



**HAL**  
open science

# Rôle du calcium et de son homéostasie dans la sénescence cellulaire et ses effets paracrines : implication de la protéine tamponnant le calcium, CALB1

Clotilde Raynard

## ► To cite this version:

Clotilde Raynard. Rôle du calcium et de son homéostasie dans la sénescence cellulaire et ses effets paracrines : implication de la protéine tamponnant le calcium, CALB1. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1213 . tel-03821871

**HAL Id: tel-03821871**

**<https://theses.hal.science/tel-03821871v1>**

Submitted on 20 Oct 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.



N°d'ordre NNT : 2021LYSE1213

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N°340**  
**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Soutenue publiquement le 19/10/2021, par :  
**Clotilde Louise Rosa Tatiana RAYNARD**

---

**Rôle du calcium et de son homéostasie  
dans la sénescence cellulaire et ses  
effets paracrines**

Implication de la protéine tamponnant le calcium,  
CALB1

---

Devant le jury composé de :

**Pr PREVARSKAYA Natalia**

PU, Université de Lille, INSERM U1003

Rapporteure

**Pr COQUERET Olivier**

PU, Université d'Angers, INSERM U1232

Rapporteur

**Pr ABBADIE Corinne**

PU, Université de Lille, UMR INSERM S1277 CNRS 9020

Examinatrice

**Pr GILLET Germain**

PU-PH CNRS, Université de Lyon, UMR INSERM U1052 CNRS 5286

Président

**Dr BERNARD David**

DR CNRS, Université de Lyon, UMR INSERM U1052 CNRS 5286

Directeur de thèse



## Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

### COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

### COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI





# RÉSUMÉ

---

## Rôle du calcium et son homéostasie lors de la sénescence cellulaire et de ses effets paracrines

Implication de la protéine tamponnant le calcium, CALB1

**MOTS-CLÉ :** Sénescence cellulaire, calcium, tampon calcique, SASP, cancer du sein, transdifférenciation neuroendocrine, vieillissement

**RÉSUMÉ :** La sénescence cellulaire est un processus se mettant en place en réponse à différents stress et correspondant à un arrêt stable de la prolifération accompagné par la sécrétion de nombreux facteurs (SASP), composé de molécules pro-inflammatoires. La sénescence cellulaire, notamment par les facteurs du SASP, peut induire de la sénescence paracrine sur d'autres types cellulaires, ce qui conduit à des effets biologiques variés impactant entre autre le cancer et le vieillissement. Si la sénescence finement régulée peut contribuer à des effets anti-tumoraux, l'accumulation de cellules sénescents et du SASP, comme lors du vieillissement, favorisent un environnement pro-inflammatoire, responsable notamment de l'EMT ou de l'angiogenèse, et donc d'une progression tumorale. L'ensemble des mécanismes régulant l'induction de la sénescence cellulaire et du SASP est encore mal connu et de récentes études ont montré l'implication de flux et canaux calciques. Cependant l'importance de l'homéostasie calcique *via* des protéines tamponnant le calcium a été très peu étudiée dans le contexte de sénescence. Mon travail de thèse tend à étudier les mécanismes de l'homéostasie calcique et son impact sur la sénescence cellulaire, dont la production de SASP et ses effets. Notamment, la chélation du calcium par CALB1, une protéine senseur calcique tamponnant les niveaux de calcium, serait capable de contrôler le niveau de SASP pro-inflammatoire. De plus, ce travail démontre un nouvel effet dépendant du calcium et du SASP pro-inflammatoire : celui d'induire une transdifférenciation neuroendocrine de cellules cancéreuses mammaires. Cette étude apporte de nouveaux éléments de réponses sur l'importance du SASP et du vieillissement et sur la biogénèse des tumeurs neuroendocrines mammaires, encore sous-étudiées. Pour résumer, ce travail met en exergue l'importance de l'homéostasie calcique, notamment grâce à des protéines tamponnant le calcium, dans la régulation de la sénescence cellulaire, la production de SASP et de nouveaux effets paracrines.

## ABSTRACT

---

### **Role of calcium and its homeostasis during cellular senescence and its paracrine effects**

Involvement of the calcium buffering protein, CALB1

**KEYWORDS** : Cellular senescence, calcium, calcium buffer, SASP, breast cancer, neuroendocrine transdifferentiation, aging

**ABSTRACT** : Cellular senescence is a process taking place in response to different stresses and corresponds to a stable arrest of proliferation accompanied by the secretion of numerous factors (SASP), notably pro-inflammatory molecules. Cellular senescence, in particular by SASP factors, can induce paracrine senescence on other cell types, which leads to various biological effects impacting among others cancer and aging. If timely regulated senescence can contribute to anti-tumor effects, but the accumulation of senescent cells and SASP, as in aging, promotes a pro-inflammatory environment, responsible in particular for EMT or angiogenesis, and thus for tumor progression. The mechanisms regulating the induction of cellular senescence and SASP are still poorly understood and recent studies have shown the involvement of calcium channels and fluxes. However, the importance of calcium homeostasis *via* calcium buffering proteins has been little studied in the context of senescence. My thesis work aims to study the mechanisms of calcium homeostasis and its impact on cellular senescence, including SASP production and its effects. In particular, calcium chelation by CALB1, a calcium-sensing protein that buffers calcium levels, would be able to control the level of pro-inflammatory SASP. Furthermore, this work demonstrates a new effect of calcium and pro-inflammatory SASP: induction of neuroendocrine transdifferentiation of breast cancer cells. This study provides new insights into the importance of SASP and aging on the biogenesis of breast neuroendocrine tumors, which is still understudied. In summary, this work highlights the importance of calcium homeostasis, including calcium buffering proteins, in the regulation of cellular senescence, SASP production and novel paracrine effects.

## REMERCIEMENTS

---

*J'ai vécu ma thèse comme une expérience riche, intense et qui m'a fait développer des compétences de persévérance et de patience insoupçonnées ! Je tenais donc grandement à remercier toutes les personnes qui ont contribué à cette expérience personnelle et à ces projets scientifiques. Je pense que personne ne sera étonné de la longueur de ces remerciements et de l'émotion découlée en les écrivant !*

Je tenais tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'y avoir consacré du temps précieux. Merci à **Natacha Prevarskaya** et **Olivier Coqueret** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que **Corinne Abbadie** et **Germain Gillet** d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci **David** pour cet environnement scientifique riche que tu m'as apporté. Merci pour ta persévérance pour développer de nouvelles idées, surtout sur l'un des deux sous-projets (tu sauras reconnaître lequel). Merci de m'avoir laissée autonome (j'en déduis, fais confiance ?), c'est ce que j'étais venue rechercher en thèse. Je te remercie également de ta disponibilité et de ton suivi : j'en ai presque réussi à apprécier les réunions du lundi !

Ensuite, je tenais à remercier tous les membres de l'équipe et les collaborateurs qui ont travaillé sur ce projet de thèse :

**Xingjie**, how can I thank you enough for starting a project that I have taken over? I remember when we were talking about it as it was started : full of uncertainty, I am now really proud to defend it. Thank you to have inspired me with your calm and constancy. Thank you to have understood me with the CALB1 struggling: you know what I am really talking about! Hope you are living a really good life in China and maybe see you there !!

**Anda**, I clearly don't know where to begin. Thank you for having been here since the beginning, you know what I really mean. Thank you for your support, for your wise advices: scientific of course, but also about life: I really learned from you. Thank you for being so passionate: it gave me so much energy when you were talking about the last hot senescence paper, the last gossip of conferences or of famous people in the field. Interestingly, it makes it much more interesting! Thank you for being this wonderful and strong Prussian Women General (and I think Western Blot room thanks you also). Thank you for your Russian cookies and dancer spirit; I feel so comfortable being at your side !

**Nolwenn et Sylvie**, merci de m'avoir fait découvrir le monde si complexe de la signalisation calcique ! Merci pour votre disponibilité, vos conseils et vos in-put ;, vous avez vraiment fait avancer les projets et ma réflexion scientifique ! Merci aussi pour toutes nos discussions sur la recherche d'une manière générale et vos encouragements.

**Delphine**, tu m'as vu arriver et galérer. Merci de m'avoir tant écoutée, tant encouragée et aidé à trouver le positif dans mes projets ! Merci de m'avoir tant appris sur le *vivo* avec patience et sans jugement. Merci pour ces jolis moments autour d'un verre à papoter. Et franchement, plus tard j'aimerais être une super maman comme toi !!

**Jean-Jacques**, merci d'avoir réussi à réorganiser ce lab et ce n'était pas une mince affaire ! Merci d'être toujours disponible, de nous aider en permanence, de proposer de nouvelles idées et surtout de ta bonne humeur qui fait plaisir dès qu'on rentre dans le labo !

**Jean-Michel**, merci pour tes blagues ! Désolée, j'étais obligée de commencer par ça. Malheureusement, je suis très bon public et je ne pouvais m'empêcher d'esquisser un sourire. Plus sérieusement, merci pour ton expertise et tes beaux discours sur la place de la science dans la société. Je te remercie de m'avoir partagé tes connaissances sur la transcriptomique et la génétique. Et j'espère pouvoir venir te voir lors de ton prochain concert de jazz !

**Nadine**, je te remercie d'avoir toujours suivi avec beaucoup d'attentions mes projets. Merci pour tes idées, remarques et conseils toujours pertinents et qui m'ont beaucoup fait avancer. Merci de m'avoir aussi rassurée (scientifiquement et humainement!) dans les moments de doute. Je te remercie aussi pour ton calme et ta justesse qui font toujours avancer les projets au mieux !

**David**, merci pour ta bienveillance et tes conseils toujours avisés sur l'expertise vivo et les projets de carrière professionnelle.

Merci **Christophe** de m'avoir initiée à l'imagerie et d'avoir répondu à toutes mes questions avec patience et pédagogie ; j'ai vraiment apprécié suivre les formations avec toi ! Merci pour ta disponibilité (entres autre pour déverrouiller la porte du confocal quand personne n'est là !)

**Enfin merci à l'ensemble de la DB team !!**

**Amélie**, Amely, Amé, Amémé et je ne dirais pas les autres ! Comment te remercier assez ? Merci d'avoir réussi à ouvrir l'huître que j'étais, merci de m'avoir écoutée, de m'avoir comprise et de m'avoir fait avancer ! Merci finalement pour tes rôlages incessants qui me font bien rire, merci de t'impliquer autant pour les gens, le labo, le centre, tu m'inspires beaucoup en ce sens ! Je suis sûre que tu feras une très belle thèse, continue d'avancer comme ça !

**Gabriela and Kexin**, I'm really happy to know you and I'm sure you will be successful PhDs, I wish you all best. Keep being strong, enjoying what you are doing at lab and giving some happiness to the lab as you already do ! Thank you for your calm, sweet jokes and every kind of gifts ! Gabriela, I'm sure your amber will give me the chance I need 😊

**Joanna**, thank you for your smile and good vibes. I'm really happy you joined the lab and that you shared your passion for MCF-7 and science in general !

**Mathieu**, arrivé depuis peu mais merci de m'avoir aidée pour la préparation de ma soutenance et nos bons échanges scientifiques.

Un grand merci aux « **past members** », qui m'ont aussi beaucoup appris. **Sara**, Maxi-Me, un infini merci pour avoir cru en moi et mes capacités, m'avoir coachée à tout point de vue : les présentations, les manips ou les réunions, je t'en suis énormément reconnaissante. Merci d'être cette femme forte qui porte ses valeurs, j'ai tant aimé discuter avec toi ! Je suis sûre que Rhéa grandira à merveille grâce à toi, je te souhaite le meilleure pour ce nouveau départ !

**Christopher**, merci pour ton aide précieuse et pour cette bonne humeur que tu as insufflée au labo. C'était un plaisir de travailler avec toi, j'espère que tu te fais plaisir dans ton nouveau travail et qu'Océane se porte à merveille !

**Dorian**, merci pour l'énergie que tu as donnée au labo et les innombrables conseils calciques et de PhD plus avancé !

Merci **Guillaume** et **Audrey** de m'avoir aidé lors de mes débuts dans le labo.

Bien évidemment, un grand merci au **groupe Bertolino**, qui nous a apporté de la joie, de la bonne humeur, des cris stridents de filles en furie et surtout un frigo ! Les filles : **Marie, Perrine, Camille, Mirela**, vous êtes tellement incroyables, merci pour votre énergie et pour toutes ces pauses qui m'ont fait un bien fou ! **Philippe**, merci pour tes conseils notamment concernant le vivo et ta pédagogie.

**Audrey**, tu arrives seulement maintenant dans la liste des remerciements et pourtant .. ! Tu as connu tous mes rageages, mes doutes, mes bonnes nouvelles, mes déceptions. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, de m'avoir fait redescendre en pression, d'avoir rajouter ta touche d'humour, d'avoir refait ma culture populaire (je peux maintenant sortir en société sans honte), de m'avoir réconfortée avec tes goûters de l'enfer et j'en passe. Enfin bref, merci d'avoir illuminé mon quotidien de thèse (rien que ça ma co\*\*\*) !

Un grand merci aux **Labros** : nos brunchs de folie agrémentés de quelques soirées très *cools* auront contribué à mon équilibre mental ! Merci **Anaïs** pour ta bienveillance, tes conseils et ton humour taquin ! **Simon**, merci pour les bons repas partagés, les jeux de mots bien placés et ton appui lors des différentes réunions pour les associations ! **Paul**, merci pour ta bonne humeur, ton énergie positive et d'être aussi bon public (mon humour se sent reboosté grâce à toi) ! **Thomas**, merci de m'avoir fait prendre de la hauteur, de ton soutien ces derniers mois et de ton dynamisme inarrêtable entremêlé de réflexions subtiles ! **Rahma** (avec la bonne prononciation) merci de m'avoir fait découvrir l'univers des mammosphères, merci pour ta culture générale et toutes ces belles conversations toujours enrichissantes !

Merci **Audrey**, alias Biodrey, pour notre vision commune de la recherche, de l'importance de la médiation et nos conversations sur la vie ! Cela m'a beaucoup aidé dans ma réflexion.

**Matthias**, merci pour tous tes conseils précieux depuis le début de ma thèse et toutes nos conversations lors d'une pause au CRCL, c'était une grande bouffée d'air frais !

Merci à toutes **les autres personnes du CRCL** avec qui j'ai pu interagir et qui m'ont fait passer de très bons moments : **Roumaïssa, Caroline, Maud, Ambroise, Valentin, Anne-Lise, Kévin, Anthony, Anne-Laure, Stéphane, Nicolas, Virginie, Noémie, les membres du CLYRA et des Petits Génies de l'IHOPE**, et je suis désolée si j'en oublie !

Merci surtout aux  **$\alpha$ - $\beta$ -iochs** (il faudrait quand même qu'un jour cette lettre soit officiellement reconnue) car c'est clairement grâce aux souvenirs de nos années fac que je me suis lancée dans cette thèse avec autant d'envie d'apprendre et de réussir. Je suis bien fière que cette jolie bande du fond de l'amphi, pas frais le vendredi matin, soit dorénavant quasi-tous docteurs !

Merci **Alexis** pour ta générosité, ta curiosité naturelle, tes jeux de mots implacables et d'avoir contribué à ma culture rappienne (même si c'était pas toujours pour du bon...). Merci **Thibault** pour tes réflexions toujours poussées et pour toutes nos longues conversations à refaire le monde, la science. Merci aussi pour tes blagues. Merci à vous deux pour avoir gravi cette montagne ensemble à Utrecht ! C'était clairement un sommet difficile à atteindre mais finalement avec le recul, tout est une question de point de vue.

Merci **Boris** pour tous tes encouragements, ta prise du recul sur la thèse et pour tous nos échanges riches ! Merci pour tes visites surprises et improbables à Lyon, je ferais pareil à New York 😊 je te souhaite tout le meilleur pour votre nouvelle vie à deux !

Merci **Jo** pour ta joie de vivre, ton humour et ton énergie ! Merci pour les après-midis avec tes bouts de chou, qui nous ont égayé !

Merci **Eliott et Elisa** pour tous ces repas partagés autour d'une bonne bouteille de vin (ou whisky), vous avez clairement contribué à améliorer cette période de confinement et surtout de thèse, en plus de m'avoir montré à quel point j'aimais bien manger 😊 Merci aussi de m'avoir toujours encouragée et longuement écoutée sur votre rooftop : j'investie dans la tente très bientôt !

Merci **Matthieu**, Maître Zno, d'avoir invité tous ces touristes français dans tes chez-toi à Outroucht. Peut-être qu'un jour on arrivera à prononcer le nom de cette ville. Merci pour tous tes conseils de doctorant avancé, merci de tes retours fréquents à Lyon, source de retrouvailles et de bonheur ! Merci de m'avoir fait découvrir Saint-Germain, qui a bercé de nombreuses heures d'analyses. Et surtout un infini merci d'avoir relu ce manuscrit et d'y avoir rajouté ta patte de crystallographe (sans compter les nombreuses remarques d'une pertinence excessive).

Merci ô grand **Guillaume** pour tes jeux de mots encore plus implacables que ceux d'Alexis et tes blagues encore plus drôles que celles de Thibault. D'ailleurs merci d'avoir fait la meilleure blague du monde devant ce four à pizzas. J'ai hâte de les entendre version american maintenant ! Du coup, merci d'avance de nous inviter de l'autre côté de l'Atlantique.

Merci **Clémence** pour ta joie de vivre et ton esprit fédérateur, qui nous a clairement permis de passer de très bons moments (et soirées !) ! Je ne pourrais pas te dire à quel point tu m'as inspirée avec ta force, ta créativité et ton grand cœur ! Et n'oublie jamais que c'est toi la plus forte !!!

**Gena**, GG (en français ou anglais), ma copine d'aventure toujours présente. Je ne sais même pas par où commencer tellement c'est une évidence ! Merci juste d'avoir continué de m'accompagner dans ma vie et j'espère qu'on parcourra encore un looooooong chemin de route ensemble. A toutes nos aventures passées et futures !

**Laurent**, mon colloc préféré (rude compétition), une mention toute particulière pour toi, qui m'a tant apporté au quotidien : de la bonne cuisine, des blagues d'une qualité douteuse, une maison toujours (trop) parfaitement rangée et un soutien permanent : bref que du bonheur ! Merci de m'avoir tant aidé à supporter les moments difficiles de la thèse, merci pour tes conseils pour mes présentations, mes manips, mon papier, mon manuscrit, ma soutenance : bref toute ma thèse ! Et bien sûr je ne te remercierais jamais assez d'avoir accepté d'intégrer Mimine chez nous !

Merci aux autres biochs que j'ai vu moins souvent : **Dorian**, pour la bonne humeur et ton énergie débordante ! **Noémie** pour nos escapades en Hollande et ton rire si communicatif ! **Frank** pour tes interventions subtiles sur BdL ! **Barth**, je suis très contente que tu sois de retour un peu et j'espère te voir mixer chez moi !! **Ambre**, merci pour tes good vibes venant du bout du monde !

Merci à tous les copains du **Master BMC**, qui m'ont beaucoup enrichi en culture scientifique (et en bonnes blagues !). Un grand merci à **Dounia, Constance, Daniela, Etienne, Guillaume (et Mylène et Tamara !), Nicolas et Wilhelm** pour nos bons moments autour d'un goûter ou

aux journées BMIC ! Je suis très fière de nous tous et suis certaine que l'on aura une belle carrière scientifique !

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont suivi depuis le début du début !

**Les bilingues : Elise, Marie, Lauriane, Alexia, Violette, Arnaud, Thomas** : merci pour tous ces bons moments aux quatre coins de la France : Marseille, Lyon, Paris (ooooooooops Pantin), hâte de fêter nos 20ans de connaissance (et d'ouvrir ce fameux « 5ans après »).

**El trianglo : Camille, Marie, Lauriane, Klélia, Judith** : merci d'être encore présentes pour moi malgré mon sale caractère ! Merci d'avoir autant enrichi ma culture générale et de m'avoir ouvert d'autres horizons !

**Eloïse**, merci pour ton énergie débordante, tes encouragements et tes idées de folie !

Merci à tous les **copains du Parkour**, qui m'ont montré comment avoir l'énergie nécessaire pour surmonter les obstacles 😊 j'ai beaucoup transposé la philosophie du Parkour à celle de la recherche et cela a beaucoup contribué à ma combativité et dépassement de mes peurs ! Un grand merci donc à **Manu, Loïc, Sacha et Daniel** pour votre inspiration et vos coachings de folie, et à tous les copains de galère (sous la pluie ou dans la neige) : **Andréa, Camille, Merin, Eva, Automne et Geoffrey**. Merci pour toutes ces conversations à essayer de comprendre et refaire le monde !

Et bien évidemment un infini merci à **mes parents, mon frère et mon oncle** pour leur soutien inconditionnel et de m'avoir toujours offert un environnement bienveillant dans lequel j'ai pu m'épanouir. Un merci particulier à ma mère et ses innombrables réconforts, entre autres au bout du téléphone.

- *Être libre, c'est avoir le droit de changer d'avis* -

Axel Kahn





# TABLE des MATIÈRES

---

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>7</b>
<b>TABLE des MATIÈRES</b> .....	<b>13</b>
<b>TABLE des FIGURES &amp; des TABLEAUX</b> .....	<b>17</b>
<b>LISTE des ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>19</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>27</b>
<b>1 Chapitre 1 : Sénescence cellulaire</b> .....	<b>27</b>
<b>1.1 Caractéristiques des cellules sénescentes</b> .....	<b>27</b>
1.1.1 Arrêt stable de la prolifération.....	28
1.1.2 Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP).....	30
1.1.3 Changements morphologiques.....	34
1.1.4 Activité $\beta$ -galactosidase.....	34
1.1.5 Résistance à l'apoptose.....	35
1.1.6 Dommages à l'ADN.....	36
1.1.7 Changements épigénétiques.....	36
<b>1.2 Stress induisant la sénescence cellulaire</b> .....	<b>38</b>
1.2.1 Sénescence répllicative.....	38
1.2.2 Sénescence induite par un stress oncogénique.....	39
1.2.2.1 Sénescence induite par un oncogène.....	39
1.2.2.2 Sénescence induite par invalidation d'oncogène.....	40
1.2.3 Sénescence induite par un stress génotoxique.....	40
1.2.4 Stress oxydant.....	41
<b>1.3 Effecteurs de la sénescence cellulaire</b> .....	<b>43</b>
1.3.1 Arrêt de prolifération : rôle clé de p53 et p16 <sup>INK4a</sup> .....	44
1.3.2 Régulation du SASP.....	48
1.3.2.1 Régulation transcriptionnelle du SASP.....	48
1.3.2.2 Régulation post-transcriptionnelle du SASP.....	52
1.3.2.3 Autres régulations par des voies de signalisation.....	52

<b>2</b>	<b><i>Chapitre 2 : Effets physiopathologiques de la sénescence cellulaire</i></b>	<b>55</b>
2.1	<b>Sénescence cellulaire et communication inter-cellules</b>	<b>55</b>
2.2	<b>Effets bénéfiques à court terme</b>	<b>56</b>
2.2.1	Rôle dans le développement embryonnaire	56
2.2.2	Rôle dans la cicatrisation et la réparation tissulaire	56
2.2.3	Barrière anti-tumorale	57
2.3	<b>Effets chroniques délétères</b>	<b>58</b>
2.3.1	Effets généraux sur le vieillissement et quelques maladies liées à l'âge	58
2.3.2	Effets dans les maladies neurodégénératives	60
2.3.3	Potentiel tumoral des cellules sénescents	61
<b>3</b>	<b><i>Chapitre 3 : Calcium, comme messager secondaire</i></b>	<b>65</b>
3.1	<b>Homéostasie et flux calciques en lien avec la sénescence</b>	<b>65</b>
3.1.1	Contrôle spatiotemporel du calcium cellulaire	65
3.1.2	Canaux calciques	67
3.1.2.1	Échanges calciques avec le milieu extracellulaire	67
3.1.2.2	Échanges calciques avec les organites	68
3.1.3	Tampons et senseurs calciques : calcium-binding protein (CaBP)	72
3.2	<b>Rôle du calcium dans divers processus cellulaires, dont la sénescence</b>	<b>73</b>
3.2.1	Voies de signalisation activées par le calcium	74
3.2.1.1	Voies de transduction activées par les kinases dépendantes de calcium	74
3.2.1.2	Voies de transduction activées par les phosphatases dépendantes de calcium	75
3.2.2	Calcium et mort cellulaire	76
3.2.3	Contrôle du cycle cellulaire et de la production de composants du SASP	77
3.2.4	Calcium et sénescence cellulaire	78
<b>4</b>	<b><i>OBJECTIFS DE LA THÈSE</i></b>	<b>81</b>
	<b><i>MATÉRIEL &amp; MÉTHODE</i></b>	<b>85</b>
	<b><i>RÉSULTATS</i></b>	<b>93</b>
<b>1</b>	<b><i>Chapitre 1 : Rôle du calcium et de CALB1 dans la sénescence cellulaire</i></b>	<b>93</b>
1.1	<b>Introduction</b>	<b>93</b>

1.1.1	Fonctions principales et régulation de CALB1 .....	93
1.1.2	Rôle anti-apoptotique de CALB1 .....	95
1.1.3	Rôles de CALB1 dans des contextes tumoraux et implication émergente lors de la sénescence cellulaire .....	95
<b>1.2</b>	<b>Résultats : rôle du senseur calcique CALB1 et de l'homéostasie calcique durant l'OIS .....</b>	<b>96</b>
<b>2</b>	<b><i>Chapitre 2 : Rôle du calcium lors des effets paracrines du SASP sur des cellules cancéreuses.....</i></b>	<b>107</b>
<b>2.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>107</b>
2.1.1	Cellule et différenciation neuroendocrine.....	107
2.1.2	Tumeurs neuroendocrines mammaires.....	108
<b>2.2</b>	<b>Article 1. The NF-<math>\kappa</math>B-dependent secretome of senescent cells can trigger neuroendocrine transdifferentiation of breast cancer cells .....</b>	<b>111</b>
<b>2.3</b>	<b>Résultats supplémentaires .....</b>	<b>157</b>
	<b><i>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES.....</i></b>	<b>167</b>
<b>1</b>	<b><i>Chapitre 1 : Rôle du calcium et de CALB1 durant la sénescence cellulaire .....</i></b>	<b>167</b>
<b>1.1</b>	<b>Importance du calcium et des flux calciques durant la sénescence .....</b>	<b>168</b>
<b>1.2</b>	<b>Calcium et SASP .....</b>	<b>168</b>
1.2.1	SASP pro-inflammatoire .....	168
1.2.2	Vésicules extracellulaires .....	168
<b>1.3</b>	<b>Importance du tamponnage calcique ? .....</b>	<b>169</b>
<b>1.4</b>	<b>Importance du calcium du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie ? .....</b>	<b>170</b>
<b>1.5</b>	<b>Importance des canaux calciques ? .....</b>	<b>171</b>
1.5.1	Importance des canaux calciques intracellulaires .....	171
1.5.2	Importance des canaux de la membrane plasmique .....	172
<b>1.6</b>	<b>Autres rôles de CALB1 durant la sénescence .....</b>	<b>175</b>
1.6.1	CALB1 et mort cellulaire .....	175
1.6.2	CALB1 en tant que senseur calcique durant la sénescence .....	176
<b>2</b>	<b><i>Chapitre 2 : SASP, calcium et différenciation neuroendocrine .</i></b>	<b>179</b>
<b>2.1</b>	<b>Signalisation calcique et différenciation neuroendocrine .....</b>	<b>179</b>
2.1.1	Rôle du calcium contenu dans les stocks intracellulaires ? .....	179
2.1.2	Régulation du calcium lors de la différenciation neuroendocrine.....	180
2.1.3	Voies de signalisation calcium dépendantes et NED .....	180

2.2	Quel lien entre NED, sénescence cellulaire et vieillissement ? .....	181
2.3	Transdifférenciation de lignées tumorales et tumeurs neuroendocrines : même phénotype ? .....	182
	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>189</b>
	<b>LISTE des PUBLICATIONS &amp; COMMUNICATIONS ORALES.....</b>	<b>191</b>
	<b>ANNEXE .....</b>	<b>195</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>211</b>

# TABLE des FIGURES & des TABLEAUX

---

## Table des Figures

Figure 1. Contrôle de l'avancement dans le cycle cellulaire par les cyclines et cyclines dépendantes de kinases (CDKs).-----	29
Figure 2. Principaux biomarqueurs de la sénescence cellulaire.-----	38
Figure 3. Principaux inducteurs de la sénescence cellulaire.-----	43
Figure 4. Effecteurs et voies de signalisation de la sénescence cellulaire.-----	45
Figure 5. Expression et cibles du locus INK4a-ARF.-----	46
Figure 6. Voie de signalisation de NF- $\kappa$ B.-----	49
Figure 7. Régulation et composition du SASP durant la sénescence cellulaire.-----	51
Figure 8. Principaux effets physiologiques et pathologiques médiés par la sénescence cellulaire.-----	61
Figure 9. Homéostasie calcique au sein de la cellule et régulation spatio-temporelle de la signalisation calcique.-----	66
Figure 10. Ensemble des acteurs (canaux, pompes et tampons calciques) permettant l'homéostasie et les flux calciques.-----	70
Figure 11. Structure des domaines « EF-hand » des protéines fixant le calcium.-----	72
Figure 12. Régulation de l'expression génique par des voies de signalisation calcium-dépendantes.-----	75
Figure 13. Signalisations calciques activées durant la sénescence cellulaire.-----	79
Figure 14. Représentation du modèle cellulaire utilisé afin d'induire l'OIS par ajout de tamoxifène (4-OHT) dans des cellules épithéliales humaines (HMEC).-----	85
Figure 15. Structure des quatre hélices comportant les domaines « EF-hand » de CALB1.-----	93
Figure 16. Les niveaux de calcium sont augmentés dans les HMEC en sénescence induite par différents inducteurs.-----	97
Figure 17. CALB1 est induit dans les modèles de sénescence où les niveaux de calcium sont augmentés.-----	99
Figure 18. La voie calcium-dépendante calcineurine/NFAT régule l'expression de CALB1 durant l'OIS.-----	101
Figure 19. La surexpression de CALB1 dans les HMEC en OIS diminue les niveaux de calcium mais n'est pas suffisante pour réverter l'induction de sénescence.-----	103
Figure 20. La surexpression de CALB1 dans des MRC-5 en OIS ne conduit pas à la réversion de l'arrêt de prolifération mais à celle de facteurs pro-inflammatoires dans le SASP.-----	105
Figure 21. Le niveau de calcium mitochondrial augmente durant la NED dans les MCF-7 traitées au SASP.-----	158
Figure 22. Le knock-down de facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la NED n'impacte le phénotype neuroendocrine.-----	161
Figure 23. La différenciation neuroendocrine est accompagnée par de la sénescence dans les MCF-7 traitées au SASP.-----	162

Figure 24. L'expression de marqueurs neuroendocrines augmente au cours du vieillissement dans les glandes mammaires de souris. -----	163
Figure 25. Potentiels rôles de l'augmentation du calcium cytosolique dans les HMEC en OIS. -----	174
Figure 26. Schéma du potentiel rôle cytoprotecteur de CALB1 comme tampon calcique lors de l'OIS. -----	176
Figure 27. Modèle de transdifférenciation par le SASP des cellules cancéreuses mammaires et prostatiques développé lors de cette étude.-----	184

### **Table des Tableaux**

Tableau 1. Composition hétérogène (et non-exhaustive) du SASP. -----	32
Tableau 2. Liste des amorces et sondes UPL utilisées pour les PCR quantitatives. ---	88
Tableau 3. Classification morphologique, immunohistochimique et moléculaire des tumeurs neuroendocrines mammaires (nouvelle classification de l'OMS, 2019). ----	109

## LISTE des ABRÉVIATIONS

---

<b>4 – OHT</b>	4-Hydroxytamoxifène
<b>53BP1</b>	p53-Binding Protein 1
<b>ABC</b>	ATP-Binding Cassette
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ALT</b>	Alternative Lengthening of Telomeres
<b>AMPK</b>	AMP-Activated Protein Kinase
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ATF</b>	Activating Transcription Factor
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated
<b>ATR</b>	ATR and RAD3-related
<b>Bax</b>	Bcl-2 associated X
<b>Bcl-2</b>	B-Cell CLL/Lymphoma
<b>BMP-2</b>	Bone Morphogenetic Protein-2
<b>CaMKII</b>	CaModulin Kinase II
<b>CBP</b>	Calcium Binding Protein
<b>CCF</b>	Cytoplasmic Chromatin Fragments
<b>CCL</b>	CC motif chemokine Ligand
<b>CDK</b>	Cycline-Dependent Kinase
<b>CDI</b>	Cycline-Dependent Kinase inhibitor
<b>cGAS</b>	cyclic GMP-AMP Synthase
<b>CHGA / B</b>	Chromagranine A / B
<b>CHK</b>	Checkpoint Kinase
<b>CIP1</b>	CDK-interacting protein 1
<b>CpG</b>	C-phosphate-G
<b>CRE</b>	c-AMP Response Element
<b>CREB</b>	c-AMP Response Element Binding protein



<b>C/EBP<math>\beta</math></b>	CCAAT-Enhancer Binding Protein $\beta$
<b>CXCL</b>	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand
<b>CXCR2</b>	Chemokine (C-X-C Motif) Receptor 2
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DDR</b>	DNA Damage Response
<b>DNA-SCARS</b>	DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence
<b>DSD</b>	Double-Strand Breaks
<b>E2F</b>	E2 Factor
<b>ECM</b>	Extra-Cellular Matrix
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EMT</b>	Epithelial-Mesenchymal Transition
<b>ER</b>	Estrogen Receptor
<b>ERK</b>	Extracellular signal-Regulated Kinase
<b>ETC</b>	Electron Transport Chain
<b>EV</b>	Extracellular Vesicles
<b>GF</b>	Growth Factor
<b>GRP75</b>	Glucose Related Protein 75
<b>HCC</b>	HepatoCellular Carcinoma
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HMEC</b>	Human Mammary Epithelial Cell
<b>HR</b>	Hormone Receptor
<b>hTERC</b>	human Telomerase RNA Component
<b>hTERT</b>	human Telomerase Reverse Transcriptase
<b>IFN</b>	InterFeroN
<b>IL</b>	InterLeukin

<b>INK4</b>	Inhibitor of CDK4
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol TriPhosphate
<b>ITPR</b>	Inositol TriPhosphate Receptor
<b>MAM</b>	Mitochondria-Associated Membranes
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>MCU</b>	Mitochondrial Calcium Uniporter
<b>MCUR1</b>	Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1
<b>MDM2</b>	Mouse Double Minute 2
<b>MEF</b>	Mouse Embryonic Fibroblast
<b>Mek</b>	MAP/ERK kinase
<b>MMP</b>	Metalloproteinase
<b>MRP</b>	Multidrug Resistance Protein
<b>mTOR</b>	mammalian Target of Rapamycin
<b>MYC</b>	MYeloCytomatosis
<b>NBC</b>	Neuroendocrine Breast Carcinoma
<b>NED</b>	NeuroEndocrine Differentiation
<b>NEM</b>	NeuroEndocrine Marker
<b>NFAT</b>	Nuclear Factor of Activated T cells
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor-kappa B
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>OIIS</b>	Oncogene Invalidation-Induced Senescence
<b>OIS</b>	Oncogene-Induced Senescence
<b>PAI-1</b>	Plasminogen Activator Inhibitor-1
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3 Kinase
<b>PIN</b>	Prostate Intraepithelial Neoplasia
<b>PKA/C</b>	Protein Kinase A/C
<b>PLC</b>	PhosphoLipase C

<b>PRC</b>	Polycomb Repressive Complex
<b>PTEN</b>	Phosphatase and TENsin homolog
<b>Raf</b>	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
<b>Ras</b>	Rat Sarcoma
<b>Rb</b>	Retinoblastoma
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique
<b>ROC</b>	Receptor-Operated Channels
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>RYR</b>	Ryanodine Receptor
<b>SA-β-Gal</b>	Senescence-Associated β-Galactosidase
<b>SAHF</b>	Senescence-Associated Heterochromatin Foci
<b>SASP</b>	Senescence-Associated Secretory Phenotype
<b>SCG2</b>	Secretogranin 2
<b>SERCA</b>	SarcoEndoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
<b>shRNA</b>	short hairpin RNA
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>SOC</b>	Store-Operated Channels
<b>STING</b>	STimulator of Interferon response cGAMP interactor
<b>SSB</b>	Single-Strand Break
<b>SUV39H1</b>	Suppressor of Variegation 3-9 homolog 1
<b>SYP</b>	Synaptophysin
<b>TAF</b>	Telomerase-Associated Foci
<b>TGF-β</b>	Transforming Growth Factor- β
<b>TIF</b>	Telomere dysfunction Induced Foci
<b>TIS</b>	Therapy-Induced Senescence
<b>TNE</b>	Tumeur NeuroEndocrine
<b>TNF-α</b>	Tumor Necrosis Factor-α
<b>UPR</b>	Unfolded Protein Response

**UV** UltraViolet

**VDAC** Voltage Dependent Anion Channel 1

**VEGF** Vascular Endothelial Growth Factor



# **- INTRODUCTION -**



# INTRODUCTION

## 1 Chapitre 1 : Sénescence cellulaire

---

La sénescence cellulaire est un état cellulaire complexe, correspondant à un arrêt stable de prolifération cellulaire. Cet état a été découvert en 1961 par Hayflick et Moorhead, lorsqu'ils ont remarqué que les fibroblastes qu'ils cultivaient atteignaient une limite répllicative et arrêtaient de proliférer après plusieurs passages en culture. Cette découverte a dans les premiers temps été discutée et il a fallu plusieurs décennies pour valider cette hypothèse et décrire les mécanismes sous-jacents. Aujourd'hui, cet état est clairement validé et a donné naissance à une nouvelle thématique en biologie cellulaire.

Outre l'arrêt de prolifération, ces cellules sénescents possèdent d'autres changements moléculaires et cellulaires, en particulier la sécrétion de biomolécules. Pendant longtemps, la sénescence cellulaire a été considérée comme une réponse à un stress réplicatif, mais aujourd'hui il est admis qu'elle est mise en place « prématurément » à la suite d'autres stress. Actuellement, de plus en plus d'études démontrent les rôles physio-pathologiques à l'échelle de l'organisme de la sénescence cellulaire à la fois dans le vieillissement, dans le cancer ou lors du développement embryonnaire. Initialement, ces effets étaient implémentés à l'arrêt de prolifération uniquement mais aujourd'hui l'ensemble de la communauté décrit le sécrétome des cellules sénescents comme tout aussi, voire plus important, dans les effets physio-pathologiques de la sénescence cellulaire, notamment en régulant l'environnement des cellules sénescents. Actuellement, de nombreuses études se concentrent sur de nouveaux mécanismes de régulation de la sénescence et de nouveaux effets du sécrétome sur l'organisme.

Dans ce chapitre, je vais d'abord décrire les caractéristiques moléculaires et cellulaires des cellules sénescents, les différents stress pouvant l'induire, puis les voies moléculaires et effecteurs conduisant à sa mise place et enfin les différents effets physio-pathologiques associés.

### 1.1 Caractéristiques des cellules sénescents

Les cellules sénescents possèdent différentes caractéristiques moléculaires et cellulaires qui permettent leur identification à la fois *in vitro* et *in vivo*. Parmi ces biomarqueurs, certains reflètent l'activation de certaines voies de signalisation permettant la mise en place et le maintien de la sénescence. D'autres correspondent aux conséquences phénotypiques de la mise en place de la sénescence. Cependant, chacun de ces marqueurs pris individuellement, n'est pas spécifique des cellules

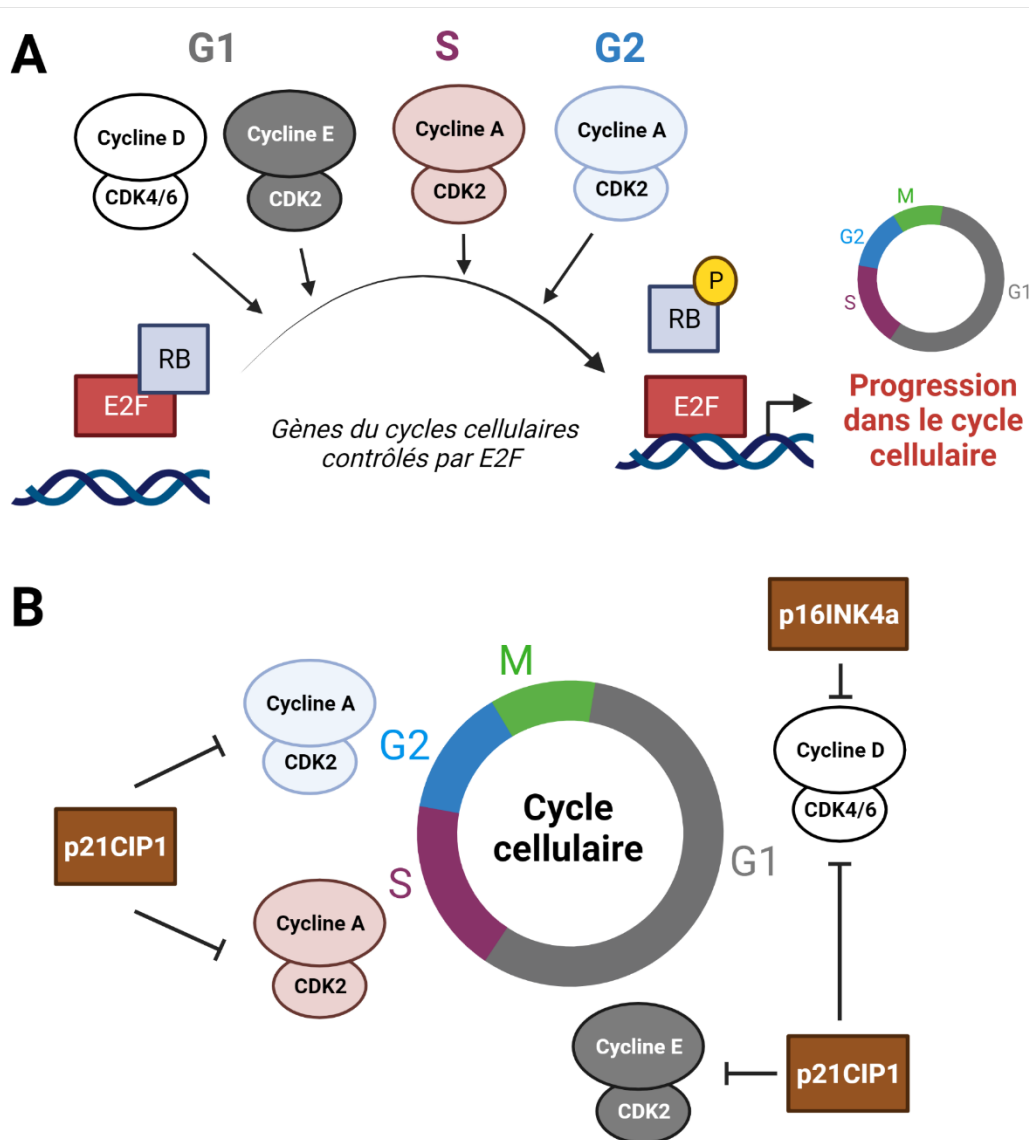


sénescentes, il faut donc utiliser la combinaison de plusieurs d'entre eux pour déterminer l'état de sénescence. De plus, certains de ces marqueurs sont universels, alors que d'autres peuvent varier en fonction du type d'inducteur de sénescence et du type cellulaire. Les caractéristiques principales de la sénescence sont : un arrêt de prolifération, un phénotype de sécrétion particulier, des changements morphologiques et l'acquisition de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase détectable à un pH de 6.

### 1.1.1 Arrêt stable de la prolifération

La caractéristique majeure, mais insuffisante, pour déterminer l'état de sénescence est l'incapacité des cellules sénescentes à avancer dans le cycle cellulaire. A l'inverse de la quiescence, la sénescence correspond à un arrêt stable du cycle cellulaire, indépendamment de la stimulation par des facteurs de croissance. Le cycle cellulaire est composé de quatre phases : phase G1 (préparation de la réplication), phase S (réplication de l'ADN), phase G2 (préparation de la mitose) et phase M (division cellulaire), et d'une cinquième phase, G0, correspondant à la différenciation cellulaire ou à la quiescence.

Toutes ces phases sont minutieusement contrôlées par des Kinases Dépendantes de Cyclines (« Cyclin-Dependant Kinases », CDKs) qui activent des voies moléculaires et facteurs de transcription permettant la progression dans le cycle cellulaire. La protéine du rétinoblastome (RB), sous sa forme non phosphorylée, séquestre initialement le facteur de transcription E2F, responsable de la transcription de gènes impliqués dans l'avancement dans le cycle cellulaire. Les CDKs, en complexe avec des cyclines, phosphorylent la protéine RB (**Figure 1**). Ainsi libéré par la phosphorylation de RB, E2F va pouvoir activer l'expression de gènes permettant la progression dans le cycle cellulaire, notamment d'autres cyclines, permettant l'avancement dans les différentes phases du cycle cellulaire. Notamment, les complexes cycline D / CDK-4 ou -6 permettent le déroulement de la phase G1 et la transition de la phase G1 à S et les complexes cycline A/CDK2 le bon déroulement de la phase S et G2.



**Figure 1. Contrôle de l'avancement dans le cycle cellulaire par les cyclines et cyclines dépendantes de kinases (CDKs).**

A. Aux différentes phases du cycle, les complexes cyclines/CDKs permettent la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (RB) et ainsi la libération du facteur de transcription E2F, nécessaire à l'expression des gènes impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire.

B. Les inhibiteurs de CDKs, p21<sup>CIP1</sup> et p16<sup>INK4a</sup>, inhibent respectivement l'activité kinase des cyclines et la formation des complexes cyclines/CDKs, ce qui permet l'arrêt aux différentes phases du cycle cellulaire.

