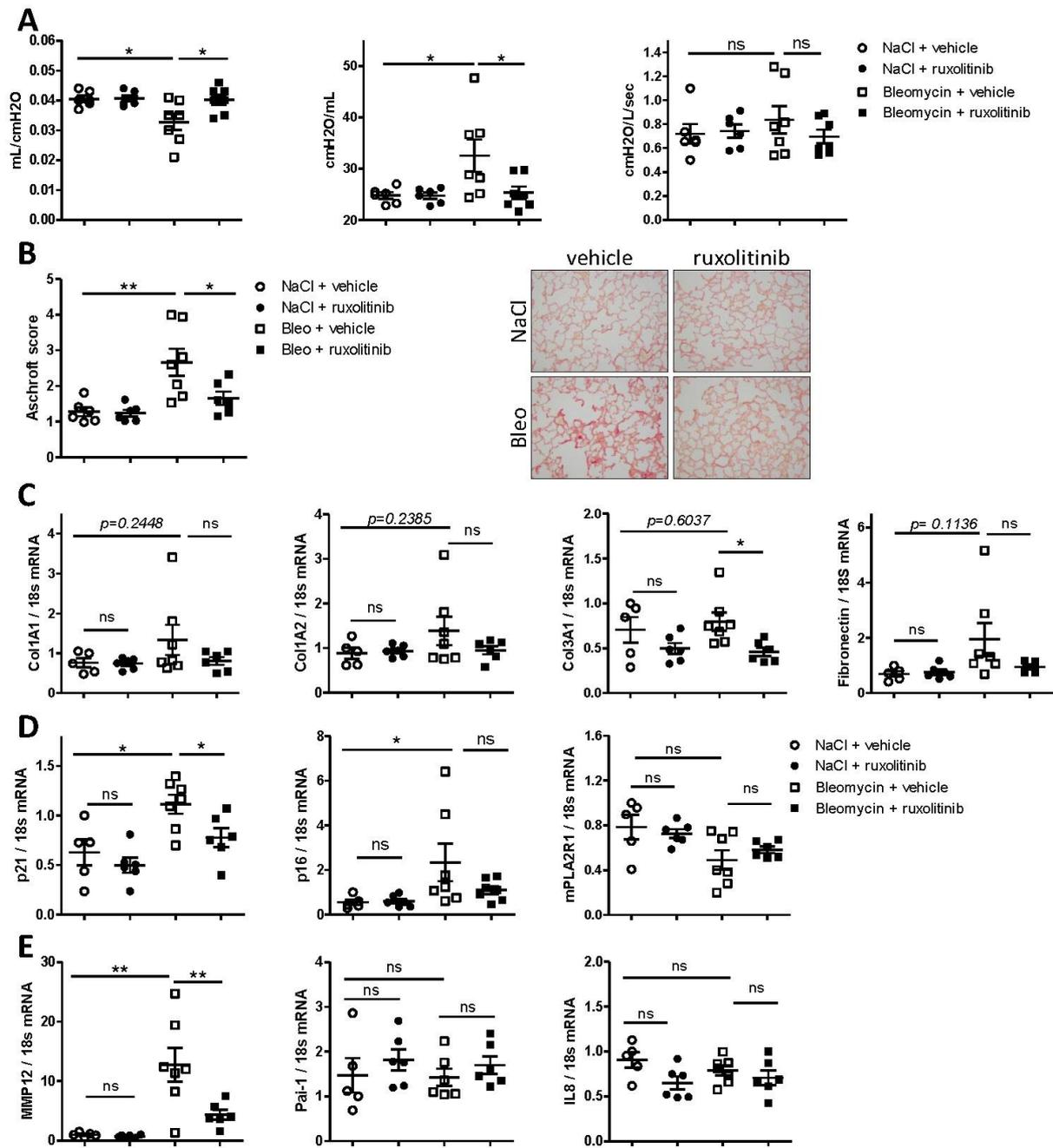
Légende Figure 4 : Les souris C57Bl6/J reçoivent par injection intratrachéale le sérum physiologique (NaCl) ou l'élastase puis sont traitées par le ruxolitinib ou par le véhicule 21 jours après l'injection intratrachéale pendant 15 jours. **A :** Mesure par le FlexiVent, de gauche à droite, de la compliance, l'élastance et la résistance. **B :** Quantification du MLI mesuré sur les coupes histologiques de poumon colorées à l'hématoxyline-éosine.

Objectif 3 : A la suite de nos résultats obtenus dans le premier article, nous avons observé que l'une des altérations pulmonaires qui avait été induite par PLA2R1 était la fibrose pulmonaire. Nous avons donc évalué l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par l'injection intratrachéale de bléomycine chez la souris.

Pour cela, les souris C57Bl6/J ont reçu par injection intratrachéale la bléomycine ou le sérum physiologique et ont été traitées par le ruxolitinib ou le véhicule durant 21 jours. Les mesures des propriétés mécaniques pulmonaires montrent une diminution significative de la compliance, une augmentation de l'élastance et pas d'effet sur la résistance chez les souris ayant reçu la bléomycine par rapport au groupe ayant reçu le sérum physiologique (**Figure 5A**). La bléomycine induit également une augmentation des zones fibrotiques mesurées par l'Ascroft score sur des coupes de poumons colorées au rouge sirius (**Figure 5B**). Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de réduire ces effets induits par la bléomycine avec l'augmentation de la compliance, la diminution de l'élastance ainsi que la diminution de l'Ascroft score.

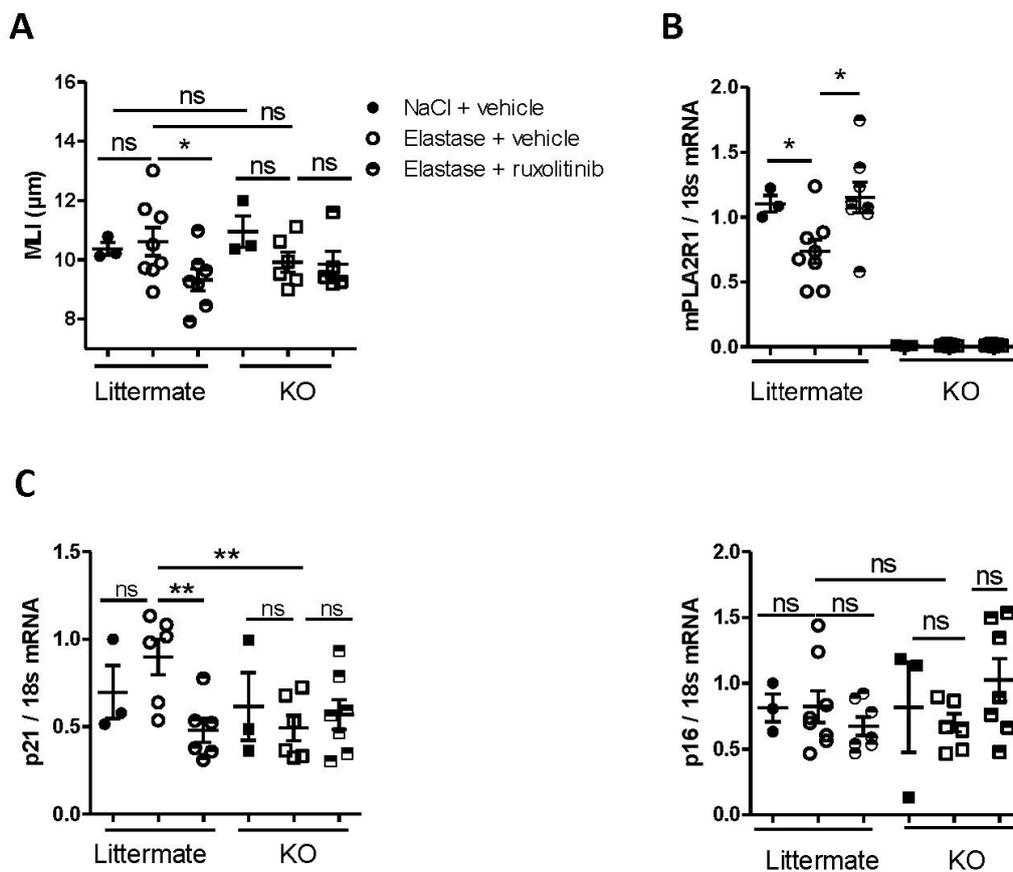
La mesure de l'expression des ARNm des éléments de la matrice extracellulaire, Col1A1, Col1A2, Col3A1 et Fibronectine montre une légère augmentation non significative induite dans le modèle bléomycine (**Figure 5C**). L'analyse à 21 jours après l'injection de bléomycine semble être trop tardive pour évaluer la fibrose pulmonaire dans ce modèle qui semble être atténué.

Cependant, les niveaux d'expression d'ARNm de p21 et p16 sont augmentés dans le groupe bléomycine et l'ARNm de PLA2R1 est inchangé (**Figure 5D**). Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de réduire significativement l'expression de p21 et non significativement l'expression de p16. La quantification d'expression des composants du SASP (MMP-12, PAI-1, IL-8) ne montre qu'une augmentation significative de MMP-12 dans le groupe bléomycine comparé au groupe sérum physiologique (**Figure 5E**). MMP-12 est également diminuée par le traitement au ruxolitinib. Les composants du SASP sont fortement diminués 21 jours après l'injection de bléomycine, il serait intéressant de les mesurer à un temps plus précoce afin d'évaluer l'effet du ruxolitinib sur ces composants. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib permet de diminuer les dépôts de collagènes induits par la bléomycine en réduisant l'expression de p21.



Légende Figure 5 : Les souris C57Bl6/J reçoivent par injection intratrachéale le sérum physiologique (NaCl) ou la bléomycine et sont traitées par le ruxolitinib ou par le véhicule pendant 21 jours. **A :** Mesure par le FlexiVent, de gauche à droite, de la compliance, l'élastance et la résistance. **B :** Quantification Ashcroft score (à gauche), mesuré sur les coupes histologiques de poumon colorées au rouge sirius (à droite). **C :** Mesure de l'expression d'ARNm des protéines de la matrice extracellulaire : Col1A1, Col1A2, Col3A1, Fibronectine. **D :** Mesure de l'expression d'ARNm de p21, p16 et PLA2R1. **E :** Mesure de l'expression d'ARNm des composants du SASP : MMP-12, PAI-1, IL-8. Tests statistiques : Two-way ANOVA avec post-test Bonferroni, ns : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

Objectif 4 : Pour évaluer l'effet du ruxolitinib indépendamment de PLA2R1, nous avons étudié l'effet de l'élastase chez les souris déficientes pour PLA2R1 (PLA2R1 KO) et leurs littermates (Litt). L'injection d'élastase chez les souris Litt n'induit pas d'augmentation du MLI (**Figure 6A**) ni d'augmentation d'expression des ARNm de p21 et p16 comme montré chez les animaux C57Bl6/J (**Figure 6C**). On note que l'injection d'élastase chez ces souris induit une diminution de l'ARNm de PLA2R1 (**Figure 6B**). Chez les souris PLA2R1KO, l'élastase n'induit pas d'augmentation du MLI, ni de modification des niveaux d'expression des ARNm de p21 et de p16. Le fait que l'élastase n'induit pas le phénotype emphysémateux chez les souris Litt retrouvé chez les souris C57Bl6/J (**Figure 2**) ne nous permet pas de conclure sur l'effet du ruxolitinib indépendamment de PLA2R1 dans ce modèle d'emphysème pulmonaire. La diminution de l'ARNm de PLA2R1 chez les littermates ayant reçu l'élastase (**Figure 6B**) pourrait expliquer les effets diminués de l'élastase sur le développement de l'emphysème et l'induction de la sénescence cellulaire par rapport à ce qui a été observé chez les souris C57Bl6/J (**Figure 2**). De nouvelles expériences avec un plus grand nombre de souris seront nécessaires pour valider les effets protecteurs du ruxolitinib indépendamment de PLA2R1 dans ce modèle d'emphysème pulmonaire.

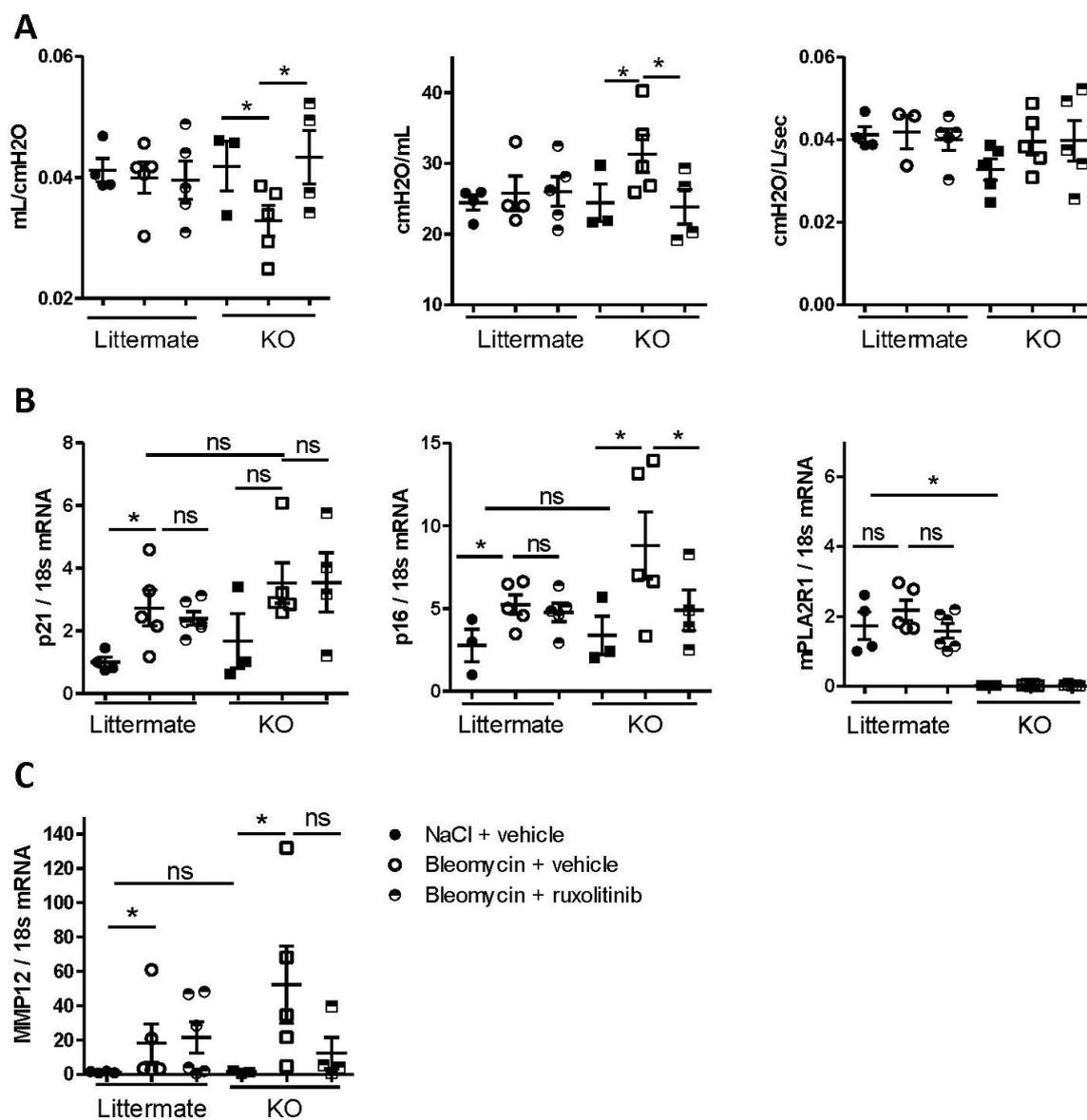


Légende Figure 6 : Les souris PLA2R1KO et les littermates âgées de 4 mois reçoivent par injection intratrachéale le sérum physiologique (NaCl) ou l'élastase et sont traitées par le ruxolitinib ou par le véhicule pendant 21 jours. **A** : Quantification du MLI mesuré sur coupes histologiques colorées à

l'hématoxyline-éosine. **B** : Mesure de l'expression d'ARNm de PLA2R1. **C** : Mesure de l'expression d'ARNm de p21 et p16. Tests statistiques : Two-tailed unpaired T test ; ns : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$.

Nous avons ensuite évalué l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT sur la sénescence cellulaire et le SASP indépendamment de PLA2R1 dans le modèle de fibrose pulmonaire induit par l'injection de bléomycine. Pour cela, ce modèle est évalué chez les souris PLA2R1 KO et leurs littermates. Chez les souris Litt, la bléomycine n'induit pas de modification du niveau de compliance, élastance et résistance (**Figure 7A**). L'expression d'ARNm de PLA2R1 est également inchangée par l'injection de bléomycine chez ces souris (**Figure 7B**). Cependant, les niveaux d'ARNm de p21, p16 et MMP-12 sont augmentés à la suite de l'injection de la bléomycine (**Figure 7 B et C**). Le traitement préventif par le ruxolitinib ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de les transcrits de p21 et p16 et du SASP chez les souris Litt (**Figure 7 B et C**). Chez les souris littermates, la bléomycine n'induisant pas les altérations pulmonaires retrouvées chez les souris C57Bl6/J (**Figure 5**), ne nous permet pas de conclure sur le rôle protecteur du ruxolitinib indépendamment de PLA2R1 dans ce modèle de fibrose pulmonaire.

L'injection de bléomycine chez les PLA2R1KO, à la différence des Litt, induit une diminution de la compliance et une augmentation de l'élastance (**Figure 7A**). La bléomycine chez les PLA2R1KO induit également une augmentation non significative du transcrit de p21 et une augmentation significative des transcrits de p16 et MMP-12 (**Figure 7 B et C**). Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de réduire significativement les effets de la bléomycine sur la compliance, l'élastance (**Figure 7A**), et le niveau de p16 (**Figure 7B**) et de manière non significative le niveau de MMP-12 (**Figure 7C**). Ces résultats obtenus chez les PLA2R1 KO, comparés aux résultats obtenus dans le modèle de fibrose chez les WT, pourraient suggérer un effet protecteur du ruxolitinib sur la sénescence cellulaire et la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine indépendamment de PLA2R1. Cependant, pour conclure sur cet effet, de nouvelles expériences avec un plus grand nombre de souris seront nécessaires pour valider le rôle de PLA2R1 dans ce modèle de fibrose pulmonaire.



Légende Figure 7: Les souris PLA2R1KO et les littermates reçoivent par injection intratrachéale le NaCl ou la bléomycine et sont traitées par le ruxolitinib ou le véhicule jusqu'à 21 jours. **A:** Mesures par le Flexivent, de gauche à droite, de la compliance, l'élastance et la résistance. **B:** Mesure de l'expression d'ARNm de p21, p16 et PLA2R1. **C:** Mesure de l'expression d'ARNm d'un composant du SASP: MMP-12. Test statistiques: Two-tailed unpaired T-test; ns: non significatif; *: p<0.05.

Discussion et perspectives étude 2 :

Dans cette seconde étude nous avons montré l'effet bénéfique du traitement préventif par le ruxolitinib sur l'emphysème et la fibrose pulmonaires par la réduction de la sénescence cellulaire.

Objectif 1 : Chez les souris p16Luc/+, nous avons montré que l'injection d'élastase induisait une sénescence cellulaire dans les poumons réduite par le traitement préventif durant 21 jours par le ruxolitinib.

Objectif 2 : Chez les souris C57Bl6/J l'élastase induit une augmentation de la compliance, une diminution de l'élastance associées à une augmentation du MLI. Le développement de l'emphysème pulmonaire chez ces animaux se trouve associé à une augmentation des marqueurs de la sénescence cellulaire p21 et p16 en ARNm et en protéines ainsi qu'à l'augmentation des composants du SASP. L'injection d'élastase induit également une augmentation de l'expression de PLA2R1 et des gènes cibles de la voie JAK/STAT mais sans activation de la protéine STAT3. Ces résultats suggèrent que la sénescence cellulaire induite dans le modèle d'emphysème pulmonaire induit par l'élastase passe par une activation des voies p21, p16 et PLA2R1/JAK/STAT mais indépendamment de la phosphorylation de STAT3. Dans ce modèle, il serait intéressant de quantifier par Western blot la protéine phosphorylée p-STAT1 qui est également induite par la voie JAK1/JAK2 (Shuai, Ziemiecki et al. 1993) (Stahl, Boulton et al. 1994) et qui semble être activée dans les poumons de patients BPCO (Yew-Booth, Birrell et al. 2015).

Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de diminuer les effets induits par l'élastase sur la compliance, l'élastance et l'emphysème pulmonaire. Cette amélioration phénotypique est associée à une diminution des niveaux de p21 et p16 et de l'expression des composants du SASP. Le ruxolitinib réduit également l'expression de PLA2R1 et l'activation des gènes cibles de la voie JAK/STAT. Le traitement par le ruxolitinib permet donc d'améliorer l'emphysème pulmonaire induit par l'élastase par une diminution de la sénescence cellulaire et du SASP. Si la protéine p-STAT1 est induite dans le modèle élastase, elle pourrait être ciblée par le ruxolitinib. L'évaluation plus détaillée de l'effet du ruxolitinib sur l'activation des STATs nous permettrait de mieux comprendre son effet anti-sénescence et de décrire plus en détail son mécanisme d'action.

Chez les souris C57Bl6/J, l'analyse de l'effet du traitement curatif du ruxolitinib sur le modèle induit par l'élastase montre que 36 jours après injection, les souris n'ont plus d'emphysème pulmonaire visible. Cela suggère une réparation spontanée de l'emphysème pulmonaire induit par l'élastase. Il serait intéressant de commencer le traitement par le ruxolitinib avant cette fenêtre de réparation spontanée pour voir un effet curatif de l'inhibition de la voie JAK/STAT sur l'emphysème pulmonaire.

Objectif 3 : Pour évaluer l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT sur la sénescence cellulaire dans un modèle de fibrose pulmonaire, nous avons étudié l'effet du traitement préventif par le ruxolitinib dans le modèle de fibrose induit par l'injection intratrachéale de bléomycine.

Dans le modèle C57Bl6/J, nous avons mesuré une diminution de la compliance, une augmentation de l'élastance et une augmentation des zones fibrotiques en histologie 21 jours après l'injection de bléomycine. Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de réduire ces effets induits par la bléomycine. Ce modèle de fibrose obtenu 21 jours après l'injection de bléomycine présente de faibles lésions fibrotiques, et une augmentation non significative de l'expression des éléments de la matrice extracellulaire couramment utilisés comme marqueur de fibrose. De nos jours, le modèle de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine est plus souvent évalué à 14 jours après injection de la bléomycine. Il semblerait que les altérations pulmonaires induites par la bléomycine s'atténuent spontanément à partir de 21 jours (Schafer, White et al. 2017). Pour contrer ce phénomène, des chercheurs utilisent des protocoles d'injection de bléomycine répétées plusieurs fois à des doses plus faibles afin de maintenir ce phénotype pathologique dans le temps.