Deux familles de protéines, appelées les CKIs (« CDK Inhibitors »), permettent le contrôle du cycle cellulaire *via* l'inhibition des CDKs: la famille INK4 (« INHibitor of CDK4 ») et CIP/KIP (« CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein »). La famille INK4, composée de p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> bloque la formation des complexes de la cycline D avec CDK4 et CDK6. Ceci lève la phosphorylation de pRB, qui séquestre toujours E2F et l'empêche de transcrire les gènes permettant d'avancer dans le cycle

cellulaire et en particulier de la transition G1-S. La famille CIP/KIP est quant à elle composée de p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup>, qui inhibent l'activité kinase des cyclines et empêchent les transitions entre toutes les différentes phases du cycle (Sherr et Roberts 1999). Durant la sénescence, les cellules surexpriment généralement p16<sup>INK4a</sup> et/ou p21<sup>CIP1</sup>, ce qui permet l'arrêt du cycle cellulaire majoritairement en phase G1 (Leonardo et al. 1994; Manuel Serrano et al. 1997; Herbig et al. 2004). Même s'il n'y a eu que peu d'études sur le rôle de p27<sup>KIP1</sup> et p57<sup>KIP2</sup> dans la sénescence, il semblerait que p27<sup>KIP1</sup> puisse être impliqué dans la sénescence (X. Cao et al. 2011). De plus, quelques études ont aussi montré un arrêt en phase G2/M (Olsen et al. 2002; Shay et Roninson 2004).

Parmi les gènes de la famille INK4, p16<sup>INK4a</sup> reste le plus étudié et est l'un des marqueurs moléculaires de la sénescence le plus utilisé à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, des études chez la souris ont montré une accumulation de cellules montrant une forte expression de p16<sup>INK4a</sup> lors de la sénescence cellulaire et du vieillissement (Baker et al. 2011; Yamakoshi et al. 2009; Burd et al. 2013). Cependant, ce marqueur n'est pas parfait car l'expression de p16<sup>INK4a</sup> n'est pas toujours augmentée lors de la sénescence. Par exemple, les cellules épithéliales mammaires (MEC) possèdent une méthylation du promoteur de p16<sup>INK4a</sup>, empêchant sa transcription mais n'empêchant pas l'entrée en sénescence des cellules (Kiyono et al. 1998).

### 1.1.2 Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence (SASP)

La sénescence cellulaire, outre l'arrêt de prolifération stable, est associée à un phénotype sécrétoire particulier, appelé SASP pour « Senescence-Associated Secretory Phenotype ». Une première étude en 1999 par Shelton et ses collègues a montré grâce à des puces ADN un changement d'expression dans trois types cellulaires humains (fibroblastes, cellules épithéliales et endothéliales) en sénescence réplivative (Shelton et al. 1999). Ils ont alors observé que chaque type cellulaire arborait une signature différente et que les fibroblastes sénescents étaient enrichis en gènes de l'inflammation. D'autres études ont ensuite montré la sécrétion des cellules sénescents et c'est en 2008 que l'équipe de Coppé précise grâce à des analyses protéomiques de fibroblastes en sénescence réplivative ou suite à un stress génotoxique ou oncogénique les composants des SASP associés (Coppé et al. 2008). Ils ont ainsi montré que les SASP étaient relativement similaires et étaient majoritairement composés de molécules pro-inflammatoires, tels que l'IL-6 et IL-8. Ce sécrétome inflammatoire a été validé la même année par deux autres études (Kuilman et al. 2008; Juan C. Acosta et al. 2008).

Ce SASP est une marque commune de la sénescence mais la composition du SASP est hétérogène et l'expression et sécrétion de ces protéines est variable en fonction du type cellulaire (Hernandez-Segura et al. 2017), de l'inducteur de sénescence (Hernandez-Segura et al. 2017; Wiley et al. 2016) et évolue au cours de la

mise en place de la sénescence (Hoare et al. 2016; De Cecco et al. 2019). De plus, ce réseau sécrétoire complexe peut avoir des effets sur les cellules sénescents elles-mêmes (effets intracrine et autocrine renforçant la sénescence) et sur les cellules environnantes et/ou à distance, normales et/ou tumorales (effet paracrine) (Coppé et al. 2008; Kuilman et al. 2008; Juan C. Acosta et al. 2008) en activant des récepteurs cellulaires et les voies de signalisations associées et en modifiant l'organisation et le contenu de la matrice extracellulaire. Ainsi, ils participent grandement aux conséquences physio(-patho)logiques associées à la sénescence, que je détaillerai dans la partie décrivant les effets physio-pathologiques du SASP.

Les facteurs du SASP sont composés majoritairement de facteurs de signalisation solubles, tels des interleukines et chimiokines, de facteurs de croissance et de métalloprotéases sécrétées au niveau de la matrice extracellulaire (« Extra-Cellular Matrix », ECM) (Coppé et al. 2010). De plus, il a récemment été décrit que les cellules sénescents pouvaient aussi sécréter des vésicules extracellulaires, tel que des exosomes, ainsi que des lipides comme les prostaglandines (**Tableau 1**).

### *Cytokines et interleukines*

Les cellules sénescents sécrètent des cytokines et interleukines qui peuvent impacter le microenvironnement cellulaire. Notamment, l'une des molécules les plus étudiées est l'interleukine (IL) pro-inflammatoire, IL-6. L'IL-6 semble être majoritairement régulé après l'activation de la voie des dommages à l'ADN (« DNA Damage Response », DDR). Les cellules sénescents peuvent ainsi directement communiquer avec elles-mêmes et les cellules environnantes *via* le récepteur à l'IL-6 (IL-6R) et induire des cascades de signalisations cellulaires. D'autres interleukines sécrétées lors de la sénescence comme les IL-1A et IL-1B, agissent sur les cellules voisines par les récepteurs IL-1R et « Toll-like », qui permettent l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (« Nuclear Factor Kappa B») et mTOR (« mammalian Target Of Rapamycin »), nécessaires à la production et sécrétion des facteurs pro-inflammatoires du SASP (décrit dans la partie « Régulation du SASP »). La plupart des cellules sénescents surexpriment également des chimiokines : essentiellement IL-8 (CXCL-8), mais aussi CXCL-1, -2 et certaines de la famille CCL (CCL-8, -13, -16), qui font partie des chimiokines activatrices du récepteur IL8-R (CXCR-2), permettant d'amplifier le réseau de sécrétion (Coppé et al. 2010).

Nature	Biomolécules	Classes	Composés
Facteurs solubles	Protéines	Interleukines	IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-13, IL-15
		Chimiokines (CXCL, CCL)	IL-8, CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3, CCL8
		Autres molécules inflammatoires	TGF $\beta$ , IFN- $\gamma$
		Facteurs de croissance	EGF, bFGF, VEGF, CSF2, Angiogenine, IGFbps, Amphiréguline,
		Protéases	MMP-1, -3, -9, TIMP-1, Cathespin B
		Ligands	ICAM-1, -3, CXCR2, OPG, Fas, EGF-R
	Métabolites	Espèces Réactives à l'Oxygène (ROS)	-
		Dérivés lipidiques	PGE2, 4-HNE
Facteurs insolubles	Fibres	Matrice extracellulaire	Fibronectine, collagène, laminine
Vésicules		Lipides Protéines Acides nucléiques (miRNA, RNA, DNA)	

**Tableau 1. Composition hétérogène (et non-exhaustive) du SASP.**

Adapté de (Coppé et al. 2010)

Le SASP est composé d'une multitude de biomolécules (molécules proinflammatoires, facteurs de croissance, protéases, ligands ou métabolites) pouvant être sécrétées de manière soluble dans l'environnement (orange) ou dans des vésicules (bleu). Il est aussi composé d'autres facteurs insolubles, comme des fibres permettant de moduler l'environnement des cellules sénescence (jaune).

#### *Facteurs de croissance et protéines associées*

Les cellules sénescences sécrètent des protéines de la famille des IGF-binding protéines (IGFBPs), notamment -3 et -5 (Goldstein et al. 1991; K. S. Kim, Seu, et al. 2007). Ces facteurs permettent de renforcer la sénescence, en effet des traitements avec les protéines recombinantes IGFBP3 et -5 sur des cellules endothéliales humaines (HUVEC) permettent d'induire la sénescence par activation de la voie p53 (K. S. Kim, Seu, et al. 2007; K. S. Kim, Kim, et al. 2007). Des facteurs de croissance impliqués dans l'activation de la voie du TGF $\beta$  (« Transforming Growth Factor  $\beta$  ») sont aussi surexprimés et sécrétés lors de la sénescence (Juan Carlos Acosta et al. 2013; Park et al. 2016).

### *Métalloprotéases*

En plus de ces facteurs de signalisation, les cellules sénescents sécrètent des métalloprotéases associées à la matrice extracellulaire (« extracellular Matrix MetalloProteases », MMPs). Les MMPs sécrétées sont majoritairement les MMP-1, -3 et -9 (Parrinello et al. 2005; Zeng et al. 1996), qui permettent de dégrader les fibres de collagènes, la fibronectine et l'élastine et de remodeler l'environnement des cellules sénescents.

### *Vésicules extracellulaires*

De récentes études ont identifié des vésicules extracellulaires (« Extracellular Vesicles », EVs) comme composants du SASP. Ces vésicules réparties en trois sous-groupes (exosomes, microvésicules et corps apoptotiques) sont constituées de nombreuses molécules, telles des protéines, lipides, mRNA, miRNA, gDNA et mDNA. En 2008, Lehmann fut le premier à décrire la présence de vésicules de type « exosome-like » lors d'une sénescence induite par irradiation et ce d'une manière dépendante de p53 (Lehmann et al. 2008). P53 a dès lors été aussi décrit comme régulant l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des vésicules. Ainsi l'activation de p53 durant la sénescence pourrait induire la sécrétion de vésicules extracellulaires. Dorénavant, la présence d'EVs a été décrite dans différents contextes de sénescence, induits par : - un oncogène (Borghesan et al. 2019) ; - un stress oxydatif (Terlecki-Zaniewicz et al. 2019) ou – un stress réplicatif (Mensà et al. 2020), démontrant que cette sécrétion semble être une caractéristique commune aux différents inducteurs de sénescence.

La composition exacte de ces vésicules lors de la sénescence reste encore à décrire et constitue un réel défi technique. Cependant il a déjà été montré qu'elles contenaient les molécules solubles classiques du SASP, tel que l'IL-6 et l'IL-8 et des composants moins décrits, tels que des miRNA ou la protéine de l'interféron IFITM3 (Urbanelli et al. 2016; Terlecki-Zaniewicz et al. 2019; Borghesan et al. 2019; Mensà et al. 2020).

Le SASP est donc un sécrétome bien spécifique des cellules sénescents composé d'une myriade de molécules et d'exosomes, mais dont la composition reste hétérogène. En effet, le SASP dépend du type cellulaire, de l'inducteur de sénescence et de la chronicité du stress. Ce SASP reste très important pour les cellules sénescents pour communiquer avec et impacter leur environnement. Les effets paracrines du SASP seront détaillés dans le deuxième chapitre mais nous pouvons déjà commenter qu'au-delà des effets sur les cellules environnantes, le SASP peut aussi jouer un rôle à distance sur d'autres types cellulaires, tissus ou organes. Ainsi, la découverte du SASP a permis une meilleure compréhension des actions paracrines des cellules sénescents et

d'imaginer de nouvelles voies de communication à distance sur les tissus et les organes.

### 1.1.3 Changements morphologiques

Il est souvent associé à la sénescence cellulaire des changements morphologiques particuliers, au niveau cytoplasmique et nucléaire. Hayflick et Moorhead avaient dans leur première étude déjà observé un étalement des fibroblastes en sénescence répllicative (Hayflick et Moorhead 1961). Cette hypertrophie cellulaire avec un cytoplasme étendu est retrouvée dans beaucoup de types cellulaires et inducteurs de sénescence. Même si par exemple des cellules épithéliales mammaires en sénescence induite par l'activation de Raf présentent une morphologie très allongée, en tige. La sénescence est aussi accompagnée par une augmentation de la masse lysosomale (Kurz et al. 2000), ainsi que mitochondriale (H.-C. Lee et al. 2002; Stab et al. 2016), qui pourrait être due à un déséquilibre dans les processus de fusion et fission mitochondriale (Ziegler, Wiley, et Velarde 2015).

De plus, les cellules sénescents présentent souvent des altérations nucléaires et possèdent un noyau plus gros, déformé voire sont multinucléés. L'enveloppe nucléaire interne est composée de protéines de structure, les lamines, essentielles pour la structure et fonction du noyau (Dechat et al. 2008). La perte de l'expression de certaines lamines est un marqueur de sénescence (Freund et al. 2012) et la sénescence induite par la progérine, conduisant à des modifications de lamine et à une enveloppe nucléaire altérée, représente un modèle de sénescence bien établi.

Il est intéressant d'observer que les morphologies associées à la sénescence dépendent du type cellulaire et de l'inducteur de sénescence. Cependant, s'ils représentent *in vitro* une marque de sénescence, ces changements morphologiques sont peu utilisables *in vivo*.

### 1.1.4 Activité $\beta$ -galactosidase

Le lysosome est un organite intracellulaire contenant des enzymes capables de dégrader les déchets cellulaires. Parmi ces enzymes, la  $\beta$ -galactosidase possède une activité optimale à pH = 4,5 dans les cellules normales et à un pH suboptimal de 6 dans les cellules sénescents du fait d'une masse lysosomale associée à une quantité d'enzyme plus importante (Kurz et al. 2000; B. Y. Lee et al. 2006). L'équipe de Judith Campisi a donc utilisé cette particularité pour mettre au point un test colorimétrique, permettant de marquer les cellules sénescents en bleu (Dimri et al. 1995), appelé activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (« Senescence-Associated  $\beta$ -galactosidase Activity », SA- $\beta$ -Gal). Cette méthode de détection des cellules

sénescentes a été l'une des premières à être développée et est aujourd'hui utilisée à la fois *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins, dans certains autres contextes cellulaires, comme lors d'un état sub-confluent des cellules, il est possible d'observer une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase (N.-C. Yang et Hu 2005). Ce marqueur n'est donc pas complètement spécifique et ne suffit pas, à lui seul, pour valider l'état de sénescence.

### 1.1.5 Résistance à l'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui permet l'élimination rapide de cellules endommagées ou stressées. Contrairement aux cellules en phase de croissance, les cellules sénescentes sont pour la plupart résistantes à l'apoptose (E. Wang 1995; Seluanov et al. 2001). Cette résistance peut être due à une absence de stabilisation de p53 (Seluanov et al. 2001) ou à la régulation de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (E. Wang 1995; Ryu, Oh, et Park 2007; Crescenzi, Palumbo, et Brady 2003). En effet, les cellules sénescentes maintiennent un niveau élevé de Bcl-2 (Ryu, Oh, et Park 2007) ou de Bcl-xL et Bcl-W (Yosef et al. 2016) les rendant résistantes à l'apoptose. De plus, la sénescence est accompagnée d'une diminution de l'expression et de l'activité des caspases, actrices majeures de l'apoptose (Rebbaa et al. 2003; Marcotte, Lacelle, et Wang 2004). Il semble donc que les mécanismes conduisant à la sénescence ou à l'apoptose soient interconnectés.

Les mécanismes moléculaires conduisant à l'entrée en sénescence ou en apoptose sont encore mal compris et il semblerait que toutes les cellules soient capables d'activer ces deux voies. C'est la nature et/ou l'intensité du stress qui pourrait induire une réponse différente (Rodier, Campisi, et Bhaumik 2007).

De récentes études ont mis à profit cette forte expression des protéines anti-apoptotiques des cellules sénescentes pour utiliser des agents pro-apoptotiques afin d'éliminer spécifiquement les cellules sénescentes. Ces composés, dits sénolytiques, peuvent cibler la famille des Bcl afin de restaurer l'apoptose dans les cellules sénescentes (Y. Zhu et al. 2016; 2017; Chang et al. 2016; Yosef et al. 2016). Ces études, suivies par d'autres, montrent en plus les bénéfices de ces composés dans des modèles murins sur la qualité et l'espérance de vie des souris (M. Xu et al. 2018; Kirkland et Tchkonja 2017). L'expression de ces protéines anti-apoptotiques apparaît comme le talon d'Achille des cellules sénescentes. Une grande partie de la communauté de la sénescence cherche donc à déterminer de nouveaux mécanismes régulant la mort cellulaire durant la sénescence afin de développer de nouveaux composés efficaces afin de tuer sélectivement les cellules sénescentes.



### 1.1.6 Dommages à l'ADN

Les dommages à l'ADN sont les dommages macromoléculaires les plus étudiés dans la sénescence car ils représentent à la fois une caractéristique et un inducteur de sénescence. Tout au long de la vie d'une cellule des dommages à l'ADN mineurs (oxydation des bases) ou majeurs (cassures simple ou double brin, «Single or Double-Strand Breaks », SSB ou DSB) peuvent s'accumuler (d'Adda di Fagagna 2008). Suite à ces altérations de l'ADN, une réponse aux dommages à l'ADN (« DNA Damage Response », DDR) se met en place. Les kinases ATM et ATR (« Ataxia-Telangienctasia Mutated » et « Ataxia-Telangienctasia and Rad3-related ») permettent la signalisation du dommage. Elles recrutent ainsi entre autres les protéines  $\gamma$ H2AX et 53BP1 (« p53-Binding Protein »), deux marqueurs des dommages à l'ADN, permettant la phosphorylation des kinases CHK1 et CHK2, menant à l'activation de p53. Suivant la nature et l'intensité du stress, la DDR induit la réparation de l'ADN, l'apoptose, ou la sénescence.

Les extrémités des télomères sont protégées par des protéines shelterines mais la dégradation progressive des télomères et leur découverture peut induire une DDR (d'Adda di Fagagna et al. 2003) ainsi que des foci induits par dysfonctionnement des télomères (« Telomere dysfunction-Induced Foci », TIFs) (Kaul et al. 2011; Takai, Smogorzewska, et de Lange 2003). De plus, des stress génotoxiques ou des irradiations peuvent induire des dommages à l'ADN et donc conduire à la sénescence.

### 1.1.7 Changements épigénétiques

Comme pour chaque état spécifique d'une cellule, les cellules sénescents possèdent des modifications épigénétiques particulières. Notamment, la sénescence peut être associée à des foyers d'hétérochromatine (« Senescence-Associated Heterochromatin Foci », SAHFs) (Narita et al. 2003; Chandra et Narita 2013) enrichies en H3K9me3 et en différents variants d'histone macroH2A. Ces structures complexes semblent permettre de réprimer les gènes cibles de E2F impliqués dans la prolifération cellulaire (Narita et al. 2003) et ainsi de contribuer à la stabilité de l'arrêt du cycle cellulaire et de la sénescence. En effet, une fois que les SAHFs sont formés, la présence des inhibiteurs du cycle et des dommages à l'ADN ne semble plus nécessaire au maintien de la sénescence (Bakkenist et al. 2004). Cependant, on observe dans certains contextes cellulaires et inducteurs de sénescence, la mise en place de la sénescence sans présence de SAHFs (Kosar et al. 2011), ce qui pose la question de la nécessité des SAHFs dans la mise en place ou le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence.

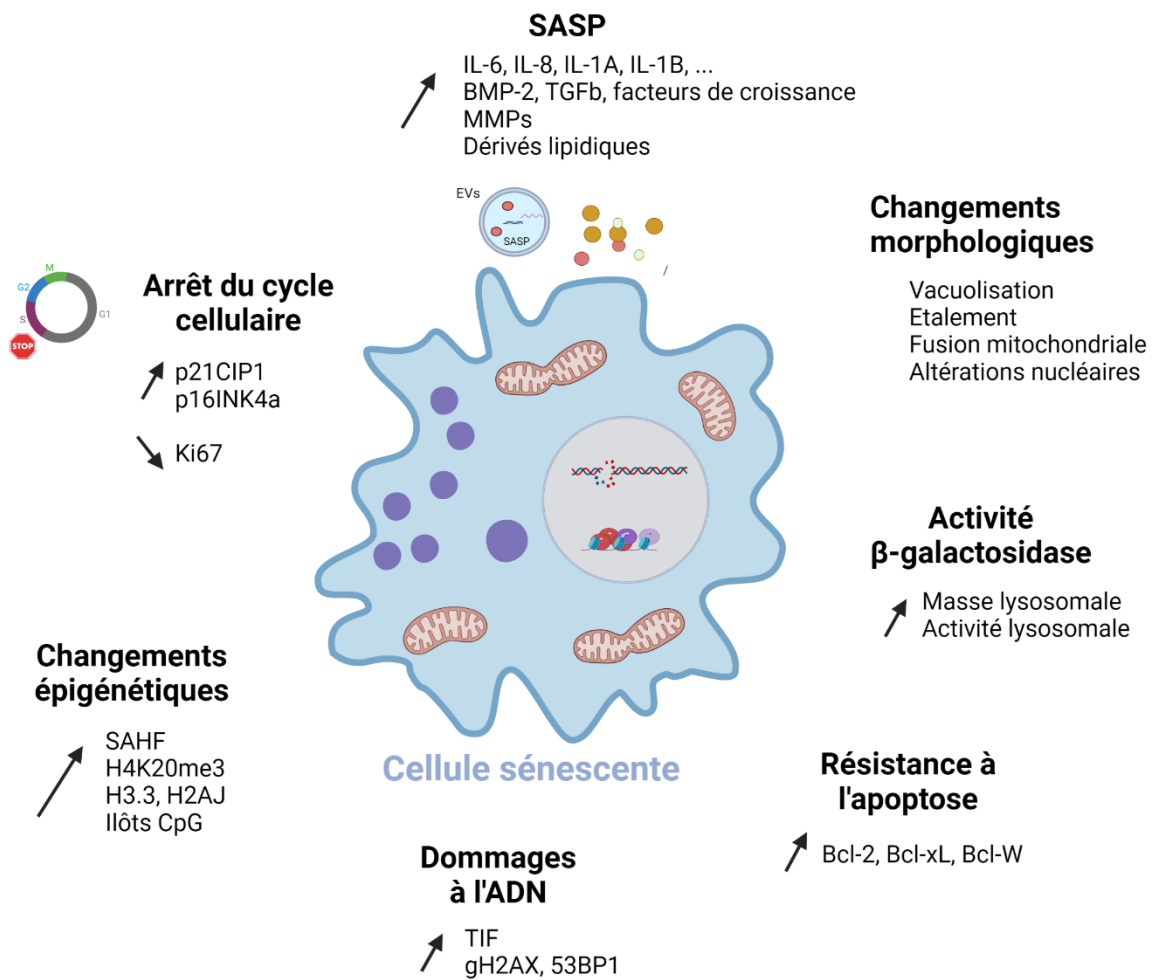
De plus, durant la sénescence des changements dans les variants d'histones ou des modifications post-traductionnelles des histones apparaissent. Notamment, il est observé dans plusieurs contextes de sénescence une augmentation des variants H3.3

et H2AJ et de la méthylation H4K20me3 (Paluvai, Di Giorgio, et Brancolini 2020). Il a aussi été recensé une perte de l'histone H1 ou d'autres variants ainsi que la perte de la protéine HMGB1 (Funayama et al. 2006; O'Sullivan et al. 2010; Davalos et al. 2013). En plus des changements sur les variants d'histone, la sénescence répliquative est accompagnée d'une diminution globale de la méthylation d'îlots CpG, dont la méthylation permet la répression de promoteurs de gènes (Cheng et al. 2017).

Il a été récemment démontré que l'histone acétyltransférase p300 était une protéine clé dans l'expression des gènes impliqués dans la sénescence cellulaire (Sen et al. 2019). En effet, p300 induit une hyper-acétylation des histones, conduisant à la décondensation de la chromatine. A l'inverse, l'invalidation de p300 conduit à la réversion de l'induction de la sénescence (Sen et al. 2019).

Ainsi, les cellules sénescents présentent différentes caractéristiques, qui peuvent parfois être propres au type cellulaire, à l'inducteur de sénescence et à l'environnement tissulaire (**Figure 2**). Aucun de ces marqueurs ne peut à lui seul déterminer l'état de sénescence. Cependant, l'arrêt de prolifération, l'expression de facteurs représentant le SASP et l'activité SA- $\beta$ -Gal représentent les marqueurs les plus couramment utilisés.

Dans la partie suivante, nous allons donc voir quels sont les différents stress pouvant induire la sénescence cellulaire.



**Figure 2. Principaux biomarqueurs de la sénescence cellulaire.**

Principales caractéristiques des cellules sénescences, permettant leur identification *in vitro* et *in vivo*.

## 1.2 Stress induisant la sénescence cellulaire

La sénescence est un programme déclenché en réponse à différents stress. Ces stress peuvent être intra- ou extra-cellulaires et permettent à la cellule de répondre à son environnement. Ces différents types de stress peuvent aboutir à différents types de sénescence.

### 1.2.1 Sénescence rélicative

La sénescence cellulaire a tout d'abord été décrite lorsque l'on a découvert que des fibroblastes, Wi38, en culture ne proliféraient pas indéfiniment en culture et atteignaient une limite rélicative (Hayflick et Moorhead 1961). Plus tard, il a été décrit

que cette limite, dite de Hayflick, est atteinte lorsque les télomères se raccourcissent jusqu'à un certain point critique.

Les télomères sont des structures ribonucléoprotéiques entourant les extrémités des chromosomes en formant une boucle T. Ils sont composés de répétition TTAGGG, d'ARN et de protéines spécialisées et protègent les chromosomes d'une potentielle dégradation et perte d'informations génétiques. En effet, la réplication de l'ADN n'est pas capable de répliquer les chromosomes jusqu'au bout de leurs extrémités et les télomères perdent environ 50 à 200 paires de base à chaque réplication. Ainsi, à chaque division cellulaire, les télomères se raccourcissent jusqu'à atteindre une limite critique. Passé ce point, les télomères ne peuvent plus former la boucle T, les extrémités simple brin sont exposées, ce qui conduit à une réponse des dommages à l'ADN, entraînant l'activation de p53 et un arrêt stable du cycle cellulaire menant à la sénescence ou l'apoptose.

Pour compenser cette réplication incomplète, la télomérase, une transcriptase inverse, peut ajouter des domaines télomériques riches en répétition G, rallongeant les extrémités raccourcies des télomères. Chez les mammifères, la télomérase est composée d'une molécule d'ARN, servant de modèle, et d'une sous-unité catalytique, TERT (Chan et Blackburn 2002). Ainsi la réintroduction de TERT dans des cellules rallonge les télomères et peut permettre d'« immortaliser » les cellules et empêcher leur entrée en sénescence (Bodnar 1998). Le plus souvent les cellules cancéreuses surexpriment ainsi la télomérase afin d'échapper à l'arrêt du cycle cellulaire (Shay 1997). Elles peuvent utiliser aussi un autre mécanisme, appelé « Alternative Lengthening Telomere » (ALT), reposant sur la recombinaison homologue entre les séquences télomériques (Muntoni et Reddel 2005).

L'entrée en sénescence par le raccourcissement des télomères est donc une protection contre le dysfonctionnement des télomères et la potentielle dégradation de l'information génétique, qui pourrait mener à une instabilité génomique. Depuis la découverte de cette sénescence réplivative, d'autres études ont montré la mise en place d'une sénescence prématurée à la suite de divers stress, indépendante de l'activité de la télomérase. Je vais notamment me concentrer sur l'induction de la sénescence par un stress oncogénique, puis génotoxique, et enfin oxydatif.

## 1.2.2 Sénescence induite par un stress oncogénique

### 1.2.2.1 Sénescence induite par un oncogène

Les oncogènes représentent des gènes qui, lorsqu'ils sont mutés ou suractivés conduisent à la formation de tumeurs. Notamment, les oncogènes de la voie MAP kinase (Ras/Raf/Mek) et leurs effets sur la prolifération et tumorigénèse ont été bien étudiés (Barbacid 1986). Mais de manière surprenante, les cellules répondent d'abord

à la suractivation d'un oncogène par l'induction de la sénescence. Serrano et Lowe ont été les premiers à démontrer dans des fibroblastes humains que l'expression ectopique de H-Ras<sup>G12V</sup> induit un arrêt de prolifération avec les caractéristiques de la sénescence : accumulation de p53 et p16<sup>INK4a</sup>, activité SA-β-galactosidase et changements morphologiques (Manuel Serrano et al. 1997). Ce nouveau type de sénescence prématurée a été appelé OIS pour Oncogene-Induced Senescence. Par la suite, d'autres oncogènes ont été décrits comme inducteurs de sénescence, tel que Raf (J. Zhu et al. 1998) ou Akt (Miyachi et al. 2004). Mécanistiquement, la suractivation d'un oncogène conduit dans un premier temps à l'augmentation de la réplication de l'ADN, augmentant le nombre de dommages à l'ADN à cause du stress réplicatif et activant la mise en place de la sénescence.

L'induction et le rôle de l'OIS *in vivo* ont été montrés plus tardivement. Notamment Collado et ses collègues ont montré que des souris exprimant K-Ras<sup>G12V</sup> présentaient une accumulation de cellules sénescents dans les lésions pré-malignes alors que la sénescence était absente des lésions malignes (Collado et al. 2005). Une autre étude a mis en évidence que la suractivation de l'oncogène N-Ras<sup>G12D</sup> dans des souris induisait la sénescence, révertée lors de l'inactivation de p53, et participait à la formation précoce de lymphomes (Braig et al. 2005). Chez l'humain, les cellules sénescents sont particulièrement présentes dans les naevi, les grains de beauté, qui sont des lésions bénignes de la peau. Ces cellules surexpriment l'oncogène B-Raf<sup>V600E</sup> et présentent des caractéristiques de cellules sénescents (Michaloglou et al. 2008). Ces études soulignent l'importance de l'OIS *in vivo* et suggèrent que l'OIS est un mécanisme de défense contre le développement tumoral.

### 1.2.2.2 Sénescence induite par invalidation d'oncogène

Il a aussi été démontré que la sénescence pouvait être induite par invalidation d'oncogène (« Oncogene Inactivation-Induced Senescence », OIIS), comme l'inactivation de PTEN (Z. Chen et al. 2005). Ce processus a notamment été décrit dans des cellules cancéreuses, qui sont dépendantes de certains oncogènes pour proliférer (Weinstein 2000). Notamment, l'inactivation de MYC ou de K-Ras dans différents contextes tumoraux peut induire la régression de la tumeur (Jain et al. 2002; Felsher et Bishop 1999).

### 1.2.3 Sénescence induite par un stress génotoxique

Outre l'attrition des télomères et l'activation d'un oncogène, la sénescence peut être induite dans des cellules normales à la suite de stress génotoxiques, par exemple sous l'action de radiations, de composés chimiques, comme la bléomycine, l'étoposide, le cisplatine ou de fumée de cigarette (Leonardo et al. 1994; Robles et Adami 1998;

Cottage et al. 2019). Mécanistiquement, ces stress induisent des dommages à l'ADN, conduisant à une réponse aux dommages à l'ADN et à la sénescence (d'Adda di Fagnana 2008).

Il a aussi été montré que les cellules tumorales peuvent rentrer en sénescence par ces stress génotoxiques, notamment lors de chimio- ou radiothérapies. C'est ce qu'on appelle la sénescence induite par thérapie (« Therapy-Induced Senescence, TIS ») car les agents génotoxiques cités plus haut (bléomycine, étoposide, doxorubicine) sont utilisés en chimiothérapies (Bojko et al. 2019; Roninson, Broude, et Chang 2001) (Chang et al., s. d.).

Une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses est leur capacité à se diviser indéfiniment (Hanahan et Weinberg 2011). La TIS des cellules cancéreuses peut donc sembler étonnante puisque les cellules cancéreuses ont échappé à la sénescence durant leur étape d'immortalisation. Ceci est toutefois possible car la sénescence cellulaire peut être induite par de nombreuses voies dont certaines restent activables dans les cellules cancéreuses (Muñoz-Espín et Serrano 2014; Ewald et al. 2010). Notamment de nombreux cancers présentant un p53 fonctionnel développent à la suite de traitements par des agents chimiothérapeutiques des caractéristiques de sénescence (Ewald et al. 2010). Il existe aussi des manières indépendantes de p53 d'induire la TIS dans des cellules tumorales. La Protéine Kinase C (PKC) a été décrite comme augmentant la sénescence et l'expression de p21<sup>CIP1</sup>, indépendamment de p53, dans des MCF-7 en réponse à des traitements à l'étoposide (Zurgil et al. 2014). L'activation chimique de la PKC dans des cellules cancéreuses du poumon ayant un p53 et p16<sup>INK4a</sup> inactivés conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, un changement de morphologie et une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase (Oliva et al. 2008).

L'induction de sénescence à la suite de chimiothérapies a beaucoup été étudiée *in vivo* dans les cellules cancéreuses et commence aussi à être montrée dans les cellules stromales, même si l'obtention de données *in vivo* sur ces cellules est délicate (Coppé et al. 2008; G. Yang et al. 2006). Dorénavant, la recherche sur les mécanismes et conséquences physiologiques de la TIS dans le contexte de l'environnement tumoral est très active dans le domaine de la sénescence.

#### 1.2.4 Stress oxydant

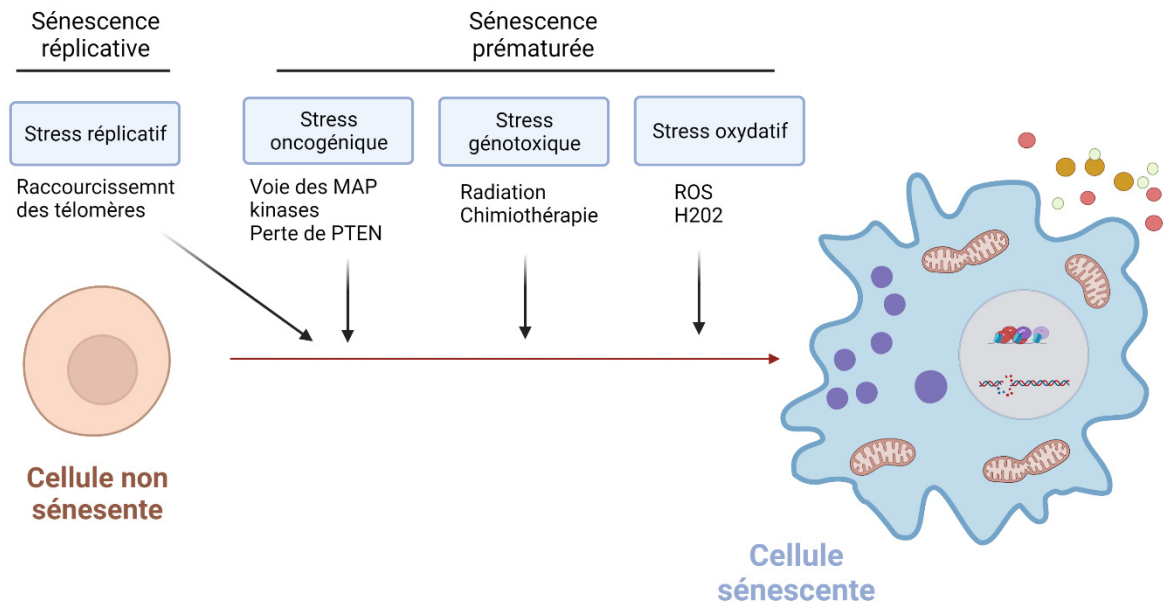
Le stress oxydatif joue un rôle dans l'induction de la sénescence cellulaire *via* l'intermédiaire de la génération d'espèces réactives à l'oxygène (« Reactive Oxygen Species », ROS) produits majoritairement par les mitochondries (Lu et Finkel 2008; Moiseeva et al. 2009). Il a notamment été montré que les niveaux de ROS sont plus

élevés dans les cellules en sénescence répliquative (Furumoto et al. 1998) et en OIS (A. C. Lee et al. 1999). L'exposition à de faibles doses de ROS, telles que l' $H_2O_2$ , est suffisante pour induire la sénescence dans différents types cellulaires primaires (Q. Chen et Ames 1994; Q. Chen et al. 1995). À l'inverse, un traitement antioxydant permet de limiter l'entrée en sénescence (Q. Chen et Ames 1994; Bodnar 1998; Serra et al. 2003).

Des études ont montré que la taille des télomères pouvait être impliquée dans ce phénomène. En effet, le stress oxydant peut conduire à une accumulation de dommages oxydatifs au niveau des bases de l'ADN télomérique, menant à une déstabilisation de la boucle T. L'ADN télomérique est alors exposé aux nucléases, qui le raccourcissent, conduisant à la sénescence répliquative (Opresko et al. 2005; Vallabhaneni et al. 2013; von Zglinicki, Pilger, et Sitte 2000). Cependant, la sénescence par augmentation du stress oxydant peut aussi être induite indépendamment du raccourcissement des télomères (Busuttill et al. 2003; Parrinello et al. 2003). Ceci est dû à l'augmentation du nombre de bases oxydées sur l'ensemble de l'ADN (Parrinello et al. 2003) et de cassures simples brins (Gosselin et al. 2009) accompagnées d'une diminution de l'efficacité des mécanismes de réparation (M. K. Kang et al. 2005) conduisant à une réponse des dommages à l'ADN.

Les voies moléculaires activées par les ROS conduisant à l'induction de la sénescence sont encore discutées. Des études ont montré l'implication de p16<sup>INK4a</sup> par l'activation de la kinase p38MAP (p38MAPK) lors d'un traitement à l' $H_2O_2$  (Volonté et al. 2001; W. Wang et al. 2002). D'autres études ont suggéré que les ROS induisent la sénescence par l'activation de p21<sup>CIP1</sup> (Passos et al. 2010) ou de p53 (Itahana et al. 2003).

Il est maintenant bien acquis que les ROS participent à l'entrée de la sénescence en activant les voies nécessaires à l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, ils sont maintenant considérés comme un des marqueurs de la sénescence. Toutefois le mécanisme de leur génération et leurs rôles exacts dans la sénescence restent encore à identifier.



**Figure 3. Principaux inducteurs de la sénescence cellulaire.**

La sénescence cellulaire peut être induite par différents stressés chroniques ou aigus, comme le raccourcissement des télomères, l'activation ou l'inactivation d'oncogènes, des stressés génotoxiques lors de radiation ou chimiothérapies, ou des stressés oxydatifs, par la production de ROS.

Divers stress peuvent induire la sénescence cellulaire, c'est pourquoi elle a longtemps été décrite seulement comme une réponse aux stress. Un type d'inducteur caractérise un type de sénescence particulier, permettant de déterminer les principaux effecteurs activés. Ainsi, le raccourcissement des télomères conduit à la sénescence réplivative, l'activation d'un oncogène à l'OIS ou des stress génotoxiques à la TIS. Ces stress peuvent être chroniques ou aigus en fonction de leur intensité et fréquence, ce qui peut conduire à des réponses différentes.

### 1.3 Effecteurs de la sénescence cellulaire

L'activation de différentes voies permet la mise en place de l'arrêt de prolifération et de la sécrétion du SASP. L'arrêt de prolifération est instauré principalement par les voies canoniques médiées par p53 et p16<sup>INK4a</sup> et la production du SASP est quant à elle mise en place par différents acteurs permettant à la fois une régulation transcriptionnelle mais aussi post-transcriptionnelle.

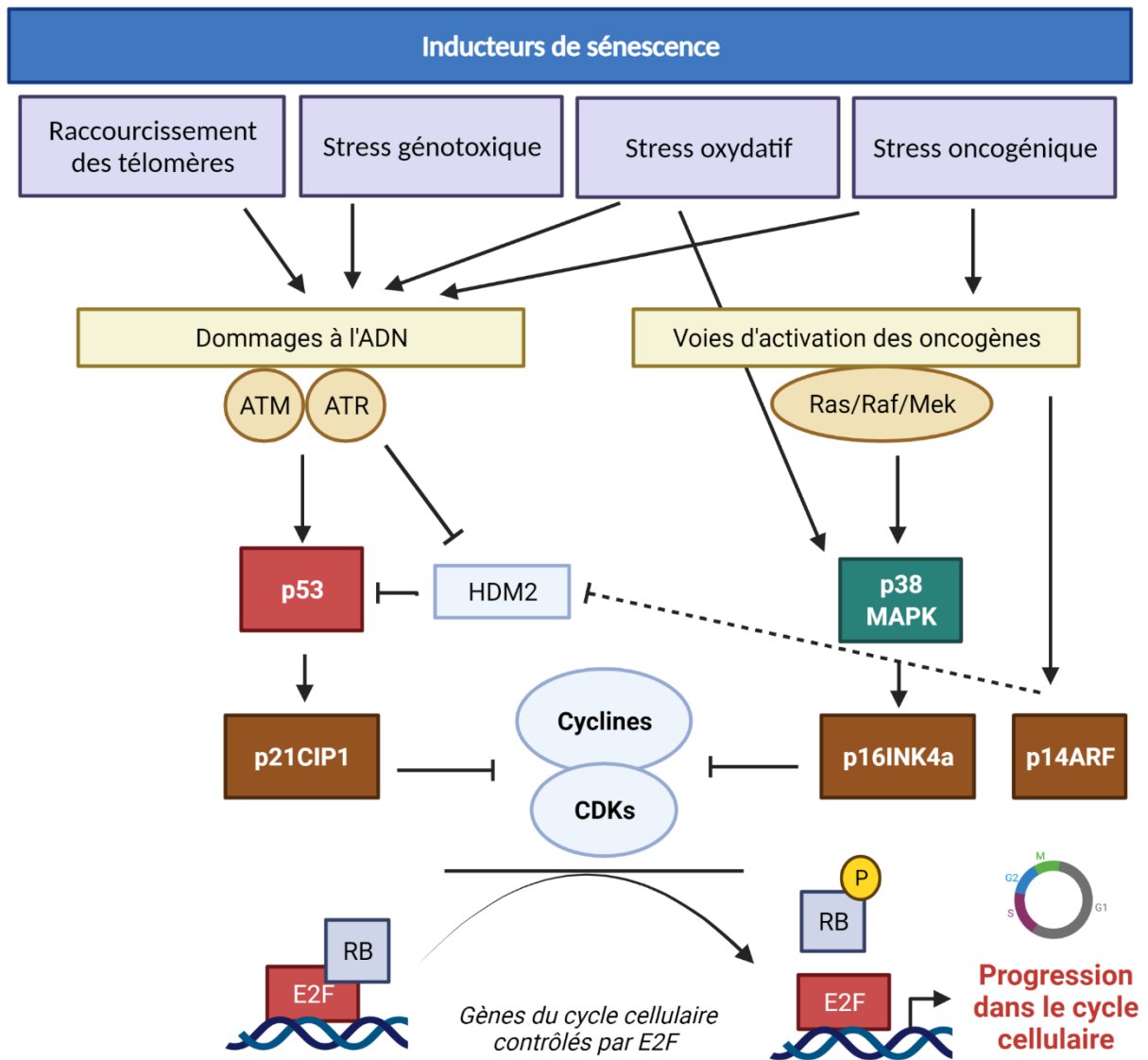


### 1.3.1 Arrêt de prolifération : rôle clé de p53 et p16<sup>INK4a</sup>

L'arrêt de prolifération cellulaire est établi et maintenu par deux axes majeurs : les voies p53 et p16<sup>INK4a</sup>. Ces voies interagissent mais peuvent aussi agir indépendamment.

#### *Rôle de p53 dans la réponse aux dommages à l'ADN*

Le facteur de transcription p53, aussi appelé « gardien du génome », permet l'expression de gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. C'est l'une des protéines « tumeur suppresseur » les plus connues et des mutations perte de fonction sont retrouvées dans près de la moitié des cancers (Levine 1997). Il est activé à la suite de divers stress réplicatifs, oncogéniques, génotoxiques ou oxydatifs et après l'activation d'une réponse aux dommages à l'ADN (« DNA Damage Response », DDR), ce qui permet l'arrêt transitoire du cycle cellulaire nécessaire à la réparation de l'ADN. Ce système d'alerte permet alors de limiter la prolifération des cellules ayant des altérations génomiques en induisant l'arrêt du cycle cellulaire. Si les stress sont persistants ou irréparables et l'arrêt de cycle cellulaire permanent, la cellule rentre en sénescence ou en apoptose. Lors d'une cassure double brin de l'ADN, les protéines de reconnaissance des dommages, ATM et ATR, et celles de signalisation des dommages, CHK1 et CHK2, activent par phosphorylation p53, conduisant à la transcription de la CKI, p21<sup>CIP1</sup> (**Figure 4**). Celle-ci inhibe alors l'activité kinase des complexes formés par CDK2 avec les cyclines E ou A en interagissant avec la CDK2 (Harper et al. 1993), ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1-S. L'activité de p53 est majoritairement régulée par l'ubiquitine ligase, double minute 2 (HDM2 chez l'humain et MDM2 chez la souris), qui favorise l'association de p53 avec le protéasome, et donc sa dégradation. Ainsi, l'inhibition pharmacologique d'HDM2 par la nutline 3-a induit la stabilisation de p53 et conduit à la sénescence (Efeyan et al. 2007).



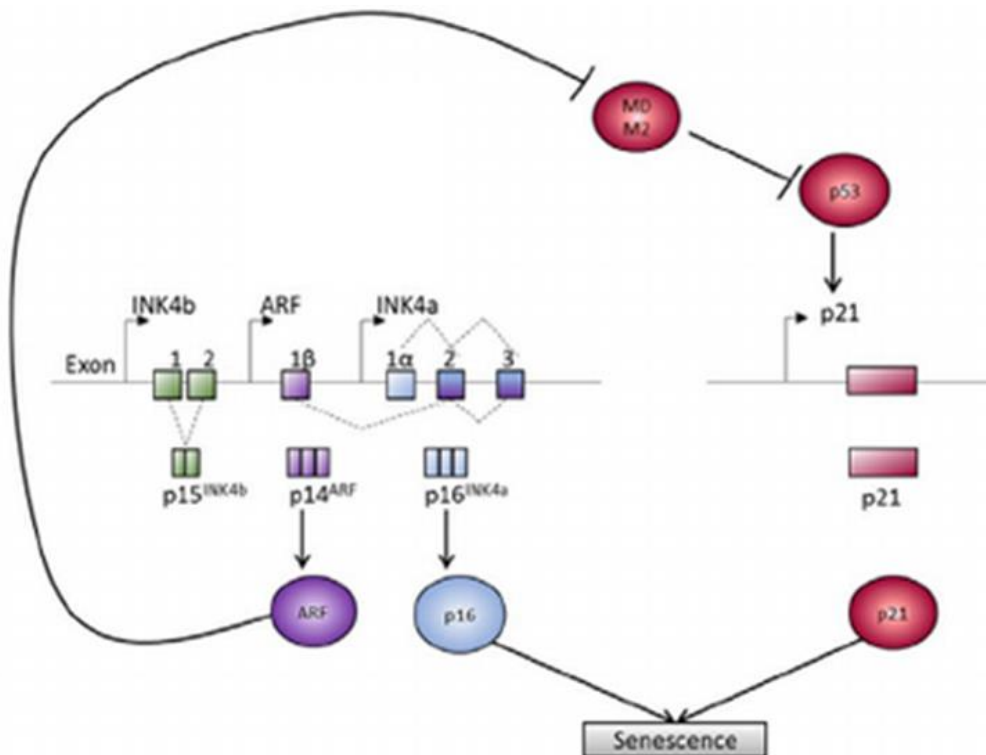
**Figure 4. Effecteurs et voies de signalisation de la sénescence cellulaire.**

Différents stress peuvent induire des dommages à l'ADN, activant les protéines ATM et ATR, p53 et la transcription de la CKI p21<sup>CIP1</sup>. Certains stress permettent aussi l'activation de la kinase p38MAPK permettant quant à elle l'activation de la CKI p16<sup>INK4a</sup>. L'activation des deux CKIs permet l'inhibition de RB et donc *in fine* à celle de la transcription des gènes cibles de E2F, nécessaires à la progression dans le cycle cellulaire. P14<sup>ARF</sup> permet quant à elle l'inhibition de HDM2, principal régulateur de p53.