Dans ce modèle de fibrose, nous avons montré une augmentation des transcrits de p21 et p16 et pas d'effet sur l'expression de PLA2R1 dans le groupe ayant reçu la bléomycine par rapport au groupe sérum physiologique. De plus, le traitement préventif par le ruxolitinib induit une diminution de ces transcrits de manière significative pour p21 et non significative pour p16. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib réduit la fibrose pulmonaire par une diminution des marqueurs de sénescence induits par l'injection intratrachéale de bléomycine.

Dans certaines études, la sénescence cellulaire pulmonaire est connue pour être induite par la bléomycine en utilisant des doses de bléomycine plus élevées (entre 3 et 5U/kg) que celle que nous avons utilisée (2U/kg) (Aoshiba, Tsuji et al. 2003, Aoshiba, Tsuji et al. 2013). Les marqueurs de sénescence cellulaire sont augmentés dans différents types de cellules pulmonaires chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (Lomas, Watts et al. 2012, Yanai, Shteinberg et al. 2015). Il serait intéressant pour nos futures expérimentations de mesurer la cinétique de l'induction des marqueurs de la sénescence cellulaire dans le modèle de bléomycine. De plus, dans ce modèle, seul le transcrite de MMP-12 sur les trois composants du SASP mesurés est augmenté. Il est connu que l'inflammation atteint son pic à 7 jours dans le modèle d'injection de la bléomycine (Lim, Park et al. 2015, Schafer, White et al. 2017). Afin d'évaluer de façon plus efficace l'effet de la bléomycine sur la sénescence cellulaire ainsi que sur les composants du SASP, nous devons effectuer un protocole d'évaluation à différents temps afin d'obtenir une référence à 7 et 14 jours. Cela nous permettra d'évaluer les effets de l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib sur un modèle de fibrose pulmonaire plus établi.

Objectif 4 : Pour évaluer si l'action anti-sénescence du ruxolitinib était dépendante de PLA2R1 dans le modèle d'emphysème pulmonaire, nous avons étudié l'effet de l'élastase dans les souris délétées pour PLA2R1 et leurs littermates. L'injection d'élastase chez les souris littermates n'induisant pas les effets retrouvés chez les souris C57Bl6/J, cela ne nous permet pas de conclure sur le rôle de PLA2R1 dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase. La diminution d'expression de l'ARNm de PLA2R1 chez les littermates induite par l'élastase pourrait expliquer les effets diminués de l'élastase sur le développement de l'emphysème et des marqueurs de sénescence cellulaire par rapport aux souris C57Bl6/J. Cette hypothèse doit être vérifiée par de nouvelles expériences sur un plus grand nombre de souris. Le traitement préventif par le ruxolitinib induit une augmentation du transcrite de PLA2R1. Il serait intéressant de comprendre comment PLA2R1 est régulé dans ce modèle d'emphysème pulmonaire chez les littermates. Chez les souris PLA2R1KO, l'élastase n'induit aucun changement de la compliance, de l'élastance, de l'emphysème pulmonaire et des marqueurs de sénescence par rapport au groupe ayant reçu le sérum physiologique. Le fait de ne pas avoir obtenu le développement d'un emphysème pulmonaire par l'injection d'élastase chez les souris littermates, nous empêche de conclure sur le rôle de PLA2R1 dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase.

Pour évaluer l'effet protecteur de l'inhibition de la voie JAK/STAT sur la sénescence cellulaire dans la fibrose pulmonaire indépendamment de PLA2R1, nous avons étudié l'effet du traitement préventif par le ruxolitinib chez les souris PLA2R1KO et leurs littermates.

La bléomycine chez les souris littermates n'a pas d'effet sur la compliance, l'élastance et le niveau d'ARNm de PLA2R1. Comme dans le modèle élastase, nous n'avons pas d'argument à ce jour pour expliquer pourquoi la bléomycine chez ces souris littermates n'induit pas les effets retrouvés chez les souris C57Bl6/J. Le fait que la bléomycine n'induit pas les altérations pulmonaires souhaitées cela nous empêche de tirer des conclusions sur le rôle de PLA2R1 dans le modèle de fibrose. Il est cependant important de noter ici que chez les souris PLA2R1KO, la fibrose pulmonaire et la sénescence cellulaire pulmonaire est induite par la bléomycine et sont diminuées par le traitement préventif par le ruxolitinib. Ces résultats pourraient suggérer un rôle protecteur du ruxolitinib dans ce modèle indépendamment de PLA2R1. De même que dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase, de nouvelles expériences doivent être réalisées sur un plus grand nombre de souris afin de confirmer cette hypothèse.

Objectif 5 : Afin de comprendre si l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib a un effet sur la sénescence cellulaire, sur le SASP ou les deux, nous mettons en place des études *in vitro* sur fibroblastes pulmonaires humains et sur fibroblastes issus des poumons de souris PLA2R1KO et littermates. Nous traitons ces cellules par la bléomycine dans le but de les rendre sénescents puis

nous évaluons l'effet du traitement par le ruxolitinib. Nous nous attendons à un effet protecteur du ruxolitinib et nous évaluerons si cet effet protecteur est dépendant de la diminution de la sénescence cellulaire et ou du SASP. Pour mieux décrire la mécanistique, nous évaluerons l'effet du ruxolitinib sur l'activation ou l'inhibition des voies PLA2R1/JAK/STAT par des analyses transcriptomiques.

Perspectives :

Afin d'évaluer l'effet protecteur du ruxolitinib dans le modèle de fibrose pulmonaire, nous allons étudier ce modèle avec d'autres protocoles d'injection de bléomycine, à différents temps d'analyse et avec des doses plus élevées de bléomycine. L'effet sur l'induction de la sénescence cellulaire sera évalué dans le modèle des p16Luc/+ comme cela a été réalisé dans le modèle d'emphysème pulmonaire induit par l'élastase.

Afin d'approfondir la description de l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT dans les modèles d'emphysème et de fibrose pulmonaires, nous allons analyser par immunohistochimie ou immunohistofluorescence la localisation de p16, PLA2R1 et phospho-JAK2 en co-marquage avec des marqueurs de différents types cellulaires comme les cellules épithéliales alvéolaires ou cellules endothéliales. Cela nous permettra de comprendre si le ruxolitinib permet la réduction de p16 et de phospho-JAK2 dans un type cellulaire pulmonaire particulier et ainsi de mettre en évidence le rôle des différents types cellulaires sénescents dans ces deux altérations pulmonaires.

Ces expérimentations peuvent être couplées à une analyse par RNA-seq afin d'évaluer plus largement quelles sont les cibles du ruxolitinib dans la voie JAK/STAT en analysant l'expression des transcrits de cette voie. Ainsi nous pourrons mieux décrire les effets du ruxolitinib sur la voie JAK/STAT sur la sénescence cellulaire et le SASP. Une fois les cibles du ruxolitinib de la voie JAK/STAT bien identifiées dans ces deux modèles d'altérations pulmonaires, des analyses de CHIP-Seq complémentaires permettraient de comprendre les interactions des acteurs de la voie PLA2R1/JAK/STAT et de définir ainsi quels acteurs moléculaires à la membrane ou dans le cytoplasme jouent un rôle de partenaire avec PLA2R1 dans l'activation de la voie JAK/STAT.

Nous prévoyons également d'examiner l'effet du ruxolitinib sur des souris C57Bl6/J et p16Luc/+ âgées pour voir s'il permet de diminuer les marqueurs de vieillissement associés à la sénescence cellulaire. L'évaluation du traitement curatif du ruxolitinib nous permettra de nous rapprocher des besoins en pathologie humaine, où les patients nécessitent un traitement de la BPCO pour réduire des altérations pulmonaires déjà établies.

Conclusion étude 2 :

Cibler la voie JAK/STAT dans les pathologies pulmonaires peut représenter un enjeu thérapeutique majeur. En effet, le ruxolitinib semble diminuer les altérations pulmonaires induites dans des modèles de souris par la réduction de la sénescence cellulaire. Le ruxolitinib ayant déjà une autorisation de mise sur le marché dans d'autres indications en thérapie humaine cela permettrait d'envisager un repositionnement de ce médicament dans les pathologies pulmonaires.

Conclusions

Pour conclure sur ces travaux de thèse nous confirmons que PLA2R1 est bien augmenté dans les poumons de patients atteints de BPCO et qu'il contribue à l'induction de la sénescence cellulaire induite chez ces patients par l'activation de JAK2. L'inhibition pharmacologique de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib permet de réduire la sénescence cellulaire dans les cellules pulmonaires issues de patients BPCO. Le ruxolitinib permet également de réduire des altérations pulmonaires telles que l'emphysème et la fibrose pulmonaires associées à la sénescence cellulaire induite par la surexpression de PLA2R1 chez la souris. Nous avons également montré un effet bénéfique de l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib dans le modèle d'emphysème induit par l'élastase et le modèle de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine. L'amélioration de ces altérations pulmonaires est associée à la réduction de la sénescence cellulaire. Il serait intéressant de poursuivre ces recherches pour mieux comprendre le mécanisme par lequel agit le ruxolitinib sur l'amélioration des altérations pulmonaires. L'inhibition de la voie JAK/STAT pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour limiter les altérations pulmonaires et la sénescence cellulaire dans les cellules pulmonaires dans les maladies pulmonaires humaines.

Tables des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique des complexes régulant les télomères : le complexe Shelterin et le complexe CST (Turner, Vasu et al. 2019).....	18
Figure 2 : Schéma expliquant la synthèse de l'ADN par les ADN polymérase des brins directe et indirecte. Issu de (Srinivas, Rachakonda et al. 2020)	19
Figure 3 : Schéma représentant les complexes de la télomérase (Srinivas, Rachakonda et al. 2020) .	20
Figure 4 : Schéma illustrant le cycle cellulaire.....	23
Figure 5 : Schéma illustrant l'évolution des chromosomes et de l'ADN au cours du cycle cellulaire...	23
Figure 6 : Activation d'ATM par les cassures d'ADN double brins (Maréchal and Zou 2013).....	25
Figure 7 : La voie p16/Rb régule la progression du cycle cellulaire en phase G1 (Serrano 1997).	31
Figure 8 : Induction des suppresseurs de tumeurs induisant l'arrêt du cycle cellulaire caractéristique des cellules sénescentes (Prieto, Graves et al. 2020).	34
Figure 9 : Modifications nucléaires et cytosoliques caractéristiques des cellules sénescentes (Hernandez-Segura, Nehme et al. 2018).....	39
Figure 10 : La sénescence cellulaire impliquée dans de nombreuses pathologies humaines liées à l'âge : en bleu avec des effets bénéfiques, en rouge délétères et en blanc indéterminés (Muñoz-Espín and Serrano 2014).	42
Figure 11 : Les effets bénéfiques (en vert) et néfastes (en rouge) du SASP. (Prieto, Graves et al. 2020)	43
Figure 12 Schéma montrant le mécanisme des inhibiteurs de BCL-2 (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).....	46
Figure 13: Schéma montrant le mécanisme d'action du FOXO4-DRI (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).....	47
Figure 14: Schéma récapitulant les différents moyens d'inhiber le SASP (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).....	48
Figure 15: Représentation schématique d'une unité terminale respiratoire.	50
Figure 16: Micrographie électronique à balayage du parenchyme pulmonaire humain (Murray 2010)	50
Figure 17: Schéma comparant les petites voies respiratoires d'un sujet sain (à gauche) à un sujet atteint de la BPCO (à droite) (Barnes, Burney et al. 2015).....	53
Figure 18: Schéma expliquant le remodelage des petites voies respiratoires. A gauche, la structure de l'épithélium chez un individu sain, à droite, le remodelage induit chez un patient BPCO (Hadzic, Wu et al. 2020).....	58
Figure 19: Destruction du parenchyme pulmonaire observée chez les patients BPCO (en bas) représentée sur des coupes Hematoxiline Eosine (Hadzic, Wu et al. 2020).....	59
Figure 20 : Schéma représentant les voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire (Chanda, Otoupalova et al. 2019).....	76
Figure 21: Schéma représentant les différents domaines du récepteur PLA2R1. Issu de (Bernard and Vindrieux 2014).	86
Figure 22: Le blocage d'expression de PLA2R1 augmente la capacité de doublement de population et diminue le nombre de cellule positives à la Béta-galactosidase.....	89
Figure 23: Schéma explicatif de la découverte des protéines STATs activées en réponse aux INF- α et INF- γ (Darnell, Kerr et al. 1994).....	100
Figure 24: Schéma résumant les différentes activations des JAK/STAT par les interférons (Espert, Dusanter-Fourt et al. 2005).	101

Figure 25: Schéma expliquant l'activation des voies JAK/STAT par la liaison d'une cytokine à son récepteur spécifique.	103
Figure 26: Structure de la protéine STAT. Figure extraite de (Levy and Darnell 2002).....	104
Figure 27: Représentation de la molécule du ruxolitinib ou INCB018424	109
Figure 28: Figure issue de Zhang, Liang et al 2017 montrant la réduction de la fibrose pulmonaire par l'inhibition de JAK1/2 par le traitement au ruxolitinib.....	114
Figure 29: Schéma représentant le rôle du récepteur PLA2R1 dans l'induction de la sénescence cellulaire par l'activation de la voie JAK/STAT.....	118

Tables des tableaux

Tableau 1: Composés sénolytiques et sénomorphiques en cours d'essais cliniques ou approuvés (Childs, Gluscevic et al. 2017).....	45
Tableau 2: Sénomorphiques utilisés ou à l'étude à ce jour (Di Micco, Krizhanovsky et al. 2021).	46
Tableau 3 : Récapitulatif des voies des JAK/STAT activées par chacune des cytokines. Tableau issu de : Vignais, ML, Protéines JAK et STAT dans la signalisation cellulaire, Med Sci (Paris), 1997, Vol. 13, N° 11; p.1277-84	102

BIBLIOGRAPHIE

- Acosta**, J. C., A. Banito, T. Wuestefeld, A. Georgilis, P. Janich, J. P. Morton, D. Athineos, T. W. Kang, F. Lasitschka, M. Andrulis, G. Pascual, K. J. Morris, S. Khan, H. Jin, G. Dharmalingam, A. P. Snijders, T. Carroll, D. Capper, C. Pritchard, G. J. Inman, T. Longerich, O. J. Sansom, S. A. Benitah, L. Zender and J. Gil (2013). "A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence." *Nat Cell Biol* **15**(8): 978-990.
- Adcock**, I. M., S. Mumby and G. Caramori (2018). "Breaking news: DNA damage and repair pathways in COPD and implications for pathogenesis and treatment." *Eur Respir J* **52**(4).
- Ahmad**, T., I. K. Sundar, A. M. Tormos, C. A. Lerner, J. Gerloff, H. Yao and I. Rahman (2017). "Shelterin Telomere Protection Protein 1 Reduction Causes Telomere Attrition and Cellular Senescence via Sirtuin 1 Deacetylase in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Am J Respir Cell Mol Biol* **56**(1): 38-49.
- Alder**, J. K., J. J. Chen, L. Lancaster, S. Danoff, S. C. Su, J. D. Cogan, I. Vulto, M. Xie, X. Qi, R. M. Tuder, J. A. Phillips, 3rd, P. M. Lansdorp, J. E. Loyd and M. Y. Armanios (2008). "Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35): 13051-13056.
- Alder**, J. K., N. Guo, F. Kembou, E. M. Parry, C. J. Anderson, A. I. Gorgy, M. F. Walsh, T. Sussan, S. Biswal, W. Mitzner, R. M. Tuder and M. Armanios (2011). "Telomere length is a determinant of emphysema susceptibility." *Am J Respir Crit Care Med* **184**(8): 904-912.
- Amsellem**, V., G. Gary-Bobo, E. Marcos, B. Maitre, V. Chaar, P. Validire, J. B. Stern, H. Noureddine, E. Sapin, D. Rideau, S. Hue, P. Le Corvoisier, S. Le Gouvello, J. L. Dubois-Randé, J. Boczkowski and S. Adnot (2011). "Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **184**(12): 1358-1366.
- Ancian**, P., G. Lambeau and M. Lazdunski (1995). "Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A2." *Biochemistry* **34**(40): 13146-13151.
- Ancian**, P., G. Lambeau, M. G. Mattéi and M. Lazdunski (1995). "The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization." *J Biol Chem* **270**(15): 8963-8970.
- Aoshiba**, K., T. Tsuji, S. Kameyama, M. Itoh, S. Semba, K. Yamaguchi and H. Nakamura (2013). "Senescence-associated secretory phenotype in a mouse model of bleomycin-induced lung injury." *Exp Toxicol Pathol* **65**(7-8): 1053-1062.
- Aoshiba**, K., T. Tsuji and A. Nagai (2003). "Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells." *Eur Respir J* **22**(3): 436-443.
- Aoshiba**, K., F. Zhou, T. Tsuji and A. Nagai (2012). "DNA damage as a molecular link in the pathogenesis of COPD in smokers." *Eur Respir J* **39**(6): 1368-1376.
- Augert**, A., C. Payré, Y. de Launoit, J. Gil, G. Lambeau and D. Bernard (2009). "The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway." *EMBO Rep* **10**(3): 271-277.
- Augert**, A., D. Vindrieux, C. A. Girard, B. Le Calvé, B. Gras, M. Ferrand, B. P. Bouchet, A. Puisieux, Y. de Launoit, H. Simonnet, G. Lambeau and D. Bernard (2013). "PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress." *Free Radic Biol Med* **65**: 969-977.
- Baker**, D. J., B. G. Childs, M. Durik, M. E. Wijers, C. J. Sieben, J. Zhong, R. A. Saltness, K. B. Jeganathan, G. C. Verzosa, A. Pezeshki, K. Khazaie, J. D. Miller and J. M. van Deursen (2016). "Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan." *Nature* **530**(7589): 184-189.
- Baker**, D. J., C. Perez-Terzic, F. Jin, K. S. Pitel, N. J. Niederländer, K. Jeganathan, S. Yamada, S. Reyes, L. Rowe, H. J. Hiddinga, N. L. Eberhardt, A. Terzic and J. M. van Deursen (2008). "Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency." *Nat Cell Biol* **10**(7): 825-836.

Barnes, P. J. (2017). "Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD." *Clin Sci (Lond)* **131**(13): 1541-1558.

Barnes, P. J. (2017). "Senescence in COPD and Its Comorbidities." *Annu Rev Physiol* **79**: 517-539.

Barnes, P. J., P. G. Burney, E. K. Silverman, B. R. Celli, J. Vestbo, J. A. Wedzicha and E. F. Wouters (2015). "Chronic obstructive pulmonary disease." *Nat Rev Dis Primers* **1**: 15076.

Barreiro, E., X. Wang and J. Tang (2019). "COPD: preclinical models and emerging therapeutic targets." *Expert Opin Ther Targets* **23**(10): 829-838.

Baumgartner, K. B., J. M. Samet, C. A. Stidley, T. V. Colby and J. A. Waldron (1997). "Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis." *Am J Respir Crit Care Med* **155**(1): 242-248.

Berg, K. and J. L. Wright (2016). "The Pathology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Progress in the 20th and 21st Centuries." *Arch Pathol Lab Med* **140**(12): 1423-1428.

Bernard, D. and D. Vindrieux (2014). "PLA2R1: expression and function in cancer." *Biochim Biophys Acta* **1846**(1): 40-44.

Brandsma, C. A., M. de Vries, R. Costa, R. R. Woldhuis, M. Königshoff and W. Timens (2017). "Lung ageing and COPD: is there a role for ageing in abnormal tissue repair?" *Eur Respir Rev* **26**(146).

Brandsma, C. A., M. Van den Berge, T. L. Hackett, G. Brusselle and W. Timens (2020). "Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: from disease mechanisms to precision medicine." *J Pathol* **250**(5): 624-635.

Bringold, F. and M. Serrano (2000). "Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence." *Exp Gerontol* **35**(3): 317-329.

Burke, J. E. and E. A. Dennis (2009). "Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling." *J Lipid Res* **50 Suppl**(Suppl): S237-242.

Chakraborty, D., B. Šumová, T. Mallano, C. W. Chen, A. Distler, C. Bergmann, I. Ludolph, R. E. Horch, K. Gelse, A. Ramming, O. Distler, G. Schett, L. Šenolt and J. H. W. Distler (2017). "Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis." *Nat Commun* **8**(1): 1130.

Chanda, D., E. Otoupalova, S. R. Smith, T. Volckaert, S. P. De Langhe and V. J. Thannickal (2019). "Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis." *Mol Aspects Med* **65**: 56-69.

Chandra, T. and K. Kirschner (2016). "Chromosome organisation during ageing and senescence." *Curr Opin Cell Biol* **40**: 161-167.

Chandra, T., K. Kirschner, J. Y. Thuret, B. D. Pope, T. Ryba, S. Newman, K. Ahmed, S. A. Samarajiwa, R. Salama, T. Carroll, R. Stark, R. Janky, M. Narita, L. Xue, A. Chicas, S. Nñez, R. Janknecht, Y. Hayashi-Takanaka, M. D. Wilson, A. Marshall, D. T. Odom, M. M. Babu, D. P. Bazett-Jones, S. Tavaré, P. A. Edwards, S. W. Lowe, H. Kimura, D. M. Gilbert and M. Narita (2012). "Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation." *Mol Cell* **47**(2): 203-214.

Chapman, K. R., J. G. Burdon, E. Piitulainen, R. A. Sandhaus, N. Seersholm, J. M. Stocks, B. C. Stoel, L. Huang, Z. Yao, J. M. Edelman and N. G. McElvaney (2015). "Intravenous augmentation treatment and lung density in severe α 1 antitrypsin deficiency (RAPID): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Lancet* **386**(9991): 360-368.

Chen, J. and J. Stubbe (2005). "Bleomycins: towards better therapeutics." *Nat Rev Cancer* **5**(2): 102-112.

Chen, Q., A. Fischer, J. D. Reagan, L. J. Yan and B. N. Ames (1995). "Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4337-4341.

Chen, Z., L. C. Trotman, D. Shaffer, H. K. Lin, Z. A. Dotan, M. Niki, J. A. Koutcher, H. I. Scher, T. Ludwig, W. Gerald, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi (2005). "Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis." *Nature* **436**(7051): 725-730.

Cheng, X. Y., Y. Y. Li, C. Huang, J. Li and H. W. Yao (2017). "AMP-activated protein kinase reduces inflammatory responses and cellular senescence in pulmonary emphysema." *Oncotarget* **8**(14): 22513-22523.

Childs, B. G., D. J. Baker, T. Wijshake, C. A. Conover, J. Campisi and J. M. van Deursen (2016). "Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis." *Science* **354**(6311): 472-477.

Childs, B. G., M. Gluscevic, D. J. Baker, R. M. Laberge, D. Marquess, J. Dananberg and J. M. van Deursen (2017). "Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing." *Nat Rev Drug Discov* **16**(10): 718-735.

Chilosi, M., A. Carloni, A. Rossi and V. Poletti (2013). "Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and COPD/emphysema." *Transl Res* **162**(3): 156-173.

Churg, A., R. D. Wang, H. Tai, X. Wang, C. Xie and J. L. Wright (2004). "Tumor necrosis factor-alpha drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse." *Am J Respir Crit Care Med* **170**(5): 492-498.

Coppé, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Muñoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez and J. Campisi (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." *PLoS Biol* **6**(12): 2853-2868.