De nombreuses études *in vitro* dans différents modèles de sénescence ont montré l'importance de l'activation permanente de la DDR et de la voie p53/p21<sup>CIP1</sup> dans l'induction de la sénescence. En effet, l'inhibition de p53, p21<sup>CIP1</sup> ou des protéines des voies ATM/ATR conduit à l'absence de l'arrêt du cycle cellulaire (Leonardo et al. 1994; d'Adda di Fagagna et al. 2003; Fumagalli et al. 2012; Di Micco et al. 2006). Cependant, bien que cette voie soit majeure pour la mise en place de la sénescence, elle n'est pas activée dans certains contextes de sénescence, ce qui suggère des mécanismes indépendants de cette voie.

## P14<sup>ARF</sup> et activation de p53

P14<sup>ARF</sup> (« Alternative Reading Frame », p19<sup>ARF</sup> chez la souris) est une protéine du locus INK4a/ARF. Elle est codée en grande partie par le même gène que p16<sup>INK4a</sup>, mais sa traduction ne suit pas le même cadre de lecture (**Figure 5**). Elle interagit avec et inhibe l'ubiquitine ligase HDM2, principal régulateur de p53 en étant responsable de sa dégradation (Haupt et al. 1997; Kamijo et al. 1998).



**Figure 5. Expression et cibles du locus INK4a-ARF.**

(adapté de (Tyler et al. 2021).

Les gènes p15<sup>INK4b</sup>, p14<sup>ARF</sup> et p16<sup>INK4a</sup> partagent le même locus et une partie des gènes p14<sup>ARF</sup> et p16<sup>INK4a</sup> la même séquence codante mais leur cadre de lecture est différent. La protéine p14<sup>ARF</sup> permet ensuite l'inhibition d'HDM2, ce qui favorise l'activation de p53 et de l'expression de la CKI, p21<sup>CIP1</sup>. p21<sup>CIP1</sup> et p16<sup>INK4a</sup> permettant ensuite l'entrée en sénescence en favorisant l'arrêt du cycle cellulaire.

La levée d'inhibition de p53 par p14<sup>ARF</sup> permet donc *in fine* l'expression des gènes cibles de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire. P14<sup>ARF</sup> est ainsi considéré comme un suppresseur de tumeurs et des souris n'exprimant pas p19<sup>ARF</sup> développent plus de tumeurs (M. Serrano et al. 1996; Sharpless 2005). La voie p19<sup>ARF</sup>-p53 est importante dans l'induction de la sénescence chez la souris, même si elle ne semble pas être

exclusive (Lowe et Sherr 2003; Sharpless 2005). Par exemple, l'activation de Ras dans des MEFs peut induire l'expression de p19<sup>ARF</sup> mais cela ne semble pas être le cas dans des cellules humaines (Brookes et al. 2002). L'importance de cette voie chez l'humain semble donc controversée (Kamijo et al. 1997; Dimri et al. 2000; W. Wei, Hemmer, et Sedivy 2001).

### *Contrôle du cycle cellulaire par p16<sup>INK4a</sup>*

L'expression de p16<sup>INK4a</sup> contrairement à p21<sup>CIP1</sup> n'est pas régulée par p53 et est assurée par la voie des MAP kinases (Ras/Raf/Mek), par exemple dans les fibroblastes et mélanocytes humains et murins en sénescence (A. W. Lin et al. 1998; Manuel Serrano et al. 1997). L'activation de Ras par des stimuli extérieurs conduit à la phosphorylation de ERK et la kinase p38MAP (p38MAPK), activant le facteur de transcription Ets2 responsable de l'expression de p16<sup>INK4a</sup>. D'autres signaux de sénescence (oncogéniques ou oxydatifs) peuvent activer la p38MAPK et la surexpression de p16<sup>INK4a</sup> *via* la protéine HBP1 (Y. Xu et al. 2014). A l'inverse, les complexes polycomb (« Polycomb Repressive Complexes », PRCs) sont responsables de la répression de la transcription de p16<sup>INK4a</sup> (Gil et al. 2004; Bracken et al. 2007). P16<sup>INK4a</sup> interagit avec les complexes cycline D - CDK4/6, permettant l'enrichissement de la forme hypophosphorylée de pRB et la formation du complexe répresseur pRB/E2F, réprimant l'expression des gènes cibles de E2F responsables de la progression du cycle cellulaire (Lukas et al. 1995). L'expression de p16<sup>INK4a</sup> permet donc le blocage dans le cycle cellulaire et joue elle aussi un rôle de suppresseur de tumeurs. P16<sup>INK4a</sup> est fréquemment inactivé dans les cancers par mutation, délétion ou méthylation de son promoteur, ce qui permet aux cellules tumorales d'échapper à la sénescence et à l'arrêt du cycle cellulaire.

Il semblerait que p21<sup>CIP1</sup> et p16<sup>INK4a</sup> agissent de manière coopérative dans la mise en place et le maintien de la sénescence. En effet, plusieurs études cinétiques ont montré leurs actions complémentaires. Après l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de la sénescence, l'expression de p21<sup>CIP1</sup> (Stein et al. 1999) est diminuée et le maintien de l'arrêt de prolifération est assuré par celle de p16<sup>INK4a</sup> (Stein et al. 1999; Alcorta et al. 1996; M. Serrano, Hannon, et Beach 1993).

Durant la sénescence, deux voies principales se mettent en place afin d'induire et de maintenir l'arrêt du cycle cellulaire. Ces deux voies, p53-p21<sup>CIP1</sup> et p16<sup>INK4a</sup> aboutissent toutes les deux à l'enrichissement de RB sous forme active permettant la répression des gènes cibles de E2F nécessaire à l'avancement dans le cycle cellulaire. Ainsi, cela conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mise en place de la sénescence.

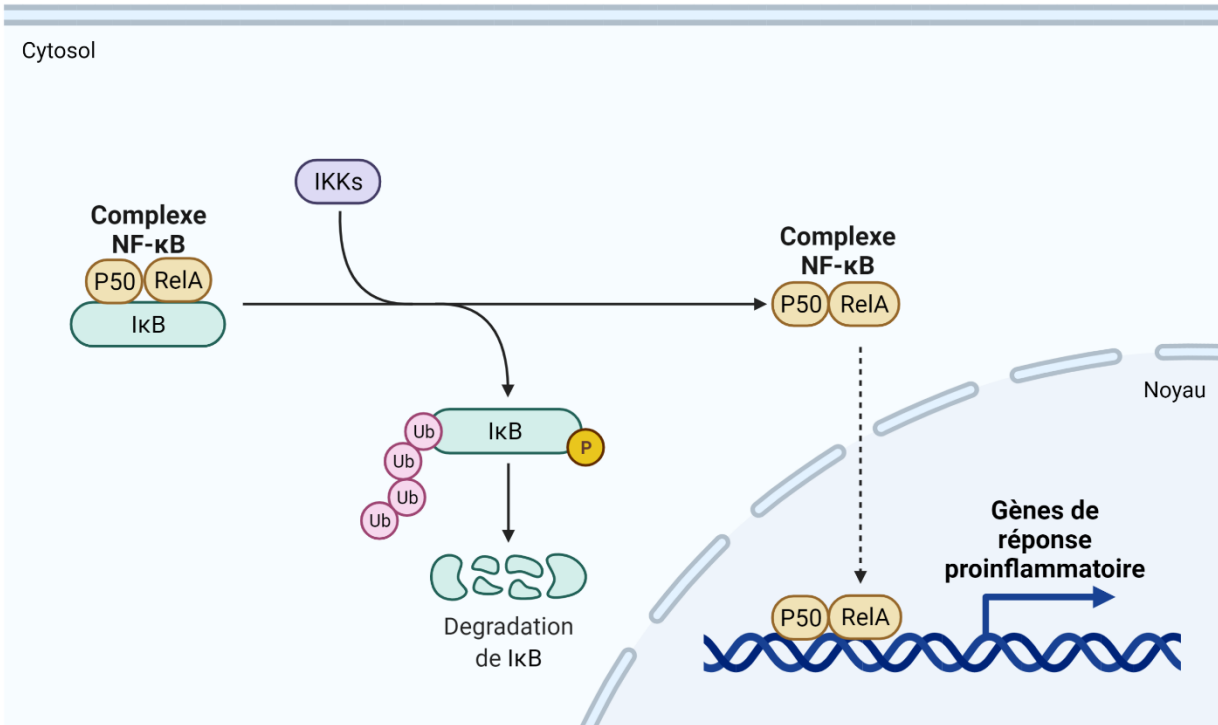
## 1.3.2 Régulation du SASP

### 1.3.2.1 Régulation transcriptionnelle du SASP

*NF- $\kappa$ B, principal régulateur du SASP pro-inflammatoire*

La famille NF- $\kappa$ B d'activateurs transcriptionnels est composée de cinq membres : p50, p52, c-rel, p65, aussi appelée RelA et RelB, qui sont présents dans la cellule sous forme de dimères. Les complexes transactivateurs rencontrés le plus souvent sont les hétérodimères p50/RelA, mais de nombreuses autres combinaisons d'homo- et hétérodimères existent. Le complexe p50/RelA joue un rôle majeur dans l'expression de gènes impliqués dans l'immunité innée et acquise. De nombreuses études ont montré que ce complexe est l'un des principaux régulateurs de l'expression des facteurs pro-inflammatoires du SASP, comme les interleukines (IL-6, -8, -1 $\alpha$ , -1 $\beta$ ), CXCLs et autres dans différents contextes de sénescence (Chien et al. 2011; Malaquin, Martinez, et Rodier 2016; Freund, Patil, et Campisi 2011).

En conditions normales, sans stresses, le complexe p50/RelA est réprimé par son interaction avec I $\kappa$ B dans le cytoplasme, ce qui empêche sa translocation dans le noyau (**Figure 6**). En réponse à différents stresses, la voie canonique d'activation de NF- $\kappa$ B est mise en place. Le complexe kinase I $\kappa$ B (IKK) phosphoryle I $\kappa$ B, induisant sa dégradation et la libération du dimère NF- $\kappa$ B, ce qui permet sa translocation et activation dans le noyau. Il a été montré durant la sénescence une augmentation de la phosphorylation de NF- $\kappa$ B et son enrichissement au niveau de la chromatine (Chien et al. 2011). Dans des fibroblastes en sénescence induite par Ras ou par le Rivaroxaban, agent utilisé en chimiothérapie, le knock-down de RelA diminue l'induction de l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, dont IL-6, IL-8 et CXCL1 (Chien et al. 2011) mais n'impacte pas la mise en place de l'arrêt de prolifération, dépendante de p53.



**Figure 6. Voie de signalisation de NF-κB.**

Les kinases IKKs permettent la phosphorylation de la protéine IκB, ce qui permet la libération et translocation du complexe NF-κB transactivateur, p50/RelA, et ainsi l'expression de ses gènes cibles.

Tous les mécanismes moléculaires menant à l'activation de NF-κB lors de la sénescence restent encore mal connus. Néanmoins, on sait qu'en plus d'activer les effecteurs nécessaires à l'arrêt du cycle cellulaire, la réponse aux dommages à l'ADN et ses protéines médiatrices (ATM, ATR, CHK1 and CHK2) sont nécessaires à l'initiation et au maintien de la sécrétion de nombreux facteurs du SASP, notamment inflammatoires (Rodier et al. 2009; H. Chen et al. 2015; C. Kang et al. 2015).

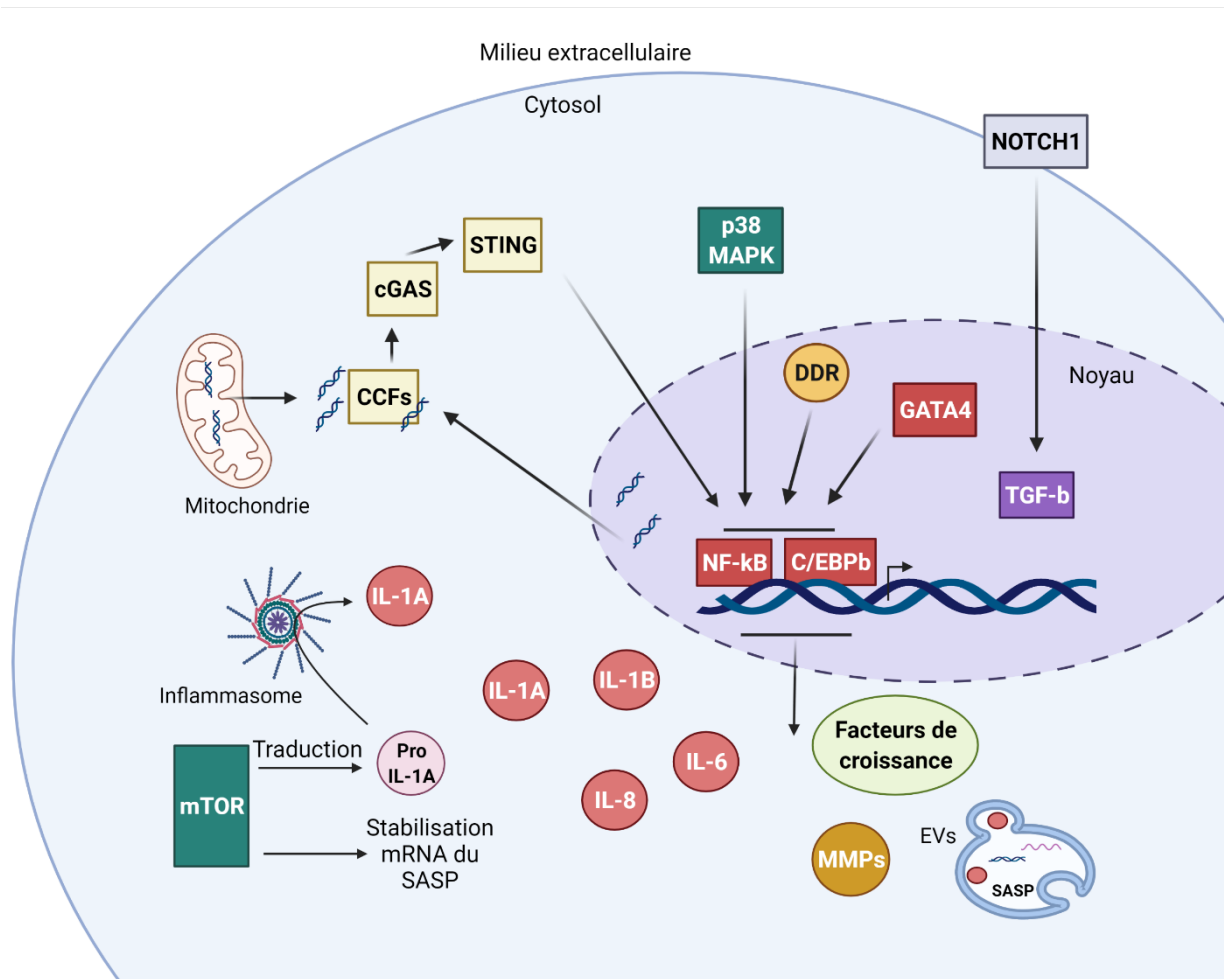
De même, la kinase p38MAP (p38MAPK), en plus de jouer un rôle dans l'arrêt de prolifération par l'activation de p53 et p16<sup>INK4a</sup>, est aussi associée à la régulation du SASP (Freund, Patil, et Campisi 2011; Alspach et al. 2014). Notamment, l'expression constitutive de cette kinase dans des fibroblastes humains mène à l'activation de NF-κB et à l'induction du SASP, sans activer de réponse des dommages à l'ADN. La répression de p38MAPK est suffisante pour inhiber l'expression des molécules pro-inflammatoires dépendantes de NF-κB, comme IL-6 et IL-8 (Freund, Patil, et Campisi 2011).

### *C/EBP $\beta$ , autre facteur de transcription renforçant le SASP*

La famille des facteurs de transcription C/EBP $\beta$  (« CCAAT Enhancer Binding Protein Beta ») aux motifs leucine zipper est composée de trois isoformes ; seule C/EBP $\beta$ -1 joue un rôle dans l'arrêt de prolifération et la sécrétion du SASP (Juan C. Acosta et al. 2008; Kuilman et al. 2008). C/EBP $\beta$ -1 se fixe directement au promoteur d'IL-6 activant sa transcription et permettant de renforcer la sécrétion des facteurs pro-inflammatoires (Kuilman et al. 2008) (**Figure 7**).

### *NOTCH1, acteur de la composition et de la chronicité du SASP*

Le facteur de transcription NOTCH1 a récemment été décrit comme régulant la dynamique et la composition du SASP au cours du temps. Son expression est forte lors de la mise en place de la sénescence et permet de réprimer C/EBP $\beta$ -1, ce qui va conduire à l'expression d'un SASP précoce anti-inflammatoire dépendant du TGF- $\beta$ . Dans un second temps, son expression va diminuer conduisant à l'activation de C/EBP $\beta$ -1 et l'expression d'un SASP enrichi en molécules pro-inflammatoires (Hoare et al. 2016) (**Figure 7**).



**Figure 7. Régulation et composition du SASP durant la sénescence cellulaire.**

Lors de l'induction de la sénescence, différents signaux permettent l'induction de l'expression, la maturation et la sécrétion du SASP. L'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et C/EBP $\beta$  est réalisée par différents acteurs comme une réponse aux dommages à l'ADN (DDR), la kinase p38MAPK, le facteur de transcription GATA4, permettant l'expression des régulateurs de NF- $\kappa$ B ou les fragments cytosoliques de chromatine (CCFs) permettant l'activation de la voie cGAS-STING. NF- $\kappa$ B et C/EBP $\beta$  permettent alors l'expression de facteurs pro-inflammatoires, tels IL-6 et IL-8. L'activation de NOTCH1 et la translocation de son domaine intracellulaire permettent l'activation du TGF- $\beta$  et sa voie de signalisation. mTOR et l'inflammasome permettent une régulation post-transcriptionnelle du SASP. mTOR induit la stabilisation de transcrits de certains facteurs du SASP et la traduction de pro-IL-1 $\alpha$ . L'inflammasome induit le clivage du pro-IL-1 $\alpha$  en IL-1 $\alpha$ , ce qui permettra de renforcer la sénescence.



### 1.3.2.2 Régulation post-transcriptionnelle du SASP

#### *mTOR*

La kinase mTOR (« mammalian Target Of Rapamycin ») est impliquée dans de nombreux processus biologiques comme l'autophagie, l'apoptose et la synthèse protéique. Son activation se fait après activation de voies moléculaires en réponse à des signaux de facteurs de croissance (insuline ou « Insulin Growth Factor », IGF), de l'inflammation (TNF $\alpha$ ) et énergétique (glucose). *In vitro*, l'inhibition de mTOR dans des fibroblastes humains en sénescence induite par radiation ou par un oncogène limite la sécrétion de facteurs du SASP tels qu'IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$  et VEGF (Laberge et al. 2015; Herranz et al. 2015) (**Figure 7**). D'autre part, mTOR permet la traduction d'IL-1 $\alpha$  et l'inhibition de la dégradation de l'ARNm de certains facteurs du SASP par la protéine ZFP36L1 (Herranz et al. 2015). mTOR permettrait donc de réguler tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel les facteurs du SASP. De plus, mTOR a été décrit comme permettant l'arrêt de prolifération des cellules et contribuerait aux changements phénotypiques et à l'étalement des cellules en sénescence. Une forte activité de mTOR limite la durée de vie alors qu'une plus faible activité favorise la longévité (Stanfel et al. 2009; Kapahi et al. 2010). Ainsi il semblerait que mTOR soit un régulateur clé de la sénescence, impactant à la fois l'arrêt de prolifération et la sécrétion de SASP.

#### *Inflammasome*

D'autres études ont montré l'implication de l'inflammasome dans la maturation et le clivage du pro-IL-1 $\alpha$  dans sa forme active (Juan Carlos Acosta et al. 2013) (**Figure 7**). Il permet l'activation des caspase -1 et -5, responsables du clivage du pro-IL-1 $\alpha$  en IL-1 $\alpha$  et ensuite sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. De plus, il peut être activé par l'IL-1 $\beta$ , ce qui permet ensuite la maturation de l'IL-1 $\beta$  (Fernández-Duran et al. 2019).

### 1.3.2.3 Autres régulations par des voies de signalisation

Le SASP peut aussi être induit par la présence de fragments cytoplasmiques de chromatine (« Cytoplasmic Chromatin Fragments », CCFs). Ces fragments d'ADN sont relargués du noyau pendant la sénescence et activent la voie antivirale de la GMP-AMP synthase cyclique (« cyclic GMP-AMP synthase », cGAS) stimulateur de la voie des gènes de l'interféron (STING) (cGAS-STING), menant à la régulation du SASP de manière dépendante de l'Interféron (IFN) ou de NF- $\kappa$ B (Dou et al. 2017; Vizioli et al. 2020; Fafián-Labora et O'Loghlen 2020).

Certaines modifications épigénétiques sont aussi connues pour réguler le SASP. Notamment, la levée de répression de l'élément rétrotransposable L1 (LINE-1) (De

Cecco et al. 2019), l'accumulation du variant d'histone H2A.J (Contrepolis et al. 2017), la perte de macroH2A1 (H. Chen et al. 2015) ou la présence de régulateurs épigénétiques sur des loci des gènes du SASP, comme BRD4 (Tasdemir et al. 2016), activent l'expression du SASP.

L'expression et la sécrétion du SASP sont donc majoritairement médiées par les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et C/EBP $\beta$ -1 et la kinase mTOR, qui peuvent être eux-mêmes être activés par les facteurs sécrétés afin de renforcer la sénescence. La majorité des études se sont concentrées sur les molécules pro-inflammatoires, car elles ont été décrites comme les principales médiatrices (pour le moment) des effets physiopathologiques du SASP, comme nous le verrons dans le prochain chapitre. Il manque ainsi un nombre important de données sur les régulateurs des facteurs du SASP non pro-inflammatoires, comme les facteurs de croissance, durant la sénescence.



## 2 Chapitre 2 : Effets physiopathologiques de la sénescence cellulaire

---

La sénescence cellulaire peut induire des effets auto- et paracrines à l'échelle de la cellule, ce qui peut entraîner des conséquences à l'échelle du tissu et ensuite sur l'ensemble de l'organisme. Notamment, les facteurs du SASP sont capables d'induire de la sénescence autocrine (sur le même type cellulaire) et paracrine (sur d'autres types cellulaires), ce qui permet de renforcer la sénescence cellulaire ou contribuer à d'autres effets. Il est admis que la chronicité de la sénescence peut engendrer des réponses différentes. En effet, à court terme l'arrêt de prolifération et le SASP peuvent générer des effets bénéfiques pour l'organisme. A l'inverse si les cellules sénescents ne sont pas éliminées correctement par le système immunitaire et s'accumulent dans l'organisme, elles peuvent engendrer des effets délétères sur l'organisme (**Figure 8**).

### 2.1 Sénescence cellulaire et communication inter-cellules

Les cellules sénescents sont capables de communiquer entre elles ou avec d'autres types cellulaires grâce à des signaux autocrines (Juan C. Acosta et al. 2008; Kuilman et al. 2008; Hoare et Narita 2013), paracrines (Juan Carlos Acosta et al. 2013; H. Chen et al. 2015) ou juxtacrines (Parry et al. 2018). Les signaux paracrines sont un moyen très efficace d'induire la sénescence cellulaire dans d'autres types cellulaires et ainsi propager la sénescence cellulaire au sein du tissu.

Les cellules sénescents peuvent communiquer avec elles-mêmes et les cellules environnantes *via* le récepteur à l'IL-6 (IL-6R) et induire des cascades de signalisations cellulaires. D'autres interleukines sécrétées lors de la sénescence comme les IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , agissent sur les cellules voisines par les récepteurs IL-1R et « Toll-like », qui permettent l'activation de NF- $\kappa$ B et de mTOR. L'ensemble des cytokines permettent un renforcement autocrine et paracrine de la sénescence cellulaire. Le TGF $\beta$  sécrété par les cellules sénescents permet lui aussi l'entrée en sénescence des cellules environnantes (Juan Carlos Acosta et al. 2013; Reynisdóttir et al. 1995; Neuzillet et al. 2015). Par ailleurs, le GDF15, autre ligand du récepteur au TGF $\beta$ , permet aussi l'induction de la sénescence cellulaire et sa surexpression dans des cellules endothéliales humaines induit l'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4a</sup> conduisant à la sénescence cellulaire (Park et al. 2016).

Les métalloprotéases, quant à elles, permettent de remodeler la structure de la matrice extracellulaire, ce qui va favoriser la migration cellulaire et la diffusion des facteurs solubles. Les vésicules extracellulaires sont décrites comme participant aux effets paracrines de la sénescence cellulaire et semblent, tout comme les autres composants du SASP, jouer un rôle favorable ou défavorable sur l'organisme en fonction du contexte et de la chronicité du stress (Wallis, Mizen, et Bishop 2020).

Les cellules sénescents sécrètent, en plus, des ligands transmembranaires, comme NKG2D, qui interagissent avec les cellules du système immunitaire. Ajoutés aux cytokines (comme CCL2) et interleukines, ils permettent de créer un environnement proinflammatoire et chemoattractant attirant des cellules du système immunitaires tels que des macrophages, des neutrophiles ou des cellules « Natural Killer », NK (Iannello et Raulet 2014; Sagiv et al. 2016). Ceci conduit à l'élimination des cellules sénescents et un défaut dans ce processus conduit à l'accumulation des cellules sénescents (Ovadya et al. 2018), contribuant à l'amplification de la sénescence paracrine et chronique (Pereira et al. 2019) (**Figure 8**).

## 2.2 Effets bénéfiques à court terme

### 2.2.1 Rôle dans le développement embryonnaire

La sénescence cellulaire a majoritairement été décrite en réponse à un stress, mais de récentes études dans des embryons de souris ont montré son importance lors du développement physiologique de l'embryon (Muñoz-Espín et Serrano 2014). La sénescence embryonnaire a aussi été observée chez l'humain, le poulet ou les amphibiens suggérant que ce phénomène est conservé entre les espèces et aurait été sélectionné au cours de l'évolution lors du développement embryonnaire (Davaapil, Brockes, et Yun 2017). En particulier, la sénescence a été observée au niveau du tube neural, des interdigitations, du mésonéphros (correspondant au rein embryonnaire) et à d'autres structures. Cette sénescence a été caractérisée grâce au marquage de l'activité SA-β-Gal, mais aussi grâce aux marqueurs d'arrêt de prolifération, comme la diminution de marqueur de prolifération Ki67 et l'augmentation de CKIs (p21<sup>CIP1</sup>, p15 et p27). L'absence de dommages à l'ADN lors de cette sénescence renforce l'idée que celle-ci n'est pas due à une réponse à un stress. L'utilisation d'embryons invalidés pour *Cdkn1a* montre une absence d'activité SA-β-Gal et d'arrêt de prolifération, soulevant le rôle essentiel de p21<sup>CIP1</sup> dans la sénescence embryonnaire, et non de p53 ou d'autres CKIs. De plus, cette sénescence est médiée par la voie TGF-β/SMAD et PI3K (Lorda-Diez et al. 2015; Muñoz-Espín, s. d.; Storer, s. d.). Cette sénescence embryonnaire est ensuite suivie d'une infiltration des macrophages, d'une élimination des cellules, ce qui conduit *in fine* au remodelage du tissu. Il a été montré une production de SASP lors de cette sénescence, néanmoins les effets physiologiques de celui-ci lors du développement n'ont pas encore été bien démontrés.

### 2.2.2 Rôle dans la cicatrisation et la réparation tissulaire

Les facteurs du SASP jouent un rôle positif lors des processus de cicatrisation tissulaire *via* leur action sur la migration cellulaire et la réorganisation du tissu

endommagé. En outre, les facteurs de croissance et les protéases permettent la réparation et le remodelage de la matrice extracellulaire (Gill et Parks 2008). Les molécules pro-inflammatoires ou d'autres protéines, telles des facteurs d'hémostase ou dérivés de plaquette (PDGF-AA) conduisent au recrutement des cellules du système immunitaire (macrophages et cellules « Natural Killer », NK) dans l'environnement des cellules sénescentes pour éliminer les corps étrangers (Demaria et al. 2014; Wiley et al. 2019). Enfin les protéines qui attirent les cellules souches favorisent le renouvellement du tissu. Notamment, la sécrétion de facteurs de la matrice extra-cellulaire (MMPs) par les cellules sénescentes lors de la cicatrisation permet de limiter la fibrose hépatique et cutanée et favorisent la réparation des tissus (Krizhanovsky et al. 2008; Jun et Lau 2010).

Cependant, à l'inverse, l'accumulation de cellules sénescentes peut promouvoir la fibrose rénale (Miao et al. 2019) ou idiopathique pulmonaire (Kato et al. 2020), suggérant qu'il est nécessaire que l'organisme élimine les cellules sénescentes afin d'éviter les effets chroniques délétères.

### 2.2.3 Barrière anti-tumorale

Comme il a été décrit précédemment les cellules tumorales, contrairement aux cellules somatiques, ne possèdent pas de limite répliquative et expriment pour la plupart la télomérase. Cependant, il est maintenant établi que les premières étapes de tumorigénèse entraînent l'activation de p16<sup>INK4a</sup> et de p53. A ce moment-là, les cellules tumorales rentrent en sénescence, ce qui limite la propagation de cellules pré-cancéreuses. Les cellules sénescentes se retrouvent dans les lésions pré-malignes alors qu'elles sont absentes dans les étapes malignes, ce qui suggère que la sénescence agit comme une barrière contre le développement tumoral (Braig et al. 2005; Collado et al. 2005). Chez l'humain, la sénescence a notamment été décrite dans les mélanocytes surexprimant BRAF<sup>V600E</sup>, constituant les nævi (Michaloglou et al. 2008), dans les lésions de PIN (Néoplasie Intra-épithéliales Prostatiques) (Z. Chen et al. 2005) et dans des adénomes pulmonaires, correspondant tous à des tumeurs pré-malignes. La délétion des médiateurs de la sénescence p53 ou de l'histone méthyltransférase SUV39H1, (essentielle dans la formation des TIFs nécessaires au phénotype sénescent) lors de stress oncogéniques conduit à la perte des marqueurs de sénescence et à la progression tumorale (Braig et al. 2005; Z. Chen et al. 2005), ce qui démontre le rôle de l'OIS en tant que barrière anti-tumorale. De plus, certaines tumeurs qui se développent ont inactivé certains acteurs de la sénescence et suppresseurs de tumeurs (Z. Chen et al. 2005; Collado et al. 2005; Juan C. Acosta et al. 2008). L'ensemble de ces observations soulignent l'importance de l'inactivation des voies régulant la sénescence dans le développement tumoral mettant en évidence le rôle de l'OIS comme barrière anti-tumorale.

Plusieurs études sur le SASP ont aussi montré son implication contre le développement tumoral. Les interleukines, les chimiokines et PAI-1 (« Plasminogen Activator Inhibitor 1 ») renforcent la sénescence *in vivo* (Juan C. Acosta et al. 2008; Kuilman et al. 2008), ce qui renforce l'arrêt de prolifération au sein de l'environnement tumoral. De plus, il a été montré que certains cas malins de cancers présentent de faibles niveaux d'expression de CXCR2, récepteur membranaire à l'IL-8 et GRO $\alpha$  (Ginos et al. 2004; Toruner et al. 2004). Parallèlement, une mutation inactivatrice de CXCR2 dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire diminue l'OIS, démontrant l'importance du SASP dans le renforcement de la sénescence *in vivo* (Juan C. Acosta et al. 2008). Dans un modèle murin de carcinomes hépatocellulaires (HCC), la réintroduction de p53 conduit à l'induction de la sénescence cellulaire et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires associées au recrutement du système immunitaire inné (macrophages, neutrophiles et cellules NK). Le système immunitaire alors activé élimine les cellules sénescents ce qui aboutit à la régression de la tumeur (Xue et al. 2007). L'élimination des cellules pré-malignes sénescents par le système immunitaire est une étape nécessaire pour empêcher leur évolution en carcinome (T.-W. Kang et al. 2011). Ainsi, l'entrée en sénescence et la sécrétion des facteurs du SASP permet d'alerter le système immunitaire d'une région à risque, ce qui conduit à la régression de la tumeur.

La sénescence à travers l'arrêt de prolifération et la génération du SASP, qui permet de renforcer la sénescence autocrine et paracrine, remodèle le microenvironnement et active des cellules du système immunitaire permettant d'engendrer des effets bénéfiques sur les tissus et l'organisme (**Figure 8**).

## 2.3 Effets chroniques délétères

### 2.3.1 Effets généraux sur le vieillissement et quelques maladies liées à l'âge

Le vieillissement est une marque universelle correspondant au déclin progressif des fonctions de nombreuses cellules et tissus et aboutit au développement de nombreuses pathologies liées à l'âge et à la mort de l'organisme (Campisi 2013). Plusieurs études ont démontré l'accumulation de cellules sénescents chez l'humain et les primates au cours du temps (Dimri et al. 1995; Erusalimsky et Kurz 2005; Jeyapalan et al. 2007). Dans un modèle murin où le nombre de cellules sénescents est accru par une forte expression de p53, les souris présentent des signes de vieillissement prématuré (Tyner et al. 2002). De plus, il a été montré que l'expression de p16<sup>INK4a</sup> augmentait lors du vieillissement, en particulier chez la souris dans les cellules souches et progénitrices du cerveau et de la moelle épinière, ce qui limite la prolifération de ces cellules et la régénération tissulaire, associée à une diminution de la neurogénèse

(Janzen et al. 2006; Molofsky et al. 2006). Ces effets sur le vieillissement sont dus à la fois à la sénescence autocrine menant au dysfonctionnement cellulaire mais aussi aux effets paracrines médiés par le SASP, qui conduisent à l'inflammation chronique (Miao et al. 2019).

L'inflammation chronique est une caractéristique du vieillissement, qui peut contribuer à plusieurs pathologies liées à l'âge (Chung et al. 2009). Il a été suggéré qu'au cours du vieillissement, l'accumulation des molécules pro-inflammatoires du SASP contribuent à l'inflammation chronique observée lors du vieillissement (Rodier et Campisi 2011). Ce SASP, au travers d'autres facteurs, comme les métalloprotéases modifiant la matrice extracellulaire, peut aussi perturber la structure et fonction des tissus (Campisi 2005), comme les niches de cellules souches (Drummond-Barbosa 2008). De plus, dans des modèles murins de progeria, maladie correspondant à un vieillissement prématuré, l'ablation de NF- $\kappa$ B permet de diminuer les signes de vieillissement et d'augmenter l'espérance de vie des souris (Tilstra et al. 2012; Osorio et al. 2012). L'inhibition des voies de signalisation de l'IL-6 et IL-8 atténue la réponse inflammatoire associée à la sénescence chez les souris. Il a aussi été démontré que l'inhibition de facteur du SASP ou de l'activation des voies moléculaires associées était bénéfique dans certaines maladies liées à l'âge (Kuilman et al. 2008; Coppé et al. 2010). Par exemple, l'inhibition pharmacologique du récepteur à l'IL-1 ou à l'IL-6 est utilisé pour traiter la polyarthrite rhumatoïde (Fleischmann, Stern, et Iqbal 2004; Karsdal et al. 2012). Ces études suggèrent que l'activation de NF- $\kappa$ B dans les cellules sénescents et des voies moléculaires associées aux molécules pro-inflammatoires pourrait contribuer à l'inflammation chronique observée durant le vieillissement et aux maladies liées à l'âge.

Depuis, l'enrichissement de cellules sénescents a aussi été identifiée dans de nombreuses pathologies chroniques liées au vieillissement, comme l'hypertension pulmonaire (Noureddine Hibo et al. 2011), la bronchopneumopathie chronique obstructive (Zhou et al. 2011; Bartling 2013), la stéatose hépatique non alcoolique (Ogrodnik et al. 2019), de l'insulinoresistance pouvant être celle retrouvée dans les diabètes de type II (Aguayo-Mazzucato et al. 2019), la sarcopénie ou l'athérosclérose (He et Sharpless 2017).

Le vieillissement est aussi associé à « l'immunosénescence », correspondant à la sénescence cellulaire des différents types de cellules composant le système immunitaire. Notamment l'immunosénescence mène à l'enrichissement de cellules T mémoires sénescents sécrétant des molécules pro-inflammatoires (Vicente et al. 2016) et à la diminution des cellules T naïves (Flach et al. 2014).

En outre, dans différents modèles murins, l'élimination sélective des cellules sénescents augmente l'espérance de vie des souris (Baker et al. 2016; M. Xu et al. 2018) et la qualité de vie en retardant les maladies liées à l'âge (Baker et al. 2011;

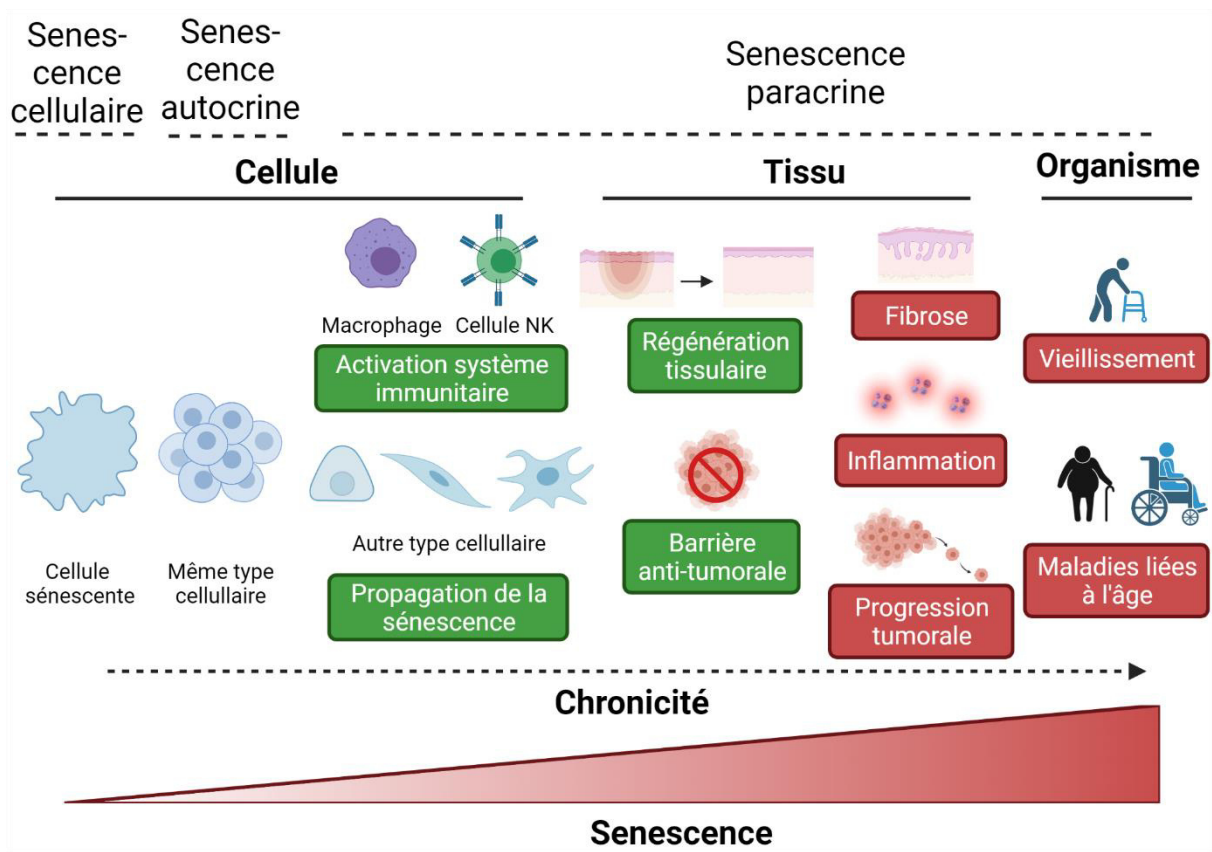


Triana-Martínez et al. 2019), ce qui montre le rôle physiopathologique de la sénescence cellulaire au cours du vieillissement.

### **2.3.2 Effets dans les maladies neurodégénératives**

La sénescence cellulaire a aussi été observée dans les cellules du système nerveux, comme les astrocytes ou oligodendrocytes. De plus en plus d'études montrent que la sénescence de ces cellules contribue à des effets délétères sur le cerveau, comme son vieillissement ou des maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (Pertusa et al. 2007; Salminen et al. 2011; Nasrabady et al. 2018; Magini et al. 2015). Le groupe de Kirkland a récemment démontré que durant l'obésité, des cellules sénescents gliales s'accumulaient près du ventricule latéral, une région dans laquelle se déroule la neurogénèse chez l'adulte. Grâce à des modèles murins ils ont observé que l'élimination spécifique des cellules sénescents chez des souris obèses diminuait l'anxiété des souris et restaurait la neurogénèse (Ogrodnik et al. 2019). Ils ont ainsi été dans les premiers à démontrer un lien fonctionnel entre sénescence cellulaire, neurogénèse et trouble comportemental des souris.

Le SASP, notamment, via ces molécules pro-inflammatoires joue aussi un rôle dans les maladies neurodégénératives liées à l'âge, comme le déclin des capacités du cerveau ou les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. L'augmentation du nombre de cellules sénescents et donc des médiateurs du SASP pendant le vieillissement pourrait être l'une des causes de l'inflammation chronique présente dans les cerveaux âgés et issus des patients d'Alzheimer (Olivieri et al. 2018).



**Figure 8. Principaux effets physiologiques et pathologiques médiés par la sénescence cellulaire.**

Une cellule sénescente peut, notamment *via* le SASP, induire de la sénescence autocrine (sur le même type cellulaire) ou paracrine (sur un autre type cellulaire). Ceci permet notamment le recrutement et l'activation de cellules du système immunitaire (macrophages, cellules NK), conduisant à l'élimination des cellules sénescents et entre autres à la régénération tissulaire ou constituer une barrière contre le développement tumoral. Si les cellules sénescents et le SASP s'accumulent, ils contribuent à une inflammation chronique, induisant notamment de la fibrose ou la progression tumorale. L'ensemble de ces effets sur les cellules, puis sur les tissus impactent l'organisme et contribuent au vieillissement et aux maladies liées à l'âge, dont le cancer.

### 2.3.3 Potentiel tumoral des cellules sénescents

Comme les pathologies dégénératives, le cancer est une maladie liée à l'âge associée à une altération des tissus. L'accumulation des cellules sénescents dans les tissus âgés peut avoir un impact négatif et promouvoir le développement tumoral. Cependant, ces effets sont en majorité médiés par le SASP des cellules sénescents. Comme nous l'avons détaillé plus haut, l'OIS participe à la protection des tissus en empêchant la transformation des cellules. Ces cellules en OIS sont donc des cellules à haut risque de transformation car elles ont accumulé des dommages qui leur ont

permis de rentrer en sénescence. Ainsi, si elles subissent d'autres stress, elles peuvent devenir plus agressives que des cellules non-sénescences.

L'inflammation est une des caractéristiques majeures du cancer et environ 20% des tumeurs sont causées par une inflammation chronique, qui contribue aux différentes étapes du développement tumoral, allant de l'initiation aux métastases. De nombreux facteurs du SASP, notamment les cytokines pro-inflammatoires, ont des propriétés oncogéniques en impactant le microenvironnement tumoral et en favorisant la migration et la prolifération de cellules pré-malignes dans différents types de cancer (Krtolica et al. 2001; Coppé et al. 2008; 2010; Bavik et al. 2006; Ohuchida et al. 2004). Plusieurs études ont montré que des fibroblastes en sénescence contribuaient à la progression tumorale de lésions cancéreuses et pré-cancéreuses (Krtolica et al. 2001; Coppé et al. 2010; D. Liu et Hornsby 2007) dans des souris immunodéprimées. Ces études soulignent l'importance du stroma et du remodelage du microenvironnement tumoral dans la progression tumorale.

Les facteurs du SASP peuvent aussi stimuler la prolifération de cellules endothéliales (Coppé et al. 2006), ce qui favorise (Kolodkin-Gal et al. 2021) la vascularisation et l'angiogénèse des tumeurs et donc l'invasion des cellules tumorales. Notamment, l'HGF (« Hepatocyte Growth Factor », facteur de croissance hépatique) intervient dans le cancer du pancréas (Ohuchida et al. 2004) et les interleukines IL-6 et IL-8 dans celui du sein (Coppé et al. 2008). En plus, ces facteurs peuvent aussi stimuler la transition épithéliomésenchymateuse dans des cellules épithéliales pré-malignes et dans des cellules épithéliales cancéreuses non agressives, notamment par la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8 (Freund et al. 2010; T.-W. Kang et al. 2011; Xue et al. 2007).

Dans un modèle de souris transgéniques, l'expression constitutive de p16<sup>INK4a</sup> augmente le nombre de papillomes épidermiques formés après un traitement carcinogène. L'utilisation d'un sénolytique permet l'élimination des cellules sénescences accompagnée par la diminution de l'hyperplasie (Azazmeh et al. 2020). De plus, il a été montré que l'élimination des cellules sénescences par un sénolytique permet de réduire le nombre de lésions de néoplasie intraépithéliale pancréatique pré-maligne (PanIN), ainsi que la progression tumorale. Ces résultats révèlent que les cellules sénescences de PanIN favorisent la croissance et la progression des tumeurs (Kolodkin-Gal et al. 2021).