Córdoba-Lanús, E., S. Cazorla-Rivero, A. Espinoza-Jiménez, J. P. de-Torres, M. J. Pajares, A. Aguirre-Jaime, B. Celli and C. Casanova (2017). "Telomere shortening and accelerated aging in COPD: findings from the BODE cohort." *Respir Res* **18**(1): 59.

d'Adda di Fagagna, F. (2008). "Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response." *Nat Rev Cancer* **8**(7): 512-522.

Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr and G. R. Stark (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." *Science* **264**(5164): 1415-1421.

Dees, C., S. Pötter, Y. Zhang, C. Bergmann, X. Zhou, M. Luber, T. Wohlfahrt, E. Karouzakis, A. Ramming, K. Gelse, A. Yoshimura, R. Jaenisch, O. Distler, G. Schett and J. H. Distler (2020). "TGF- β -induced epigenetic deregulation of SOCS3 facilitates STAT3 signaling to promote fibrosis." *J Clin Invest* **130**(5): 2347-2363.

Deslee, G., J. C. Woods, C. M. Moore, L. Liu, S. H. Conradi, M. Milne, D. S. Gierada, J. Pierce, A. Patterson, R. A. Lewit, J. T. Battaile, M. J. Holtzman, J. C. Hogg and R. A. Pierce (2009). "Elastin expression in very severe human COPD." *Eur Respir J* **34**(2): 324-331.

Di Micco, R., V. Krizhanovsky, D. Baker and F. d'Adda di Fagagna (2021). "Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities." *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**(2): 75-95.

Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith and et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-9367.

Easter, M., S. Bollenbecker, J. W. Barnes and S. Krick (2020). "Targeting Aging Pathways in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Int J Mol Sci* **21**(18).

Even, B., S. Fayad-Kobeissi, J. M. Gagliolo, R. Motterlini, J. Boczkowski, R. Foresti and M. Dagouassat (2018). "Heme oxygenase-1 induction attenuates senescence in chronic obstructive pulmonary disease lung fibroblasts by protecting against mitochondria dysfunction." *Aging Cell* **17**(6): e12837.

Fabbri, E., Y. An, M. Zoli, E. M. Simonsick, J. M. Guralnik, S. Bandinelli, C. M. Boyd and L. Ferrucci (2015). "Aging and the burden of multimorbidity: associations with inflammatory and anabolic hormonal biomarkers." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **70**(1): 63-70.

Fisher, D. A. C., C. A. Miner, E. K. Engle, H. Hu, T. B. Collins, A. Zhou, M. J. Allen, O. N. Malkova and S. T. Oh (2019). "Cytokine production in myelofibrosis exhibits differential responsiveness to JAK-STAT, MAP kinase, and NF κ B signaling." *Leukemia* **33**(8): 1978-1995.

Foreman-Wykert, A. K., Y. Weinrauch, P. Elsbach and J. Weiss (1999). "Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria." *J Clin Invest* **103**(5): 715-721.

Freund, A., A. V. Orjalo, P. Y. Desprez and J. Campisi (2010). "Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences." *Trends Mol Med* **16**(5): 238-246.

Freund, A., C. K. Patil and J. Campisi (2011). "p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype." *Embo j* **30**(8): 1536-1548.

Furue, S., K. Kuwabara, K. Mikawa, K. Nishina, M. Shiga, N. Maekawa, M. Ueno, Y. Chikazawa, T. Ono, Y. Hori, A. Matsukawa, M. Yoshinaga and H. Obara (1999). "Crucial role of group IIA phospholipase A(2) in oleic acid-induced acute lung injury in rabbits." *Am J Respir Crit Care Med* **160**(4): 1292-1302.

Furue, S., K. Mikawa, K. Nishina, M. Shiga, M. Ueno, Y. Tomita, K. Kuwabara, I. Teshirogi, T. Ono, Y. Hori, A. Matsukawa, M. Yoshinaga and H. Obara (2001). "Therapeutic time-window of a group IIA phospholipase A2 inhibitor in rabbit acute lung injury: correlation with lung surfactant protection." *Crit Care Med* **29**(4): 719-727.

Gohy, S. T., C. Hupin, C. Fregimilicka, B. R. Detry, C. Bouzin, H. Gaide Chevronay, M. Lecocq, B. Weynand, M. Z. Ladjemi, C. E. Pierreux, P. Birembaut, M. Polette and C. Pilette (2015). "Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition." *Eur Respir J* **45**(5): 1258-1272.

Granata, F., V. Nardicchi, S. Loffredo, A. Frattini, R. Ilaria Staiano, C. Agostini and M. Triggiani (2009). "Secreted phospholipases A(2): A proinflammatory connection between macrophages and mast cells in the human lung." *Immunobiology* **214**(9-10): 811-821.

Granata, F., A. Petraroli, E. Boilard, S. Bezzine, J. Bollinger, L. Del Vecchio, M. H. Gelb, G. Lambeau, G. Marone and M. Triggiani (2005). "Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor." *J Immunol* **174**(1): 464-474.

Griveau, A., G. Devailly, L. Eberst, N. Navaratnam, B. Le Calvé, M. Ferrand, P. Faull, A. Augert, R. Dante, J. M. Vanacker, D. Vindrieux and D. Bernard (2016). "The PLA2R1-JAK2 pathway upregulates ER α and its mitochondrial program to exert tumor-suppressive action." *Oncogene* **35**(38): 5033-5042.

Griveau, A., C. Wiel, B. Le Calvé, D. V. Ziegler, S. Djebali, M. Warnier, N. Martin, J. Marvel, D. Vindrieux, M. O. Bergo and D. Bernard (2018). "Targeting the phospholipase A2 receptor ameliorates premature aging phenotypes." *Aging Cell* **17**(6): e12835.

Griveau, A., C. Wiel, D. V. Ziegler, M. O. Bergo and D. Bernard (2020). "The JAK1/2 inhibitor ruxolitinib delays premature aging phenotypes." *Aging Cell* **19**(4): e13122.

Hanasaki, K. and H. Arita (1999). "Biological and pathological functions of phospholipase A(2) receptor." *Arch Biochem Biophys* **372**(2): 215-223.

Hanasaki, K. and H. Arita (2002). "Phospholipase A2 receptor: a regulator of biological functions of secretory phospholipase A2." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 71-82.

Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* **345**(6274): 458-460.

Hashimoto, M., A. Asai, H. Kawagishi, R. Mikawa, Y. Iwashita, K. Kanayama, K. Sugimoto, T. Sato, M. Maruyama and M. Sugimoto (2016). "Elimination of p19(ARF)-expressing cells enhances pulmonary function in mice." *JCI Insight* **1**(12): e87732.

Hautamaki, R. D., D. K. Kobayashi, R. M. Senior and S. D. Shapiro (1997). "Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice." *Science* **277**(5334): 2002-2004.

Hernandez-Segura, A., J. Nehme and M. Demaria (2018). "Hallmarks of Cellular Senescence." *Trends Cell Biol* **28**(6): 436-453.

Higham, A., A. M. Quinn, J. E. D. Cançado and D. Singh (2019). "The pathology of small airways disease in COPD: historical aspects and future directions." *Respir Res* **20**(1): 49.

Hou, J., U. Schindler, W. J. Henzel, T. C. Ho, M. Basseur and S. L. McKnight (1994). "An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat." *Science* **265**(5179): 1701-1706.

Houben, J. M., E. M. Mercken, H. B. Ketelslegers, A. Bast, E. F. Wouters, G. J. Hageman and A. M. Schols (2009). "Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease." *Respir Med* **103**(2): 230-236.

Houssaini, A., M. Breau, K. Kebe, S. Abid, E. Marcos, L. Lipskaia, D. Rideau, A. Parpaleix, J. Huang, V. Amsellem, N. Vienney, P. Validire, B. Maitre, A. Attwe, C. Lukas, D. Vindrieux, J. Boczkowski, G. Derumeaux, M. Pende, D. Bernard, S. Meiners and S. Adnot (2018). "mTOR pathway activation drives lung cell senescence and emphysema." *JCI Insight* **3**(3).

Hubackova, S., Z. Novakova, K. Krejcikova, M. Kosar, J. Dobrovolna, P. Duskova, H. Hanzlikova, M. Vancurova, P. Barath, J. Bartek and Z. Hodny (2010). "Regulation of the PML tumor suppressor in drug-induced senescence of human normal and cancer cells by JAK/STAT-mediated signaling." Cell Cycle **9**(15): 3085-3099.

Hübner, R. H., W. Gitter, N. E. El Mokhtari, M. Mathiak, M. Both, H. Bolte, S. Freitag-Wolf and B. Bewig (2008). "Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples." Biotechniques **44**(4): 507-511, 514-507.

Hung, C., G. Linn, Y. H. Chow, A. Kobayashi, K. Mittelsteadt, W. A. Altemeier, S. A. Gharib, L. M. Schnapp and J. S. Duffield (2013). "Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **188**(7): 820-830.

Hwang, E. S., G. Yoon and H. T. Kang (2009). "A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging." Cell Mol Life Sci **66**(15): 2503-2524.

Hwang, J. W., S. Rajendrasozhan, H. Yao, S. Chung, I. K. Sundar, H. L. Huyck, G. S. Pryhuber, V. L. Kinnula and I. Rahman (2011). "FOXO3 deficiency leads to increased susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation, airspace enlargement, and chronic obstructive pulmonary disease." J Immunol **187**(2): 987-998.

Imada, K. and W. J. Leonard (2000). "The Jak-STAT pathway." Mol Immunol **37**(1-2): 1-11.

Ingebrigtsen, T., S. F. Thomsen, J. Vestbo, S. van der Sluis, K. O. Kyvik, E. K. Silverman, M. Svartengren and V. Backer (2010). "Genetic influences on Chronic Obstructive Pulmonary Disease - a twin study." Respir Med **104**(12): 1890-1895.

Itahana, K., G. Dimri and J. Campisi (2001). "Regulation of cellular senescence by p53." Eur J Biochem **268**(10): 2784-2791.

Ivanov, A., J. Pawlikowski, I. Manoharan, J. van Tuyn, D. M. Nelson, T. S. Rai, P. P. Shah, G. Hewitt, V. I. Korolchuk, J. F. Passos, H. Wu, S. L. Berger and P. D. Adams (2013). "Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence." J Cell Biol **202**(1): 129-143.

Jiang, C., G. Liu, T. Luckhardt, V. Antony, Y. Zhou, A. B. Carter, V. J. Thannickal and R. M. Liu (2017). "Serpine 1 induces alveolar type II cell senescence through activating p53-p21-Rb pathway in fibrotic lung disease." Aging Cell **16**(5): 1114-1124.

Jin, M., E. C. Lee, S. W. Ra, N. Fishbane, S. Tam, G. J. Criner, P. G. Woodruff, S. C. Lazarus, R. Albert, J. E. Connett, M. K. Han, F. J. Martinez, S. D. Aaron, R. M. Reed, S. F. P. Man, J. M. Leung and D. D. Sin (2018). "Relationship of Absolute Telomere Length With Quality of Life, Exacerbations, and Mortality in COPD." Chest **154**(2): 266-273.

Jones, B., C. Donovan, G. Liu, H. M. Gomez, V. Chimankar, C. L. Harrison, C. H. Wiegman, I. M. Adcock, D. A. Knight, J. A. Hirota and P. M. Hansbro (2017). "Animal models of COPD: What do they tell us?" Respirology **22**(1): 21-32.

Justice, J. N., A. M. Nambiar, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, R. Pascual, S. K. Hashmi, L. Prata, M. M. Masternak, S. B. Kritchevsky, N. Musi and J. L. Kirkland (2019). "Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study." EBioMedicine **40**: 554-563.

Kaur, A., S. K. Mathai and D. A. Schwartz (2017). "Genetics in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathogenesis, Prognosis, and Treatment." Front Med (Lausanne) **4**: 154.

Kojima, H., H. Kunitomo, T. Inoue and K. Nakajima (2012). "The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts." Cell Cycle **11**(4): 730-739.

Kong, X., D. Feng, H. Wang, F. Hong, A. Bertola, F. S. Wang and B. Gao (2012). "Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice." Hepatology **56**(3): 1150-1159.

Königshoff, M., M. Kramer, N. Balsara, J. Wilhelm, O. V. Amarie, A. Jahn, F. Rose, L. Fink, W. Seeger, L. Schaefer, A. Günther and O. Eickelberg (2009). "WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis." J Clin Invest **119**(4): 772-787.

Kumar, M., W. Seeger and R. Voswinckel (2014). "Senescence-associated secretory phenotype and its possible role in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Cell Mol Biol **51**(3): 323-333.

Laberge, R. M., D. Adler, M. DeMaria, N. Mechtouf, R. Teachenor, G. B. Cardin, P. Y. Desprez, J. Campisi and F. Rodier (2013). "Mitochondrial DNA damage induces apoptosis in senescent cells." *Cell Death Dis* **4**(7): e727.

Lambeau, G., P. Ancian, J. Barhanin and M. Lazdunski (1994). "Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2." *J Biol Chem* **269**(3): 1575-1578.

Lambeau, G., A. Schmid-Alliana, M. Lazdunski and J. Barhanin (1990). "Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle." *J Biol Chem* **265**(16): 9526-9532.

Lee, A. C., B. E. Fenster, H. Ito, K. Takeda, N. S. Bae, T. Hirai, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, B. H. Howard and T. Finkel (1999). "Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species." *J Biol Chem* **274**(12): 7936-7940.

Lee, J., A. J. Sandford, J. E. Connett, J. Yan, T. Mui, Y. Li, D. Daley, N. R. Anthonisen, A. Brooks-Wilson, S. F. Man and D. D. Sin (2012). "The relationship between telomere length and mortality in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)." *PLoS One* **7**(4): e35567.

Lee, S., C. A. Schmitt and M. Reimann (2011). "The Myc/macrophage tango: oncogene-induced senescence, Myc style." *Semin Cancer Biol* **21**(6): 377-384.

Lehmann, M., M. Korfei, K. Mutze, S. Klee, W. Skronska-Wasek, H. N. Alsafadi, C. Ota, R. Costa, H. B. Schiller, M. Lindner, D. E. Wagner, A. Günther and M. Königshoff (2017). "Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo." *Eur Respir J* **50**(2).

Leopold, J. G. and J. Gough (1957). "The centrilobular form of hypertrophic emphysema and its relation to chronic bronchitis." *Thorax* **12**(3): 219-235.

Letsiou, E., Y. M. Htwe and S. M. Dudek (2021). "Secretory Phospholipase A(2) Enzymes in Acute Lung Injury." *Cell Biochem Biophys*: 1-9.

Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 651-662.

Li, J., S. Sun, R. Tang, H. Qiu, Q. Huang, T. G. Mason and L. Tian (2016). "Major air pollutants and risk of COPD exacerbations: a systematic review and meta-analysis." *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **11**: 3079-3091.

Lim, H., H. Park and H. P. Kim (2015). "Effects of flavonoids on senescence-associated secretory phenotype formation from bleomycin-induced senescence in BJ fibroblasts." *Biochem Pharmacol* **96**(4): 337-348.

Lomas, N. J., K. L. Watts, K. M. Akram, N. R. Forsyth and M. A. Spiteri (2012). "Idiopathic pulmonary fibrosis: immunohistochemical analysis provides fresh insights into lung tissue remodelling with implications for novel prognostic markers." *Int J Clin Exp Pathol* **5**(1): 58-71.

Lopes-Paciencia, S., E. Saint-Germain, M. C. Rowell, A. F. Ruiz, P. Kalegari and G. Ferbeyre (2019). "The senescence-associated secretory phenotype and its regulation." *Cytokine* **117**: 15-22.

Lu, T. and T. Finkel (2008). "Free radicals and senescence." *Exp Cell Res* **314**(9): 1918-1922.

Ma, X., R. Chen, X. Liu, J. Xie, K. Si and L. Duan (2013). "Effects of matrine on JAK-STAT signaling transduction pathways in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." *Afr J Tradit Complement Altern Med* **10**(3): 442-448.

Maréchal, A. and L. Zou (2013). "DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(9).

Menschikowski, M., A. Hagelgans, B. Nacke, C. Jandek, O. Sukocheva and G. Siegert (2015). "Epigenetic control of phospholipase A2 receptor expression in mammary cancer cells." *BMC Cancer* **15**: 971.

Menschikowski, M., U. Platzbecker, A. Hagelgans, M. Vogel, C. Thiede, C. Schönefeldt, R. Lehnert, G. Eisenhofer and G. Siegert (2012). "Aberrant methylation of the M-type phospholipase A(2) receptor gene in leukemic cells." *BMC Cancer* **12**: 576.

Merrilees, M. J., P. S. Ching, B. Beaumont, A. Hinek, T. N. Wight and P. N. Black (2008). "Changes in elastin, elastin binding protein and versican in alveoli in chronic obstructive pulmonary disease." *Respir Res* **9**(1): 41.

Milara, J., T. Peiró, A. Serrano and J. Cortijo (2013). "Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke." *Thorax* **68**(5): 410-420.

Mirzayans, R., B. Andrais, G. Hansen and D. Murray (2012). "Role of p16(INK4A) in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells." *Biochem Res Int* **2012**: 951574.

Molloy, K., C. P. Hersh, V. B. Morris, T. P. Carroll, C. A. O'Connor, J. A. Lasky-Su, C. M. Greene, S. J. O'Neill, E. K. Silverman and N. G. McElvaney (2014). "Clarification of the risk of chronic obstructive pulmonary disease in α 1-antitrypsin deficiency PiMZ heterozygotes." *Am J Respir Crit Care Med* **189**(4): 419-427.

Morlá, M., X. Busquets, J. Pons, J. Sauleda, W. MacNee and A. G. Agustí (2006). "Telomere shortening in smokers with and without COPD." *Eur Respir J* **27**(3): 525-528.

Mui, T. S., J. M. Man, J. E. McElhaney, A. J. Sandford, H. O. Coxson, C. L. Birmingham, Y. Li, S. F. Man and D. D. Sin (2009). "Telomere length and chronic obstructive pulmonary disease: evidence of accelerated aging." *J Am Geriatr Soc* **57**(12): 2372-2374.

Müller, K. C., L. Welker, K. Paasch, B. Feindt, V. J. Erpenbeck, J. M. Hohlfeld, N. Krug, M. Nakashima, D. Branscheid, H. Magnussen, R. A. Jörres and O. Holz (2006). "Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro." *Respir Res* **7**(1): 32.

Muñoz-Espín, D. and M. Serrano (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(7): 482-496.

Muñoz, N. M., A. Y. Meliton, L. N. Meliton, S. M. Dudek and A. R. Leff (2009). "Secretory group V phospholipase A2 regulates acute lung injury and neutrophilic inflammation caused by LPS in mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**(6): L879-887.

Murakami, M. and I. Kudo (2002). "Phospholipase A2." *J Biochem* **131**(3): 285-292.

Murray, J. F. (2010). "The structure and function of the lung." *Int J Tuberc Lung Dis* **14**(4): 391-396.

Nagase, T., N. Uozumi, S. Ishii, Y. Kita, H. Yamamoto, E. Ohga, Y. Ouchi and T. Shimizu (2002). "A pivotal role of cytosolic phospholipase A(2) in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." *Nat Med* **8**(5): 480-484.

Naikawadi, R. P., S. Disayabutr, B. Mallavia, M. L. Donne, G. Green, J. L. La, J. R. Rock, M. R. Looney and P. J. Wolters (2016). "Telomere dysfunction in alveolar epithelial cells causes lung remodeling and fibrosis." *JCI Insight* **1**(14): e86704.

Nicolas, J. P., G. Lambeau and M. Lazdunski (1995). "Identification of the binding domain for secretory phospholipases A2 on their M-type 180-kDa membrane receptor." *J Biol Chem* **270**(48): 28869-28873.

Nolin, J. D., R. C. Murphy, M. H. Gelb, W. A. Altemeier, W. R. Henderson, Jr. and T. S. Hallstrand (2019). "Function of secreted phospholipase A(2) group-X in asthma and allergic disease." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* **1864**(6): 827-837.

Noureddine, H., G. Gary-Bobo, M. Alifano, E. Marcos, M. Saker, N. Vienney, V. Amsellem, B. Maitre, A. Chaouat, C. Chouaid, J. L. Dubois-Rande, D. Damotte and S. Adnot (2011). "Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease." *Circ Res* **109**(5): 543-553.

Novakova, Z., S. Hubackova, M. Kosar, L. Janderova-Rossmeislova, J. Dobrovolna, P. Vasicova, M. Vancurova, Z. Horejsi, P. Hozak, J. Bartek and Z. Hodny (2010). "Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence." *Oncogene* **29**(2): 273-284.

Nyunoya, T., M. M. Monick, A. Klingelhutz, T. O. Yarovinsky, J. R. Cagley and G. W. Hunninghake (2006). "Cigarette smoke induces cellular senescence." *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**(6): 681-688.

Ostojic, A., R. Vrhovac and S. Verstovsek (2011). "Ruxolitinib: a new JAK1/2 inhibitor that offers promising options for treatment of myelofibrosis." *Future Oncol* **7**(9): 1035-1043.

Ou, H. L. and B. Schumacher (2018). "DNA damage responses and p53 in the aging process." *Blood* **131**(5): 488-495.

Parrinello, S., E. Samper, A. Krtolica, J. Goldstein, S. Melov and J. Campisi (2003). "Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts." *Nat Cell Biol* **5**(8): 741-747.

Paschalaki, K. E., R. D. Starke, Y. Hu, N. Mercado, A. Margariti, V. G. Gorgoulis, A. M. Randi and P. J. Barnes (2013). "Dysfunction of endothelial progenitor cells from smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients due to increased DNA damage and senescence." *Stem Cells* **31**(12): 2813-2826.

Passos, J. F., G. Saretzki, S. Ahmed, G. Nelson, T. Richter, H. Peters, I. Wappler, M. J. Birket, G. Harold, K. Schaeuble, M. A. Birch-Machin, T. B. Kirkwood and T. von Zglinicki (2007). "Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence." *PLoS Biol* **5**(5): e110.

Prêle, C. M., T. Iosifidis, R. J. McAnulty, D. R. Pearce, B. Badrian, T. Miles, S. E. Jamieson, M. Ernst, P. J. Thompson, G. J. Laurent, D. A. Knight and S. E. Mutsaers (2021). "Reduced SOCS1 Expression in Lung Fibroblasts from Patients with IPF Is Not Mediated by Promoter Methylation or Mir155." *Biomedicine* **9**(5).

Prieto, L. I., S. I. Graves and D. J. Baker (2020). "Insights from In Vivo Studies of Cellular Senescence." *Cells* **9**(4).

Rana, T., C. Jiang, G. Liu, T. Miyata, V. Antony, V. J. Thannickal and R. M. Liu (2020). "PAI-1 Regulation of TGF- β 1-induced Alveolar Type II Cell Senescence, SASP Secretion, and SASP-mediated Activation of Alveolar Macrophages." *Am J Respir Cell Mol Biol* **62**(3): 319-330.

Rashid, K., I. K. Sundar, J. Gerloff, D. Li and I. Rahman (2018). "Lung cellular senescence is independent of aging in a mouse model of COPD/emphysema." *Sci Rep* **8**(1): 9023.