En outre le SASP engendre des effets importants lors de la sénescence induite par thérapie (TIS). Dans un premier temps, le SASP sécrété va permettre l'attraction du système immunitaire afin d'éliminer les cellules sénescences et cancéreuses (Chien et al. 2011). Cependant, après traitement, les cytokines et facteurs de croissance, vont moduler le microenvironnement et créer un environnement inflammatoire local et systémique. Les effets du SASP peuvent porter directement sur les cellules cancéreuses mais aussi sur les cellules normales adjacentes. Dans des modèles murins, il a été montré que la TIS favorisait les métastases et la rechute tumorale, démontrant une

résistance à la chimiothérapie (Demaria et al. 2017). Notamment la sécrétion de GRO (« Growth Related Oncogene ») peut stimuler la prolifération des cellules tumorales dans le cas de cancer ovarien (G. Yang et al. 2006). La sécrétion de MMP-3 favorise la dégradation de la matrice extracellulaire, promouvant la migration des cellules cancéreuses (D. Liu et Hornsby 2007). Enfin dans des modèles murins, l'élimination des cellules sénescents après thérapie permet de diminuer considérablement les effets secondaires de la thérapie, comme la rechute tumorale et la diminution de la forme physique, souvent observée lors de traitements chimiothérapeutiques (Demaria et al. 2017) (**Figure 8**).

L'accumulation des cellules sénescents au cours du vieillissement conduit à l'augmentation de la sécrétion du SASP. Notamment *via* ses molécules pro-inflammatoires et les molécules remodelant le microenvironnement, le SASP induit de la sénescence autocrine et paracrine. Il permet aussi d'attirer et activer des cellules du système immunitaire, ce qui contribue à l'élimination des cellules sénescents et ainsi à la régénération tissulaire et peut constituer une barrière anti-tumorale. En revanche, la présence chronique des cellules sénescents et du SASP engendre une inflammation importante contribuant à des effets délétères pour le tissu et *in fine* pour l'ensemble de l'organisme. Il est en effet de plus en plus démontré que la sénescence cellulaire contribue au vieillissement de l'organisme et aux maladies liées à l'âge, tel le cancer.

Pour résumer ces deux premières parties, nous pouvons dire que la sénescence cellulaire est un programme complexe inductible par différents stress. Bien que quelques caractéristiques de la sénescence soient partagées, la multitude de stress peuvent induire des réponses phénotypiques variées. Cette diversité d'inducteurs et d'effecteurs de la sénescence rend ce phénotype encore plus complexe. De plus, la sénescence n'est pas un phénomène impactant seulement les cellules mais aussi les tissus et les organes, contribuant ainsi à différents effets physiologiques et pathologiques. Comprendre plus précisément les mécanismes moléculaires de mise en place de la sénescence cellulaire permet donc une meilleure compréhension de mise en place de ces effets physiopathologiques.

Si certains inducteurs et effecteurs de la sénescence cellulaire sont déjà bien caractérisés, la recherche sur de nouveaux régulateurs et de nouveaux effets paracrines reste encore bien active. Notamment, un thème émergent démontre l'importance du calcium et des flux calciques dans la régulation de la sénescence cellulaire. Je vais donc décrire dans cette troisième partie l'ion calcium et son rôle en tant que messenger secondaire dans divers processus cellulaires, dont la sénescence.



## 3 Chapitre 3 : Calcium, comme messenger secondaire

---

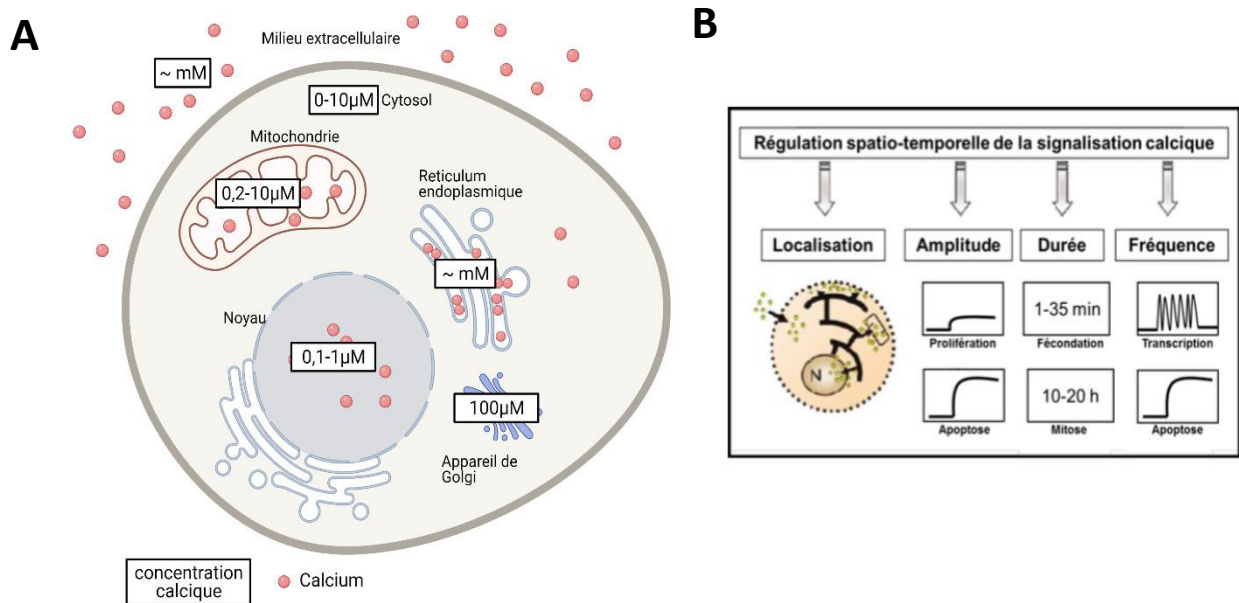
Le cation divalent calcium possède une haute affinité pour les groupements à base d'oxygène (groupements carbonyle et carboxylique). Cette propriété lui permet d'interagir avec de nombreuses protéines (dites calcium-dépendantes), de réguler leur activité biologique et ainsi d'activer des voies de signalisation en réponse à différents stress. Le calcium est ainsi considéré comme un important messenger secondaire.

Cependant, l'ion calcium est moins soluble dans l'eau que d'autres ions, et peut précipiter plus facilement avec le phosphate lorsque sa concentration est trop élevée, ce qui entraîne des effets cytotoxiques (Clapham 2007). De plus, il peut activer des voies de signalisation conduisant à la mort cellulaire. Ainsi, chaque cellule doit maintenir une concentration calcique assez faible pour empêcher les effets cytotoxiques du calcium tout en permettant un fonctionnement normal de fonctions calcium-dépendantes (respiration mitochondriale, migration, sécrétion...).

### 3.1 Homéostasie et flux calciques en lien avec la sénescence

#### 3.1.1 Contrôle spatiotemporel du calcium cellulaire

La concentration en calcium dans le milieu extracellulaire est de 1 à 2mM, alors que sa concentration dans le cytosol est beaucoup plus faible, de l'ordre de 100nM (**Figure 9**). En revanche, la concentration calcique dans ce qu'on appelle les stocks intracellulaires, comme dans la lumière du réticulum endoplasmique ou dans la matrice de la mitochondrie, est aussi très élevée, de l'ordre du mM. La cellule doit donc gérer ses flux et ses capacités de stockage de calcium afin de ne pas garder une concentration calcique trop élevée dans le cytosol, qui pourrait conduire à des effets cytotoxiques. C'est ce qu'on appelle l'homéostasie calcique. Pour cela, la cellule a mis en place de nombreux acteurs : des pompes ATP-dépendantes permettant le passage du calcium du cytosol aux milieux à forte concentration calcique (allant à l'inverse du gradient de concentration), des canaux calciques permettant le passage passif du calcium, des protéines tampons (chélateurs calciques biologiques), des protéines senseurs de calcium, des enzymes-dépendantes du calcium et des organites impliqués dans le stockage du calcium, comme le réticulum endoplasmique, la mitochondrie ou l'appareil de Golgi.



**Figure 9. Homéostasie calcique au sein de la cellule et régulation spatio-temporelle de la signalisation calcique.**

A. Hétérogénéité de la concentration de calcium dans la cellule et ses compartiments intracellulaires. La concentration calcique extracellulaire et dans le réticulum endoplasmique est élevée (de l'ordre du mM), tandis qu'elle est plus faible dans le cytosol et dans les autres organites.

B. La régulation spatio-temporelle de la signalisation calcique suivant quatre paramètres (localisation, amplitude, durée et fréquence) correspond à une signature calcique spécifique et induit des réponses physiologiques différentes (d'après (Prevarskaya et al. 2007)).

L'ensemble des flux (efflux et influx) au sein du cytosol permet de générer des signaux calciques se distinguant par quatre paramètres : leur fréquence, leur durée, leur amplitude et leur localisation cellulaire (**Figure 9**). Ceci engendre une "signature calcique" particulière et chaque cellule pour chaque état possède une signature calcique très finement régulée (Beat Schwaller 2012), ce qui permet d'induire des voies de signalisation et réponses physiologiques précises. Ces études ont été possibles grâce à des sondes calciques spécifiques, qui ont permis la mesure des niveaux calciques spatialement (cytosol ou dans les différents compartiments intracellulaires) et en fonction du temps (Berridge, Bootman, et Roderick 2003).

Un signal calcique peut être global (étendu à toute la cellule) ou localisé. L'importance d'un signal calcique localisé a notamment été démontré dans les neurones et à l'inverse, une augmentation globale du calcium intracellulaire est importante dans la contraction musculaire (Kovac, Chrones, et Sims 2008). La durée et la fréquence des signaux sont aussi importantes dans la mise en place de la réponse

physiologique, qui varie suivant le tissu. Ces durées et fréquences de signal sont notamment régulées par des protéines "calcium-binding", qui, grâce à leur forte affinité pour le calcium, permettent de le chélater et ainsi de diminuer transitoirement ou pour une longue durée sa concentration dans le cytosol. Je définirai plus en détail ces protéines et leur rôle dans la partie suivante.

Enfin, l'amplitude et l'intensité du signal permettent aussi d'induire des réponses spécifiques et différentes. En effet la somme de ces signaux calciques au-delà d'un certain seuil va permettre d'activer des voies moléculaires différentes. Chaque protéine senseur de calcium, c'est-à-dire activée par la fixation du calcium (calmoduline, calnexine, calcineurine, de la famille S100) possède un seuil d'activation différent, déterminé par leur affinité ( $K_D$ ) pour le calcium et donc dépendant de la concentration calcique. Ces seuils sont différents d'une protéine à l'autre, ce qui leur permet d'être activées de manière très spécifique.

Ainsi, l'ion calcium est complexe et peut générer des réponses variées en fonction des paramètres de ses flux.

### 3.1.2 Canaux calciques

Pour réguler ses flux (efflux et influx) intracellulaires, différents canaux et pompes sont activés afin de permettre le passage du calcium entre le cytosol avec le milieu extracellulaire et avec les stocks intracellulaires, majoritairement réticulum endoplasmique et mitochondries. On distingue : les canaux dépendants de ligands (« Receptor-Operated Channels », ROC), les canaux chimio-dépendants (« Second-Messenger-Operated Channels », SMOC) activés par des messagers secondaires, les canaux SOC (« Store-Operated Channels ») activés à la suite de la diminution du niveau de calcium cytosolique et les canaux VOC (« Voltage-Operated Channels ») activés lors d'une variation du potentiel de la membrane plasmique (Berridge, Bootman, et Roderick 2003) (**Figure 10**). Je parlerai tout d'abord des échanges avec le milieu extracellulaire, puis avec les organelles. Comme les différentes familles de ces canaux sont très larges, je détaillerai seulement des canaux qui ont été décrits comme jouant un rôle fonctionnel dans l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence cellulaire ou dans des contextes tumoraux.

#### 3.1.2.1 Échanges calciques avec le milieu extracellulaire

Au niveau de la membrane plasmique, il existe différents types de canaux afin de contrôler les entrées de calcium dans le cytoplasme. Je détaillerai ici seulement les canaux voltage-dépendants (VOCs), qui s'activent lors de la dépolarisation de la membrane plasmique. Même si aucune étude n'a pour le moment démontré l'implication directe de ces canaux durant la sénescence cellulaire, nous savons que la



membrane plasmique se dépolarise lors de la sénescence, ainsi il est possible que cela puisse activer des VOCs ou bien que ceux-ci jouent un rôle dans la dépolarisation de la membrane plasmique durant la sénescence.

Ces canaux sont activés par une variation du potentiel de la membrane plasmique mais leurs propriétés électrophysiques et structurelles diffèrent, ce qui les distingue en différentes sous-familles. La première catégorie sont les canaux HVA (« High Voltage-Activated ») ou canaux de type L (pour « Large » ou « Long Lasting ») à haut seuil d'activation, c'est-à-dire lorsque le potentiel de membrane est supérieur à -30mV ; le potentiel de membrane au repos étant d'environ -70mV. A l'inverse, la deuxième catégorie sont les canaux LVA (« Low Voltage Activated ») ou de type T (pour « Tiny » ou « Transient ») activés par une faible dépolarisation (entre -80mV et -60mV).

L'expression de ces canaux varie selon les tissus. Il a été démontré une altération de l'expression, de l'activation ou de la localisation de l'ensemble de ces canaux dans les cellules cancéreuses. Notamment il a été montré une augmentation de l'expression de certains canaux de types T dans des tumeurs du sein, du cerveau, du colon et de la prostate (Panner et Wurster 2006) et dans certaines lignées cellulaires cancéreuses, comme les MCF-7 (Taylor et al. 2008). De plus, il semblerait que l'expression des canaux T soit associée au grade de la tumeur, notamment dans des tumeurs prostatiques (Mariot et al. 2002). Ces canaux jouent aussi un rôle important dans la prolifération et la différenciation cellulaires de différents tissus, et aussi dans le cycle cellulaire. L'ensemble de ces études suggèrent que les canaux voltage-dépendants jouent un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire et pourraient être reliés à la sénescence.

### 3.1.2.2 Échanges calciques avec les organites

Certains organites intracellulaires, comme le réticulum endoplasmique ou la mitochondrie constituent des réserves calciques importantes. Ainsi il est important que les réserves soient toujours chargées et qu'elles puissent libérer du calcium dans le cytoplasme lorsque cela est nécessaire. Je vais commencer par décrire les canaux situés au niveau de la membrane externe du réticulum, puis des mitochondries (**Figure 11**).

#### *Pompes SERCA*

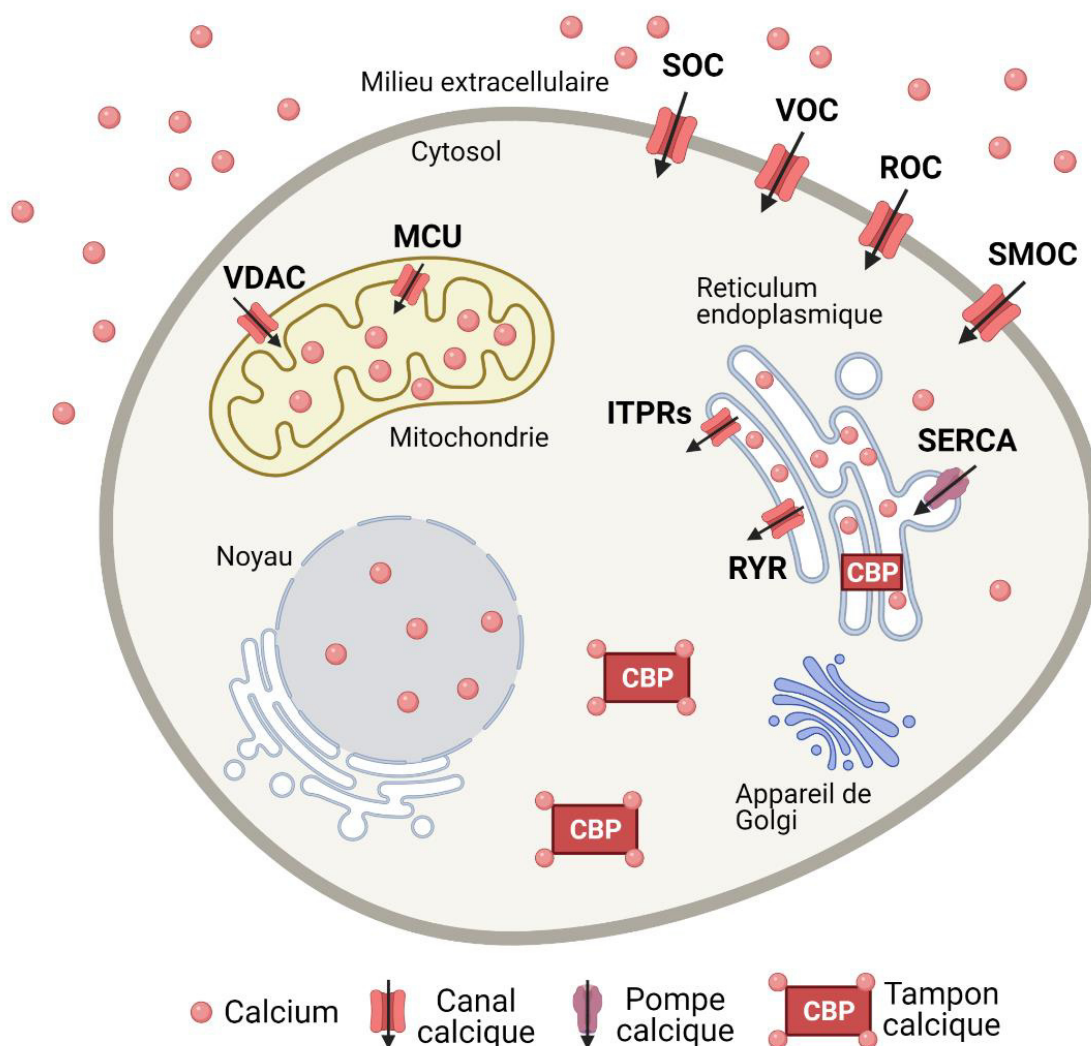
Les pompes SERCA (« Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases ») permettant de maintenir les niveaux de calcium élevés dans le réticulum sont des canaux SOCss, composés des canaux STIM et Orai. Elles permettent l'entrée de calcium directement du milieu extracellulaire à la lumière du réticulum à l'inverse du gradient de concentration.

### *Récepteurs à l'inositol tri-phosphate (IP<sub>3</sub>), les ITPRs*

Les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> sont parmi les principaux canaux de sortie du calcium du réticulum endoplasmique. Il en existe trois isoformes : ITPR-1, -2 et -3. Chacun est constitué de quatre sous-unités identiques et leur partie N-terminale permet la liaison avec l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Ces récepteurs sont principalement activés par l'IP<sub>3</sub> ou le calcium lui-même lorsque la concentration calcique cytosolique est faible. En revanche, lorsque la concentration de calcium intracellulaire redevient élevée, après libération du calcium, celui-ci inhibe les canaux. L'IP<sub>3</sub> agit aussi comme cofacteur puisque sa fixation sur le récepteur entraîne une meilleure sensibilité et lui permet de s'ouvrir à des concentrations plus faibles de calcium. Ces canaux sont aussi régulés par des protéines fixant le calcium (CaM, CaMKII) et les protéines kinases A et C (Garcia et Boehning 2017; Berridge, Bootman, et Roderick 2003). Ainsi en répondant à des stimulus extracellulaires, ces récepteurs permettent de les convertir en signal intracellulaire.

La production d'IP<sub>3</sub> peut être stimulée par différentes voies, notamment par l'activation des récepteurs couplés aux protéines G ou de type tyrosine kinase. Grâce à cette activation, la phospholipase C (PLC), associée à la membrane plasmique, hydrolyse le phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP<sub>2</sub>), phospholipide de la membrane plasmique, en deux messagers secondaires, l'IP<sub>3</sub> et le diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub>, ainsi libéré, se fixe aux récepteurs à l'IP<sub>3</sub> au niveau du réticulum, induit un changement dans leur conformation quaternaire, ce qui permet la formation et l'ouverture d'un pore, libérant le calcium. Il a été montré que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 interagit avec ITPR et inhibe la sortie de calcium réticulaire, conduisant à l'inhibition de l'induction de l'apoptose dans fibroblastes. L'apoptose est alors restaurée lors de la levée de l'inhibition de l'interaction Bcl-2/ITPR (S. S. Kang et al. 2010). Une autre étude dans des cellules prostatiques montre l'implication d'ITPR dans la prolifération cellulaire. Le traitement de LNCaP, cellules cancéreuses prostatiques, avec du cadmium induit l'augmentation de la concentration intracellulaire d'IP<sub>3</sub> et du calcium cytosolique et stimule la prolifération cellulaire. En parallèle, il a été observé une augmentation de l'activité des facteurs de transcription CREB et de NF-κB (Misra, Gawdi, et Pizzo 2003).

De plus, il a été démontré que l'expression d'ITPR2 était augmentée durant l'OIS, permettant le relargage du calcium réticulaire et son accumulation dans la mitochondrie *via* le Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU). L'entrée de calcium mitochondrial conduit ensuite à la production de ROS et à la sénescence (Wiel et al. 2014). De plus, le knock-out d'ITPR2 dans des souris permet d'augmenter leur espérance de vie et de diminuer des marques de vieillissement (Ziegler et al. 2021).



**Figure 10. Ensemble des acteurs (canaux, pompes et tampons calciques) permettant l'homéostasie et les flux calciques.**

Les flux calciques intracellulaires du milieu extracellulaire et entre les compartiments cellulaires sont régulés par des canaux (flux passif) et pompes (flux actif) calciques. D'autres protéines, les tampons calciques, permettent la fixation et régulation des niveaux de calcium. CBP : « Calcium-Binding Protein », SOC : « Store-Operated Channels », VOC : « Voltage-Operated Channels », ROC : « Receptor-Operated Channels », SMOC : « Second-Messenger-Operated Channels ».

#### *Mitochondrial Calcium Uniporter, MCU*

Ce canal permet l'entrée du calcium cytosolique dans la mitochondrie, ce qui conduit alors au tamponnage du calcium cytosolique. La composition exacte de ce canal est encore controversée et pour le moment nous savons qu'il est formé d'un complexe multiprotéique. Les régulateurs essentiels de MCU sont les Mitochondrial Calcium Uptake 1 et 2 (MICU1 et MICU2), le Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1 (MCUR1), l'Essential MCU Regulator (EMRE) et MCUB, ayant une structure tertiaire

très proche de celle de MCU et agissant comme dominant négatif (Sancak et al. 2013), qui forment tous un complexe avec MCU (Marchi et Pinton 2014). Lorsque la concentration en calcium cytosolique est faible, MICU1 et -2 gardent le MCU fermé. A l'inverse, lorsque les concentrations calciques cytosoliques augmentent, le calcium se lie aux domaines de liaison au calcium « EF-hand » de MICU1 et -2, induisant leur changement conformationnel et l'ouverture de MCU (Bagur et Hajnóczky 2017). Son rôle a été montré lors de l'OIS afin de capter le calcium relargué par le réticulum dans les mitochondries (Wiel et al. 2014).

### *Interactions entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries*

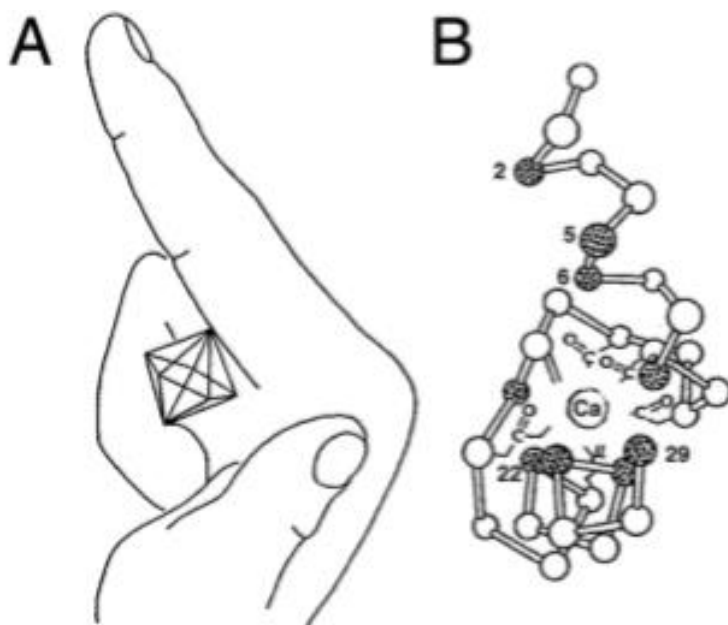
Le réticulum endoplasmique et les mitochondries peuvent former des sites de contacts qui vont leur permettre de communiquer par la formation de canaux, permettant notamment l'échange de lipides et de calcium (Marchi et al. 2017; van Vliet, Verfaillie, et Agostinis 2014). Ces échanges vont ainsi réguler plusieurs activités cellulaires telles que le métabolisme énergétique, les homéostasies calciques et lipidiques et la balance entre la mort et la survie cellulaire. Bien que l'épaisseur des points de contact soit très faible (comprise entre 10 et 25nm), les membranes des organites ne fusionnent pas et les échanges se font grâce à la formation de pores. Plus de 1 000 protéines pourraient être localisées dans ce complexe (György Csordás, Weaver, et Hajnóczky 2018b) mais je détaillerai seulement les protéines principales permettant le transfert du calcium.

Les protéines impliquées dans ce transfert sont principalement : les ITPRs, GRP75 du côté du réticulum et VDAC (« Voltage-Dependent Anion Channel) et le complexe MCU du côté de la mitochondrie (György Csordás, Weaver, et Hajnóczky 2018a). GRP75 a un rôle de soutien et permet de faire le « pont » entre les deux organites tandis que les ITPRs et VDAC permettent la sortie de calcium du réticulum et MCU l'entrée dans la mitochondrie.

Physiologiquement, il a été montré que ces contacts étaient augmentés lors de la sénescence (Ziegler et al. 2021). De plus, le rapprochement forcé des membranes par un « linker » induit de la sénescence prématurée par relargage du calcium du réticulum et de son accumulation dans la mitochondrie. Ceci induit la production de ROS et l'activation de p53, ainsi que la sécrétion de facteurs du SASP dépendants de NF-κB. Cette étude montre le rôle d'ITPR2 dans la formation de ces contacts et l'invalidation *in vitro* et *in vivo* d'ITPR2 diminue la quantité de ces points de contacts et prévient la sénescence cellulaire (Ziegler et al. 2021).

### 3.1.3 Tampons et senseurs calciques : calcium-binding protein (CaBP)

Les structures permettant de chélater le calcium doivent contenir des groupements riches en charges négatives géométriquement agencés de manière à emprisonner le calcium. Les protéines avec des résidus aminés acides (glutamate ou aspartate) correctement espacés permettent de former une "cage" autour du calcium. Différentes familles de protéines fixant le calcium ont émergé au cours de l'évolution, telles que les annexines, les protéines aux domaines "EF-hand" ou les pentraxines (Gifford, Walsh, et Vogel 2007; Bindreither et Lackner 2009). Cependant le terme de tampons calciques est réservé aux protéines cytosoliques aux domaines "EF-hand", comme la parvalbumine (PV), les calbindin D9k et D28k (respectivement CD9K et CD28K ou CALB1) et la calrétinine (CALB2). Ces protéines possèdent toutes une séquence consensus de 12 résidus, entourée de deux séquences de 12 résidus formant les hélices. L'ensemble de ces séquences déterminent la structure 3D de la protéine avec deux hélices perpendiculaires ("EF-hand") et une zone centrale, flexible permettant la fixation du calcium, qui va induire un changement de conformation des hélices, repliant ainsi la "cage" sur le calcium (**Figure 11**).



**Figure 11. Structure des domaines « EF-hand » des protéines fixant le calcium.**

de (B. Schwaller 2009)

A. La structure tridimensionnelle des domaines « EF-hand » peut être représentée comme la main droite : l'index représente l'hélice E (résidus 1 à 10), le majeur plié les 12 aminoacides du domaine de liaison au calcium (résidus 10 à 21) et le pouce l'hélice F (résidus 19 à 29). Les ions oxygènes coordonnant la fixation du calcium sont représentés par les sept extrémités de la bipyramide pentagonale.

B. Structure 3D des domaines « EF-hand » de la parvalbumine.

En fixant le calcium, les tampons calciques, peuvent ainsi moduler rapidement et localement les niveaux de calcium. Leur activité et leurs rôles dépendent de quatre paramètres : a) leur concentration dans le cytosol, b) leur affinité pour le calcium ( $K_D$ ), c) la cinétique de fixation et de relargage du calcium et d) leur mobilité dans la cellule (Beat Schwaller 2010). Ceci permet aux tampons calciques de moduler les niveaux calciques, suivant les quatre paramètres décrits plus haut (localisation, amplitude/intensité, durée et cinétique) et chaque tampon possède ses propres caractéristiques.

Ces caractéristiques confèrent des propriétés différentes aux tampons calciques et certains ont émergé comme « senseurs calciques ». Ce terme signifie que la fixation du calcium induit un changement conformationnel des tampons calciques, qui exposent leurs domaines hydrophobiques, leur permettant d'interagir avec d'autres protéines (B. Schwaller 2010; Ikura 1996). Ainsi les senseurs calciques possèdent une double propriété à la fois en tamponnant le calcium cytosolique et en induisant des voies de signalisation.

L'importance physiologique de ces tampons et senseurs calciques a été montrée dans différents contextes. Notamment, la parvalbumine (PV) permet la relaxation musculaire en facilitant le transport du calcium des myofibrilles au réticulum sarcoplasmique (Hou, Johnson, et Rall 1993). La calrétinine (CALB2) permet quant à elle de moduler les niveaux de calcium au niveau du cortex cérébelleux du cerveau (Cheron et al. 2004).

L'ensemble de ces données montre que les niveaux de calcium intracellulaire peuvent être régulés par des protéines chélatant le calcium, les tampons calciques. Ces tampons permettent le maintien de l'homéostasie calcique essentielle à certaines fonctions biologiques. Cependant, la majorité des études se sont concentrées au niveau neuronal et musculaire et le rôle de ces protéines dans la prolifération cellulaire, l'apoptose ou la sénescence est peu étudié.

### **3.2 Rôle du calcium dans divers processus cellulaires, dont la sénescence**

Grâce à ces propriétés le calcium peut interagir avec de nombreuses protéines cellulaires, activer des voies de signalisation précises et induire des réponses physiologiques adaptées. Au sein de la cellule, la modulation des niveaux de calcium, correspondant à une signature calcique particulière, va permettre de réguler l'activation de ces voies.

### 3.2.1 Voies de signalisation activées par le calcium

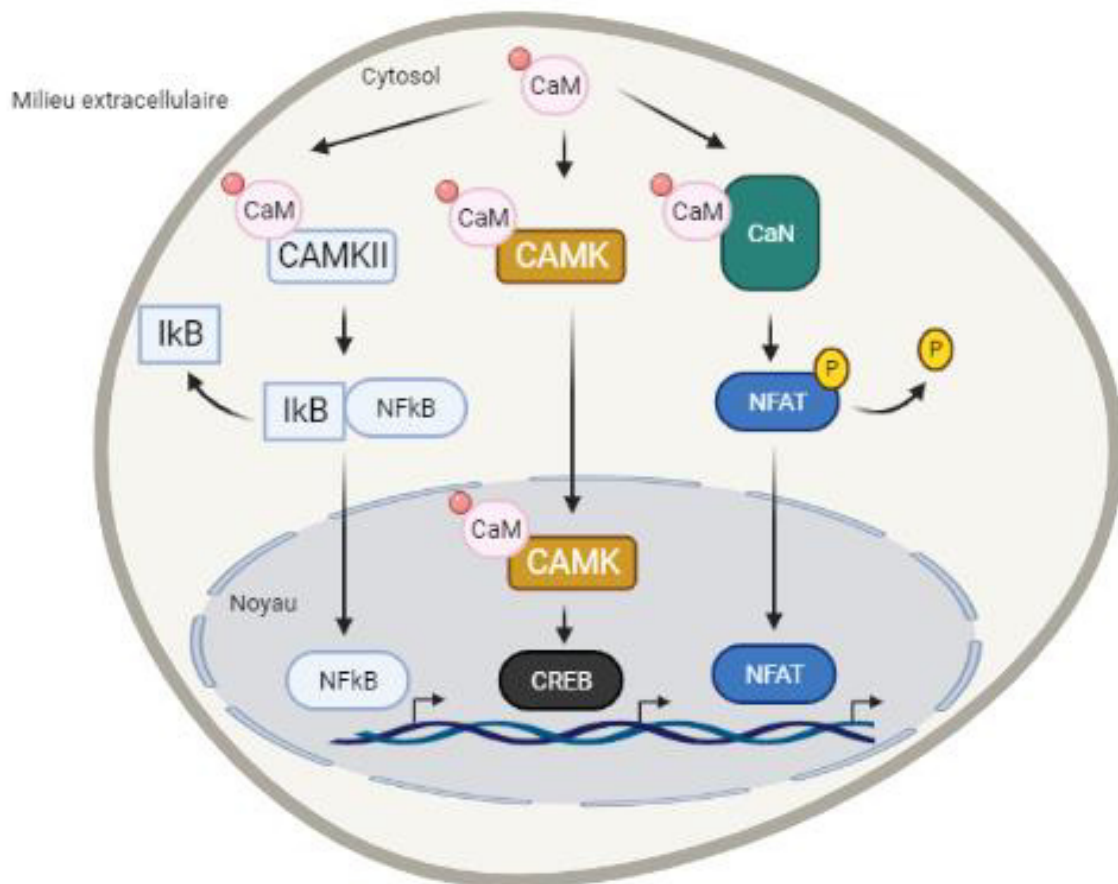
De nombreux changements dans l'expression génique sont observés lors des oscillations de la concentration de calcium dans le cytosol et/ou dans le noyau (Hardingham, Arnold, et Bading 2001; Bading 2000). Ceci est notamment régulé par des cascades de phosphorylation/déphosphorylation, qui permettent d'amplifier et de contrôler le signal calcique et d'activer différents facteurs de transcription. L'importance de l'activation des voies de signalisation calcique a été amplement décrite dans le système nerveux ou musculaire, par exemple lors de la transmission d'un message nerveux ou de la contraction musculaire. Durant cette partie, je vais seulement décrire certaines voies impliquées dans le cycle cellulaire, la mort ou la sénescence cellulaire.

#### 3.2.1.1 Voies de transduction activées par les kinases dépendantes de calcium

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est retenu dans le cytoplasme par association avec I $\kappa$ B, ce qui empêche sa translocation dans le noyau. La phosphorylation de I $\kappa$ B, permettant l'activation de NF- $\kappa$ B, est aussi possible grâce aux kinases dépendantes du complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline CaMK ("Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dependent kinases") et de PI3K (« Phosphoinositide 3-Kinase »), activables par une augmentation de calcium cytosolique (**Figure 12**) (Théâtre, Bours, et Oury 2009; Moscat, Diaz-Meco, et Rennert 2003). NF- $\kappa$ B permet alors l'expression de nombreux gènes, impliqués notamment dans la prolifération et survie cellulaire. La Ca<sup>2+</sup>/calmoduline n'est pas la voie canonique d'activation de NF- $\kappa$ B mais permet son activation dans certains contextes cellulaires.

D'autres facteurs de transcription peuvent être activés grâce aux CaMK, comme CREB ("cyclic AMP Responsive Element Binding protein"), permettant la transcription de gènes cibles, comme *c-fos* ou de la tyrosine kinase (Alonso et García-Sancho 2011), ce qui contrôle notamment la prolifération cellulaire. Une étude a montré que CREB pouvait être activé par l'augmentation locale de calcium due à la présence d'un canal calcique de type L, permettant l'activation de la CaMKII par le complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline, sa translocation dans le noyau et ainsi l'activation de CREB (Wheeler et al. 2008) (**Figure 13**). De plus, l'activité de CREB requiert des CBP ("CREB Binding Protein"), elles aussi sensibles au calcium (Hardingham, Arnold, et Bading 2001).





**Figure 12. Régulation de l'expression génique par des voies de signalisation calcium-dépendantes.**

Le calcium (rond rose) en se fixant à la calmoduline (CaM) permet la transduction du signal en activant différentes voies de signalisation, conduisant *in fine* à l'expression des gènes cibles de NF-κB, CREB et NFAT (adapté (Alonso et García-Sancho 2011)).

### 3.2.1.2 Voies de transduction activées par les phosphatases dépendantes de calcium

La calcineurine (CaN) est une sérine/thréonine phosphatase activable par la fixation simultanée de la calmoduline et du calcium, qui fixent respectivement les sous-unités catalytique A et régulatrice B. Elle est une protéine clé de la transduction du signal calcique car elle permet *in fine* l'activation de trois facteurs de transcription : NFAT ("Nuclear Factor of Activated T cells"), TORC ("Transducers of Regulated CREB protein") et MEF-2 ("Myocyte Enhancer Factor 2"). Elle peut ainsi interférer sur l'expression génique après son activation due à une augmentation de calcium cytosolique (Swoap et al. 2000; Crabtree 2001). Notamment, elle permet l'expression de gènes impliqués dans la signalisation calcique et plus particulièrement dans



l'homéostasie calcique, tel que le récepteur à la ryanodine (RyR) ou à l'IP3 (IP3R) (Genazzani, Carafoli, et Guerini 1999; Bultynck et al. 2003).

Les facteurs NFAT (« Nuclear Factor of Activated T cells ») représentent une famille de facteurs de transcription cytosoliques activables et translocables au noyau par la calcineurine. La calcineurine, après activation par le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline, déphosphoryle NFAT ce qui expose ses domaines de localisation nucléaire NLS ("Nuclear Localization Sequence"), et en induisant sa translocation dans le noyau, sa fixation sur ses éléments de réponses et l'activation de ses gènes cibles (Hogan et al. 2003) (**Figure 12**). Notamment, les facteurs NFATs sont importants dans la réponse immunitaire ou dans le système nerveux.

Il est aussi intéressant de noter que l'affinité du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline est plus importante pour la calcineurine que pour la CaMKII. Ainsi, l'activation de NFAT est possible même à des faibles concentrations de calcium, alors que celle de NF- $\kappa$ B demande une augmentation calcique de plus forte amplitude (Dolmetsch et al. 1997). Il pourrait donc y avoir une chronicité dans l'activation de ces voies qui pourrait mener à des réponses phénotypiques différentes.

### 3.2.2 Calcium et mort cellulaire

Le calcium permet de réguler la mort cellulaire, notamment l'apoptose. En effet une surcharge de calcium dans la mitochondrie conduit à l'activation de facteurs pro-apoptotiques. Notamment cela va conduire à l'altération de la respiration mitochondriale et à la diminution du potentiel de membrane menant au gonflement de la mitochondrie et à la perméabilisation de la membrane externe induisant la libération du cytochrome c (Hajnóczky et al. 2006). Le cytochrome c va alors permettre la formation du complexe protéique, apoptosome, permettant le clivage et activation de caspases entraînant la mort cellulaire. La surcharge en calcium de la mitochondrie est régulée notamment par la famille des Bcl-2, régulant les signaux pro- et anti-apoptotiques (P. Li et al. 1997). Comme nous l'avons vu un peu plus haut, la quantité de calcium au sein de la mitochondrie peut dépendre de l'activité des ITPR qui permettent le relargage du réticulum (G. Csordás et Hajnóczky 2001; G. Csordás, Thomas, et Hajnóczky 1999). Il a été décrit que Bcl-2 et Bcl-xL contrôlent le relargage du calcium du réticulum endoplasmique en interagissant avec ITPR (Scorrano et al. 2003) et en inhibant la sortie du calcium réticulaire par ces canaux (Rong et al. 2009).

De plus, des altérations des niveaux de calcium dans le réticulum endoplasmique peuvent aussi conduire à la mort cellulaire. En effet, de nombreuses fonctions du RE, notamment celles des protéines chaperonnes, sont dépendantes du calcium. Une diminution trop importante des niveaux de calcium conduit donc à une mauvaise activation des protéines chaperonnes et l'accumulation de protéines mal repliées, conduisant au stress du RE. Et de nombreuses études ont montré l'induction

de l'apoptose ou de l'autophagie par un stress du RE trop important (Decuypere, Bultynck, et Parys 2011; Harr et Distelhorst 2010).

### 3.2.3 Contrôle du cycle cellulaire et de la production de composants du SASP

Si l'implication du calcium durant la sénescence reste encore sous-étudiée, son rôle lors de l'avancement dans le cycle cellulaire a bien été décrit. Les niveaux de calcium sont modulés durant les phases du cycle cellulaire, notamment G1, la transition G1/S et la mitose (Pande, Kumar, et Manogaran 1996). Lors de la mitose, on observe une augmentation du niveau de calcium cytosolique dans des fibroblastes et cellules épithéliales de mammifères, ainsi que dans des embryons (Poenie et al. 1986; Tombes et Boris 1989). Par ailleurs, le calcium contrôle la duplication en G1/S et la séparation des centrosomes en G2/M et un défaut dans ce processus conduit à l'aneuploïdie et l'instabilité génétique (Matsumoto et Maller 2002; Tsang et al. 2006). Ainsi, la modulation des niveaux de calcium est cruciale pour l'avancement correct dans le cycle cellulaire.

En plus du rôle direct du calcium, la voie calcium/calmoduline est essentielle à la progression dans le cycle cellulaire. Elle permet notamment l'accumulation de la cycline D1 (Kahl et Means 2004) et l'inhibition de la calmoduline conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Kahl et Means 2004; Rasmussen et Means 1989). En outre, cette voie permet l'activation de différents facteurs de transcription, tels que NFAT et CREB, dont les gènes cibles contrôlent la progression du cycle de la phase G1 à S. NFAT1c permet la suractivation de MYC et l'expression de ses gènes cibles, comme la cycline E et E2F, ce qui conduit à l'augmentation de la prolifération cellulaire (Buchholz et al. 2006). De plus, la phosphorylation et activation de CREB par les calmoduline-kinases 2 et 4 permet l'expression de la cycline D1 (Schneider et al. 2002).

Il semblerait que l'activité de p53 puisse aussi être régulée par le calcium. En effet, de nombreuses « calcium-binding » protéines de la famille S100 sont capables d'interagir avec p53. Ainsi, l'interaction de S100B avec p53 dans des mélanomes réduit le niveau protéique de p53, réprime sa fonction anti-apoptotique et conduit à la progression tumorale (J. Lin et al. 2010).

En plus de réguler la prolifération cellulaire, le calcium joue un rôle dans la production de certains facteurs retrouvés dans le SASP. En effet, en activant des CaMK, le calcium permet l'activation de NF- $\kappa$ B, un des principaux régulateurs du SASP. Notamment l'activation de la calmoduline inhibe c-Rel, un des membres de la famille NF- $\kappa$ B, et permet la translocation de RelA dans le noyau (Maubach et al. 2013; J.-E. Kim et al. 2014), permettant ainsi l'expression de ses gènes cibles, comme les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8. Le calcium et la calmoduline permettent aussi la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , autre composant majeur du SASP pro-inflammatoire, en favorisant

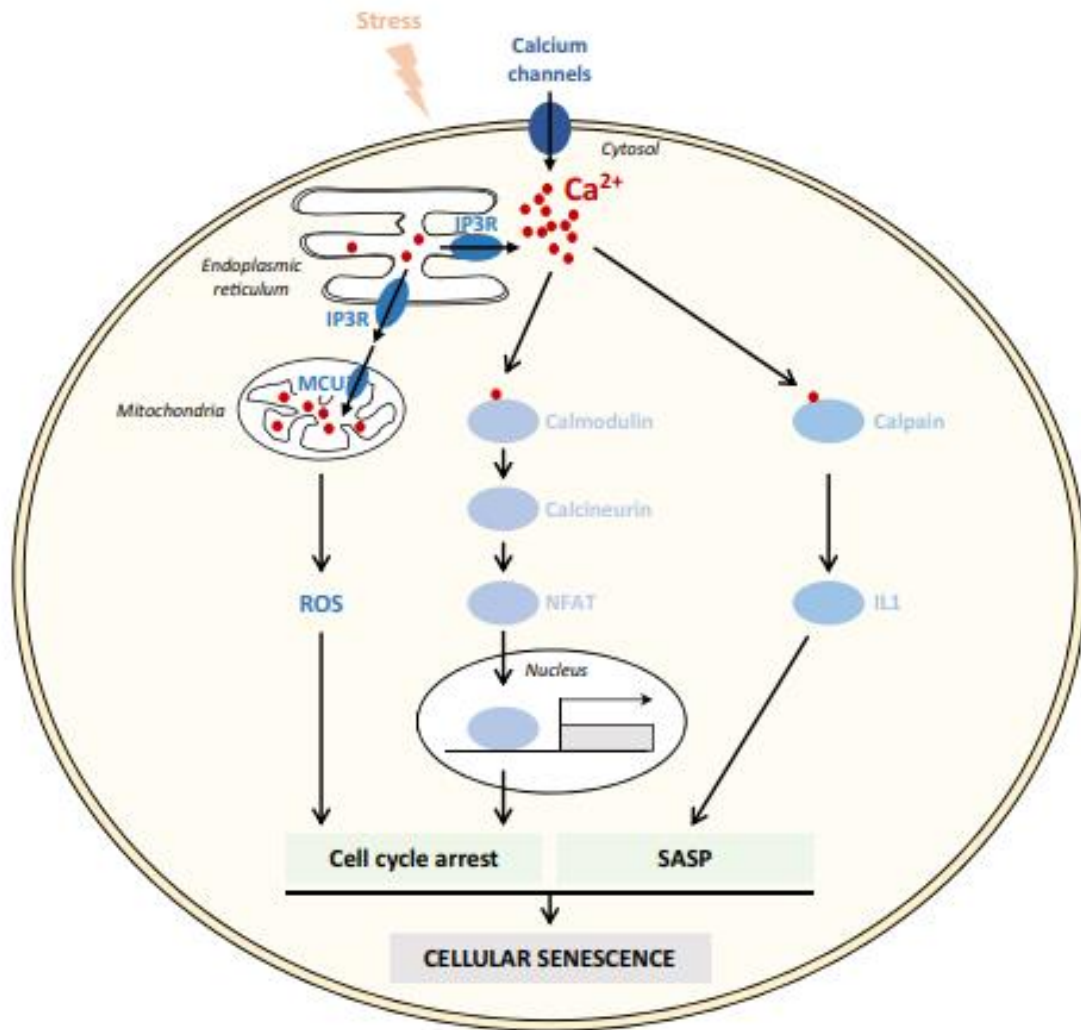
sa maturation et son relargage d'une manière dépendante du calcium (Ainscough et al. 2015). Le SASP est aussi régulé par la voie mTOR. Récemment, il a été démontré que le canal calcique TRPML1 (« Transient Receptor Potential Channel Mucolipin 1 »), localisé à la membrane des vésicules intracellulaires, comme les lysosomes, permettait le relargage du calcium lysosomal. Ceci conduit à l'activation de mTORC1 *via* la calmoduline et stimule son activité kinase (R.-J. Li et al. 2016). Ainsi, mTOR peut aussi être activé par des voies dépendantes du calcium.