Rayess, H., M. B. Wang and E. S. Srivatsan (2012). "Cellular senescence and tumor suppressor gene p16." *Int J Cancer* **130**(8): 1715-1725.

Richeldi, L., H. R. Collard and M. G. Jones (2017). "Idiopathic pulmonary fibrosis." *Lancet* **389**(10082): 1941-1952.

Rock, J. R., C. E. Barkauskas, M. J. Crouse, Y. Xue, J. R. Harris, J. Liang, P. W. Noble and B. L. Hogan (2011). "Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(52): E1475-1483.

Rodier, F., S. H. Kim, T. Nijjar, P. Yaswen and J. Campisi (2005). "Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 977-990.

Rohde, G., A. Wiethage, I. Borg, M. Kauth, T. T. Bauer, A. Gillissen, A. Bufe and G. Schultze-Werninghaus (2003). "Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study." *Thorax* **58**(1): 37-42.

Russo, P., P. Lamonaca, M. Milic, E. Rojas, G. Prinzi, V. Cardaci, L. Vitiello, S. Proietti, A. Santoro, C. Tomino, M. Fini and S. Bonassi (2019). "Biomarkers of DNA damage in COPD patients undergoing pulmonary rehabilitation: Integrating clinical parameters with genomic profiling." *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* **843**: 111-117.

Rutten, E. P., P. Gopal, E. F. Wouters, F. M. Franssen, G. J. Hageman, L. E. Vanfleteren, M. A. Spruit and N. L. Reynaert (2016). "Various Mechanistic Pathways Representing the Aging Process Are Altered in COPD." *Chest* **149**(1): 53-61.

Ruwanpura, S. M., L. McLeod, A. Miller, J. Jones, R. Vlahos, G. Ramm, A. Longano, P. G. Bardin, S. Bozinovski, G. P. Anderson and B. J. Jenkins (2012). "Deregulated Stat3 signaling dissociates pulmonary inflammation from emphysema in gp130 mutant mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**(7): L627-639.

Savale, L., A. Chaouat, S. Bastuji-Garin, E. Marcos, L. Boyer, B. Maitre, M. Sarni, B. Housset, E. Weitzenblum, M. Matrat, P. Le Corvoisier, D. Rideau, J. Boczkowski, J. L. Dubois-Randé, C. Chouaid and S. Adnot (2009). "Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **179**(7): 566-571.

Schafer, M. J., T. A. White, K. Iijima, A. J. Haak, G. Ligresti, E. J. Atkinson, A. L. Oberg, J. Birch, H. Salmonowicz, Y. Zhu, D. L. Mazula, R. W. Brooks, H. Fuhrmann-Stroissnigg, T. Pirtsckhalava, Y. S. Prakash, T. Tchkonja, P. D. Robbins, M. C. Aubry, J. F. Passos, J. L. Kirkland, D. J. Tschumperlin, H. Kita and N. K. LeBrasseur (2017). "Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease." *Nat Commun* **8**: 14532.

Segelmark, M. (2011). "Genes that link nephritis to autoantibodies and innate immunity." *N Engl J Med* **364**(7): 679-680.

Serrano, M., G. J. Hannon and D. Beach (1993). "A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4." *Nature* **366**(6456): 704-707.

Shapiro, S. D. (2000). "Animal models for COPD." *Chest* **117**(5 Suppl 1): 223s-227s.

Shapiro, S. D., N. M. Goldstein, A. M. Houghton, D. K. Kobayashi, D. Kelley and A. Belaaouaj (2003). "Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice." *Am J Pathol* **163**(6): 2329-2335.

Shi, K., J. Jiang, T. Ma, J. Xie, L. Duan, R. Chen, P. Song, Z. Yu, C. Liu, Q. Zhu and J. Zheng (2014). "Dexamethasone attenuates bleomycin-induced lung fibrosis in mice through TGF- β , Smad3 and JAK-STAT pathway." *Int J Clin Exp Med* **7**(9): 2645-2650.

Shi, K., J. Jiang, T. Ma, J. Xie, L. Duan, R. Chen, P. Song, Z. Yu, C. Liu, Q. Zhu and J. Zheng (2014). "Pathogenesis pathways of idiopathic pulmonary fibrosis in bleomycin-induced lung injury model in mice." *Respir Physiol Neurobiol* **190**: 113-117.

Shimizu, H., A. Ito, K. Sakurada, J. Nakamura, K. Tanaka, M. Komatsu, M. Takeda, K. Saito, Y. Endo, T. Kozaki, M. Shoda and H. Kuriyama (2019). "AK106-001616, a Potent and Selective Inhibitor of Cytosolic Phospholipase A(2): In Vivo Efficacy for Inflammation, Neuropathic Pain, and Pulmonary Fibrosis." *J Pharmacol Exp Ther* **369**(3): 511-522.

Shuai, K., A. Ziemiecki, A. F. Wilks, A. G. Harpur, H. B. Sadowski, M. Z. Gilman and J. E. Darnell (1993). "Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins." *Nature* **366**(6455): 580-583.

Siedlinski, M., D. Tingley, P. J. Lipman, M. H. Cho, A. A. Litonjua, D. Sparrow, P. Bakke, A. Gulsvik, D. A. Lomas, W. Anderson, X. Kong, S. I. Rennard, T. H. Beaty, J. E. Hokanson, J. D. Crapo, C. Lange and E. K. Silverman (2013). "Dissecting direct and indirect genetic effects on chronic obstructive pulmonary disease (COPD) susceptibility." *Hum Genet* **132**(4): 431-441.

Silliman, C. C., E. E. Moore, G. Zallen, R. Gonzalez, J. L. Johnson, D. J. Elzi, X. Meng, K. Hanasaki, J. Ishizaki, H. Arita, L. Ao, K. M. England and A. Banerjee (2002). "Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion." *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(4): C1102-1113.

Silverman, E. K. (2020). "Genetics of COPD." *Annu Rev Physiol* **82**: 413-431.

Silverman, E. K., H. A. Chapman, J. M. Drazen, S. T. Weiss, B. Rosner, E. J. Campbell, W. J. O'Donnell, J. J. Reilly, L. Ginns, S. Mentzer, J. Wain and F. E. Speizer (1998). "Genetic epidemiology of severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Risk to relatives for airflow obstruction and chronic bronchitis." *Am J Respir Crit Care Med* **157**(6 Pt 1): 1770-1778.

Simon, A. R., U. Rai, B. L. Fanburg and B. H. Cochran (1998). "Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species." *Am J Physiol* **275**(6): C1640-1652.

Simon, A. R., S. Takahashi, M. Severgnini, B. L. Fanburg and B. H. Cochran (2002). "Role of the JAK-STAT pathway in PDGF-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**(6): L1296-1304.

Sørheim, I. C., P. Bakke, A. Gulsvik, S. G. Pillai, A. Johannessen, P. I. Gaarder, E. J. Campbell, A. Agustí, P. M. Calverley, C. F. Donner, B. J. Make, S. I. Rennard, J. Vestbo, E. F. Wouters, P. D. Paré, R. D. Levy, H. O. Coxson, D. A. Lomas, C. P. Hersh and E. K. Silverman (2010). " α_1 -Antitrypsin protease inhibitor MZ heterozygosity is associated with airflow obstruction in two large cohorts." *Chest* **138**(5): 1125-1132.

Sousa-Victor, P., L. García-Prat, A. L. Serrano, E. Perdiguero and P. Muñoz-Cánoves (2015). "Muscle stem cell aging: regulation and rejuvenation." *Trends Endocrinol Metab* **26**(6): 287-296.

Srinivas, N., S. Rachakonda and R. Kumar (2020). "Telomeres and Telomere Length: A General Overview." *Cancers (Basel)* **12**(3).

Stahl, N., T. G. Boulton, T. Farruggella, N. Y. Ip, S. Davis, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini and et al. (1994). "Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components." *Science* **263**(5143): 92-95.

Staudt, M. R., L. J. Buro-Auriemma, M. S. Walters, J. Salit, T. Vincent, R. Shaykhiev, J. G. Mezey, A. E. Tilley, R. J. Kaner, M. W. Ho and R. G. Crystal (2014). "Airway Basal stem/progenitor cells have diminished capacity to regenerate airway epithelium in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **190**(8): 955-958.

Stevens, T., K. Ekholm, M. Gränse, M. Lindahl, V. Kozma, C. Jungar, T. Ottosson, H. Falk-Håkansson, A. Churg, J. L. Wright, H. Lal and A. Sanfridson (2011). "AZD9668: pharmacological characterization of a novel oral inhibitor of neutrophil elastase." *J Pharmacol Exp Ther* **339**(1): 313-320.

Suki, B., E. Bartolák-Suki and P. R. M. Rocco (2017). "Elastase-Induced Lung Emphysema Models in Mice." *Methods Mol Biol* **1639**: 67-75.

Sukocheva, O., M. Menschikowski, A. Hagelgans, N. S. Yarla, G. Siegert, P. Reddanna and A. Bishayee (2019). "Current insights into functions of phospholipase A2 receptor in normal and cancer cells: More questions than answers." *Semin Cancer Biol* **56**: 116-127.

Sundar, I. K., K. Rashid, J. Gerloff, D. Li and I. Rahman (2018). "Genetic Ablation of p16(INK4a) Does Not Protect against Cellular Senescence in Mouse Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease/Emphysema." *Am J Respir Cell Mol Biol* **59**(2): 189-199.

Suryadevara, V., R. Ramchandran, D. W. Kamp and V. Natarajan (2020). "Lipid Mediators Regulate Pulmonary Fibrosis: Potential Mechanisms and Signaling Pathways." *Int J Mol Sci* **21**(12).

Takahashi, S., K. Watanabe, Y. Watanabe, D. Fujioka, T. Nakamura, K. Nakamura, J. E. Obata and K. Kugiyama (2015). "C-type lectin-like domain and fibronectin-like type II domain of phospholipase A(2) receptor 1 modulate binding and migratory responses to collagen." *FEBS Lett* **589**(7): 829-835.

Taskar, V. S. and D. B. Coultas (2006). "Is idiopathic pulmonary fibrosis an environmental disease?" *Proc Am Thorac Soc* **3**(4): 293-298.

Taylor, A. E., T. K. Finney-Hayward, J. K. Quint, C. M. Thomas, S. J. Tudhope, J. A. Wedzicha, P. J. Barnes and L. E. Donnelly (2010). "Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD." *Eur Respir J* **35**(5): 1039-1047.

To, M., D. Takagi, K. Akashi, I. Kano, K. Haruki, P. J. Barnes and K. Ito (2013). "Sputum plasminogen activator inhibitor-1 elevation by oxidative stress-dependent nuclear factor- κ B activation in COPD." *Chest* **144**(2): 515-521.

Tsuji, T., K. Aoshiba and A. Nagai (2004). "Cigarette smoke induces senescence in alveolar epithelial cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**(6): 643-649.

Tsuji, T., K. Aoshiba and A. Nagai (2006). "Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema." *Am J Respir Crit Care Med* **174**(8): 886-893.

Tsuji, T., K. Aoshiba and A. Nagai (2010). "Alveolar cell senescence exacerbates pulmonary inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease." *Respiration* **80**(1): 59-70.

Turner, K. J., V. Vasu and D. K. Griffin (2019). "Telomere Biology and Human Phenotype." *Cells* **8**(1).

Uniyal, S., A. Dhasmana, A. Tyagi and J. P. Moyal (2018). "ATRA reduces inflammation and improves alveolar epithelium regeneration in emphysematous rat lung." *Biomed Pharmacother* **108**: 1435-1450.

Vainchenker, W. and R. Kralovics (2017). "Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms." *Blood* **129**(6): 667-679.

Velazquez, L., M. Fellous, G. R. Stark and S. Pellegrini (1992). "A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway." *Cell* **70**(2): 313-322.

Verhoeven, Y., S. Tilborghs, J. Jacobs, J. De Waele, D. Quatannens, C. Deben, H. Prenen, P. Pauwels, X. B. Trinh, A. Wouters, E. L. J. Smits, F. Lardon and P. A. van Dam (2020). "The potential and controversy of targeting STAT family members in cancer." *Semin Cancer Biol* **60**: 41-56.

Vindrieux, D., A. Augert, C. A. Girard, D. Gitenay, H. Lallet-Daher, C. Wiel, B. Le Calvé, B. Gras, M. Ferrand, S. Verbeke, Y. de Launoit, X. Leroy, A. Puisieux, S. Aubert, M. Perrais, M. Gelb, H. Simonnet, G. Lambeau and D. Bernard (2013). "PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2." *Cancer Res* **73**(20): 6334-6345.

Vindrieux, D., G. Devailly, A. Augert, B. Le Calvé, M. Ferrand, P. Pigny, L. Payen, G. Lambeau, M. Perrais, S. Aubert, H. Simonnet, R. Dante and D. Bernard (2014). "Repression of PLA2R1 by c-MYC and HIF-2 α promotes cancer growth." *Oncotarget* **5**(4): 1004-1013.

Viniol, C. and C. F. Vogelmeier (2018). "Exacerbations of COPD." *Eur Respir Rev* **27**(147).

Vlahos, R. and S. Bozinovski (2014). "Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD." *Clin Sci (Lond)* **126**(4): 253-265.

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

Weichhart, T. (2018). "mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review." *Gerontology* **64**(2): 127-134.

Wilks, A. F., A. G. Harpur, R. R. Kurban, S. J. Ralph, G. Zürcher and A. Ziemiecki (1991). "Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase." *Mol Cell Biol* **11**(4): 2057-2065.

Woldhuis, R. R., M. de Vries, W. Timens, M. van den Berge, M. Demaria, B. G. G. Oliver, I. H. Heijink and C. A. Brandsma (2020). "Link between increased cellular senescence and extracellular matrix changes in COPD." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **319**(1): L48-L60.

Woldhuis, R. R., I. H. Heijink, M. van den Berge, W. Timens, B. G. G. Oliver, M. de Vries and C. A. Brandsma (2021). "COPD-derived fibroblasts secrete higher levels of senescence-associated secretory phenotype proteins." *Thorax* **76**(5): 508-511.

Xu, J., E. T. Gonzalez, S. S. Iyer, V. Mac, A. L. Mora, R. L. Sutliff, A. Reed, K. L. Brigham, P. Kelly and M. Rojas (2009). "Use of senescence-accelerated mouse model in bleomycin-induced lung injury suggests that bone marrow-derived cells can alter the outcome of lung injury in aged mice." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64**(7): 731-739.

Xu, M., T. Tchkonja, H. Ding, M. Ogrodnik, E. R. Lubbers, T. Pirtskhalava, T. A. White, K. O. Johnson, M. B. Stout, V. Mezera, N. Giorgadze, M. D. Jensen, N. K. LeBrasseur and J. L. Kirkland (2015). "JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(46): E6301-6310.

Yanai, H., A. Shteinberg, Z. Porat, A. Budovsky, A. Braiman, R. Ziesche and V. E. Fraifeld (2015). "Cellular senescence-like features of lung fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis patients." *Aging (Albany NY)* **7**(9): 664-672.

Yao, H., S. Chung, J. W. Hwang, S. Rajendrasozhan, I. K. Sundar, D. A. Dean, M. W. McBurney, L. Guarente, W. Gu, M. Rönty, V. L. Kinnula and I. Rahman (2012). "SIRT1 protects against emphysema via FOXO3-mediated reduction of premature senescence in mice." *J Clin Invest* **122**(6): 2032-2045.

Yaswen, P. and J. Campisi (2007). "Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry." *Cell* **128**(2): 233-234.

Yew-Booth, L., M. A. Birrell, M. S. Lau, K. Baker, V. Jones, I. Kilty and M. G. Belvisi (2015). "JAK-STAT pathway activation in COPD." *Eur Respir J* **46**(3): 843-845.

Yokota, Y., M. Ikeda, K. Higashino, K. Nakano, N. Fujii, H. Arita and K. Hanasaki (2000). "Enhanced tissue expression and elevated circulating level of phospholipase A(2) receptor during murine endotoxic shock." *Arch Biochem Biophys* **379**(1): 7-17.

Zhang, Y., R. Liang, C. W. Chen, T. Mallano, C. Dees, A. Distler, A. Reich, C. Bergmann, A. Ramming, K. Gelse, D. Mielenz, O. Distler, G. Schett and J. H. W. Distler (2017). "JAK1-dependent transphosphorylation of JAK2 limits the antifibrotic effects of selective JAK2 inhibitors on long-term treatment." *Ann Rheum Dis* **76**(8): 1467-1475.

Zhong, Z., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1994). "Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 4806-4810.

Zhong, Z., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1994). "Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6." *Science* **264**(5155): 95-98.

Zhou, F., S. Onizawa, A. Nagai and K. Aoshiba (2011). "Epithelial cell senescence impairs repair process and exacerbates inflammation after airway injury." *Respir Res* **12**(1): 78.

Zhou, J. J., M. H. Cho, P. J. Castaldi, C. P. Hersh, E. K. Silverman and N. M. Laird (2013). "Heritability of chronic obstructive pulmonary disease and related phenotypes in smokers." *Am J Respir Crit Care Med* **188**(8): 941-947.

Zhu, J., D. Woods, M. McMahon and J. M. Bishop (1998). "Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf." Genes Dev **12**(19): 2997-3007.

Résumé

La sénescence cellulaire est un processus clé dans la physiopathologie des maladies liées à l'âge, en particulier les maladies pulmonaires telle la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la fibrose pulmonaire. L'accumulation de cellules sénescentes dans le poumon conduit à un défaut de régénération tissulaire associé à une inflammation par la production du SASP ou « sécrétome associé à la sénescence ». Limiter la sénescence cellulaire et le SASP représente un objectif thérapeutique majeur dans les maladies pulmonaires liées à l'âge. L'objectif de ma thèse était d'évaluer le rôle de l'activation de PLA2R1 (récepteur 1 de la phospholipase A2) dans la sénescence cellulaire pulmonaire associée à la BPCO et en définir les applications thérapeutiques. Nous avons montré que PLA2R1 est augmenté dans plusieurs types cellulaires ayant des caractéristiques de cellules sénescentes dans les poumons de patients BPCO. L'inactivation génétique de PLA2R1 par ARN interférents permet d'augmenter la capacité de doublement de population et d'inhiber les composants du SASP. La transduction du gène *PLA2R1* induit une sénescence cellulaire précoce qui est inhibée en présence du ruxolitinib, inhibiteur sélectif de JAK1/2. Chez la souris, la surexpression constitutive de PLA2R1 (PLA2R1-TG) induit une sénescence cellulaire précoce et le développement d'emphysème et de fibrose pulmonaires à l'âge de 5 mois. L'emphysème et la fibrose pulmonaires sont réduits par l'administration de ruxolitinib. La surexpression pulmonaire de PLA2R1 induite par l'injection intratrachéale d'un lentivirus codant pour le gène *PLA2R1* (LV-PLA2R1) conduit au développement d'un emphysème pulmonaire après quatre semaines, qui est fortement atténué par le traitement concomitant au ruxolitinib. Afin de comprendre l'effet du ruxolitinib sur la sénescence cellulaire et sur le SASP associés aux altérations pulmonaires indépendamment de PLA2R1, nous avons ensuite évalué l'effet de l'inhibition de la voie JAK/STAT par le ruxolitinib sur la sénescence cellulaire dans deux modèles d'altérations pulmonaires, l'emphysème induit par l'élastase et la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine. L'élastase administrée aux souris exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur p16 (souris p16-luciférase) induit un fort signal luminescent partiellement inhibé par le ruxolitinib. Chez les souris C57Bl6/J, l'élastase induit une augmentation de la compliance et un emphysème pulmonaire associés à l'augmentation des marqueurs de sénescence cellulaire (p21 et p16) et du SASP. Le traitement préventif par le ruxolitinib permet de diminuer la compliance et l'emphysème ainsi que les marqueurs de sénescence cellulaire et le SASP. Dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine, on mesure une diminution de la compliance et une augmentation des dépôts de collagène dans le poumon, associés à une augmentation des marqueurs de sénescence cellulaire. Le traitement préventif par le ruxolitinib permet d'augmenter la compliance et de réduire les dépôts de collagène ainsi que les marqueurs de sénescence cellulaire. Ces résultats soulignent l'importance de la voie JAK/STAT dans le contrôle de la sénescence cellulaire et du SASP dans les modèles murins d'emphysème pulmonaire et de fibrose pulmonaire. Ces résultats confirment le rôle majeur de l'activation de PLA2R1 dans la sénescence des cellules pulmonaires et les altérations pulmonaires dans la BPCO. L'inhibition de la voie JAK/STAT pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour limiter les altérations pulmonaires et la sénescence des cellules pulmonaires dans les maladies pulmonaires humaines.

Mots clefs: Sénescence cellulaire, PLA2R1, maladies pulmonaires, JAK/STAT, BPCO, fibrose pulmonaire

Abstract

Cell senescence is a key process in age-associated dysfunction and diseases, notably chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and lung fibrosis. Senescent cells accumulation in the lung limits the tissue renewal potential and contributes to chronic inflammation through the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Limiting cellular senescence and the SASP may represent a new therapeutic approach in age-related lung diseases. The goal of my thesis was to assess the role of PLA2R1 (phospholipase A2 receptor 1) on cellular senescence in the context of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We found that PLA2R1 was overexpressed in various cell types exhibiting senescence characteristics in COPD lungs. PLA2R1 knockdown extended the population doubling capacity of these cells and inhibited the SASP. PLA2R1-mediated cell senescence in COPD was largely reversed by treatment with the potent JAK1/2 inhibitor ruxolitinib. In vivo, constitutive PLA2R1 overexpression in transgenic mice (PLA2R1-TG mice) led to early lung-cell senescence and to a combination of lung emphysema and lung fibrosis in 5-month-old mice. Lung overexpression of PLA2R1 induced by intratracheal injection of a lentivirus encoding the murine PLA2R1 gene lead to the development of lung emphysema within four weeks, which was markedly attenuated by concomitant ruxolitinib treatment. To question whether ruxolitinib could affect lung cell senescence, reduce the SASP, and protect against lung alterations independently of PLA2R1, we next evaluated the effect of the JAK/STAT inhibitor ruxolitinib in two mouse models of lung alterations: elastase-induced lung emphysema and bleomycin-induced lung fibrosis. Elastase injection in p16-luciferase mice induced a strong luminescent signal partially inhibited by ruxolitinib. In C57Bl6/J mice, elastase injection led to severe lung emphysema which was associated with increased in cellular senescence markers (p21 and p16) and the SASP. Preventive treatment with ruxolitinib reduced lung emphysema and cellular senescence markers together with a reduction of the SASP. In mice injected with bleomycin, lung fibrosis developed, together with an increase in lung cellular senescence markers. Preventive treatment with ruxolitinib partially prevented lung fibrosis and cellular senescence markers. These results emphasized the importance of the JAK/STAT pathway in controlling cellular senescence and the SASP in mouse models of lung emphysema and lung fibrosis. These data support a major role for PLA2R1 activation in driving lung-cell senescence and lung alterations in COPD. Inhibition of the JAK/STAT pathway may represent a new therapeutic strategy for limiting lung alterations and lung cell senescence in human lung diseases.

Key words: Cellular senescence, PLA2R1, lung diseases, JAK/STAT, COPD, lung fibrosis.