Ainsi, les niveaux de calcium peuvent moduler deux des caractéristiques de la sénescence cellulaire : l'arrêt du cycle cellulaire et la production de molécules, notamment pro-inflammatoires, pouvant être retrouvées dans le SASP.

### 3.2.4 Calcium et sénescence cellulaire

Comme il a été décrit tout au long de cette introduction sur le calcium, ce messager secondaire joue un rôle dans beaucoup (si ce n'est tous) les processus et réponses physiologiques de la cellule. Ainsi, j'ai commencé à suggérer son implication dans des processus cellulaires caractéristiques de la sénescence et je vais dans cette partie détailler plus en profondeur les mécanismes par lesquels le calcium pourrait participer à la sénescence cellulaire.

Il a été décrit précédemment que l'expression et activation de certains canaux calciques, situés à la membrane plasmique ou au niveau des réservoirs calciques, étaient modulés durant la sénescence. Plusieurs études ont aussi montré dans différents contextes de sénescence que les niveaux de calcium étaient augmentés. Il a ainsi été démontré dans des cellules de neuroblastomes que l'inhibition de CaV1.3, un canal calcique de type L, prévenait l'augmentation de calcium induite par la roténone, ainsi que la sénescence associée (Yu et al. 2013). De plus, dans des cellules souches endométriales humaines, la sénescence induite par un stress oxydatif conduit au relargage du calcium des stocks intracellulaires dans le cytosol *via* l'activation de la voie PLC/IP<sub>3</sub>/ITPR (Borodkina et al. 2016b) (**Figure 13**). Enfin, dans des cellules épithéliales mammaires et fibroblastes primaires humains, l'activation d'un oncogène ou le raccourcissement des télomères déclenchent la libération du calcium du réticulum endoplasmique également par l'activation d'ITPR2, qui pourrait être activé par la voie PLC/IP<sub>3</sub> (Wiel et al. 2014). En outre, la chélation chimique du calcium par le BAPTA empêche l'entrée en sénescence (Borodkina et al. 2016b), ce qui suggère que des niveaux élevés de calcium intracellulaire sont nécessaires lors de la sénescence cellulaire. Les niveaux de calcium cytosolique et dans les stocks intracellulaires semblent donc augmenter dans plusieurs contextes de sénescence. Ainsi, il serait intéressant de déterminer sur un plus grand nombre d'études (différents inducteurs de sénescence et types cellulaires) si cette augmentation de calcium est universelle et pourrait être une marque de sénescence.



**Figure 13. Signalisations calciques activées durant la sénescence cellulaire.**

de (Martin et Bernard 2017)

Après différents stress, les niveaux de calcium intracellulaire augmentent conduisant à l'activation de différentes voies menant à l'arrêt du cycle cellulaire et à la production du SASP, et donc à la sénescence cellulaire.

De plus, certaines voies dépendantes du calcium sont activées durant la sénescence. En effet, quelques études ont montré que le facteur de transcription NFAT joue un rôle crucial durant la sénescence cellulaire. L'inhibition pharmacologique de NFAT1c par la cyclosporine A dans un modèle murin de kératinocytes humains xéno greffés réprime la sénescence induite par un oncogène et dépendante de p53. L'inhibition de NFAT1c augmente ainsi la formation de tumeurs dans ces kératinocytes exprimant *H-RasV12* (Wu et al. 2010). Dans un autre modèle murin où PTEN est déficient, l'activation de NFAT1c permet de contrer la sénescence induite par la perte d'oncogène et conduire à la formation de tumeurs prostatiques (Manda et al. 2016). Ainsi la voie de signalisation calcium/calmoduline/NFAT semble avoir une fonction pro- ou anti-sénescence en fonction du contexte et du type cellulaire. Une autre étude

a montré que l'augmentation des niveaux de calcium durant la sénescence induite par un stress oxydatif permettait l'expression et la maturation d'IL-1 $\alpha$  par activation des calpaïnes (McCarthy et al. 2013) (**Figure 13**). Les calpaïnes permettent le clivage d'IL-1 $\alpha$  et la chelation par le BAPTA du calcium empêche cette maturation, ainsi que l'expression d'autres cytokines en aval d'IL-1 $\alpha$ . Le SASP produit sans calcium ne permet pas d'induire les effets paracrines de la sénescence observés en condition normale (McCarthy et al. 2013) (**Figure 13**).

Pour résumer cette partie, l'ion calcium est un messager secondaire important qui, grâce à ses propriétés électrochimiques, transduit et induit des réponses cellulaires variées. La diversité des réponses cellulaires induites dépend des différents paramètres régulant les « pulses » de calcium et des dérégulations dans son homéostasie intracellulaire peut conduire à des réponses cytotoxiques. Son implication directe dans la sénescence cellulaire est de plus en plus montrée.

## 4 OBJECTIFS DE LA THÈSE

---

Comme je l'ai décrit tout au long de mon introduction, le calcium joue un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques, notamment lors de la sénescence cellulaire. Sa concentration et les flux cytosoliques doivent être finement régulés afin d'engendrer des réponses cellulaires adaptées. Pour maintenir un niveau de calcium stable la cellule utilise différentes stratégies, notamment l'expression et activation de protéines tamponnant le calcium, les « calcium-binding proteins », CBPs.

Grâce à des microarrays réalisés dans des cellules épithéliales mammaires immortalisées en OIS par activation de l'oncogène Mek, l'équipe a pu identifier l'induction de l'expression de la CBP, Calbindin D28k ou CALB1. CALB1 est un tampon calcique dont la fonction cytoprotectrice a principalement été décrite dans les neurones. Son induction durant la sénescence nous a paru intéressante car jusqu'à présent aucun tampon calcique n'a été décrit durant ce phénotype. L'implication de CALB1 a récemment été étudiée dans la sénescence mais aucun lien avec le calcium n'a été déterminé (L.-Q. Cao et al. 2019).

Le premier objectif de ma thèse a été d'étudier l'induction des niveaux de calcium et de CALB1 dans plusieurs modèles de sénescence dans les HMEC afin de déterminer des mécanismes calciques communs lors de la sénescence. Ensuite, j'ai étudié plus précisément le rôle de CALB1 et du calcium lors de cette sénescence.

Dans un second projet, j'ai étudié le rôle du calcium et de CALB1 dans les effets paracrines de la sénescence. Notamment, j'ai démontré un nouvel effet du SASP dans des cellules cancéreuses mammaires et prostatiques : la transdifférenciation neuroendocrine qui permettent aux cellules cancéreuses d'acquérir des marqueurs de cellules neuroendocrines. Les objectifs de ce projet ont été dans un premier temps de déterminer les mécanismes d'induction et de signalisation calcique impliqués. Dans un second temps, j'ai étudié la pertinence biologique de ces observations réalisées *in vitro* sur des tumeurs mammaires grâce à des données génétiques et cliniques de patientes atteintes de cancer du sein.

Ces deux projets tendent à déterminer des mécanismes de régulation du calcium dans la sénescence et la médiation de ses effets paracrines. Ceci permettrait de déterminer de nouveaux régulateurs de la sénescence, ainsi que de nouveaux effets du SASP médiés par le calcium.



**- MATÉRIEL  
& MÉTHODE -**





## MATÉRIEL & MÉTHODE

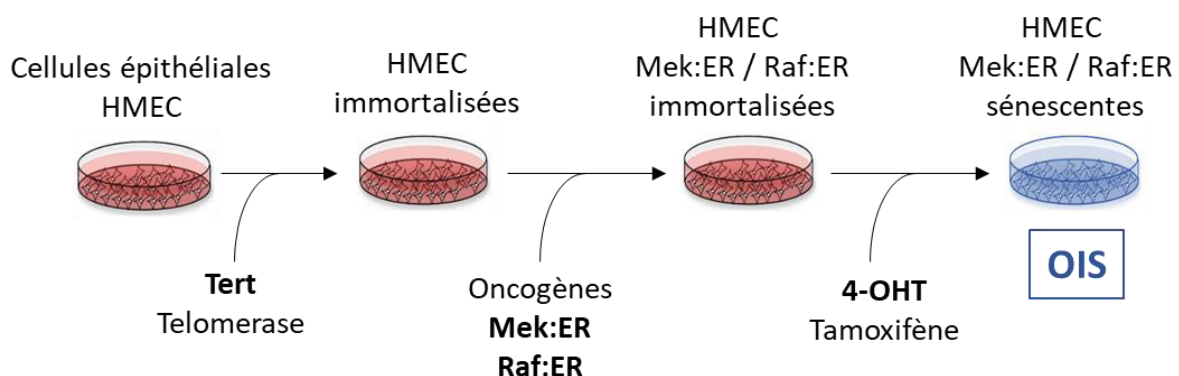
- **Culture cellulaire et traitement**

Les cellules épithéliales mammaires humaines (HMEC, CC-2551B, Lonza) ont été cultivées dans du milieu de culture optimisé pour ce type cellulaire (C-21210, Promocell) avec de la pénicilline/streptomycine à 100 U/mL (Life Technologies). Les fibroblastes MRC-5 (ATCC), les cellules 293T (Clontech), pour produire des particules lentivirales, et 293GP (Clontech), pour produire des particules rétrovirales, ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies) supplémenté avec 10% de Serum de Veau Fœtal, SVF (Life Technologies) et en pénicilline/streptomycine 100 U/mL. Toutes les cellules ont été cultivées dans une atmosphère humide à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Le (Z)-4-hydroxytamoxifène (4-OHT) (Sigma) et le FK-506 (MedChem Express) ont été utilisés quotidiennement pour les durées de traitement indiquées respectivement à des concentrations de 250 ou 100 nM et 2 µM.

- **Plasmides rétro- et lentiviraux et infection**

### Vecteurs

Les HMEC ont d'abord été infectées par un vecteur codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase reverse transcriptase (hTert) (22396, Addgene) dans le but d'être immortalisées. Puis elles ont été infectées par le plasmide pNLCΔMEK1 (ΔN3, S218E, S222D):ER (Lallet-Daher et al. 2013; Wiel et al. 2014) codant pour les oncogènes MAPK/ERK kinase (Mek):récepteur à l'œstrogène (Mek:ER), oncogène de Mek, ou Raf:ER pour l'oncogène Raf inducible par le tamoxifène (4-OHT). Ces cellules deviennent sénescentes après ajout de 4-OHT (**Figure 14**).



**Figure 14. Représentation du modèle cellulaire utilisé afin d'induire l'OIS par ajout de tamoxifène (4-OHT) dans des cellules épithéliales humaines (HMEC).**

Les plasmides pLV-CALB1 (VectorBuilder) et NFAT1c-CA (11102, Addgene) ont été utilisés pour exprimer respectivement les protéines CALB1 et NFAT1c constitutivement actives avec des vecteurs contrôles sans les gènes codant des protéines d'intérêt.

### Transfection/Infection

Nous avons d'abord utilisé des cellules 293 pour produire les particules virales contenant les séquences d'intérêt, puis nous avons infecté les cellules cibles par ces particules. Les plasmides lentiviraux (codant pour les shCTL, shCALB1, pLV-CTL et pLV-CALB1) ont chacun été cotransfectés dans des cellules 293T avec des plasmides d'expression pour la protéine gag et la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) essentielles à la formation du virus. Les plasmides rétroviraux (codant pour le contrôle, Mek:ER, Raf:ER et NFAT1c) ont été cotransfectés avec le plasmide codant pour le VSV-G, dans des cellules 293GP qui expriment stablement les protéines gag et pol. Pour les deux types cellulaires, la transfection a été réalisée grâce à du réactif de transfection GeneJuice (Novagen) dans du milieu sans sérum Opti MEM (Life Technologies) qui a été ajouté au milieu des 293. Après une incubation de 6 heures sur les cellules, le surnageant a été remplacé par un mélange de 50% de milieu DMEM et 50% de milieu pour HMEC. Deux jours plus tard, le surnageant viral a été récupéré, filtré et ajouté à du milieu pour HMEC (1 mL de milieu pour 1 mL de surnageant viral) et du polybrène ( $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , Sigma Aldrich) et incubé 6 heures pour infecter les cellules HEC. Le surnageant a ensuite été remplacé par du milieu pour HMEC et le lendemain les cellules infectées ont été sélectionnées avec de la puromycine ( $500 \text{ ng.mL}^{-1}$ , InvivoGen) et généticine ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Life Technologies).

- **Microarray dans les HMEC/Mek :ER**

Les analyses transcriptomiques ont été réalisées sur des cellules HMEC Mek :ER traitées ou non par du 4-OHT (100 nM) pendant 24 ou 96 heures en utilisant des puces Whole Human Genome Oligo 4x44K Microarrays (Agilent Technologies) (Warnier et al. 2018). Les ARNc ont été synthétisés et marqués par le colorant Cy3 à partir de 100 ng d'ARN total en utilisant le kit monocoloré Low Input Quick Amp Labeling (Agilent Technologies). Ensuite, ces ARNc marqués et purifiés ont été hybridés sur les puces 4x44K pendant 17 h à 65°C. Toutes les conditions ont été réalisées en trois réplicats biologiques indépendants. Les gènes différentiellement exprimés entre les cellules traitées et non traitées ont été identifiés par un *t-test* avec une P-value < 0,01 avec une correction de Benjamani Hochberg. Les gènes avec un différentiel d'expression d'au moins deux fois ont été sélectionnés.

- **Mesure de l'activité SA-β-Galactosidase (SA- β-Gal)**

Après ensemencement de 15 000 cellules par puits de plaque 12 puits et traitement, les cellules sont rincées deux fois avec du Phosphate Buffered Saline (PBS), fixées avec du Formaldéhyde 2% / Glutaraldéhyde 0,2% (v/v) pendant 5 minutes. Elles sont ensuite rincées avec du PBS et avec une solution fraîche de coloration (acide citrique/tampon phosphate/sodium 40 mM,  $K_4[Fe(CN)_6]3H_2O$  5 mM,  $K_3[Fe(CN)_6]$  5 mM, NaCl 150 mM,  $MgCl_2.6H_2O$  2 mM, 5-bromo-4-chloro-3-indoyl β-D-galactopyranoside  $1\text{ mg.mL}^{-1}$  dissous préalablement dans du N,N-diméthylformamide, pH=6), préparée comme décrit par Augert *et al.* (Augert et al. 2009), puis incubées pendant la nuit à 37°C (sans CO<sub>2</sub>) avec cette même solution fraîche de coloration. Les cellules ont été considérées comme positives lorsqu'elles étaient bleues à la lumière du microscope. Le pourcentage de cellules SA-β-Gal positives a été calculé à partir de la moyenne obtenue à partir d'au moins une centaine de cellules par condition.

- **Colony Assay**

Après ensemencement des cellules en puits de plaques 12 puits et traitement, les cellules ont été rincées au PBS deux fois, fixées avec du paraformaldéhyde 3,3% pendant 15 minutes, rincées encore avec du PBS, et colorées par une solution de cristal violet à 0,05% sur la nuit. Les scans des puits sont présentés.

- **Reverse Transcription (RT) et PCR quantitative en temps réel (qPCR)**

Après ensemencement de 30 000 cellules par puits de plaques 6 puits, les cellules ont été reprises par 1 mL de solution de UPzol™ (Biotechrabbit) auquel a été ajouté 200 µL de chloroforme et centrifugé à 16 000 g pendant 10 minutes à 4°C afin de séparer les ARN, l'ADN et les protéines. La phase aqueuse claire, correspondant aux ARN, a été récupérée et 500 µL d'isopropanol sont rajoutés, incubés 10 minutes à température ambiante, puis centrifugés dans les mêmes conditions afin de précipiter l'ARN. Le surnageant est éliminé et 1 mL d'éthanol 75% est ajouté pour laver le culot, puis centrifugé à 6 000 g 5 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot séché pendant au moins 30 minutes à température ambiante. Dix µL d'eau sont enfin ajoutés et le tout est incubé 5 minutes à 55°C puis mis dans la glace.

Les ARN sont dosés par le NanoDrop™ One/One<sup>C</sup> (AZY1602414, Ozyme). Le kit « First-Strand cDNA Synthesis » est utilisé pour synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) de 3 µg d'ARN total selon les recommandations du fournisseur. L'ADNc est dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  et utilisé comme matrice pour la qPCR. La PCR quantitative TaqMan a été menée sur le Thermocycler FX96 (Biorad). Le mix de PCR contient du mix TaqMan (Roche), 200 nM d'amorces, 100 µM de sonde de l'Universal Probe Library pour le gène d'intérêt (Life Technologies) avec 1,67 µL d'ADN complémentaire. Toutes les réactions

ont été réalisées en triplicat. Le niveau d'ARNm a été calculé en utilisant la méthode comparative Ct ( $\Delta\Delta CT$ ), normalisé avec deux gènes de ménage (GAPDH et PGK1). Par souci de clarté, seuls les niveaux d'ARNm normalisés avec l'expression de la GAPDH ont été montrés dans toutes les figures. Les amorces de PCR utilisées sont listées dans le **Tableau 2**.

Nom du gène	Référence de la séquence NCBI	Amorces	Numéro de sonde UPL
CALB1	NM_004929.3	Sens 5' – aagatccggttcggtacagctt- 3' Anti-sens 5'–ctgaaggatctgtgcgagaa-3'	58
GAPDH	NM_001289745.1	Sens 5'–attggcaatgagcggttc-3' Anti-sens 5'–cgtggatgccacaggact-3'	60
NFAT1c	NM_172389.1	Sens 5'–ggtcagtttctgcttccatc-3' Anti-sens 5'–ccaaggtcatttctggtgag-3'	45

**Tableau 2. Liste des amorces et sondes UPL utilisées pour les PCR quantitatives.**

- **Western-Blot (WB)**

Après ensemencement et traitement, les cellules sont récupérées et lysées par du tampon Laemmli 6X (docécyle sulfate, SDS 2% (m/v), glycérol 10% (v/v), Tris 125 mM pH=6,8, bleu de bromophénole (1/10 ; v/v), avec 3 000 cellules pour 1  $\mu$ L de tampon Laemmli) avec 15% de  $\beta$ -mercaptoéthanol, puis chauffées 10 minutes à 95°C. Quinze  $\mu$ L d'échantillon ont été déposés sur des gels à 15% (pour l'anticorps de CALB1) ou 12% (pour l'anticorps de l' $\alpha$ -tubuline) afin de réaliser une électrophorèse sur gel discontinu de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) dans du tampon Tris-HCl-Glycine–SDS TGS pH=8,5 (Euromedex). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (BioRad) dans du tampon Tris-Glycine pH=8,5 (Euromedex)/éthanol 20% à 4°C pendant 2 heures à voltage constant 100V. Le transfert des protéines et le dépôt d'une même quantité de protéines ont été vérifiés par coloration de la membrane avec du rouge Ponceau. Puis la membrane est rincée trois fois dans du tampon Tris Buffer Saline pH=7,5 (TBS) Tween-20 0,05% (TBS-T) et incubée 1 heure dans TBS-T auquel est ajouté 5% (m/v) de lait écrémé (TBS-T-lait), puis avec les anticorps primaires (pour CALB1 : dilution au 1/250<sup>ème</sup>, sc28285, SantaCruz, Interchim pour l'IL-6, sc-28343, Santacruz (dilution au 1/1 000<sup>ème</sup>) ; pour l'IL-8, sc-8427, Santacruz (dilution au 1/1 000<sup>ème</sup>) et pour ANGPTL4, sc-373761, Santacruz (dilution au 1/1 000<sup>ème</sup>), ainsi que pour l' $\alpha$ -tubuline : IgG monoclonal de souris diluées au 1/1 000<sup>ème</sup>, T6199, Sigma Aldrich) à 4°C pendant la nuit. Les membranes ont ensuite été rincées avec du TBS-T et incubées avec les anticorps secondaires (anti-lapin pour

CALB1, 711-035-152, Interchim, et anti-souris pour l' $\alpha$ -tubuline, 715-035-150, tous dilués au 1/5 000<sup>ème</sup>) conjugués à la peroxydase, dans du TBS-T-lait pendant 1 heure à température ambiante à faible agitation. Le kit de GE Healthcare RPN2106V1/2 a été utilisé pour la détection du signal.

- **Immunofluorescence**

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques Lab-Tek (Falcon). Après traitement, elles ont été rincées une fois avec du PBS, puis fixées par du méthanol froid pendant 10 minutes à -20°C. Les cellules sont ensuite rincées avec du TBS Tween-20 0,5% (TBS-T'). Les sites aspécifiques sont ensuite saturés par du TBS-T'-SVF 20% (TBS-T'-SVF) pendant 30 minutes à température ambiante. L'anticorps primaire contre CALB1 (au 1/250<sup>ème</sup>) est ensuite incubé dans la même solution toute la nuit à 4°C à faible agitation. Après trois rinçages avec la solution de TBS-T'-SVF 20%, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin IgG couplé avec le fluor Alexa 488-labeled ou Alexa 555-labeled (au 1/500<sup>ème</sup>, respectivement A11008 et A21424, Life Technologies) dans du TBS-T'-SVF pour 1 heure à température ambiante à l'obscurité. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS et contre-colorées avec du Hoechst dilué (au 1/1 000<sup>ème</sup>, Sigma Aldrich) dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante à l'obscurité. Les lames ont ensuite été montées avec le Fluoromount-G (Southern Biotech) et observées au microscope Nikon (Ni\_2CE-MQVH-7).

- **Mesure calcique**

La mesure du calcium intracellulaire a été réalisée avec Nolwenn Tessier et Sylvie Ducreux de l'équipe Cardioprotection, du laboratoire CarMeN, Inserm U1060. Trente mille cellules (HEC-TM) ont étéensemencées dans des boîtes de 35 mm de diamètre (MatTek corporation) pour imagerie et après 4 jours de traitement par le tamoxifène à 250 nM, elles ont été rincées deux fois avec du milieu Hanks' Balances Salt Solution (CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0,4 mM, KCl 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,45 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4,2 mM, NaCl 140 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM) (HBSS, Life Technologies) avec calcium. La sonde Fura-2 acétoxyméthylester (AM) (Fura-2/AM, Molecular Probes) est ensuite incorporée au milieu HBSS avec calcium à 2  $\mu$ M final et incubée pendant 30 minutes à 37°C à l'obscurité. Les cellules sont ensuite rincées deux fois par du milieu HBSS sans calcium (KCl 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,45 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4,2 mM, NaCl 140 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 mM) (Life Technologies). Une fois l'acquisition réalisée au niveau basal, la ionomycine (ab120370, Abcam) à 1  $\mu$ M final est injectée dans le milieu avec cellules, ce qui va induire la perméabilisation de l'ensemble des membranes intracellulaires des cellules et permettre la libération du calcium contenu dans les organites intracellulaires. Le Fura-2/AM peut passer la membrane plasmique grâce au groupement

acétoxyméthylester qui est ensuite hydrolysé dans le cytosol par des estérases endogènes. Le Fura-2 ainsi libéré en excès dans la cellule se lie avec une forte affinité avec le calcium présent dans la cellule ( $K_D = 0,14 \mu\text{M}$ ) et permet la mesure de calcium cytoplasmique. Cette sonde est dite ratiométrique car lorsqu'elle est libre, le spectre d'excitation possède un pic pour une longueur d'onde à 380 nm et lorsqu'elle est liée au calcium, ce pic est obtenu à 340 nm. Toutes deux possèdent une longueur d'onde d'émission de fluorescence à 510 nm. Les images (1024x1024 pixels) sont acquises avec Orca-Flash 4.0 Scientific CMOS camera (Hamamatsu) et un microsysteme Leica en utilisant un objectif 40x à immersion, utilisant un filtre Lambda DG-4+ (Sutter instruments). Les images (1024x1024 pixels) sont prises toutes les 5 secondes pendant 10 minutes et le rapport des intensités de fluorescence émises après excitation à 340 et 380 nm (F340/F380) est calculé. L'augmentation du calcium dans le cytosol se traduit par une diminution de fluorescence suite à l'excitation à 380 nm et une augmentation de fluorescence après excitation à 340 nm et donc du ratio F340/F380. Les résultats sont représentés avec les moyennes, et les analyses statistiques ont été réalisées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis et post-hoc Dunns et avec le logiciel Graph Pad Prism.

Pour les sondes génétiques ratiométriques spécifique de RE et de la mitochondrie, les MCF-7 ont été infectées avec pLNCX2 G-SEPIA1-ER (Suzuki et al. 2014) ou pLNCX2-mito-GEM-GECO1 (Zhao et al. 2011) et sélectionnées à la néomycine pendant 10 jours. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques avec lames de verre Lab-Tek (ThermoFisher Scientific). Six jours après traitement avec le SASP, les cellules ont été lavées avec du HBSS, sans  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et sans rouge de phénol, et observées à 37°C et 5% de  $\text{CO}_2$  sous un microscope confocal Zeiss LSM 780. La longueur d'onde d'excitation a été contrôlée à 408nm et 565nm. Pour les sondes calciques, la détection de la fluorescence a été contrôlée pour F(470-500nm) (sonde liée au calcium) et F(>520nm) (sonde libre, sans calcium). Le rapport F(470-500nm) / F(>520nm) a été calculé. Afin de procéder aux analyses unicellulaires, les fichiers LSM ont ensuite été convertis au logiciel Columbus. La mesure de l'intensité de fluorescence au niveau de la cellule unique a été évaluée avec le logiciel Columbus.

# - RÉSULTATS -





# RÉSULTATS

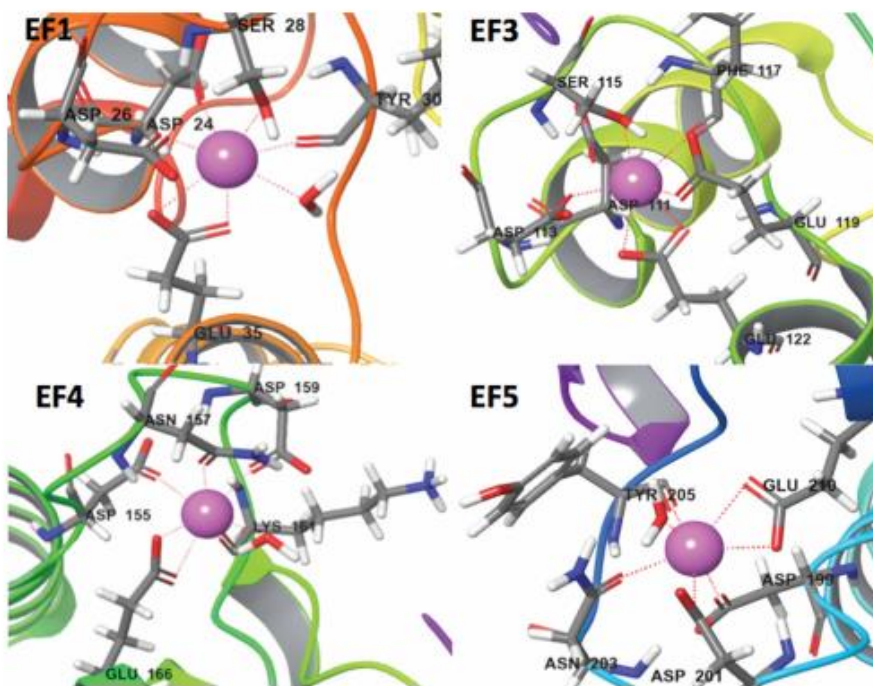
## 1 Chapitre 1 : Rôle du calcium et de CALB1 dans la sénescence cellulaire

---

### 1.1 Introduction

#### 1.1.1 Fonctions principales et régulation de CALB1

La Calbindin D28k, calbindin 1 ou CALB1 est une protéine ubiquitaire de la famille des tampons calciques, qui chélate le calcium et permet de réguler sa concentration intracellulaire. Cette protéine majoritairement cytosolique possède six domaines de liaison au calcium, les « EF-hand », dont quatre sont spécifiques du calcium, comme ont pu le montrer l'étude par Résonance Magnétique Nucléaire (entrée PDB : 2g9b) (Kojetin et al. 2006) et plus récemment celle par cristallographie à rayons X (entrée PDB : 6fie) (Noble et al. 2018) (**Figure 15**).



**Figure 15. Structure des quatre hélices comportant les domaines « EF-hand » de CALB1.**

Les acides aminés lient le calcium, le calcium (sphère violette) et les molécules d'eau sont représentés. Le reste de la structure est illustré en représentation « cartoon ». Les liaisons formées sont représentées en pointillé. Les acides aminés de charge négative sont géométriquement agencés afin de fixer le calcium de la manière la plus stable possible (Noble et al. 2018).

La fixation du calcium sur ces structures est un processus séquentiel et coopératif, c'est-à-dire que la fixation d'un ion calcium sur un domaine « EF-hand » augmente l'affinité des autres domaines pour le calcium, permettant une capture plus efficace du calcium (Kojetin et al. 2006; Venters et al. 2003).

Ainsi CALB1 permet de diminuer rapidement et de tamponner la concentration calcique dans la cellule, ce qui lui confère un rôle important dans l'homéostasie calcique. La majorité des études sur CALB1 ont été réalisées dans les neurones où des variations rapides des flux calciques sont nécessaires, notamment lors de la transmission du message nerveux (Schmidt 2012). CALB1 permet de protéger les neurones contre les effets cytotoxiques du calcium (Mattson et al. 1991).

CALB1 n'est pas seulement décrite comme une protéine tamponnant le calcium mais aussi comme un senseur calcique (Berggard et al. 2002; Schmidt 2012). C'est-à-dire que la fixation du calcium induit des changements conformationnels de la protéine, exposant ses régions hydrophobes, ce qui lui permet d'interagir avec différentes protéines (Hobbs et al. 2009; Bobay et al. 2012; Lutz et al. 2003; Berggård et al. 2002).

Notamment dans des cellules  $\beta$  du pancréas, où CALB1 est fortement exprimée, CALB1 interagit avec la sous-unité  $\alpha 1$  du canal calcique de type L voltage-dépendant Cav1.2, ce qui diminue l'entrée de calcium intracellulaire causée par ce canal et modifie ainsi les flux calciques de la cellule indépendamment de sa capacité à tamponner le calcium (D. Lee et al. 2006). Une autre étude a montré l'interaction directe de CALB1 avec la myo-inositol monophosphatase (IMPase), enzyme catalysant le myo-inositol-1(ou 4)-monophosphate en myo-inositol, précurseur des phospholipides inositol (PI), messenger secondaire important dans la transduction du message à travers les membranes (Berggård et al. 2002). Cette interaction permet l'activation de l'IMPase et permettrait par la suite la production d'IP<sub>3</sub>, stimulant le relargage du calcium du réticulum endoplasmique *via* le canal calcique réticulaire IP<sub>3</sub>R. Ainsi, CALB1 joue un rôle dans la réponse cellulaire au calcium, à la fois en tamponnant le calcium mais aussi en induisant des signalisations cellulaires dépendantes du calcium.

En ce qui concerne la régulation de l'expression de CALB1, il a été montré dans des cellules  $\beta$  du pancréas que les facteurs de transcription NFAT-1c et -2c, en coopération avec le facteur de transcription TFII-I, activaient l'activité du promoteur de CALB1 (Hajibeigi et al. 2015). A l'inverse, l'inhibition pharmacologique de l'ensemble des membres de la famille NFAT diminue l'expression de CALB1. Cependant, cette étude n'a pas démontré le rôle direct du calcium dans l'induction de l'expression de CALB1.

### 1.1.2 Rôle anti-apoptotique de CALB1

Le calcium peut induire de nombreuses réponses physiologiques, dont l'apoptose. CALB1 en régulant la concentration de calcium disponible permet de préserver les cellules d'une trop forte augmentation de celui-ci pouvant mener à la mort cellulaire. Une étude a notamment montré que la surexpression de CALB1 prévenait l'apoptose de neurones présentant des mutations sur la presenillin-1. CALB1 prévient de l'augmentation du calcium intracellulaire, menant à la production massive de Espèces Réactives à l'Oxygène, ROS, et au dysfonctionnement mitochondrial, ce qui aboutit à l'activation de l'apoptose (Guo et al. 1998). De plus, CALB1 interagit de manière dépendante du calcium avec des protéines impliquées dans l'apoptose, ce qui conduit à l'inhibition de la mort cellulaire. Notamment, CALB1, après fixation avec le calcium, peut interagir avec et inactiver la caspase 3 (Bobay et al. 2012), une protéine clé dans le processus d'apoptose. Cette inhibition d'activité aboutit à la réversion de l'apoptose dans des ostéoblastes surexprimant CALB1 (Bellido 2000).

CALB1 est donc impliquée dans le contrôle de la mort cellulaire à la fois par ses propriétés de tampon calcique mais aussi par sa capacité à interagir avec et inhiber des protéines impliquées dans la mort cellulaire.

### 1.1.3 Rôles de CALB1 dans des contextes tumoraux et implication émergente lors de la sénescence cellulaire

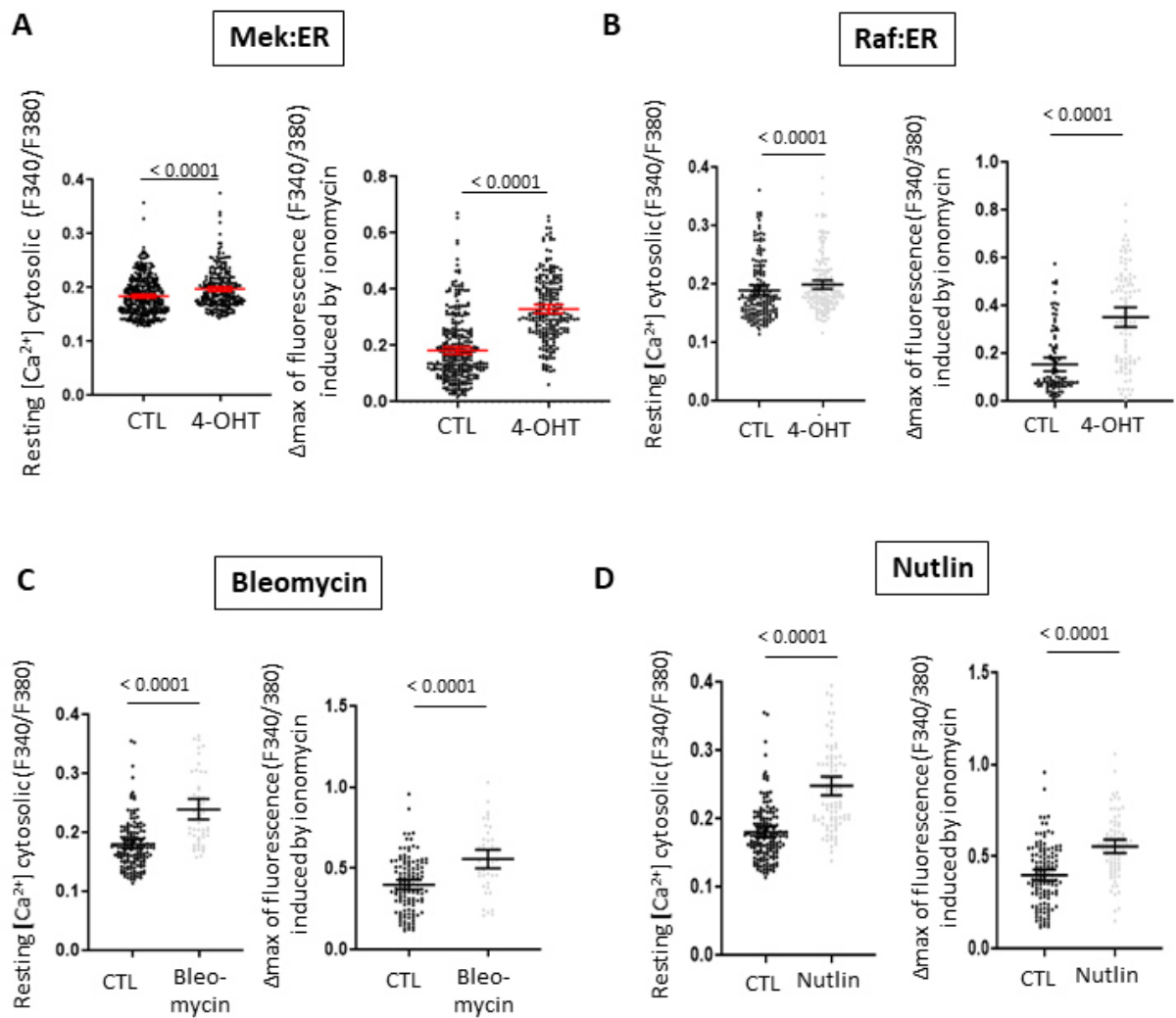
Peu d'études ont été réalisées sur l'expression de CALB1 dans les cancers et son impact sur le pronostic de la tumeur. L'expression de CALB1 dans différents types de cancer n'est pas toujours associée à un bon ou mauvais pronostic et suivant le type et stade du cancer, une forte expression de CALB1 peut être favorable ou défavorable pour le patient. Ainsi une forte expression de CALB1 est associée à un meilleur pronostic pour des patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires (Castro et al. 2000). Cependant une autre étude démontre que l'expression de CALB1 est plus élevée dans des stades avancés de cancers pulmonaires et majoritairement retrouvée dans les tumeurs neuroendocrines pulmonaires (« Small Cell Lung Cancer », SCLC) comparées aux non-neuroendocrines (« non SCLC », NSCLC) (Watanabe et al. 1994). *In vitro*, la répression de l'expression de CALB1 par RNA interférents dans des cellules épithéliales d'ostéosarcomes, U-2OS, induit la mort par apoptose des cellules, diminuant ainsi la prolifération et la formation de colonies des cellules cancéreuses (Huang, Fan, et Wang 2017).

## 1.2 Résultats : rôle du senseur calcique CALB1 et de l'homéostasie calcique durant l'OIS

### ***Les niveaux de calcium augmentent dans les HMEC lors de différentes inductions de sénescence***

Il a été récemment démontré que le calcium est régulé au cours de la sénescence cellulaire dans certains contextes (X. Ma et al. 2018; Wiel et al. 2014; Borodkina et al. 2016a) et, plus particulièrement, nous avons démontré, avec d'autres, que le transfert de calcium entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries entraîne la sénescence cellulaire (Wiel et al. 2014; Ziegler et al. 2021; X. Ma et al. 2018). Par conséquent, pour savoir si les altérations du niveau de calcium sont une nouvelle caractéristique des cellules en sénescence, nous avons étudié le niveau relatif de calcium dans le cytosol et dans les stocks intracellulaires (c'est-à-dire principalement le réticulum endoplasmique et les mitochondries) de HMEC en sénescence en utilisant différents types d'inducteurs de sénescence : par l'activation de différents oncogènes, par l'agent chimiothérapeutique bléomycine ou par le traitement à la nutlin-3, un stabilisateur de p53. Pour l'activation de l'oncogène, les cellules HMEC ont été infectées avec des vecteurs rétro- ou lentiviraux pour exprimer de manière stable une protéine MEK ou RAF inductibles par le 4-HydroxyTamoxifen (4-OHT) en fusion avec une forme modifiable du récepteur d'œstrogène (ER) (HMEC/Mek:ER et Raf:ER). La sénescence peut également être induite par des agents chimiothérapeutiques et des médicaments génotoxiques dans les cellules normales ou cancéreuses, par exemple avec la bléomycine par l'activation d'une réponse aux dommages de l'ADN ou avec la nutline par la stabilisation de p53, l'un des principaux effecteurs de la sénescence.

Nous avons donc étudié les niveaux de calcium à la fois dans le cytosol (panneau de gauche pour chaque figure) et dans les stocks intracellulaires (panneau de droite pour chaque figure) visibles après stimulation par l'ionomycine. La ionomycine perméabilise l'ensemble des membranes des organites intracellulaires, ce qui libère le calcium contenu à l'intérieur. La sonde Fura2 restant dans le cytosol permet alors de mesurer le niveau relatif de calcium contenu dans la totalité des stocks intracellulaires. Nous avons observé une augmentation des niveaux de calcium dans le cytosol et dans les stocks intracellulaires avec chaque inducteur de sénescence, par l'activation de Mek (**Figure 16A**) et Raf (**Figure 16B**), ainsi qu'après un traitement à la bléomycine (**Figure 16C**) ou à la nutline (**Figure 16D**). L'augmentation des niveaux de calcium dans le cytosol et dans les stocks est donc retrouvée lors de la sénescence induite par différents stress, ainsi elle pourrait être une marque de sénescence cellulaire dans les HMEC.



**Figure 16. Les niveaux de calcium sont augmentés dans les HMEC en sénescence induite par différents inducteurs.**

Les niveaux de calcium ont été mesurés grâce à la sonde ratiométrique Fura2. Les rapports de fluorescence mesurée à 340nm et 380nm ont été comptabilisés au niveau basal pour le calcium cytosolique (panneau de gauche) et après stimulation à la ionomycine pour le calcium des stocks intracellulaires (panneau de droite) (mean +/- SEM, issues de 3 expériences indépendantes).

Ces mesures ont été réalisées dans des HMEC infectées par l'oncogène inducible par le 4-OHT : A. Mek:ER et B. Raf :ER et dans des HMEC traitées à C. la bléomycine et D. la nutline.

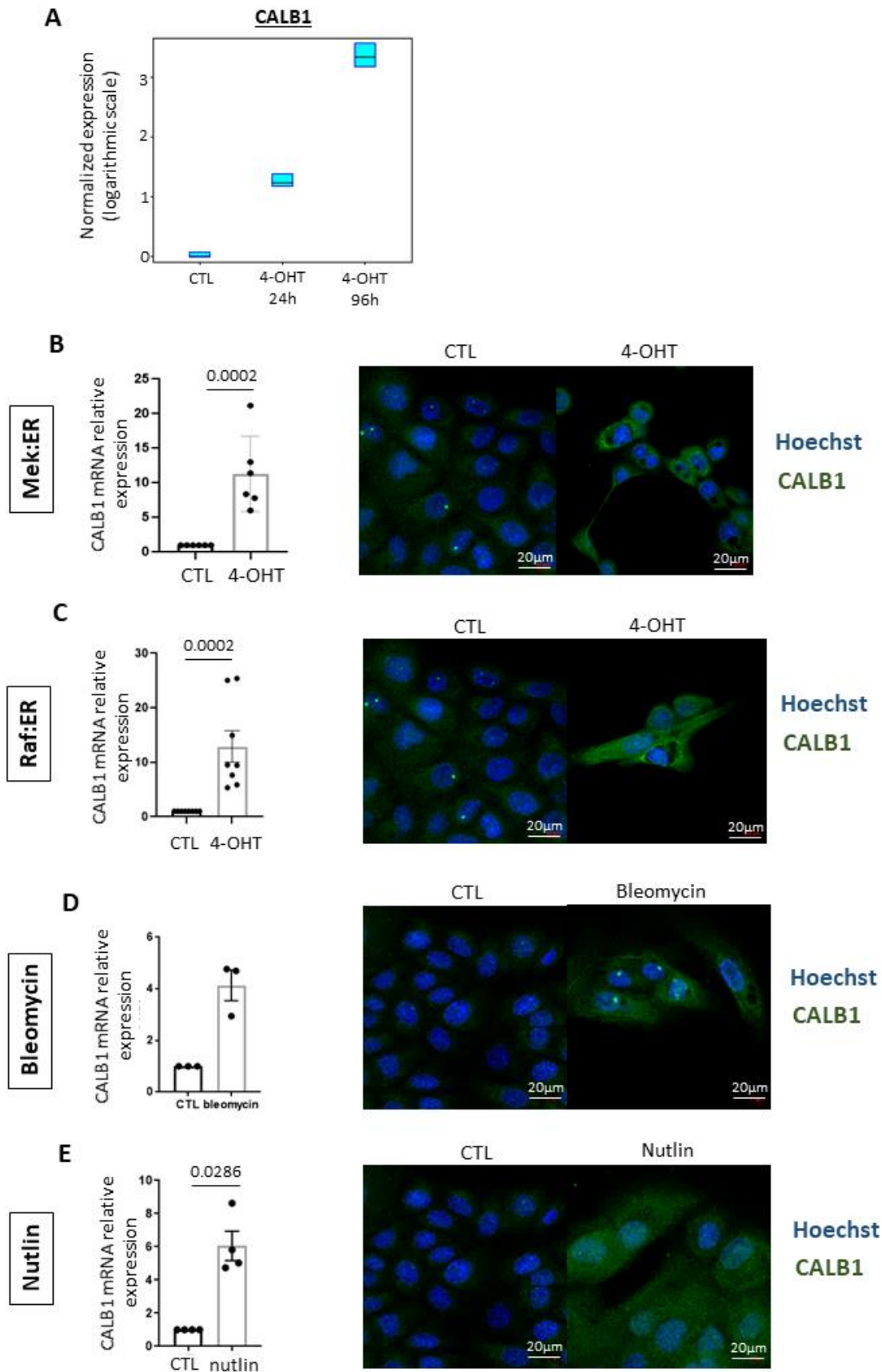
Dans notre étude, nous avons regardé le niveau de calcium contenu dans le cytosol et aussi dans l'ensemble des stocks intracellulaires. Le calcium mitochondrial et celui du réticulum endoplasmique jouent des rôles importants dans divers processus cellulaires tels que la production d'énergie *via* le cycle de Krebs ou de ROS, ou contribuent au stress du RE. Il a été montré, entre autres par l'équipe, que durant la sénescence le niveau de calcium mitochondrial augmente (Wiel et al. 2014; X. Ma et al.

2018; Ziegler et al. 2021) dû au transfert du calcium du réticulum endoplasmique (Wiel et al. 2014; Ziegler et al. 2021). L'augmentation du calcium mitochondrial permet alors la génération de ROS et l'augmentation des dommages à l'ADN conduisant à l'entrée en sénescence (Wiel et al. 2014; X. Ma et al. 2018). Nous planifions donc de regarder les niveaux de calcium dans ces deux organites grâce à d'autres outils rétroviraux : les sondes ratiométriques MITO-GECO (pour la mitochondrie) (Suzuki et al. 2014; Ziegler et al. 2021) et SEPIA-ER (pour le RE) (Zhao et al. 2011; Ziegler et al. 2021).

### ***La protéine CALB1, tampon calcique, est induite parallèlement aux niveaux de calcium durant la sénescence***

Nous avons réalisé un microarray sur l'ensemble du génome dans les HMEC Mek:ER en OIS afin d'étudier l'expression de protéines impliquées dans l'homéostasie ou les flux calciques. De manière intéressante, nous avons détecté l'induction de l'expression de CALB1, une protéine tamponnant le calcium jouant un rôle cytoprotecteur contre les effets cytotoxiques du calcium (Bellido 2000; Bobay et al. 2012; Schmidt 2012; K. Liu et al. 2020) (**Figure 17A**). L'ensemble des études réalisées jusqu'à présent sur le calcium et la sénescence décrivait l'importance de canaux calciques permettant certains flux calciques (Wiel et al. 2014; X. Ma et al. 2018; Ziegler et al. 2021; Farfariello et al. 2015). Nous avons donc voulu déterminer si l'expression de CALB1 était retrouvée dans les différents modèles de sénescence précédemment décrits. Nous avons confirmé son induction observée dans le microarray par RT-qPCR et par immunofluorescence (**Figure 17B**) pendant l'OIS dans les HMEC Mek:ER. De manière intéressante, l'augmentation du niveau de l'ARNm de CALB1 a également été observée par RT-qPCR (**Figure C, D, E panel de gauche**) et au niveau protéique par immunofluorescence (**Figure C, D, E panel de droite**), dans les HMEC en OIS par l'activation de Raf :ER (**Figure 17C**) ou par traitement par la bléomycine (**Figure 17D**) et nutline (**Figure 17E**). CALB1 est dans ces contextes de sénescence aussi localisé dans le cytoplasme. Ces résultats montrent que parallèlement à l'augmentation des niveaux de calcium, les cellules HMEC en sénescence induisent l'expression d'une protéine tamponnant le calcium, CALB1.





**Figure 17. CALB1 est induit dans les modèles de sénescence où les niveaux de calcium sont augmentés.**



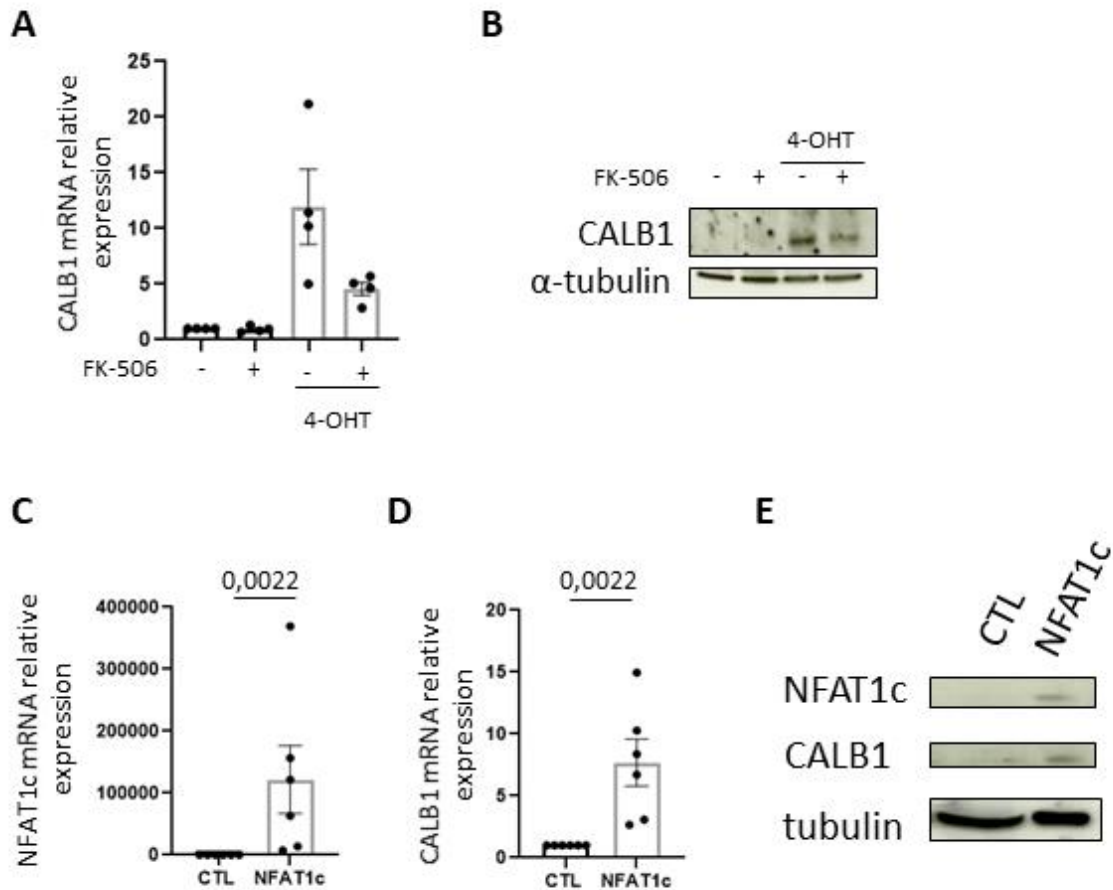
A. Après 24h (4-OHT 24h) ou 96h (4-OHT 96h) de traitement au 4-OHT, les HMEC Mek:ER ont été lysées, l'ARN récupéré et des analyses transcriptomiques (triplicat biologique) par microarrays ont été réalisées. Le niveau d'ARNm de CALB1 est présenté.

Les HMEC B. Mek :ER, C. Raf :ER et traitées à D. la bléomycine et E. la nutline ont été lysées, les ARN récupérés puis rétrotranscrits et des PCR quantitatives ont permis de quantifier le niveau relatif d'ARNm de CALB1 (panneau de gauche) et des immunofluorescences ont été réalisées en marquant CALB1 (vert) et les noyaux au Hoechst (bleu), afin de déterminer le niveau protéique relatif de CALB.

Pour Mek:ER : moyenne +/- SEM de 6 expériences indépendantes, Raf:ER : moyenne +/- SEM de 6 expériences indépendantes, traitement à la bléomycine : moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes et à la nutline : moyenne +/- SEM de 4 expériences indépendantes.

### ***L'expression de CALB1 est régulée par la voie dépendante du calcium, calcineurine/NFAT, pendant l'OIS***

Le calcium, en tant que messager secondaire, est connu pour activer différentes voies de signalisation. Il se lie notamment à la calmoduline, activant la calcineurine qui permet la translocation et l'activation du facteur de transcription NFAT dans le noyau (Hogan et al. 2003). Un membre de la famille NFAT, NFAT1c, a été décrit comme induisant l'expression de CALB1 (Hajibeigi et al. 2015). De plus, l'inhibition pharmacologique de la voie calcineurine/NFAT réverte la sénescence dépendante de p53 dans des cellules cancéreuses (Manda et al. 2016). Nous avons donc voulu étudier si la voie NFAT dépendante du calcium pouvait avoir un impact sur l'expression de CALB1 pendant l'OIS. Tout d'abord, nous avons traité les cellules HMEC Mek:ER avec un inhibiteur chimique de la calcineurine couramment utilisé, le FK-506. Le traitement au FK-506 entraîne une réversion partielle de l'induction du niveau d'expression de CALB1 en ARNm (**Figure 18A**) et en protéine (**Figure 18B**). A l'inverse, la surexpression de NFAT1c (**Figures 18C et E**) conduit à une induction de l'ARNm de CALB1 (**Figure 18D**) et de la protéine (**Figure 18E**) dans les HMEC. Nous avons donc conclu que CALB1 peut être régulé par le facteur de transcription NFAT1c, qui peut lui-même être activé par le calcium. Ainsi, l'augmentation des niveaux de calcium pourrait activer NFAT1c et conduire à l'expression de CALB1 pendant l'OIS dans les cellules HMEC.



**Figure 18. La voie calcium-dépendante calcineurine/NFAT régule l'expression de CALB1 durant l'OIS.**

A. Les ARN des HMEC traitées au FK-506, inhibiteur de la calcineurine, ont été extraits, puis rétrotranscrits et des PCR quantitatives ont permis de quantifier le niveau d'expression de CALB1 (moyenne +/- SEM de 4 expériences indépendantes, test de Kruskal-Wallis).

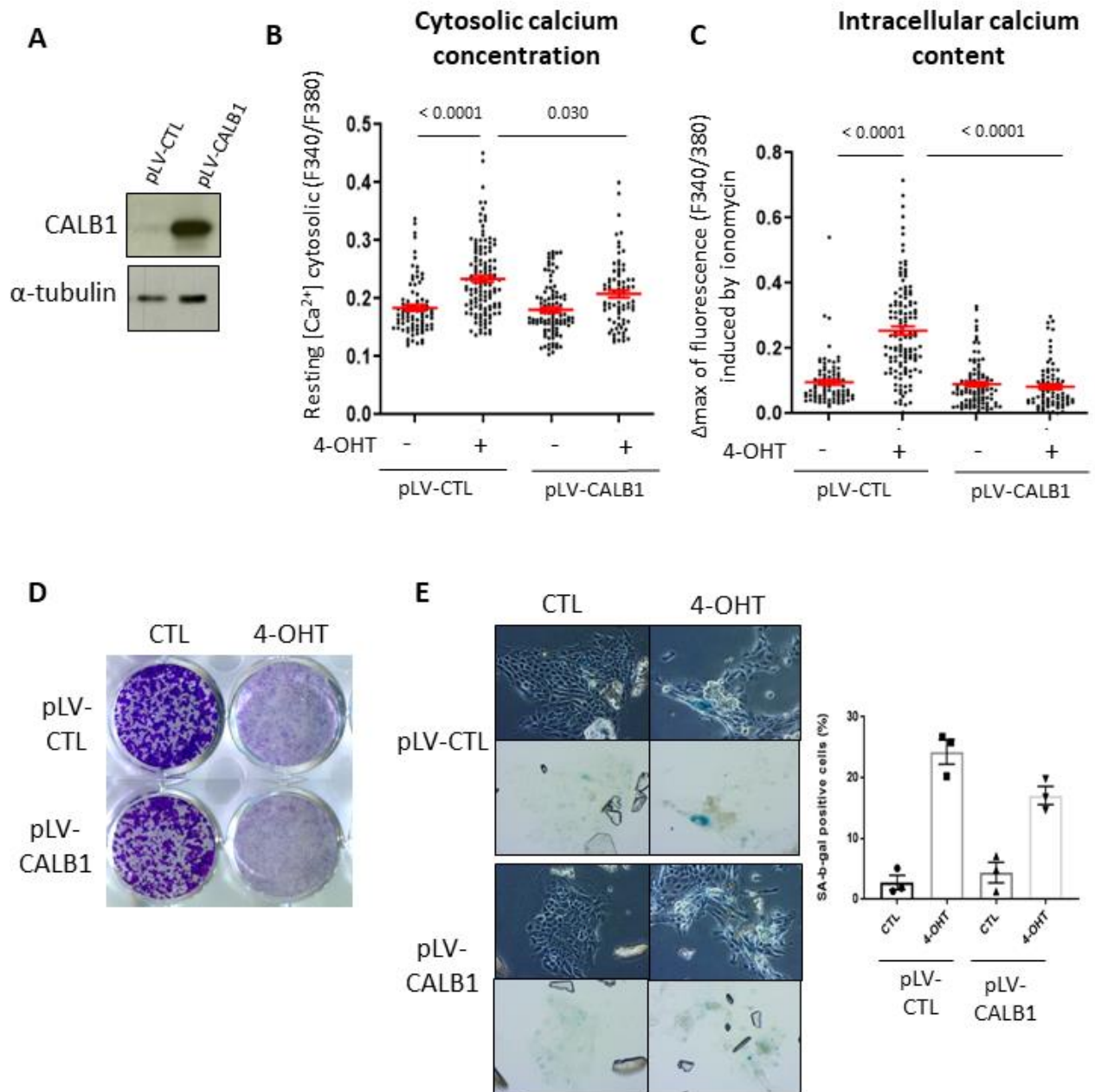
B. Le niveau protéique de CALB1 est observé par Western-Blot lors de l'utilisation d'un inhibiteur de la voie calcium/calcineurine/NFAT.

Les ARN des cellules lors de la surexpression de NFAT1c ont été extraits, puis rétrotranscrits et des PCR quantitatives ont permis de C. valider la surexpression de NFAT1c et D. d'évaluer le niveau d'expression de CALB1 (moyenne +/- SEM de 6 expériences indépendantes, test de Mann-Whitney).

E. Le niveau protéique de NFAT1c et CALB1 a aussi été évalué par Western-Blot.

***La surexpression de CALB1 entraîne une diminution des niveaux de calcium mais n'a pas d'impact sur le phénotype sénescence pendant l'OIS dans les HMEC***

Comme il a été décrit en introduction, CALB1 est une protéine tamponnant le calcium bien décrite (Schmidt 2012; Beat Schwaller 2010), nous avons donc cherché à savoir si la surexpression de CALB1 pouvait altérer les niveaux de calcium et le phénotype sénescence. Nous avons observé que la surexpression de CALB1 (**Figure 19A**) réverte l'induction des niveaux de calcium dans le cytosol (**Figure 19B**) mais aussi dans les stocks intracellulaires (**Figure 19C**) pendant l'OIS. Ainsi, CALB1 pourrait tamponner le calcium pendant l'OIS. Le calcium étant décrit comme un nouveau régulateur de la sénescence cellulaire, nous avons cherché à savoir si cette surexpression et indirectement la régulation des niveaux de calcium avaient un impact sur le phénotype de sénescence. La surexpression de CALB1 n'entraîne aucun changement de la densité cellulaire après marquage des cellules au crystal violet (**Figure 19D**) et aucun effet sur l'activité SA- $\beta$ -Gal (**Figure 19E**) dans les cellules HMEC/Mek:ER au cours de l'OIS. Ces résultats suggèrent que CALB1 pourrait tamponner le calcium à la fois présent dans le cytosol et dans les stocks intracellulaires, mais sans avoir d'impact sur le phénotype sénescence pendant l'OIS.



**Figure 19. La surexpression de CALB1 dans les HMEC en OIS diminue les niveaux de calcium mais n'est pas suffisante pour réverter l'induction de senescence.**

A. La surexpression de CALB1 est validée par Western-Blot dans les HMEC Mek:ER.

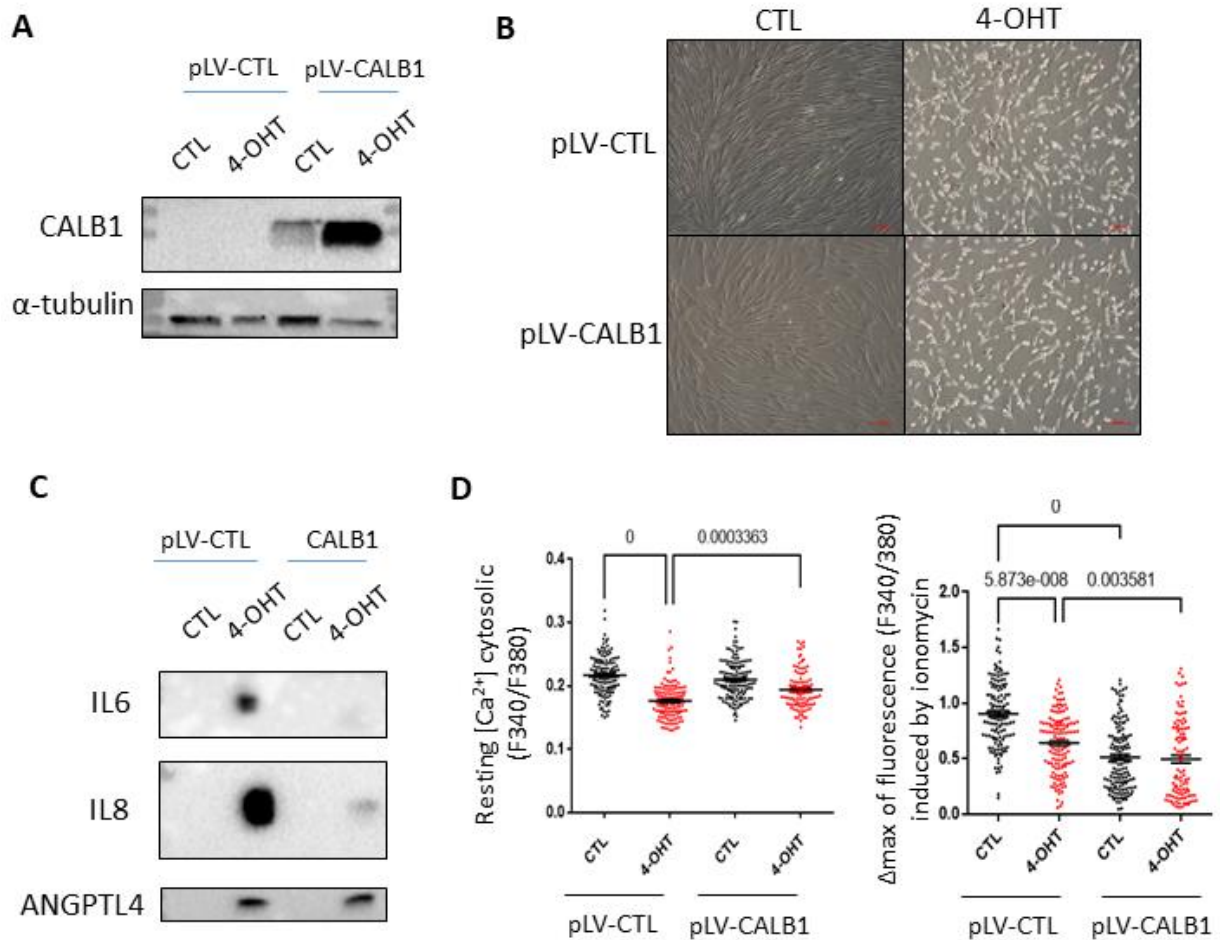
Les niveaux de calcium B. dans le cytosol et C. dans les stocks intracellulaires ont été mesurés grâce à la sonde Fura2-AM, respectivement avant et après stimulation à la ionomycine ( $n = X$  cellules issues de 3 expériences indépendantes, moyenne  $\pm$  SEM, test de Kruskal-Wallis).

D. La densité cellulaire a été observée grâce au crystal violet.

E. Le pourcentage de cellules positives SA- $\beta$ -Gal a été comptabilisé durant l'OIS lors de la surexpression de CALB1 ( $n = 3$  expériences indépendantes,  $\pm$  SEM).

Cependant, nous savons que le calcium est un second messenger important pouvant activer différentes voies de signalisation. Notamment, une forte concentration de calcium peut activer de façon non-canonique NF- $\kappa$ B (*via* les CaMKII) et l'expression des gènes cibles pro-inflammatoires (Théâtre, Bours, et Oury 2009; Moscat, Diaz-Meco, et Rennert 2003). Il est ainsi possible que CALB1, en tamponnant le calcium, maintienne sa concentration à un niveau inférieur à celui du seuil d'activation de la CaMKII et ainsi évite l'expression trop importante de facteurs pro-inflammatoires. Comme le SASP des HMEC Mek:ER en OIS n'est pas riche en facteurs pro-inflammatoires, nous avons utilisé un autre modèle cellulaire dont le SASP pro-inflammatoire est bien induit et décrit.

Nous avons utilisé des MRC-5 exprimant la forme inductible de l'oncogène Raf : MRC-5/Raf:ER. La surexpression de CALB1 dans ce modèle (**Figure 20A**) n'impacte pas l'arrêt de prolifération ou la morphologie des cellules sénescents (**Figure 20B**). Nous avons ensuite récupéré le surnageant des fibroblastes sénescents (SASP) et étudié par Western-Blot la présence de certains marqueurs pro-inflammatoires. Nous avons alors observé que la surexpression de CALB1 lors de l'OIS réverte la présence d'IL-6 et d'IL-8 dans le surnageant des MRC-5 en OIS (**Figure 20C**). En revanche, cela n'impacte pas le niveau d'ANGPTL4, autre facteur soluble du SASP non NF- $\kappa$ B-dépendant (données non montrées obtenues par l'équipe). Ceci suggère que CALB1 peut impacter les niveaux protéiques de facteurs pro-inflammatoires du SASP. Nous avons alors étudié les niveaux de calcium dans le cytosol et les stocks intracellulaires grâce à la sonde Fura2-AM. De manière surprenante, nous avons observé que l'ensemble des niveaux de calcium étaient diminués dans ce modèle (**Figure 20D**). Ceci est surprenant et ne corrèle pas avec les résultats observés dans les HMEC. Les MRC-5 en sénescence par l'activation de Raf sont des cellules très allongées et fines, ainsi nous nous demandons si cette morphologie très particulière pour des cellules sénescents ne conduit pas à des biais techniques et une mauvaise analyse des niveaux de calcium.



**Figure 20. La surexpression de CALB1 dans des MRC-5 en OIS ne conduit pas à la réversion de l'arrêt de prolifération mais à celle de facteurs pro-inflammatoires dans le SASP.**

A. La surexpression de CALB1 est validée par Western Blot dans les MRC-5/Raf:ER.

B. Des photos ont été prises au 20X afin de montrer la morphologie et la densité cellulaire des MRC-5/Raf:ER en OIS.

C. Le niveau protéique des facteurs proinflammatoires, IL-6 et IL-8, ainsi que celui d'ANGTLL4 a été déterminé par Western-Blot dans le surnageant concentré des MRC-5 en OIS surexprimant CALB1.

D. La mesure du niveau de calcium dans le cytosol et dans les stocks intracellulaires ont été mesurés par la sonde ratiométrique Fura2-AM respectivement avant et après stimulation à la ionomycine (moyenne +/- SEM, issues de 3 expériences indépendantes, test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

Dans cette étude, nous avons montré que les niveaux de calcium dans le cytosol et dans les organites stockant le calcium étaient augmentés dans plusieurs contextes de sénescence dans des cellules épithéliales mammaires, les HMEC. En corrélation avec d'autres études, ces résultats suggèrent que l'augmentation des niveaux de calcium pourrait être une nouvelle caractéristique de sénescence cellulaire. En parallèle, nous avons observé l'induction de l'expression d'une protéine tamponnant le calcium, CALB1, dans l'ensemble de ces modèles de sénescence. L'expression de CALB1 est induite par la voie dépendante du calcium calcineurine/NFAT, elle-même dépendante du calcium. La surexpression de CALB1 durant l'OIS permet de diminuer les niveaux de calcium mais n'est pas suffisante pour impacter le phénotype sénescence dans les HMEC en OIS. Cependant, cette surexpression permet de réverter la présence de molécules pro-inflammatoires dans le SASP dans des fibroblastes en OIS, suggérant un rôle du calcium dans l'expression et/ou sécrétion du SASP.

Les rôles précis de l'augmentation du calcium et des niveaux de CALB1 durant la sénescence restent donc à préciser et seront abordés dans la discussion.



## 2 Chapitre 2 : Rôle du calcium lors des effets paracrines du SASP sur des cellules cancéreuses

---

Dans ce second projet, nous avons étudié l'impact du SASP sur des cellules cancéreuses mammaires. Nous souhaitons étudier si un même SASP provenant de fibroblastes sénescents pouvait induire des effets différents sur des cellules cancéreuses mammaires aux caractéristiques différentes (statut de p53, statut du récepteur à l'œstrogène, ER). De manière intéressante, nous avons observé que le SASP dépendant de NF- $\kappa$ B induisait une transdifférenciation neuroendocrine (NED) des cellules cancéreuses mammaires positives pour l'ER et présentant un p53 sauvage. De plus, nous avons déterminé une augmentation des niveaux de calcium dans les cellules cancéreuses en différenciation neuroendocrine, qui pourrait être responsable du phénotype. Ces observations *in vitro* nous ont poussé à explorer la présence et le rôle physiologique de phénotype neuroendocrine au cours du vieillissement et chez des patientes atteintes de cancer du sein.

### 2.1 Introduction

#### 2.1.1 Cellule et différenciation neuroendocrine

Les cellules neuroendocrines sont des cellules qui répondent à un stimulus du système nerveux en sécrétant des hormones ou propeptides. Ces cellules neuroendocrines qui composent le système neuroendocrine sont retrouvées dans la plupart des organes tels que le tube digestif, le pancréas, les poumons, la prostate ou le sein. Il a été montré que les cellules épithéliales normales pouvaient subir une différenciation en cellules neuroendocrines. De plus, certains changements moléculaires ou environnementaux de la cellule neuroendocrine peuvent ensuite entraîner la formation de tumeurs neuroendocrines (TNE).

Il est aussi possible que des cellules épithéliales déjà cancéreuses subissent une transdifférenciation neuroendocrine (NED), ce qui leur permet de posséder des caractéristiques neuronales et endocrines. Notamment, les cellules cancéreuses épithéliales de la prostate peuvent subir une NED et les cancers prostatiques présentant une transdifférenciation neuroendocrine sont caractérisés par la présence de foyers de cellules neuroendocrines dans les cellules malignes. Les cellules neuroendocrines produisent alors de nombreuses pré-hormones ou facteurs peptidiques, comme la chromogranine B (CHGB) et les sécrétogranines (comme SCG2) (Lloyd 2003), qui joueront un rôle dans la transduction du signal. La privation d'androgènes utilisée dans la thérapie contre le cancer de la prostate a été décrite comme l'un des principaux inducteurs de l'émergence d'un phénotype neuroendocrine, qui est associé à un pronostic plus défavorable (Zhang et al. 2018). Bien que la NED ait également été décrite dans d'autres types de cancers épithéliaux,



par exemple dans le cancer du sein, ce processus est peu décrit dans le contexte mammaire (Lavigne et al. 2018; Inno et al. 2016; Makretsov et al. 2003).

### 2.1.2 Tumeurs neuroendocrines mammaires

Les cancers du sein sont subdivisés en plusieurs sous-types en fonction de leur degré d'expression des récepteurs aux hormones et du gène *HER2*. Les tumeurs mammaires positives pour le récepteur à l'œstrogène (ER +) représentent les tumeurs lumineales, divisées en deux catégories en fonction de la présence de gènes liés à la prolifération : lumineales A (bon pronostic) et lumineales B (moins bon pronostic). Enfin, les tumeurs négatives pour l'ER (ER-) peuvent être positives pour HER (tumeurs HER+ et tumeurs apocrines HER+) ou négative pour HER (tumeurs triple négatives, basal-like ou claudin-low). Ces grands sous-types de tumeurs représentent des sous-groupes parfois hétérogènes et une classification plus fine en fonction des données génétiques et moléculaires des patientes existe. Ainsi, des signatures moléculaires, basées sur la quantification de gènes impliqués dans la cancérogenèse, ont été mises en place pour identifier des sous-types plus précis de cancers du sein.

Les tumeurs neuroendocrines du sein représentent quant à elles un sous-type rare de tumeurs du sein composé d'un groupe hétérogène de tumeurs étant associé à des comportements biologiques et pronostiques différents. Elles correspondent à 2 à 5% des tumeurs mammaires suivant les critères d'inclusivité. Leur incidence est difficile à déterminer car les marquages en immunohistochimie ne sont pas toujours réalisés dans le cadre de cancers du sein, ainsi ce sous-groupe est surement sous-estimé. Il est ainsi aussi difficile de trouver des données moléculaires sur ce sous-groupe et seules les analyses immunohistochimiques sont utilisées pour le classifier. C'est seulement en 2003 que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a différencié les tumeurs neuroendocrines des autres tumeurs mammaires en se basant sur la définition de Sapino et al. de 2001 (Sapino et al. 2001). Elles ont ainsi été définies comme des tumeurs d'origine épithéliale avec une morphologie similaire aux tumeurs neuroendocrines pulmonaires ou intestinales et qui expriment un marqueur neuroendocrine dans au moins 50% de la population cellulaire total. Les marqueurs neuroendocrines utilisés en IHC montrant la meilleure sensibilité et spécificité sont les chromogranines et la synaptophysine (SYP). La nomenclature de l'OMS a souvent changé et les NBC sont maintenant classifiées en deux classes principales : les tumeurs et les carcinomes neuroendocrines en fonction de la différenciation cellulaire des cellules. Les tumeurs neuroendocrines sont elles-mêmes composées de deux sous-groupes : les carcinomes avec NED ou les tumeurs neuroendocrines bien différenciés (de type carcinoïdes) (**Tableau 3**).

Current WHO 5th Edition Classification	Prior WHO 4th Edition Classification	Morphology	IHC	Molecular features
Neuroendocrine tumor	Carcinoma with neuroendocrine differentiation Neuroendocrine tumor, well-differentiated ("carcinoid-like")	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grade 1 or 2 nuclei</li> <li>Cellular solid nests of cells</li> <li>Delicate fibrovascular stroma</li> <li>Polygonal, spindle, plasmacytoid cells</li> <li>Classic "carcinoid-like" features rare</li> </ul>	NE markers+ ER+ (>90%) PR± HER2- GATA3+	Luminal molecular subtype Low frequency of TP53 and PIK3CA mutations Enrichment in chromatin remodeler mutations (ARID1A, ATRX) Enrichment in transcription factor mutations (TBX3, FOXA1) Low frequency of concurrent 1q gains and 16q losses
Neuroendocrine carcinoma	Neuroendocrine tumor, poorly differentiated/ small cell carcinoma	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grade 3 nuclei</li> <li>Morphology identical to small cell carcinoma and large cell carcinoma counterparts in lung</li> </ul>	<i>Small cell carcinoma:</i> NE markers + ER+ (30%-50%) PR± HER2- TTF-1± Ki-67 > 90% <i>Large cell carcinoma:</i> ???	<i>Small cell carcinoma:</i> Co-occurring TP53 and RB1 alterations <i>Large cell carcinoma:</i> ???

Abbreviations: ER, estrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; IHC, immunohistochemistry; NE, neuroendocrine; PR, progesterone receptor.

### Tableau 3. Classification morphologique, immunohistochimique et moléculaire des tumeurs neuroendocrines mammaires (nouvelle classification de l'OMS, 2019).

D'après (Pareja et D'Alfonso 2020).

Plusieurs hypothèses sur l'origine de tumeurs neuroendocrines mammaires sont encore prévalentes. La première suggère que les NBC proviendraient directement de tumeurs neuroendocrines présentes dans le sein, mais ce type de cellules n'a jusqu'alors pas été retrouvé dans le sein (Bussolati et al. 1985). Suivant une autre hypothèse, les NBC proviendraient de cellules souches de cancer du sein qui se seraient différenciées à des stades précoces en lignées neuroendocrines et épithéliales (Miremadi et al. 2002). Cette théorie s'appuie sur le fait que les NBC représentent des tumeurs mixtes composées de cellules endocrines et exocrines et que les études moléculaires montrent que les cellules neuroendocrines des NBC sont clonalement liées à la composante intraductale de la tumeur. Les NBC sont majoritairement positives pour les récepteurs aux hormones (ER+) et en se basant sur les profils d'expression génique, les NBC appartiennent au sous-groupe luminal (Weigelt et al. 2008).

A cause du manque d'uniformité sur les critères d'inclusion des tumeurs neuroendocrines mammaires dans les différentes études, les études concernant l'agressivité et le pronostic de la tumeur sont souvent contradictoires (Lavigne et al. 2018; Bogina et al. 2016; B. Wei et al. 2010). De plus, à cause de leur rareté, aucune étude moléculaire n'a été conduite sur les carcinomes neuroendocrines du sein.

Peu de mécanismes sont connus pour décrire la formation de tumeurs neuroendocrines mammaires chez la patiente ou *in vitro* sur des cellules cancéreuses mammaires. Ainsi, notre étude est l'une des premières à décrire des mécanismes

d'induction de la NED dans des cellules cancéreuses mammaires au contact du SASP et incriminer la sénescence et une signalisation calcique dans ce phénotype.

## **2.2 Article 1. The NF- $\kappa$ B-dependent secretome of senescent cells can trigger neuroendocrine transdifferentiation of breast cancer cells**

En revision chez AgingCell



The NF- $\kappa$ B-dependent secretome of senescent cells can trigger neuroendocrine  
transdifferentiation of breast cancer cells

Clotilde RAYNARD<sup>1,\*</sup>, Xingjie MA<sup>1,2,\*</sup>, Anda HUNA<sup>1</sup>, Nolwenn TESSIER<sup>3</sup>, Jean-Michel FLAMAN<sup>1</sup>,  
Delphine GOEHRIG<sup>1</sup>, Jean-Jacques MEDARD<sup>1</sup>, David VINDRIEUX<sup>1</sup>, Isabelle TREILLEUX<sup>1</sup>, Hector  
HERNANDEZ-VARGAS<sup>1</sup>, Sylvie DUCREUX<sup>3</sup>, Nadine MARTIN<sup>1</sup> and David BERNARD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Inserm U1052, CNRS UMR 5286, Centre Léon Bérard, Université de Lyon, 69373 Lyon, France; <sup>2</sup>Department of Intensive Care, The Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China; <sup>3</sup>University of Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 69500 Bron, France.

\* Equal contributions

Correspondence: david.bernard@lyon.unicancer.fr

The authors have declared that no conflict of interest exists

## ABSTRACT

Cellular senescence is characterized by a stable proliferation arrest in response to stresses and the acquisition of a senescence-associated secretory phenotype, called SASP, composed of numerous factors including pro-inflammatory molecules, proteases and growth factors. The SASP affects the environment of senescent cells, especially during aging, by inducing and modulating various phenotypes such as paracrine senescence, immune cell activity, and extracellular matrix deposition and organization, which critically impact various pathophysiological situations, including fibrosis and cancer. Here, we uncover a novel paracrine effect of the SASP: the neuroendocrine transdifferentiation (NED) of some epithelial cancer cells, evidenced both in the breast and prostate. Mechanistically, this effect is mediated by NF- $\kappa$ B-dependent SASP factors, and leads to an increase in Ca<sup>2+</sup> levels. Consistently, buffering Ca<sup>2+</sup> by overexpressing the CALB1 buffering protein partly reverts SASP-induced NED, suggesting that the SASP promotes NED through a SASP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling. Human breast cancer dataset analyses support that NED occurs mainly in p53 WT tumors and in older patients, in line with a role of senescent cells and its secretome, as they are increasing during aging. In conclusion, our work, uncovering SASP-induced NED in some cancer cells, paves the way for future studies aiming at better understanding the functional link between senescent cell accumulation during aging, NED and clinical patient outcome.

## Keywords

Cellular senescence, SASP, neuroendocrine transdifferentiation, breast cancer, aging

## INTRODUCTION

Cellular senescence is a cell response triggered by various stresses, such as oncogenic or genotoxic stresses, as well as telomere shortening. Senescent cells thus accumulate during aging and/or following chronic exposure to factors inducing these stresses. This cell state corresponds to a stable cell cycle arrest and to the acquisition of some specific features, including an enhanced Senescence-Associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) activity<sup>1</sup> and the secretion of numerous factors, named Senescence-Associated Secretory Phenotype or SASP<sup>2-4</sup>. This SASP is mainly composed of metalloproteases, growth factors and pro-inflammatory molecules. Its composition notably depends on the signaling and transcription factors involved. So far two main transcription factors are known to regulate levels of pro-inflammatory SASP components: NF- $\kappa$ B and C/EBP $\beta$ <sup>3-5</sup>, and NOTCH1 has been reported to induce a TGF- $\beta$  dependent secretome<sup>6</sup>. Senescence, largely through its SASP, plays key roles in regulating a variety of pathophysiological conditions including aging and cancer, aging increasing the risk of developing a cancer<sup>7-9</sup>.

The SASP was reported to exert initial anti-tumoral effects in autocrine and paracrine manners, by blocking cell proliferation and by recruiting and activating immune cells to eliminate harmful and defective senescent cells<sup>3,4,10</sup>. Nevertheless, the SASP can also have long term pro-tumoral effects as it promotes, among others, tumor initiation, migration, epithelia-mesenchymal transition (EMT), cancer stemness and tumor resistance<sup>10-13</sup>. Hence, our understanding of the broad effects of the SASP in cancer and aging biology are emerging.

Neuroendocrine transdifferentiation (NED) has been depicted in some epithelial tumors, that allow to epithelial cells to possess neuronal and endocrine features. In particular, prostate epithelial cancer cells can undergo NED and prostatic cancers featuring neuroendocrine



transdifferentiation are characterized by the presence of neuroendocrine cell foci into malignant cells. Neuroendocrine cells produce numerous pre-hormones or peptide factors, such as chromogranin B (CHGB) and secretogranins (as SCG2)<sup>14</sup>. Androgen deprivation used in therapy against prostate cancer has been described as one of the main inducers of the emergence of a neuroendocrine phenotype, which is associated with a worse prognosis<sup>15</sup>. Though NED has also been depicted in other types of epithelial cancers, for instance in breast cancer, very little is known about this process in this context<sup>16-18</sup>. Breast neuroendocrine tumors are a rare and underrecognized subtype of mammary carcinomas, as they represent only 2% to 4 % of breast tumors. These tumors express specific NED markers, such as Chromogranin A (CHGA) and SCG2<sup>19</sup>. However, their mechanisms of formation and the features of these tumors in terms of treatment response, progression and aggressiveness are largely debated and unknown<sup>19</sup>.

While assessing the effects of the SASP on breast cancer cells, we discovered a new link between senescent cells and their secretome, and the induction of NED in hormone-dependent breast cancers during aging.

## RESULTS

### The SASP promotes neuroendocrine transdifferentiation (NED) of some breast cancer cells

To investigate the role of the SASP on some breast cancer cells, we produced control or SASP-containing conditioned media. The SASP is released from normal human fibroblasts exposed to classical stresses, either through the activation of oncogenic proteins<sup>20,21</sup> or using genotoxic drugs<sup>22</sup>, provoking their entry into senescence. Here, MRC-5 cells were infected with a retroviral vector to stably express a 4-HydroxyTamoxifen (4-OHT) inducible RAF protein, RAF:estrogen receptor (ER) (MRC-5/RAF:ER). As expected, RAF activation by inserting 4-OHT into MRC-5/RAF:ER led to cellular senescence. This was evidenced by (i) an increase in the senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) activity (Figure S1a), and (ii) in the mRNA level of the p21<sup>CIP1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) (Figure S1b), as well as (iii) a decrease in the mRNA of the proliferation marker Ki67 (Figure S1c) and by (iv) an increase in the mRNA of the IL-6, IL-8, BMP-2 and SPP1 SASP components (Figure S1d). This latter increase in SASP mRNA resulted in higher levels of SASP proteins in the supernatant, as illustrated for IL-6 (Figure S1e).

Having validated the generation of SASP through this experimental set-up, control (CTL, from MRC-5/RAF:ER untreated with 4-OHT) and SASP conditioned media were added to several breast cancer cell lines with molecular features representative of breast cancer cells: MCF-7 (ER+; WT p53), T47D (ER+; mutated p53) or MDA-MB231 (ER-; mutated p53). For T47D (Figure S2a) and MDA-MB-231 (Figure S2b), we did not observe significant differences between control and SASP-treated cells according to cell density and cell morphology. Strikingly in MCF-7 cells, the SASP treatment resulted in decreased cell density and strong morphological changes characterized by the appearance of ramifications arising from cell bodies (Figure 1a),

reminiscent of neuroendocrine-like structures.  $\alpha$ -tubulin staining highlighted the cytoskeleton containing the “neurite-like” structures, which could be quantified using image analysis algorithms from the Columbus software (Figure 1b). This automated method revealed that total neurite length and number of segments per cell increased following treatment with SASP in MCF-7 cells (Figure 1c, d). In addition to the neurite-like structures, we assessed the expression of neuroendocrine markers, namely SCG2 and CHGB, and observed their upregulation in SASP-treated MCF-7 cells (Figure 1e, f). To further confirm and extend these unexpected results, we verified whether a SASP generated by another senescence inducer could trigger this neuroendocrine transdifferentiation (NED) in MCF-7 cells, and whether this phenotype could also arise following exposure to SASP in prostate cancer cells known to be able undergo NED. Here, we generated the SASP by treating WI-38 fibroblasts with the genotoxic drug etoposide to activate pro-inflammatory molecules, as previously described<sup>22</sup>. We observed the induction of NED in MCF-7 cells incubated in this SASP-containing supernatant, as evidenced by changes in cell morphology and expression of NED markers (Figure S3a-d). Additionally, we tested the SASP obtained from MRC-5/RAF:ER on LNCaP prostate cancer cells, well-known to undergo NED upon certain stresses<sup>15,23,24</sup>. Consistently, we observed that the SASP induced a NED in these cells according to both cell morphology and NED marker expression (Figure S3e-h).

Together, these results support that the secretome of senescent cells, the SASP, triggers a NED in some breast and prostate cancer cells.

#### **NF- $\kappa$ B dependent SASP factors drive induction of NED**

The SASP is composed of a large variety of molecules, including but not limited to pro-inflammatory molecules, growth factors and proteases. Notably, the NF- $\kappa$ B family of

transcription factors is critical for promoting the expression of numerous pro-inflammatory factors in senescent cells, including IL-6, whereas they do not affect other non-inflammatory SASP factors<sup>6,25</sup>. IL-6 is a key pro-inflammatory molecule from the SASP as it mediates some of the previously described paracrine SASP effects<sup>4,26</sup>. Moreover, it was reported to induce NED in LNCaP cells<sup>23,24</sup>.

We thus sought to determine whether removing the NF- $\kappa$ B-dependent pro-inflammatory factors of the SASP would impact SASP-induced NED. To this end, MRC-5/RAF:ER cells were transfected with siRNA directed against RELA, a critical member of the NF- $\kappa$ B family of transcription factors, before activating RAF by adding 4-OHT. We first confirmed knockdown of RELA in these cells (Figure S4a) and the subsequent decrease in the expression of NF- $\kappa$ B-dependent SASP factors including IL-6 and IL-8 (Figure S4b). Conversely, other markers of cellular senescence, such as SA- $\beta$ -Gal activity and expression of p21<sup>CIP1</sup> CKI, were not impacted, nor were NF- $\kappa$ B-independent SASP factors BMP-2 and SPP1 (Figure S4c-f). Compared to the complete SASP, this NF- $\kappa$ B-independent SASP was unable to promote neurite-like structures (Figure 2a-c) and to induce the expression of the NED marker, SCG2 (Figure 2d).

Collectively, these data demonstrate that the NF- $\kappa$ B dependent pro-inflammatory SASP drives NED induced by the secretome of senescent cells.

#### **Ca<sup>2+</sup> as a secondary messenger drives SASP-mediated NED**

Ca<sup>2+</sup> is known to be a powerful secondary messenger, as it is activated by many ligand-receptor couples and plays critical roles in numerous biological and cellular processes, such as cell shape, proliferation, migration or cell death<sup>27,28</sup>. Ca<sup>2+</sup> fluxes have been associated with NED of prostate

cancer cells<sup>29</sup>. Using the Fura2-AM ratiometric calcium probe, we observed increased calcium levels in both cytosol and intracellular stocks (i.e. mitochondria and endoplasmic reticulum) in MCF-7 after SASP treatment (Figure 3a). To investigate whether Ca<sup>2+</sup> was involved in SASP-induced NED we used the CALB1 Ca<sup>2+</sup> buffering protein<sup>30,31</sup> which binds intracellular calcium and balances its concentration<sup>30,32</sup>. Its constitutive overexpression (Figure 3b) impaired NED induction by the SASP as evidenced by the reduction of neurite-like structures (Figure 3c-e) and expression of the NED marker, SCG2 (Figure 3f). In conclusion, these results support an involvement of calcium signaling in mediating, at least partly, SASP-induced NED.

#### **Human breast tumors displaying NED are ER+ and p53 WT and their proportion increases in older patients**

As mentioned above, the SASP did not induce marks of NED in breast cancer cells that were either ER-negative or mutated for p53. To verify whether our findings are relevant for human breast tumors, we explored the METABRIC human breast cancer database<sup>33</sup>. We isolated human breast tumors that displayed NED based on their co-expression of four NED markers SCG2, CHGB, CHGA and synaptophysin, SYP (Figure S5). Of the 1,904 breast tumors identified in the database, 45 tumors were positive for all of these 4 markers (NBC for Neuroendocrine Breast Carcinomas), within the expected range of 2-4%, whereas 1,635 were negative for these 4 markers (non-NBC) (Figure 4a). We then compared the gene expression profiles between NBC and the non-NBC to define the specific features of these tumors. We performed Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) based on the mean fold change in gene expression data between NBC and non-NBC for all genes. As expected, molecular signatures such as neurotransmitter transport or signal release GO signatures were found in NBC compared to non-NBC (Figure 4b).

Moreover, some calcium GO signatures were upregulated exclusively in NBC patients, emphasizing the role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the neuroendocrine phenotype (Figure 4c). In line with the literature<sup>18,34</sup> and our data, NBC were all ER-positive (Figure 4d). To avoid any bias during our analysis we next compared features of NBC (all ER+) to ER+ non-NBC, which represents luminal breast tumors and found that NBC were mostly p53 WT when compared to ER+ non-NBC (Figure 4e). Moreover, NBC present lower proportions of grade 3 tumors (Figure 4f) and display a lower proliferation rate according to Ki67 expression levels (Figure 4g). These findings were reminiscent of the proliferation arrest observed during SASP-induced NED *in cellulo*. Finally, the proportion of patients with a breast cancer displaying NBC strongly increased with age (Figure 4h). This is likely due to higher levels of SASP with aging, as senescent cells accumulate in older people<sup>35–37</sup>.

## DISCUSSION

The importance of the secretome of senescent cells in different pathophysiological contexts, including cancer biology, has been highlighted in the last ten years<sup>38</sup>. In this study, we uncover a new role for the secretome of senescent cells in shaping cancer cell identity, as their SASP induces NED of some epithelial cancer cells. Mechanistically, this effect of the SASP involves NF- $\kappa$ B-dependent SASP factors and relies on the induction of Ca<sup>2+</sup> signalling. The ability of the SASP to induce NED in breast cancer cells seems to be relevant *in vivo* as it correlated with features of human neuroendocrine breast carcinoma (NBC) samples.

Several effects of the SASP are mediated by pro-inflammatory molecules, in particular IL-6<sup>4,26</sup>. Interestingly, treatment with IL-6 was described to induce NED in LNCaP prostate cancer cells<sup>39</sup>. We substantiated these findings, as the SASP, which is enriched in IL6, also induced NED in LNCaP cells (Fig. S6A), arguing in favor of using IL-6 to induce NED in breast cancer cells. Nevertheless, IL6 treatment of MCF-7 cells did not induce NED (Fig. S6B), suggesting either that factors inducing NED in breast and prostate cancer cells are different or that breast cancer cells are less permissive and need additional SASP factors to undergo NED. In line with the last hypothesis, eliminating the NF- $\kappa$ B-dependent pro-inflammatory SASP, including IL6 and IL8, was sufficient to abolish SASP-induced NED in breast cancer cells. This observation indicates that several NF- $\kappa$ B-dependent SASP factors are needed to drive NED of breast cancer cells.

Several SASP factors are known to activate Ca<sup>2+</sup> signaling by their binding and the activation of their receptors<sup>40–42</sup>. Ca<sup>2+</sup> signaling has also been reported in the regulation of NED in prostate cancer cells<sup>29,43,44</sup> and our analysis of the NBC in the METABRIC collection confirmed enrichment in Ca<sup>2+</sup>-dependent signature. Our results support an involvement of the Ca<sup>2+</sup> in mediating SASP-induced NED of breast cancer cells as its level increased in cells undergoing

NED and as its buffering repressed SASP-induced NED. However, the molecular mechanisms increasing  $\text{Ca}^{2+}$  levels in response to the SASP, in particular the channels involved, as well as the downstream mechanisms activated by calcium and leading to NED in response to the SASP, remain to be determined.

Little is known about NBC, leading to controversial conclusions about their origin and their behaviour, for instance in terms of prognosis, likely due to the scarcity of such breast tumors<sup>19,34</sup>. To better understand their features, we took advantage of the extensive number of breast cancer patients enrolled in the METABRIC database and of the genomic and clinical information available. As far as we know this is the first time that such an approach is undertaken for NBC. The luminal WT p53 derived MCF-7 breast cancer cell line displayed a NED phenotype after SASP treatment, whereas luminal p53 mutant T47D or triple negative p53 mutant MDA-MB-231 breast cancer cells remained unaffected. This seems to be particularly relevant as (i) our analysis of the METABRIC database also supports that NBC are luminal p53 WT tumors and (ii) NBC have been reported to express the ER and to be eventually p53 WT and to be classified in the luminal breast cancer subtype according to the literature<sup>17,19,34</sup>. In line with features of NED in SASP-treated MCF-7 cells, NBC compared to luminal non-NBC tumors displayed a lower proliferation rate and consequently a lower tumor grade. Importantly these analyses also show that patients displaying NBC are generally older. This is in line with our results showing that the secretome of senescent cells can induce NED as senescent cells and their secretome accumulate with aging<sup>36,37</sup>.

The events driving NBC formation, a rare event, instead of driving classical non-NBC luminal breast cancer are largely unknown<sup>19</sup>. Overall, our work proposes a new hypothesis by which senescent cells and their secretome contribute to NED and NBC formation. More generally and



beyond NBC, and as suggested by our results obtained in prostate cancer cells, our work paves the way for future studies investigating the contribution of senescent cells, especially during aging, to the formation of other types of neuroendocrine carcinoma and/or to the transdifferentiation of some adenocarcinoma into a neuroendocrine phenotype. This may ultimately lead to improving clinical applications in terms of NBC treatment and prognosis <sup>45</sup>.

## MATERIAL AND METHODS

### Vectors, transfection and infection

The retroviral vector pLNCX/RAF:ER express an inducible RAF protein. The lentiviral vectors pLV-puro-CALB1 expressing CALB1 and pLV-GFP as control were used (VectorBuilder). To transfect 293 T lentiviral-producing cells and 293 GP retroviral-producing cells, GeneJuice transfection reagent (Merck Millipore) was used according to the manufacturer's recommendations. Two days after transfection, the virus-containing supernatant was mixed with fresh medium (1:20 for 293 T cells and 1:4 for 293 GP cells) and hexadimethrine bromide at 8 µg/mL (Sigma-Aldrich) and used to infect target cells. One day later, infected cells were selected using puromycin (Invivogen) at 500 ng/mL for 4 days.

### Cell culture, reagents and conditioned medium production

MCF-7, MDA-MB231, T47D, LNCaP, WI-38 and MRC-5 cells (ATCC, Manassas, VA, USA), 293 T lentiviral- and 293 GP retroviral-producing cells (Clontech, Mountain View, CA, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) containing GlutaMax and supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin (ThermoFisher Scientific). Cells were maintained at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. MRC-5/RAF:ER were treated with 4-OHT 100 nM and the medium was changed after 3 days. Conditioned medium was collected 3 days later and filtered using 0.45 µm sterile filters (Clearline, 146561). This conditioned medium was diluted 1:5 or 1:10 with fresh medium to treat breast cancer or prostate cancer cells, respectively, every 3 days for 6 days. For treatment with recombinant protein IL6 (Peprotech, 200-06), MCF-7 and LNCaP cells

were treated every 2 days with 20 ng/mL recombinant IL-6 for 7 days, cells were then fixed, and RNA extracted.

#### **siRNA transfection**

For siRNA knockdown we used an ONTARGETplus nontargeting siRNA control SMARTpool (sictl) or an ON-TARGETplus siRNA SMARTpool targeting RELA (siRELA) (Horizon Discovery) (see Supp. Table 1 for their sequence). Cells were reverse transfected with siRNAs using Dharmafect 1 transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Horizon Discovery). siRNAs were used at a final concentration of 15 nM. Sequences of the 4 siRNAs included in each pool are provided in Supplemental Table 1. The day after transfection, medium was changed with DMEM with Glutamax (10% FBS and 1% antibiotics).

#### **Reverse transcription and real-time quantitative PCR**

NucleoZOL (Macherey-Nagel) was used to perform total RNA extraction according to the manufacturer's recommendations. The First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) was used to synthesize cDNA from 2 µg of total RNA, according to the manufacturer's instructions. The RT reaction mixture was diluted 1:4 and used as a cDNA template for qPCR. TaqMan quantitative PCR was carried out on a FX96 Thermocycler (Bio-Rad). The PCR mixture contained TaqMan mix (Roche), 200 nM of primers (see Supp. Table 2 for their sequence), Universal Probe Library probe (100 µM, ThermoFisher Scientific) for the gene of interest (TaqMan Gene Expression Assays (Primers/probe), Life technologies) and 50 ng/µg of cDNA template. Reactions were performed in triplicate with the following program:

95°C 10 min, followed with 40 cycles of 95°C for 10 s, 59°C for 30 s. The relative amount of mRNA was calculated using the comparative Ct ( $\Delta\Delta$ CT) method, following data normalization against GAPDH housekeeping gene.

#### **Crystal violet staining and SA- $\beta$ -galactosidase staining**

For crystal violet, MCF-7, T47D and MDA-MB231 were washed with PBS 1X, fixed for 15 min in 3.7 % formaldehyde, washed with PBS 1X and stained with crystal violet solution at 0.05 % overnight. Scans of wells are presented.

For SA- $\beta$ -galactosidase staining, MRC-5/RAF:ER cells were washed once with PBS 1X, fixed for 5 min in 2 % formaldehyde / 0.2 % glutaraldehyde, rinsed twice with PBS 1X and incubated overnight at 37°C in SA- $\beta$ -Galactosidase staining solution as previously described<sup>46</sup>.

#### **Immunofluorescent staining and quantification of neurite-like structures**

After six days of treatment with conditioned medium in 96-well plates (PerkinElmer, 600558), cells were fixed in paraformaldehyde 3.7 % for 10 min and permeabilized with 0.1% triton X-100 for 10 min, then blocked in PBS-Tween 0.05 % containing 20 % FBS (PBST-FBS). The antibody against  $\alpha$ -tubulin (1:1,000; Sigma-Aldrich T6199) was incubated overnight at 4 °C in PBST-FBS. After three washes using PBST-FBS, cells were incubated for 1 h with anti-rabbit IgG coupled with Alexa Fluor 455 (LifeTechnologies, A21424) diluted 1:2,000 in PBST-FBS. Cells were then washed twice in PBS, counterstained with Hoechst (Sigma-Aldrich) diluted 1:1,000 in PBS for 10 min at room temperature and washed twice with PBS before analysis.

Pictures of cells were then taken using an Operetta High-Content Analysis System (PerkinElmer) and single cells were analyzed with the Columbus software using a macro measuring cell body (nucleus with Hoechst) and cytoplasm (with  $\alpha$ -tubulin) (see Supp. Table 3 for parameters used to configure the algorithm). The software calculated the distance of elongation from the cell body to their extremity (neurite length) and the number of segments from the cell body. These quantifications were used to determine NED structures.

### Calcium imaging

Wide field calcium imaging was performed as previously described<sup>47,48</sup>. For cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  measurements, MCF-7 cells (placed 7 days in conditioned medium renewed every 3 days) were loaded with Fura-2 AM (Molecular Probes,  $K_d = 0.14 \mu\text{M}$ ) at a final concentration of  $2.5 \mu\text{M}$  for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  in  $\text{Ca}^{2+}$ -containing HBSS (Gibco). All calcium measurements were performed at room temperature in  $\text{Ca}^{2+}$ -free HBSS (Gibco). Coverslips were mounted on a magnetic chamber (Chamlide). The chamber was placed on a DMI6000 inverted wide-field microscope (Leica microsystem). Images were acquired with an Orca-Flash 4.0 Scientific CMOS camera (Hamamatsu) using a 40X oil-immersion objective. Using a Lambda DG-4+ filter (Sutter instruments), Fura-2 AM was excited at 340 and 380 nm and the fluorescent signal emitted measured at 510 nm. Images ( $1024 \times 1024$  pixels) were taken with a 5 s interval. Fluorescence ratios (F340 nm/F380 nm) were analyzed with MetaFluor 6.3 (Universal Imaging) after removing background fluorescence. To measure intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  content, ionomycin (Abcam, 120370) at  $1 \mu\text{M}$  final was added into the medium during acquisition and fluorescence ratios (F340 nm/F380 nm) were analyzed as previously described.

### **METABRIC and GSEA analyses**

Data from the Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium (METABRIC)<sup>33,49</sup>, regrouping gene expression and clinical data, were extracted from the cBioportal website. Expression of four neuroendocrine markers (NEM) in breast tumors from 1,904 patients were ranked on a log scale allowing us to discriminate tumors with high or low expression of NEM (expression higher or lower than mean + 1log considered as positive or negative for NEM). With Venn Diagrams, patients positive for the four NEMs were considered to be patients with Neuroendocrine Breast Carcinomas (NBC) and the ones negative for the 4 NEMs, non-NBC. Because all NBC patients were positive for estrogen receptor (ER+), we re-analyzed the two groups to include only ER+ patients. Thus, further analyses of p53 status, tumor grade, patient age, expression levels and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) were conducted only on ER+ NBC and ER+ non-NBC patients. Pre-Ranked GSEA was performed on ranked lists of gene expression ratio, between average expression in ER+ NBC tumors versus non-NBC tumors using the GSEA v2.0.13 software with default parameters. All gene set files for this analysis were obtained from the GSEA website ([www.broadinstitute.org/gsea/](http://www.broadinstitute.org/gsea/)).

### **Immunoblot**

For immunoblot, MRC-5 were lysed in Laemmli 6X buffer (SDS 2% (m/v), Glycerol 10 % (v/v), Tris 125 mM pH, 6.8) with 15 % of  $\beta$ -mercaptoethanol. After determining protein concentration, 20  $\mu$ g of proteins were heated at 95°C for 10 min, loaded onto 12 % gels and separated by SDS-PAGE in Tris-HCl-Glycine-SDS TGS, pH 8.5 buffer (Euromedex). Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) in Tris-Glycine, pH 8.5 buffer (Euromedex)/ethanol 20 % at 4°C for 2 h at a 100 V constant voltage. Membranes were blocked

with TBS Tween-20 0.05 % / Milk 5 % for 30 min and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against CALB1 (Santacruz, sc28285; 1:500 dilution) or against  $\alpha$ -tubulin (Sigma Aldrich, T6199; 1:2,000 dilution). Membranes were then washed and incubated with secondary antibody for 1 h at room temperature: anti-rabbit secondary antibody (Interchim, 711-035-152) for CALB1 and anti-mouse secondary antibody (Interchim, 715-035-150) for  $\alpha$ -tubulin, both diluted at 1:5,000. Detection was performed using the ECL kit (Amersham).

## ELISA

To analyze IL6 protein levels in cells following 4-OHT-induced senescence, Human IL6 ELISA kit from Thermo Scientific was used (BMS213-2). The standard for IL6 was prepared by serial dilutions. Stock solution – 200 ng/mL was diluted to: 6,666 pg/mL, 2,222 pg/mL, 740.7 pg/mL, 246.9 pg/mL, 82.3 pg/mL and 27.4 pg/mL, the last dilution point contained only Assay Diluent. After, 100  $\mu$ L of each standard and sample were dispatched into a standard 96-well ELISA plate. The plate was covered and incubated for 2.5 h at room temperature (RT) with gentle shaking. After incubation, the solution was discarded, wells were washed 4 times with 1X washing buffer and 1X biotinylated antibody was added. The incubation with antibody was conducted for 1 h at RT with gentle shaking. The solution was then discarded, the 4 washes were repeated and Streptavidin-HRP solution added. This step was followed by a 45 min incubation at RT with gentle shaking. After incubation, the solution was discarded and wells were washed for 4 times. TMB Substrate was then added and incubated for 30 min at RT in the dark with gentle shaking. Finally, stop solution was added and absorbance was measured at 450 and 550 nm.

## Statistical analyses

Means are represented with  $\pm$  SD (technical replicates) or SEM (biological replicates) as indicated in the figure legend. Statistical analyses were performed as indicated in the figure legend using GraphPad Prism 8 software. D'Agostini & Pearson normality test was used before proceeding to any analyses to evaluate the normality of the samples. P-value are indicated on each figure.



#### Author contributions

C.R., X.M., A.H., N.T., F.M.F., D.G., J.J.M., D.V., H.H.V, S.D. performed experiments. C.R., X.M., A.H., S.D., N.M. and D.B. designed the experiments and the results were analyzed by all the co-authors. C.R., X.M., N.M. and D.B. designed the overall study. D.B. and N.M. supervised the work. C.R., N.M. and D.B. wrote the manuscript with input from all authors.

#### Data availability Statement

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

#### Acknowledgements

We thank Fabien Van Coppenolle, Carl Mann, laboratory members for helpful suggestions and collaborations, and Brigitte Manship for critical reading of the manuscript. This work was supported by a grant of the French National Cancer Institute INCA PLBio (N°2018-144) to DB. CR was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer, XM by the China Scholarship Council (CSC) and AH by the Fondation pour la Recherche Médicale FRM.

## REFERENCES

1. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9363–9367 (1995).
2. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* **6**, 2853–2868 (2008).
3. Acosta, J. C. *et al.* Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008).
4. Kuilman, T. *et al.* Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* **133**, 1019–1031 (2008).
5. Chien, Y. *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & Development* **25**, 2125–2136 (2011).
6. Hoare, M. *et al.* NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol* **18**, 979–992 (2016).
7. He, S. & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease. *Cell* **169**, 1000–1011 (2017).
8. Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 729–740 (2007).
9. Smetana, K. *et al.* Ageing as an Important Risk Factor for Cancer. *Anticancer Res* **36**, 5009–5017 (2016).
10. Kang, T.-W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547–551 (2011).

11. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *PNAS* **98**, 12072–12077 (2001).
12. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **5**, 99–118 (2010).
13. Liu, D. & Hornsby, P. J. Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Res* **67**, 3117–3126 (2007).
14. Lloyd, R. V. Practical markers used in the diagnosis of neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* **14**, 293–301 (2003).
15. Zhang, Y. *et al.* Androgen deprivation promotes neuroendocrine differentiation and angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 pathway in prostate cancers. *Nat Commun* **9**, 1–17 (2018).
16. Lavigne, M. *et al.* Comprehensive clinical and molecular analyses of neuroendocrine carcinomas of the breast. *Mod Pathol* **31**, 68–82 (2018).
17. Inno A. *et al.* Neuroendocrine Carcinoma of the Breast: Current Evidence and Future Perspectives. *The Oncologist* **21**, 28–32 (2016).
18. Makretsov, N., Gilks, C. B., Coldman, A. J., Hayes, M. & Huntsman, D. Tissue microarray analysis of neuroendocrine differentiation and its prognostic significance in breast cancer. *Human Pathology* **34**, 1001–1008 (2003).
19. Gallo, M. *et al.* Primary Neuroendocrine Neoplasms of the Breast: Still Open Issues. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, 610230 (2020).

20. Collin, G., Huna, A., Warnier, M., Flaman, J.-M. & Bernard, D. Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence. *Cell Death Dis* **9**, 259 (2018).
21. Acosta, J. C. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* **15**, 978–990 (2013).
22. Contrepois, K. *et al.* Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat Commun* **8**, 14995 (2017).
23. Chang, P.-C. *et al.* Autophagy Pathway Is Required for IL-6 Induced Neuroendocrine Differentiation and Chemoresistance of Prostate Cancer LNCaP Cells. *PLOS ONE* **9**, e88556 (2014).
24. Zhu, Y. *et al.* Interleukin-6 induces neuroendocrine differentiation (NED) through suppression of RE-1 silencing transcription factor (REST). *The Prostate* **74**, 1086–1094 (2014).
25. Ferrand, M. *et al.* Screening of a kinase library reveals novel pro-senescence kinases and their common NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional program. *Aging (Albany NY)* **7**, 986–1003 (2015).
26. Mosteiro, L., Pantoja, C., Martino, A. de & Serrano, M. Senescence promotes in vivo reprogramming through p16INK4a and IL-6. *Aging Cell* **17**, e12711 (2018).
27. Humeau, J. *et al.* Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell Calcium* **70**, 3–15 (2018).
28. Clapham, D. E. Calcium Signaling. *Cell* **131**, 1047–1058 (2007).
29. Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevée, N., Rossier, M. F. & Prevarskaya, N. Overexpression of an  $\alpha$ 1H (Cav3.2) T-type Calcium Channel during Neuroendocrine Differentiation of Human Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 10824–10833 (2002).

30. Kojetin, D. J. *et al.* Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca<sup>2+</sup>-loaded calbindin-D(28K). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 641–647 (2006).
31. Noble, J. W. *et al.* The X-ray structure of human calbindin-D28K: an improved model. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **74**, 1008–1014 (2018).
32. Schmidt, H. Three functional facets of calbindin D-28k. *Front Mol Neurosci* **5**, 25 (2012).
33. METABRIC Group *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature* **486**, 346–352 (2012).
34. Marchiò, C. *et al.* The genetic landscape of breast carcinomas with neuroendocrine differentiation. *The Journal of Pathology* **241**, 405–419 (2017).
35. Fafián-Labora, J. A. & O’Loghlen, A. Classical and Nonclassical Intercellular Communication in Senescence and Ageing. *Trends Cell Biol* **30**, 628–639 (2020).
36. van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446 (2014).
37. Karin, O., Agrawal, A., Porat, Z., Krizhanovsky, V. & Alon, U. Senescent cell turnover slows with age providing an explanation for the Gompertz law. *Nat Commun* **10**, 5495 (2019).
38. Sun, Y., Coppé, J.-P. & Lam, E. W.-F. Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends Mol Med* **24**, 871–885 (2018).
39. Yuan, T.-C., Veeramani, S. & Lin, M.-F. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* **14**, 531–547 (2007).
40. Rittner, H. L. *et al.* Pain control by CXCR2 ligands through Ca<sup>2+</sup>-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. *FASEB J* **20**, 2627–2629 (2006).
41. Qiu, Z., Parsons, K. L. & Gruol, D. L. Interleukin-6 selectively enhances the intracellular calcium response to NMDA in developing CNS neurons. *J Neurosci* **15**, 6688–6699 (1995).

42. Tuschil, A., Lam, C., Haslberger, A. & Lindley, I. Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. *J Invest Dermatol* **99**, 294–298 (1992).
43. Gackière, F. *et al.* CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem* **283**, 10162–10173 (2008).
44. Sekiguchi, F. & Kawabata, A. [Role of Cav3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channels in prostate cancer cells]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **154**, 97–102 (2019).
45. Rubin, M. A., Bristow, R. G., Thienger, P. D., Dive, C. & Imielinski, M. Impact of Lineage Plasticity to and from a Neuroendocrine Phenotype on Progression and Response in Prostate and Lung Cancers. *Mol Cell* **80**, 562–577 (2020).
46. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. & Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* **4**, 1798–1806 (2009).
47. Bosson, C. *et al.* Variations in the TRPV1 gene are associated to exertional heat stroke. *J Sci Med Sport* **23**, 1021–1027 (2020).
48. Al-Mawla, R. *et al.* Acute Induction of Translocon-Mediated Ca<sup>2+</sup> Leak Protects Cardiomyocytes Against Ischemia/Reperfusion Injury. *Cells* **9**, 1319 (2020).
49. Pereira, B. *et al.* The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun* **7**, 11479 (2016).

## FIGURE LEGENDS

FIGURE 1 SASP promotes neuroendocrine transdifferentiation in MCF-7 breast cancer cells. MCF-7 cells were treated every 3 days with control (CTL) or SASP conditioned medium for 6 days. (a) Bright-field micrographs of MCF-7 cell morphology (representative of more than 5 independent experiments). (b) Immunostaining against nucleus and  $\alpha$ -tubulin was performed. High content imaging Operetta system was used to automatically acquire images and Columbus software was used to perform analysis of cell shape (colorful segments). (c) Total neurite length per cell and (d) number of segments per cell were quantified ( $n = 3$ , unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test, mean  $\pm$  SEM). qPCR was performed to quantify mRNA levels of the neuroendocrine markers (NEM) (e)SCG2 and (f) CHGB ( $n = 4$ , unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test, mean  $\pm$  SEM).

FIGURE 2 NF- $\kappa$ B-dependent pro-inflammatory SASP molecules drive NED in MCF-7. Six days after treatment with conditioned medium from MRC-5/RAF:ER cells (CTL or SASP) transfected with control siRNA (siCtrl) or siRNA directed against RELA (siRELA), images of MCF-7 cells (a) were taken. Neurite-like structures were quantified, either (b) total neurite length or (c) number of segments per cell, using an Operetta system and Columbus software after immunostaining against  $\alpha$ -tubulin ( $n = 1,408$  cells, 3 independent experiments, non-parametric Kruskal-Wallis, mean  $\pm$  SEM). (d) RT-qPCR on NEM SCG2 was performed ( $n = 5$ , unpaired parametric Mann-Whitney t-test, mean  $\pm$  SEM).

FIGURE 3  $Ca^{2+}$  signaling mediates SASP-induced NED. Six days after treatment with conditioned medium from MRC-5/RAF:ER (CTL or SASP), (a) Cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration and intracellular

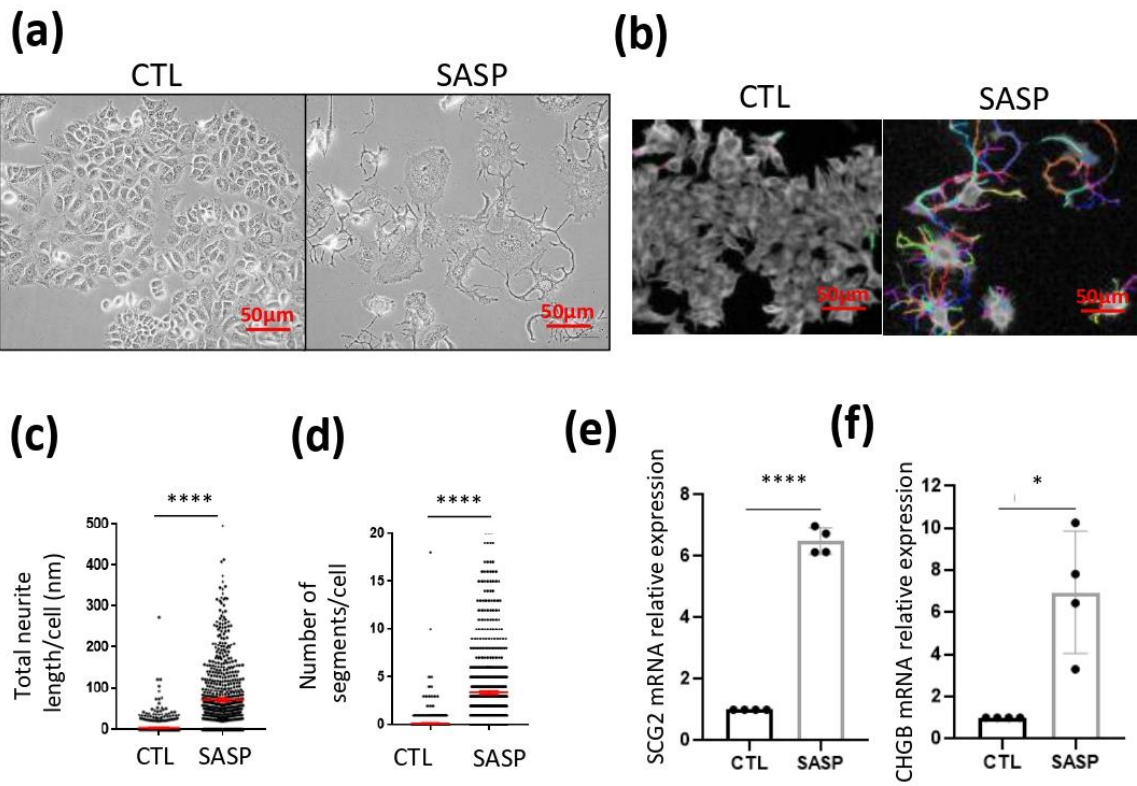
Ca<sup>2+</sup> content (i.e. intracellular organelles: mitochondria and endoplasmic reticulum) were measured with the ratiometric probe Fura2-AM (n = 136 for CTL and n = 48 for SASP, 3 independent experiments, non-parametric Kruskal-Wallis, mean +/- SEM). (b-f) MCF-7 cells were infected with a lentiviral vector encoding CALB1 (pLV-CALB1) or GFP (pLV-GFP) as control vector. (b) CALB1 protein levels were validated by Western Blot. After six days of treatment with MRC-5/RAF:ER (CTL or SASP), (c) images of MCF-7 were taken and (d,e) neurite-like structures (total neurite length and number of segments per cell) quantified using the Operetta system and Columbus software after  $\alpha$ -tubulin immunostaining (n = 881 cells, 3 independent experiments, non-parametric Kruskal-Wallis test, mean +/- SEM). (f) mRNA level of NEM SCG2 was measured by RT-qPCR (n = 7, unpaired parametric Mann-Whitney t-test, mean +/- SEM).

FIGURE 4 Breast tumors presenting neuroendocrine features are ER+, p53 wild-type and their proportion in breast cancer patients increases with aging. METABRIC data on breast tumor patients (clinical data and gene expression for 1,904 tumors) were extracted and analyzed. (a) Based on the low (negative, neg) or high (positive, pos) expression of the four neuroendocrine markers (NEM) SCG2, CHGB, CHGA and SYP, Venn Diagrams were used to determine two groups of tumors: the "non-Neuroendocrine Breast Carcinomas" (non-NBC) (n = 1,635) and the "Neuroendocrine Breast Carcinomas" (NBC) (n = 45). (b,c) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) between the two groups of patients. The y-axis represents enrichment score (ES) and on the x-axis are genes (vertical black lines) represented in gene sets from C5 MSigDB collection related to neuroendocrine features in (b) ("GO-NEUROTRANSMITTER TRANSPORT" and "GO\_SIGNAL\_RELEASE") or in (c) Calcium signaling (CALCIUM\_ION\_REGULATED\_EXOCYTOSIS") FDR pValue is indicated in red. (d) ER status measured by immunohistochemistry was examined



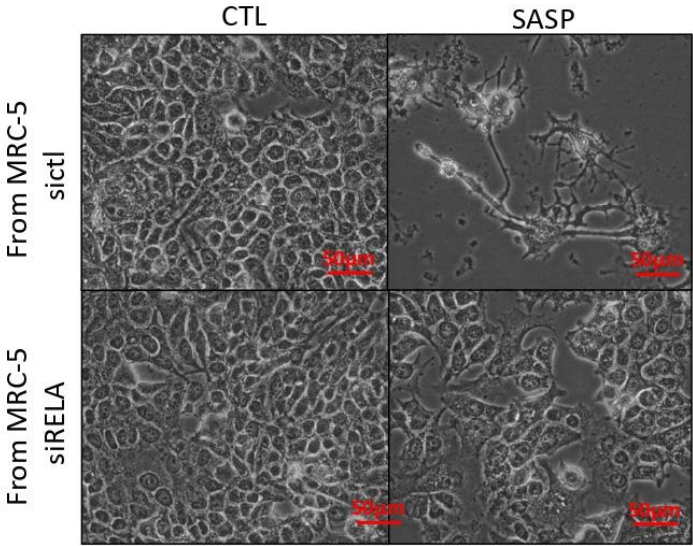
(n = 1,635 for non-NBC and n = 45 for NBC, Fisher's exact test). Further analyses were performed only on ER-positive breast tumors. (e) Status of p53 (wild-type, WT, or mutated) was analyzed in non-NBC and NBC (n = 1,210 for non-NBC and n = 45 for NBC, Fisher's exact test). (f) Tumor grade was compared between non-NBC and NBC patients (n = 1,210 for non-NBC and n = 45 for NBC, Fisher's exact test). (g) Mean mRNA levels of proliferation marker Ki67 in the two groups of patients was determined (n = 1,210 for non-NBC and n = 45 for NBC, non-parametric unpaired Mann-Whitney t-test). (h) Percentage of patients with the different types of tumors (NBC, non-NBC or partial-NBC presenting 1, 2 or 3 positive NEM) was examined in different age groups (n = 1,255).

# FIGURE 1

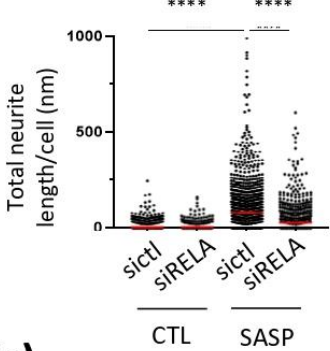


# FIGURE 2

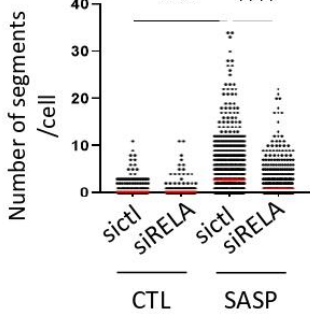
(a)



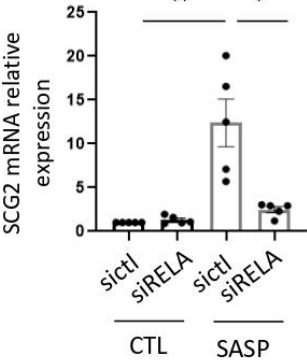
(b)



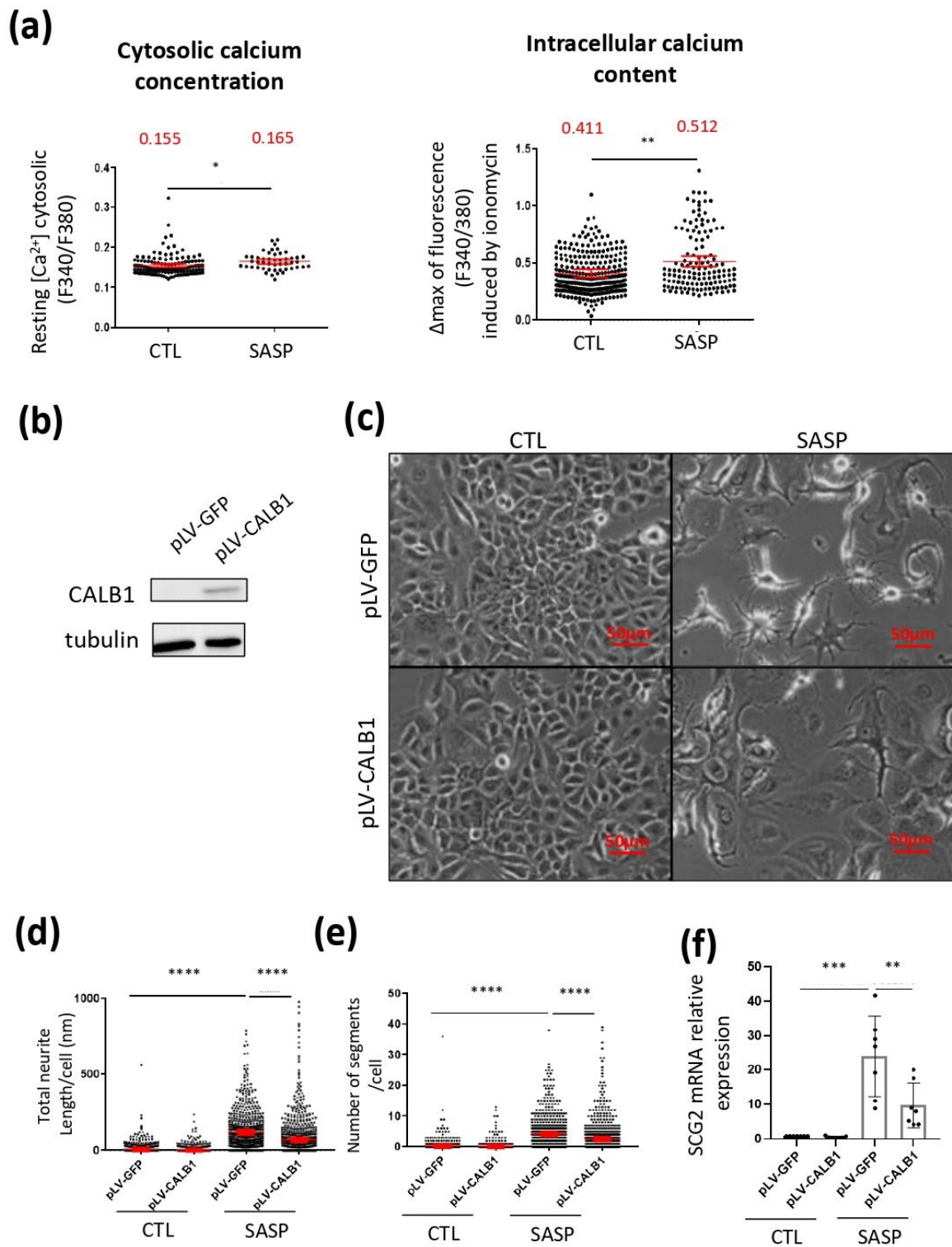
(c)



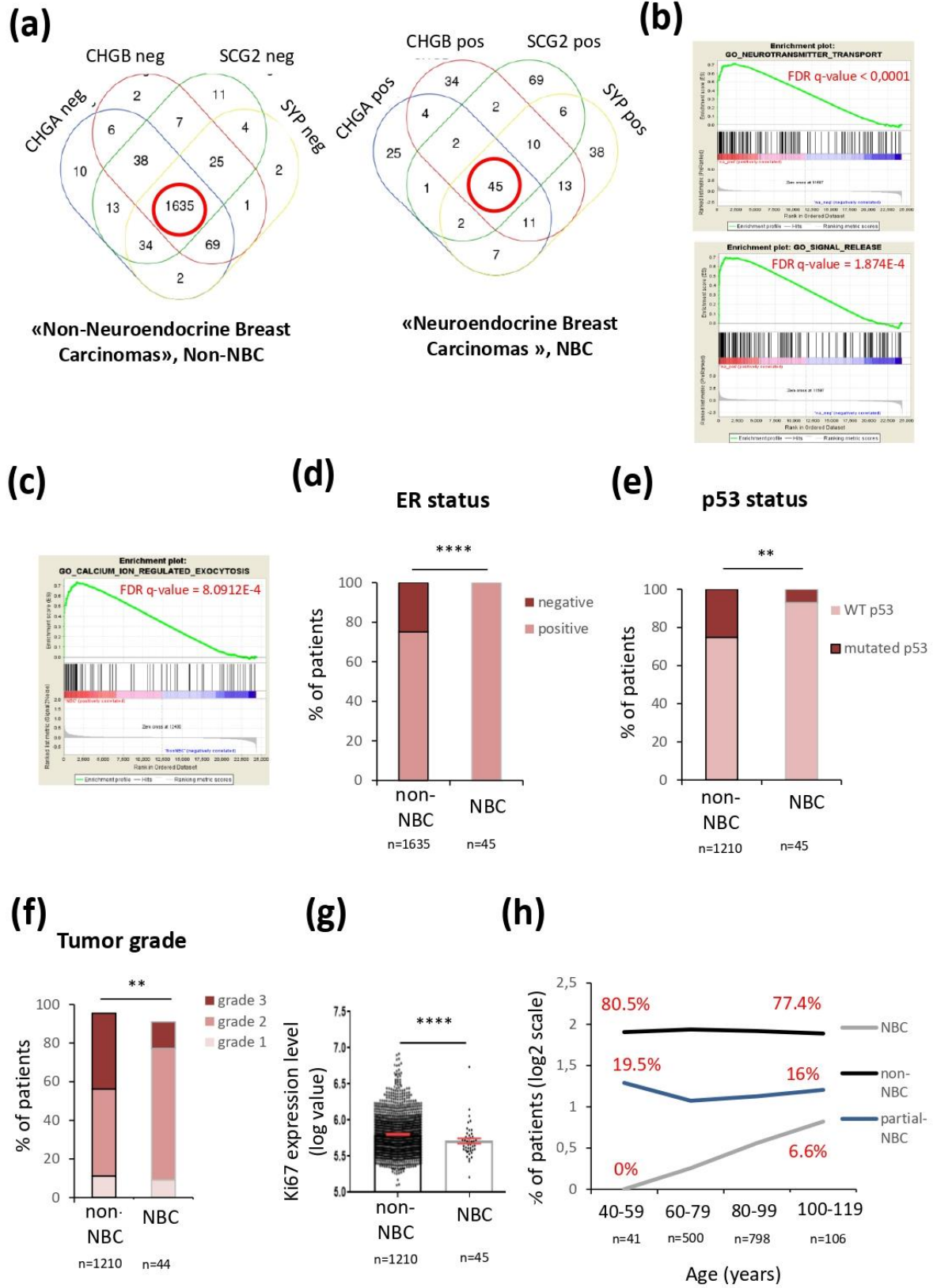
(d)



# FIGURE 3



# FIGURE 4



## SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

FIGURE 1 RAF activation induces senescence and SASP secretion. MRC-5 fibroblasts were infected with a RAF:ER encoding retroviral vector and puromycin selected. The day after seeding, cells were treated with 4-OHT at 100 nM. Six days later, various features of senescent cells were quantified. (a) Cells were fixed and SA- $\beta$ -Gal assay performed. Percentage of positive cells was calculated (n = 4, unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test). (b-d) Relative mRNA levels of (b) p21<sup>CIP1</sup> CKI, (c) Ki67 proliferation marker and (d) the indicated SASP components (n = 4, unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test, mean +/- SEM). (e) IL6 protein levels in the control and SASP supernatants were measured by ELISA (n = 2, mean +/- SD).

FIGURE 2 SASP induces proliferation arrest, but not NED in ER- or p53-mutated breast cancer cells. Six days after treatment with control (CTL) or SASP conditioned media of MRC-5/RAF:ER, (a) T47D and (b) MDA-MB231 were fixed and stained for crystal violet to reveal cell density (left panel) and cell morphology was observed (right panel).

FIGURE 3 The ability of SASP to promote NED is conserved with SASP from senescent cells undergoing a genotoxic stress and in prostate cancer cells. (a-d) MCF-7 were treated for six days with conditioned medium from senescence-induced WI-38 using etoposide (etoposide SASP) or control (CTL). (a) Images were acquired to assess MCF-7 cell morphology. (b,c) Immunostaining against  $\alpha$ -tubulin was performed. A high content imaging Operetta system was used to automatically acquire images and Columbus software was used to perform



analysis of cell shape. (b) Total neurite length per cell and (c) number of segments per cell were quantified (n = 585 cells, 3 independent experiments, unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test). (d) RT-qPCR on NEMs SCG2 and CHGB were performed (n = 4, unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test, mean +/-SEM). (e-h)LNCaP prostate cancer cells were treated for six days with conditioned media from MRC-5/RAF:ER (SASP) or control (CTL). (e) Images were acquired to assess LNCaP cell morphology. (f, g) Immunostaining against  $\alpha$ -tubulin was performed. High content imaging Operetta system was used to automatically take images and Columbus software was used to perform analysis of cell shape. (f) Total neurite length per cell and (g) number of segments per cell were quantified (n = 1401 cells, 3 independent experiments, unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test). (h) RT-qPCR on NEM SCG2 and CHGB were performed (n = 6, unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test, mean +/- SEM).

FIGURE 4 RELA knockdown abrogates pro-inflammatory SASP, but not the induction of SA- $\beta$ -galactosidase activity, cell cycle arrest and NF- $\kappa$ B-independent SASP molecules in response to RAF activation. MRC-5/RAF:ER were transfected with a control non-targeting siRNA pool (sictl) or a siRNA pool targeting RELA, one of the NF- $\kappa$ B subunits (siRELA). Cells were treated with 4-OHT after siRNA reverse transfection to activate RAF and induce senescence. Six days after treatment, (a) RELA knockdown was validated by RT-qPCR on RELA mRNA expression. (b) Expression of NF- $\kappa$ B-dependent SASP interleukins IL6 and IL8 was also assessed, as well as (c) the percentage of cells positive for SA- $\beta$ -galactosidase activity and (d) mRNA levels of p21<sup>CIP1</sup>, NF- $\kappa$ B-independent molecule (e) BMP-2 and (f) SPP1 by RT-qPCR (n = 4, unpaired non-parametric Mann-Whitney t-test, mean +/-SEM).

2

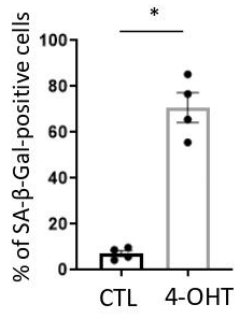
Figure 5 Analyses of gene expression from breast cancer patients reveal that few patients present high expression levels of NEM. METABRIC data of breast tumor patients (gene expression for 1,904 tumors) were extracted and analyzed. Expression levels of four neuroendocrine markers (SCG2, CHGB, CHGA and synaptophysin, SYP) in each breast tumor were ranked from lower to higher expression per patient. Cut-off representing the mean log value of the total expression level for each NEM + 1 was chosen. Patients having lower NEM expression levels than the cut-off were considered to be negative for the NEM, or positive if they displayed a higher expression level than the cut-off.

Figure 6 Recombinant IL6 treatment induces neurite-like morphology in LNCaP prostate cancer cells, but not in MCF-7 breast cancer cells. (a) MCF-7 cells were treated with recombinant IL6 at 20 ng/mL. After 7 days, images were acquired to assess MCF-7 cell morphology. (b) LNCaP cells were treated with recombinant IL6 at 20 ng/mL. After 7 days, images were acquired to assess LNCaP cell morphology.

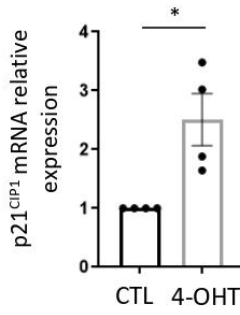


# SUPPLEMENTARY 1

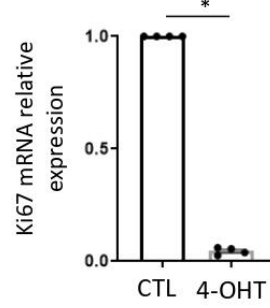
(a)



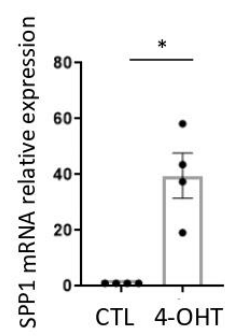
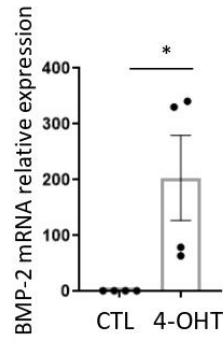
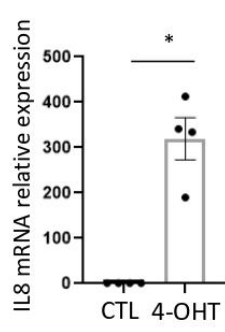
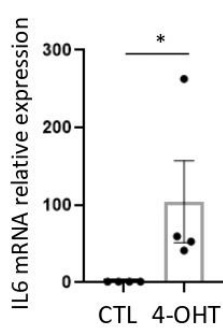
(b)



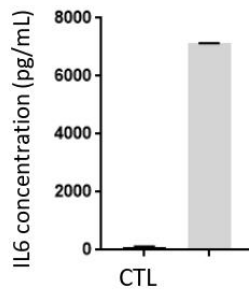
(c)



(d)

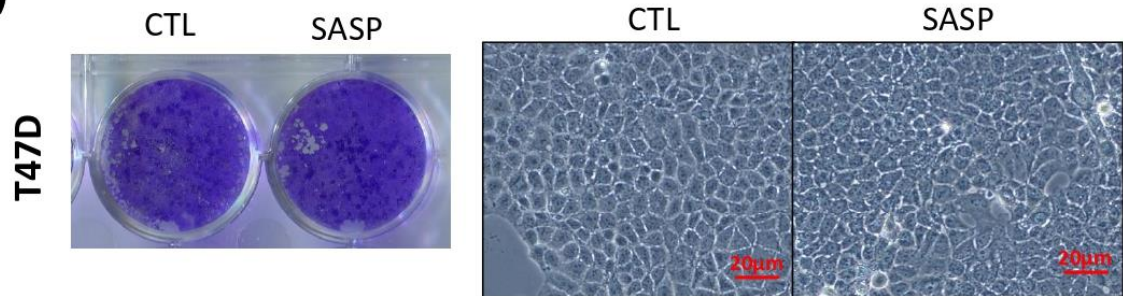


(e)

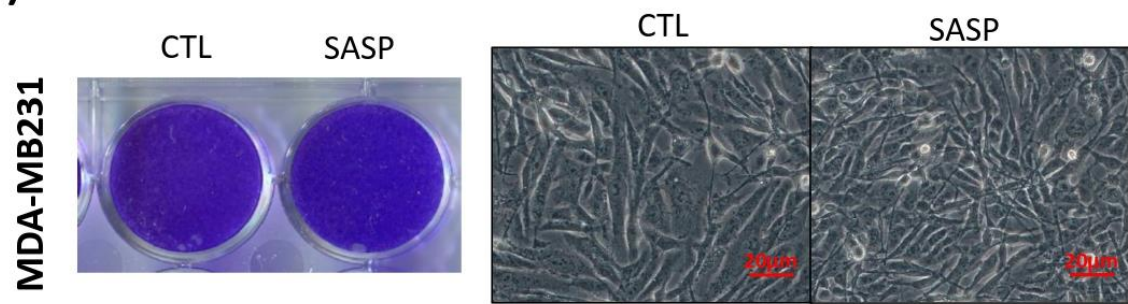


## SUPPLEMENTARY 2

(a)

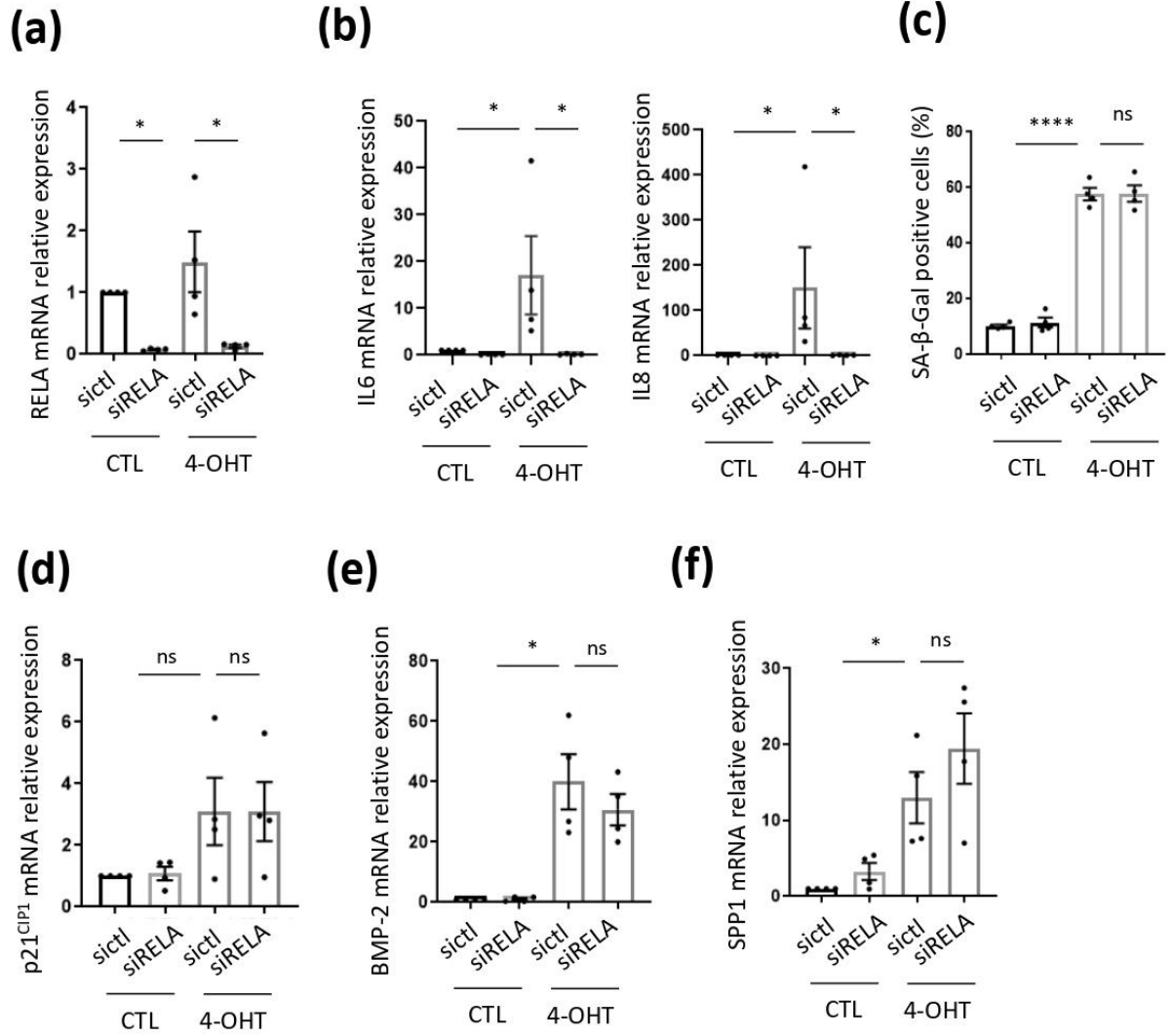


(b)

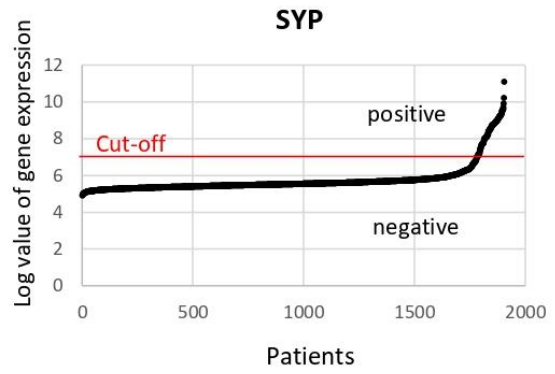
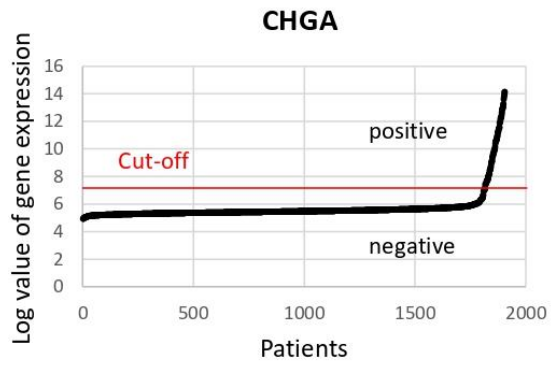
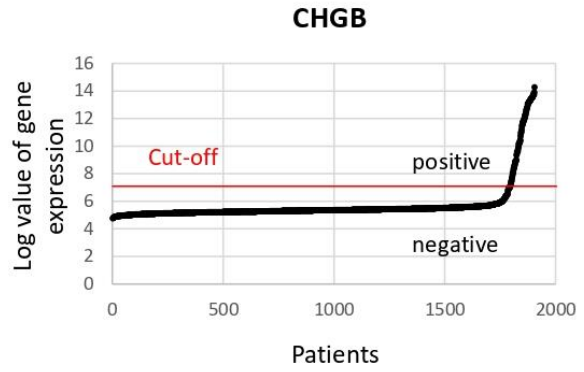
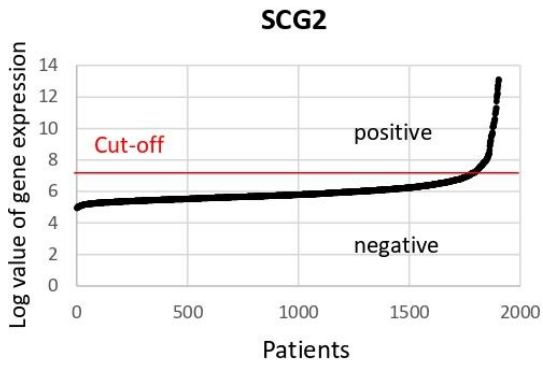




# SUPPLEMENTARY 4

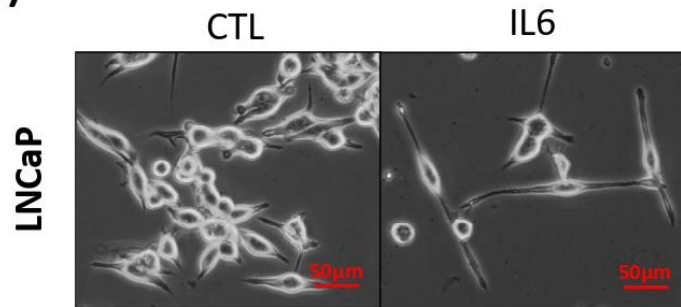


# SUPPLEMENTARY 5

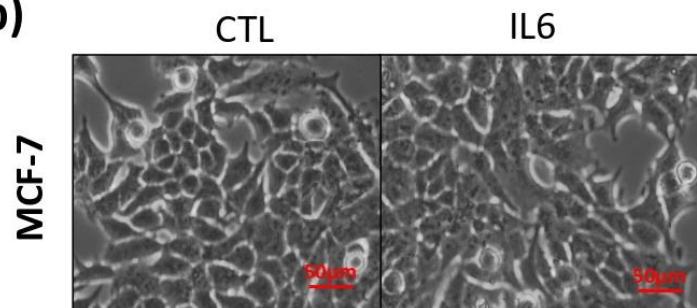


## SUPPLEMENTARY 6

(a)



(b)



**TABLE 1** siRNA sequences used for reverse transfection.

Name	Accession number	Sequences
sictl		UGGUUUACAUGUCGACUAA
sictl		UGGUUUACAUGUUGUGUGA
sictl		UGGUUUACAUGUUUUCUGA
sictl		UGGUUUACAUGUUUCCUA
siRELA	46430498	GGAUUGAGGAGAAACGUAA
siRELA	46430498	CCCACGAGCUUGUAGGAAA
siRELA	46430498	GGCUAUAAACUCGCCUAGUG
siRELA	46430498	CCACACAACUGAGCCCAUG

**TABLE 2** Primers sequences and UPL used for qPCR.

Name	Forward	Reverse	Probe
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	UPL #60
IL8	AGACAGCAGAGCACACAAGC	ATGGTTCCTCCGGTGGT	UPL #72
P21	TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC	GGCGTTGGAGTGGTAGAAAT	UPL #32
IL6	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA	CTGCAGCCACTGGTTCTGT	UPL #2
SPP1	GAGGGCTTGGTTGTCAGC	CAATTCTCATGGTAGTGAGTTTCC	UPL #18
BMP-2	CGGACTGCGGTCTCCTAA	GGAAGCAGCAACGCTAGAAG	UPL #49
CALB1	AAGATCCGTTCCGGTACAGCTT	CTGAAGGATCTGTGCGAGAA	UPL #58
SCG2	GGGAGGAATATGCTGTGGAG	AGCCATGTTTGAAAGATTCCT	UPL #53
CHGB	CCCCTGAGGACCTGGAGT	GGTCTTGGAGCCCTGTATTCT	UPL #79

**Supp. Table 3.** Parameters used for quantification of neurite-like structures on Columbus software

	Input Population	Method
Channel : Hoechst « Nuclei »	Find nuclei	<b>Method : B</b> Common Threshold : 0.4 Area : > 30 $\mu\text{m}^2$ Splitting Coefficient : 6 Individual Threshold : 0.3 Contrast : > 0.1
	Calculate Morphology Properties	<b>Method : Standard Area</b> Ratio Width to Length <b>Method : Filter by Property</b> Nucleus Ratio Width to Length : > 0.5
Channel : Alexa 555 « Cell »	Find cytoplasm	<b>Method : F</b> Membrane Channel : Alexa 555 Individual Threshold : 0.15
	Calculate Morphology Properties	<b>Method : Standard Area</b>
Channel : Hoechst « Nuclei »	Select Population	<b>Method : Filter by Property</b> Cell Area [ $\mu\text{m}^2$ ] : < 8000 <b>Method : Common Filters</b> Remove Border Objects Region : Cell <b>Method : Resize Region [<math>\mu\text{m}/\text{px}</math>]</b> Outer Border : -15 px Inner Border : INF px
		Find neurites





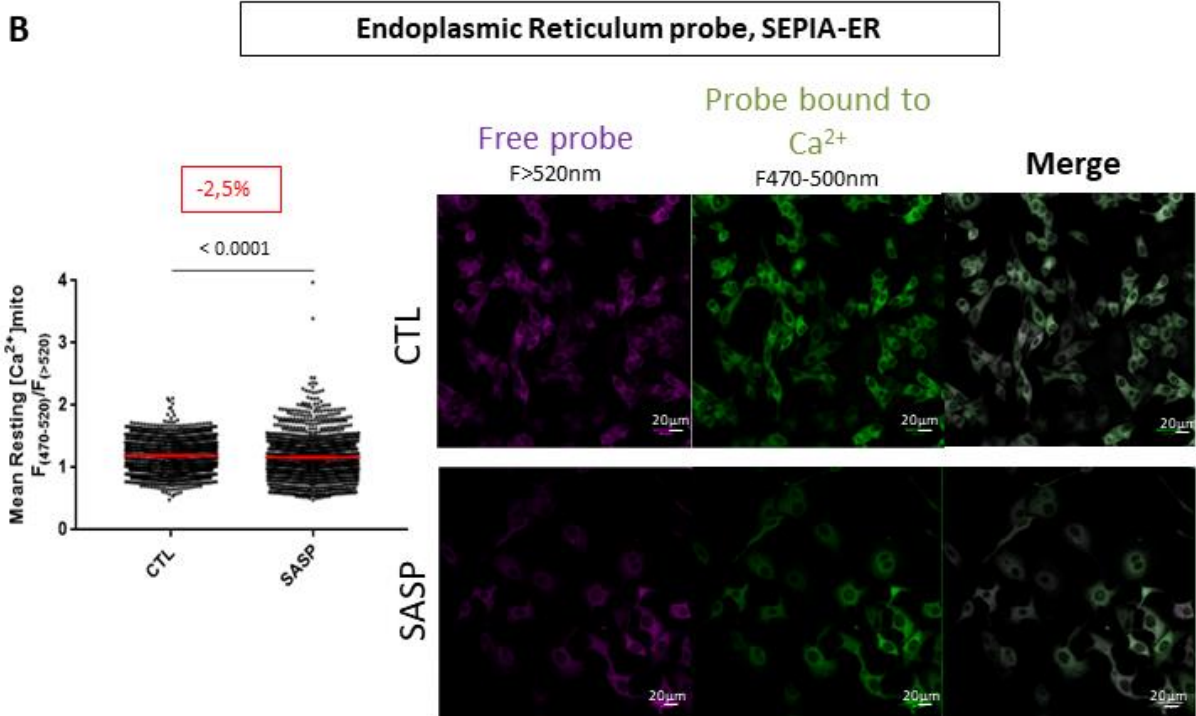
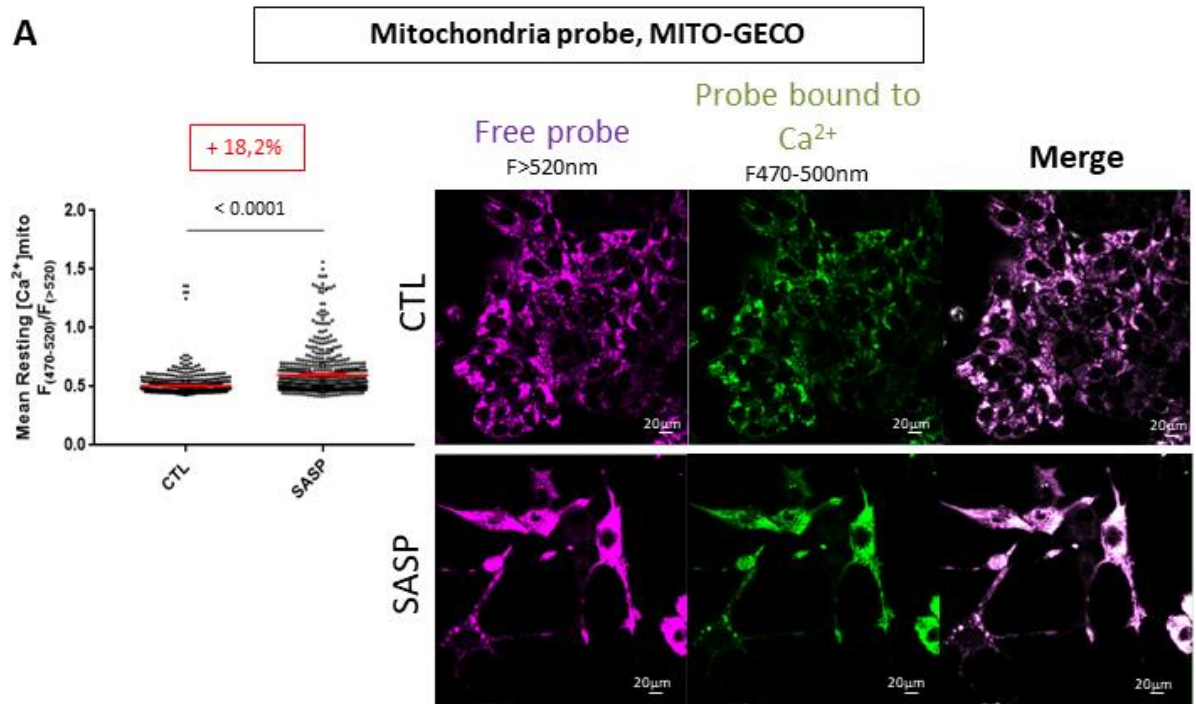
## 2.3 Résultats supplémentaires

### ***Le niveau de calcium mitochondrial, et non celui du réticulum endoplasmique, est augmenté dans les MCF-7 en NED***

Nous avons démontré dans notre étude que la différenciation neuroendocrine des MCF-7 était accompagnée d'une augmentation des niveaux de calcium cytosolique et dans les stocks intracellulaires, probablement majoritairement dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique.

Nous savons que les niveaux de calcium dans les différents organites intracellulaires sont impliqués dans différents processus biologiques, dont la sénescence (Martin et Bernard 2017; Ziegler et al. 2021). Jusqu'à présent, les niveaux de calcium dans les stocks intracellulaires durant la différenciation neuroendocrine n'ont pas été étudiés. Nous avons donc voulu examiner plus précisément les niveaux de calcium dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique, pour cela nous avons utilisé des sondes ratiométriques et génétiques ciblées à la mitochondrie (sonde MITO-GECO) ou au réticulum endoplasmique (sonde SEPIA-ER). Nous avons alors observé une augmentation du niveau de calcium dans la mitochondrie (**Figure 21A**) mais pas dans le réticulum endoplasmique (**Figure 21B**).

Comme la surexpression de CALB1, comme tampon calcique, conduit à une réversion partielle des niveaux de calcium et du phénotype neuroendocrine, il serait maintenant important de réaliser la mesure des niveaux de calcium dans les MCF-7 lors de la surexpression de CALB1 afin de vérifier que CALB1 permet bien le tamponnage du calcium lors de sa surexpression.



**Figure 21. Le niveau de calcium mitochondrial augmente durant la NED dans les MCF-7 traitées au SASP.**

A. Le niveau de calcium mitochondrial durant l'OIS dans les HMEC a été mesuré grâce à la sonde ratiométrique MITO-GECO, après infection lentivirale. Les ratios de fluorescence de la sonde liée au calcium et de la sonde libre après excitation sont

représentés (moyenne +/- SEM, issues de 3 expériences indépendantes, test de Mann-Whitney).

B. Le niveau de calcium du réticulum endoplasmique durant l'OIS dans les HMEC a été mesuré grâce à la sonde ratiométrique SEPIA-ER, après infection lentivirale. Les ratios de fluorescence de la sonde liée au calcium et de la sonde libre après excitation sont représentés (moyenne +/- SEM, issues de 3 expériences indépendantes, test de Mann-Whitney).

### ***Détermination des facteurs de transcription responsables de la NED dans les MCF-7***

Afin de déterminer quels facteurs peuvent être impliqués dans la transdifférenciation des cellules cancéreuses mammaires et prostatiques, nous avons utilisé des ARN interférents (siRNAs) dirigés contre des facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la NED. Pour choisir les siRNAs, nous avons regardé les profils d'expression de gènes correspondant à des signatures pour des facteurs de transcription dans les tumeurs NBC comparées aux tumeurs ER+ totales. Grâce à ces analyses GSEA (« Gene Set Enrichment Analysis »), nous avons recensé l'enrichissement des signatures de cinq facteurs de transcription : CREB1 (« cAMP Response Element Binding protein »), ATF1 (« Activating Transcription Factor » 1), ATF3, ATF4 et ATF6 (**Figure 22A**). Les facteurs de transcription CREB et ATFs appartiennent à la même super famille de facteurs de transcription comportant un domaine bZIP. CREB est de plus impliqué dans l'induction du marqueur neuroendocrine, CHGA (Canaff et al. 1998) et comme régulateur de la NED (Suarez, Deng, et Hu 2014; Sang et al. 2016) et peut être activé par le calcium (Kornhauser et al. 2002; H. Ma et al. 2014). Cependant, dans notre modèle le knock-down de ces facteurs de transcription n'impacte pas la mise en place de la NED et ne réverte pas le phénotype « neurite-like » observé dans les MCF-7 traitées au SASP (**Figure 22B**), suggérant que ces facteurs de transcription seuls ne permettent pas la NED.

**A**

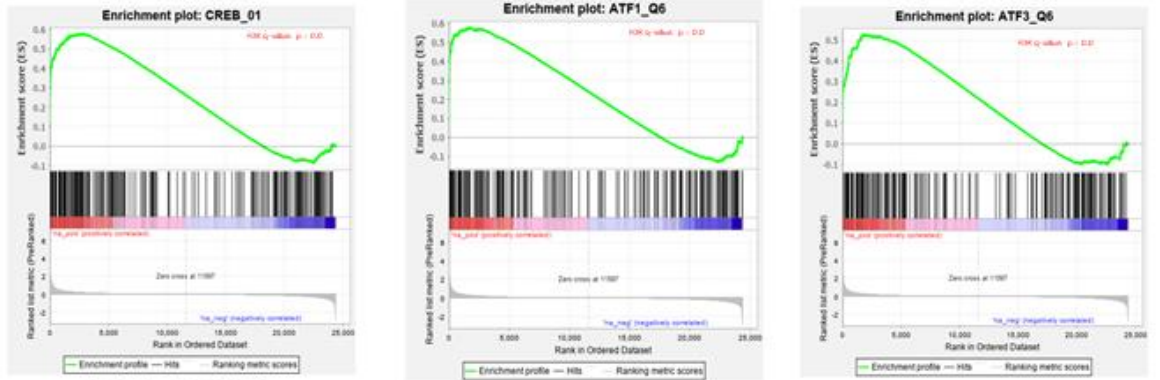


Fig 1: Enrichment plot: CREB\_Q1

Fig 1: Enrichment plot: ATF1\_Q6

Fig 1: Enrichment plot: ATF3\_Q6

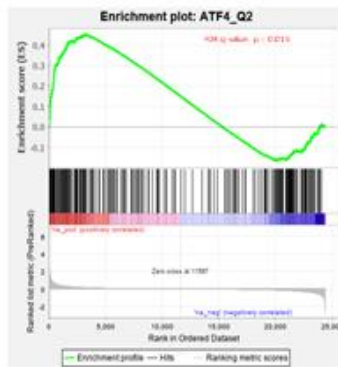


Fig 1: Enrichment plot: ATF4\_Q2

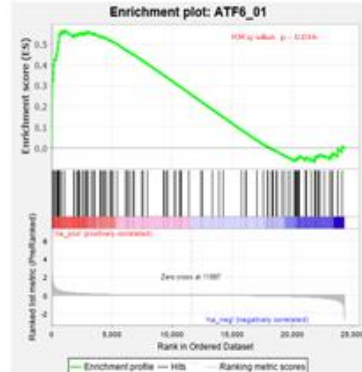
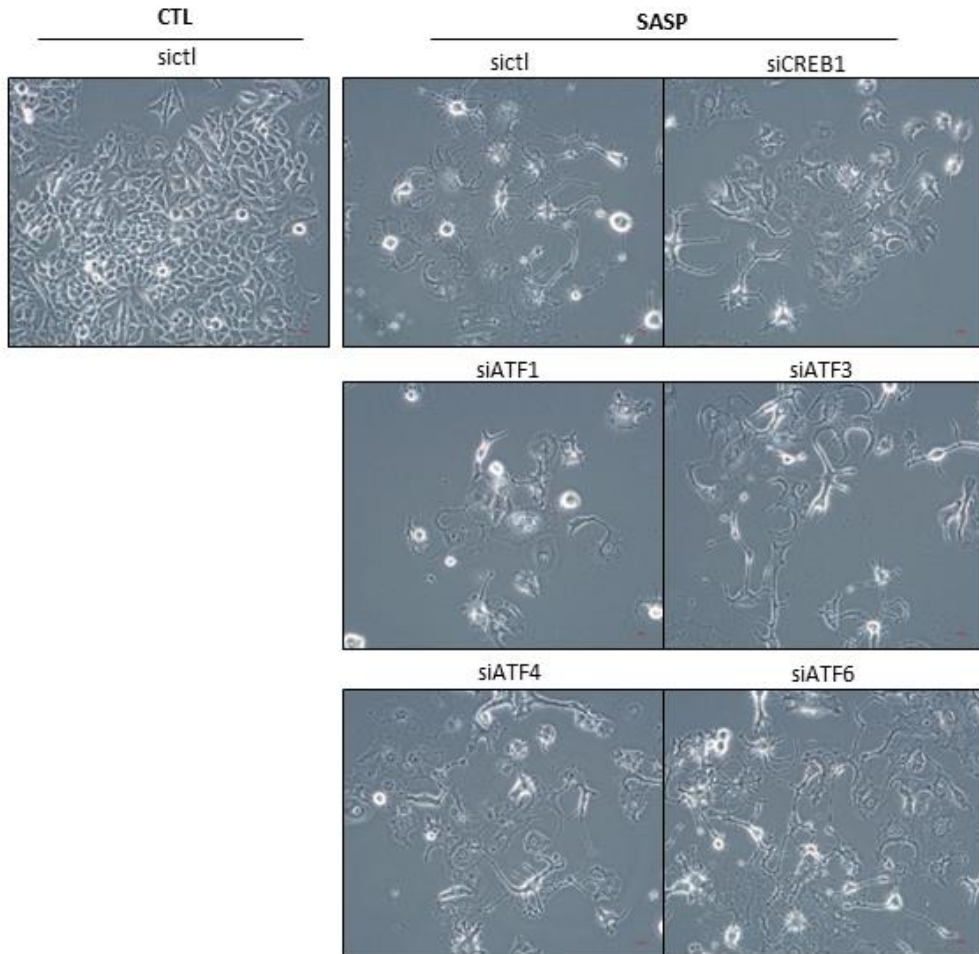


Fig 1: Enrichment plot: ATF6\_Q1

**B**



## **Figure 22. Le knock-down de facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la NED n'impacte le phénotype neuroendocrine.**

A. Les analyses GSEA comparant le profil d'expression des tumeurs neuroendocrines mammaires (NBC) avec les tumeurs mammaires ER+ permettent de détecter l'enrichissement de signatures de certains facteurs de transcription.

B. Les photos prises des MCF-7 traitées au SASP et avec les siRNA dirigés contre les facteurs de transcription sont montrées permettant de montrer la morphologie des cellules.

De plus, nous avons voulu déterminer plus précisément quels étaient les facteurs dépendants de NF- $\kappa$ B qui pourraient activer des voies de signalisation induisant la NED. Il a été décrit que l'IL-6, un des composés majeurs du SASP, en traitement chronique induit à lui-seul la NED et l'expression de marqueurs neuroendocrines dans des LNCaP (Spiotto et Chung, s.d., 6). Nos résultats supplémentaires ont montré qu'un traitement chronique à l'IL-6 était bien capable d'induire une morphologie de type « neurite-like » dans les LNCaP, mais ne conduisait à aucun changement de morphologie ni d'induction de NEMs dans les MCF-7. Ceci suggère des différences dans les mécanismes d'activation de la NED entre les deux lignées cellulaires. Pour affiner ces résultats et déterminer si un autre facteur bien particulier du SASP pouvait induire la NED dans les MCF-7, nous souhaiterions utiliser dans les MRC-5 Raf:ER des siRNA dirigés contre certains facteurs pro-inflammatoires du SASP (entre autres IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et CSF2) et contre certains facteurs indépendants de NF- $\kappa$ B (tels que MMP-1, MMP-3 et MMP-9), comme contrôles négatifs.

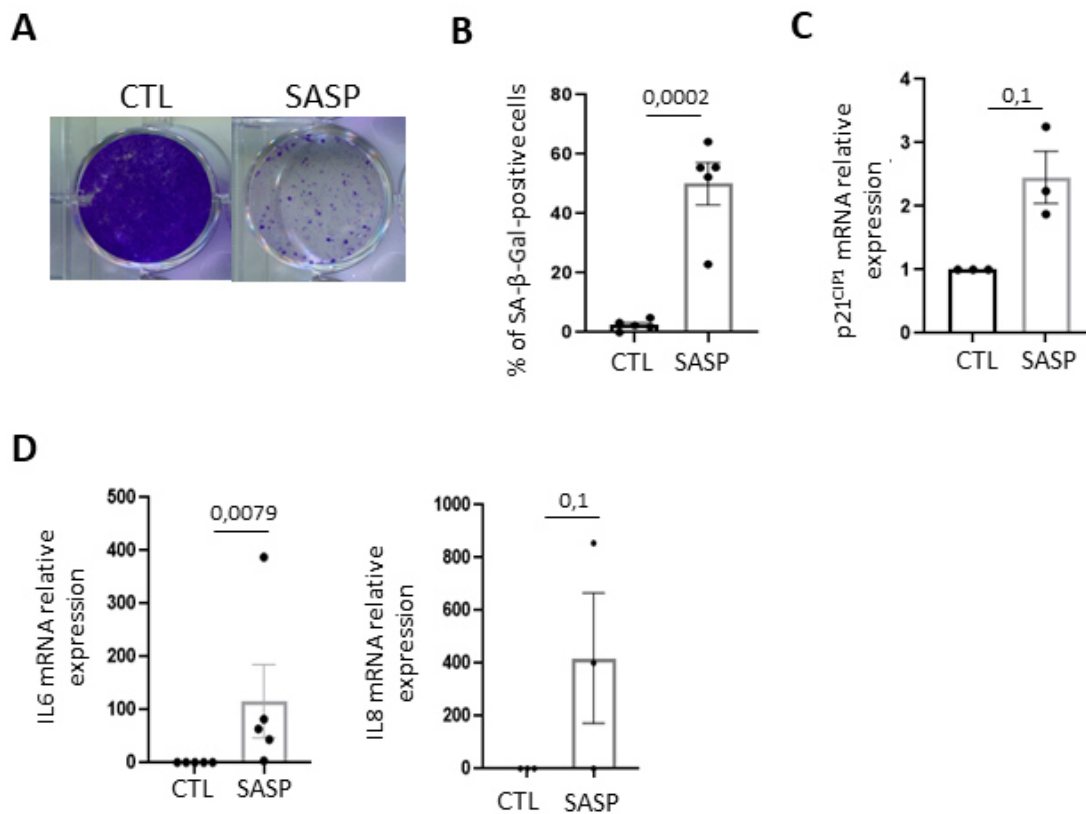
### ***L'induction de la NED par le SASP est accompagnée par de la sénescence paracrine des MCF-7***

L'une des caractéristiques du SASP est de pouvoir induire de la sénescence paracrine sur d'autres cellules, ainsi nous avons étudié si le SASP des fibroblastes en OIS pouvaient induire de la sénescence dans les MCF-7 en parallèle de la transdifférenciation. Lors du traitement au SASP, les MCF-7 présentent une diminution de la densité cellulaire montrée par colony assay (**Figure 23A**), l'augmentation de l'activité SA- $\beta$ -Gal (**Figure 23B**) et de l'expression de la CDKI p21<sup>CIP1</sup> (**Figure 23C**) ainsi que des facteurs pro-inflammatoires du SASP, IL-6 et IL-8 (**Figure 23D**). La transdifférenciation neuroendocrine des MCF-7 traitées au SASP est associée à de la sénescence cellulaire. Ainsi, le SASP peut induire de la sénescence paracrine en parallèle de la différenciation neuroendocrine dans les cellules cancéreuses MCF-7.

Les précédentes études de l'équipe ont montré qu'une augmentation des niveaux de calcium mitochondriaux permettait l'induction de la sénescence cellulaire (Wiel et al. 2014; Ziegler et al. 2021). Nous pouvons donc penser que l'augmentation



du calcium mitochondrial dans notre modèle pourrait être lié à l'induction de sénescence. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions utiliser des siRNA dirigés contre MCU, ce qui empêcherait l'augmentation du calcium mitochondrial par ce canal et regarder l'impact sur la sénescence. De plus, le niveau de calcium mitochondrial pourra être testé lors de la surexpression de CALB1.



**Figure 23. La différenciation neuroendocrine est accompagnée par de la sénescence dans les MCF-7 traitées au SASP.**

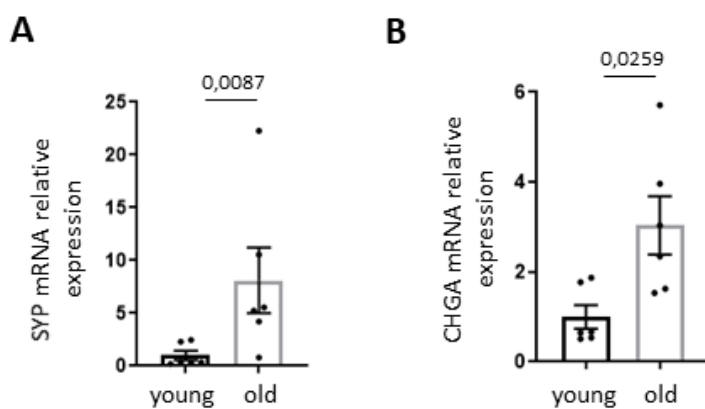
A. La densité cellulaire est montrée par colony assay.

B. Le pourcentage de cellules positives pour l'activité SA-β-Gal a été comptabilisé (moyenne +/- sem de 5 expériences indépendantes, t-test non pairé).

Les ARN des cellules traitées au CTL ou au SASP ont été extraits, puis rétrotranscrits et des PCR quantitatives ont permis de déterminer les taux d'expression relatifs de C. p21<sup>cip1</sup> (moyenne +/- sem de 3 expériences indépendantes, test de Mann-Whitney) et D. d'IL-6 et d'IL-8 (moyenne +/- sem de 5 expériences indépendantes pour IL-6 et 8 expériences indépendantes pour IL-8, test de Mann-Whitney).

## ***Des marqueurs neuroendocrines sont induits in vivo dans les glandes mammaires de souris âgées***

Comme il a été décrit dans l'introduction, il a été démontré que les cellules sénescents et le SASP s'accumulaient au cours du vieillissement et pouvaient contribuer à certaines maladies liées à l'âge et au vieillissement (Baker et al. 2011; Campisi 2013). De plus, les tumeurs neuroendocrines mammaires sont majoritairement retrouvées chez les patientes âgées (Lavigne et al. 2018). Ainsi, nous avons regardé si la différenciation neuroendocrine pouvait survenir au cours du vieillissement dans des glandes mammaires de souris. Pour cela, nous avons comparé l'expression des NEMs d'ARN issus de glandes mammaires de souris jeunes (âgées de moins de 6 mois) à celles issues de souris âgées de plus 20 mois. Nous avons constaté une augmentation de l'expression de la synaptophysine, SYP (**Figure 24A**), et de la chromogranine A, CHGA (**Figure 25B**), deux marqueurs neuroendocrines. Ceci suggère que l'accumulation du SASP au cours du vieillissement pourrait conduire à la différenciation neuroendocrine dans les glandes mammaires.



**Figure 24. L'expression de marqueurs neuroendocrines augmente au cours du vieillissement dans les glandes mammaires de souris.**

Les ARN des glandes mammaires issues de souris jeunes (« young », âgées de 6 mois) ou vieilles (« old », âgées de plus de 20 mois) ont été extraits et rétrotranscrits et des PCR quantitatives ont permis de déterminer les taux d'expression relatifs des marqueurs neuroendocrines A. SYP et B. CHGA (moyenne de 6 souris pour chaque groupe, moyenne +/- sd, test de Mann-Whitney).





**- DISCUSSION  
&  
PERSPECTIVES -**



## DISCUSSION & PERSPECTIVES

---

Ces deux projets nous ont permis de mettre en avant plusieurs rôles du calcium et l'importance de son homéostasie lors de la sénescence et dans la médiation de ses effets paracrines. Tout d'abord, dans plusieurs modèles de sénescence dans des cellules épithéliales mammaires, nous avons observé l'augmentation des niveaux de calcium cytosolique et dans les stocks intracellulaires et accompagnée en parallèle de l'induction de l'expression d'une protéine tamponnant le calcium, CALB1. Les potentiels rôles de cette augmentation de calcium et de l'expression de CALB1 vont être discutés ci-dessous.

Ensuite, nous avons étudié les effets paracrines du SASP et plus particulièrement nous avons démontré que le SASP dépendant de NF- $\kappa$ B est capable d'induire de la transdifférenciation neuroendocrine dans des cellules mammaires ER+ et p53 sauvage, et ce de manière dépendante du calcium. Dans cette partie, nous allons discuter de la manière dont cette différenciation est induite et de l'impact biologique de ce phénotype neuroendocrine chez des patientes atteintes de cancers du sein et lors du vieillissement.

### 1 Chapitre 1 : Rôle du calcium et de CALB1 durant la sénescence cellulaire

---

Dans ce premier projet, nous avons étudié dans des HMEC en sénescence à la fois les niveaux de calcium dans le cytosol et dans les stocks intracellulaires et aussi la présence d'une protéine régulant la concentration calcique, CALB1. Nous avons observé une augmentation des niveaux de calcium cytosolique et dans les stocks intracellulaires dans l'ensemble des modèles de sénescence étudiés (HMEC en OIS et en TIS). Ces résultats, en addition d'autres études réalisées dans d'autres types cellulaires et par d'autres inducteurs de sénescence, suggèrent qu'une augmentation des niveaux de calcium pourrait être une nouvelle caractéristique de la sénescence. En revanche, cette étude est la première à décrire l'induction d'une protéine tamponnant le calcium, CALB1. Si la surexpression de CALB1 dans notre modèle d'OIS permet la réversion de l'augmentation des niveaux de calcium cytosolique et dans les stocks intracellulaires, elle n'impacte pas le phénotype sénescence. Ainsi, le(s) rôle(s) précis de l'augmentation des niveaux calciques et de l'expression de CALB1 restent encore à déterminer et sont discutés dans la partie suivante.

## 1.1 Importance du calcium et des flux calciques durant la sénescence

### 1.2 Calcium et SASP

#### 1.2.1 SASP pro-inflammatoire

La surexpression de CALB1 dans les MRC-5/Raf:ER n'impacte pas l'arrêt de prolifération ou l'activité SA- $\beta$ -Gal mais réverte le niveau de molécules pro-inflammatoires du SASP, IL-6 et IL-8, retrouvées dans le surnageant des cellules en sénescence. Ainsi nous pouvons supposer que le calcium peut permettre l'activation de NF- $\kappa$ B, comme cela a été décrit dans la littérature et que cela puisse induire l'expression des gènes cibles de NF- $\kappa$ B.

De plus, le calcium peut activer les facteurs de transcription CREB et NFAT, qui peuvent être eux aussi impliqués respectivement dans l'expression de facteurs du SASP ou de l'inflammation. Il serait alors intéressant d'étudier la localisation subcellulaire de ces facteurs par imagerie et observer s'il y a une potentielle relocalisation dans le noyau durant la sénescence. Ceci pourrait mettre en évidence de nouveaux régulateurs dépendants du calcium dans la régulation des facteurs du SASP durant la sénescence.

#### 1.2.2 Vésicules extracellulaires

Le calcium participe aussi à des processus cellulaires variés, comme la sécrétion de molécules *via* la formation de vésicules extracellulaires. Ces vésicules, formées par une bicouche lipidique, comportent des exosomes, des microvésicules et des corps apoptotiques et contiennent des biomolécules, tels des facteurs pro-inflammatoires, des lipides, de l'ARN, de l'ADN ou des miRNAs. Ils participent donc grandement aux échanges intercellulaires entre les cellules. Leurs implications dans la sénescence et ses effets paracrines sont de plus en plus montrées, comme cela a été décrit en introduction (Lehmann et al. 2008; Borghesan et al. 2019; Terlecki-Zaniewicz et al. 2019; Mensà et al. 2020; Wallis, Mizen, et Bishop 2020). De plus, le calcium a été décrit comme un régulateur du relargage des vésicules extracellulaires. Nous envisageons donc de regarder dans les HMEC en OIS (qui présentent un SASP peu décrit) la présence de ces vésicules extracellulaires dans le surnageant des cellules sénescents et de regarder si le tamponnage du calcium par la surexpression de CALB1 peut impacter la sécrétion de ces vésicules. Pour ce faire, nous allons regarder par Western-Blot le niveau protéique de protéines impliquées dans la formation des vésicules, telles Tsg101 et CD81. Il est aussi envisagé de regarder la potentielle présence de ces vésicules par microscopie électronique à transmission, qui est une méthode couramment utilisée pour les détecter.

Ainsi, dans nos contextes cellulaires il est possible que le calcium ne participe pas directement au maintien de l'arrêt de prolifération ou de la sénescence mais à l'expression et/ou à la sécrétion du SASP. Il serait alors intéressant de regarder la fonctionnalité des SASP et la sénescence paracrine médiée par ces SASP lors de la surexpression de CALB1. Ainsi, nous pourrions utiliser les SASP issus de cellules sénescents contrôles ou surexprimant CALB1 pour traiter le même ou d'autres types cellulaires afin d'étudier le potentiel impact sur l'induction de sénescence paracrine.

### 1.3 Importance du tamponnage calcique ?

L'ensemble des études réalisées jusqu'à présent sur le calcium et la sénescence décrivait l'importance de canaux calciques permettant certains flux calciques (Wiel et al. 2014; X. Ma et al. 2018; Ziegler et al. 2021; Farfariello et al. 2015). Ce projet est donc le premier à montrer l'induction de l'expression d'une protéine qui tamponne le calcium. Dans les HMEC, l'induction de l'expression de CALB1 a été retrouvée dans tous les modèles de sénescence où les niveaux de calcium étaient augmentés. Ainsi nous pensons que l'expression de CALB1 dans les HMEC permettrait de contrôler les niveaux de calcium afin d'éviter soit les effets cytotoxiques dû au calcium, soit l'activation de certaines voies de signalisation dépendantes du calcium.

Nos résultats suggèrent que CALB1 permettrait de tamponner le calcium durant l'OIS mais que les variations de ces niveaux de calcium ne sont pas suffisantes pour impacter le phénotype sénescents dans notre modèle.

Ce résultat est surprenant car une autre étude effectuée dans des cellules souches embryonnaires en sénescence induite par un stress oxydatif a montré une augmentation du niveau de calcium cytosolique (Borodkina et al. 2016a). Cette sénescence dépendante de la voie PLC/IP3/ITPR est révertée lors de l'utilisation d'un chélateur calcique chimique, le BAPTA-AM, et que cela contribue à la réversion de l'induction d'une réponse des dommages à l'ADN nécessaire à la mise en place de la sénescence. D'autre part dans une autre étude réalisée par l'équipe, l'augmentation des niveaux de calcium étaient aussi reliés à une augmentation des dommages à l'ADN (X. Ma et al. 2018). Ainsi, il semblerait que l'augmentation des niveaux de calcium pourrait contribuer à la formation de dommages à l'ADN nécessaires à l'induction de la sénescence. Dans notre modèle, il serait alors intéressant de regarder les niveaux des protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN, tel ATM, ATR ou 53BP1.

Puisque la diminution générale des niveaux de calcium durant l'OIS n'est pas suffisante pour réverter le phénotype sénescents, on peut s'interroger sur l'importance de l'augmentation globale des niveaux de calcium durant la sénescence dans notre

modèle. Ainsi, on peut se demander si une régulation plus fine des niveaux de calcium serait plus importante. En effet, comme mentionné en introduction, le calcium induit des réponses physiologiques en fonction de quatre paramètres : sa localisation (intracellulaire et intracytosolique) et l'amplitude, la durée et la fréquence de son signal. Lors de la surexpression de CALB1, nous ne savons pas quel paramètre nous avons impacté. Nous observons une diminution des niveaux de calcium, mais il est possible qu'un signal d'une certaine fréquence, amplitude et durée soit maintenu à une localisation intracellulaire particulière, ce qui permet le maintien de la sénescence. Il serait alors important de déterminer plus précisément les variations de ces paramètres. Par exemple, il peut être envisagé de faire des acquisitions longues (30 minutes) des niveaux de calcium dans le cytosol avec la sonde Fura2. Ainsi, nous pourrions comparer au niveau basal si nous observons des différences dans les pics de calcium observés au cours du temps. Cela nous donnerait une idée de la fréquence, de l'amplitude et de la durée des « pulses » de calcium durant la sénescence et lors de la surexpression de CALB1.

## **1.4 Importance du calcium du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie ?**

Dans les HMEC en OIS, nous n'avons pas réalisé une analyse fine de la localisation du calcium dans les organites intracellulaires, c'est-à-dire plus particulièrement dans le réticulum endoplasmique et dans la mitochondrie. Or il a été décrit que des changements dans les niveaux de calcium dans ces organites peuvent impacter la sénescence par différentes actions.

Au niveau du RE, le calcium est essentiel aux protéines chaperonnes, comme la calréticuline ou GRP78, impliquées dans le repliement des protéines. Des variations des niveaux de calcium dérèglent l'activité de ces protéines et induisent une réponse des protéines mal repliées et un stress du RE (Krebs, Agellon, et Michalak 2015; Carreras-Sureda, Pihán, et Hetz 2018). Il a été reporté dans différents contextes de sénescence l'activation de différentes voies impliquées dans le stress du RE (Blazanin et al. 2017; Yuan et al. 2017; T. Wang et al. 2016). De plus le stress du RE peut conduire à la génération de ROS (Carreras-Sureda, Pihán, et Hetz 2018; G.-H. Lee et al. 2007; Kiviluoto et al. 2013). Cette augmentation du stress RE et de la génération de ROS peut conduire à la sénescence cellulaire (Yuan et al. 2017). Ainsi nous pouvons nous demander si l'augmentation des ROS observée durant la sénescence dans certains contextes cellulaires peut aussi provenir d'un stress du réticulum médié par des variations des niveaux de calcium.

Au niveau de la mitochondrie, le calcium joue un rôle essentiel sur le plan énergétique et métabolique. Tout d'abord, le calcium est impliqué dans le bon

déroulement du cycle de Krebs en activant trois enzymes du cycle. Les enzymes  $\alpha$ -cétoglutarate- et isocitrate-déshydrogénase possèdent toutes deux des domaines « EF-hand » les rendant dépendantes du calcium et la pyruvate déshydrogénase est activée par une phosphatase dépendante du calcium (Denton 2009). Ainsi l'augmentation du calcium mitochondrial induit l'activation du cycle et la transformation des métabolites menant à la respiration mitochondriale (Denton 2009; Satrustegui, Pardo, et Del Arco 2007). De plus, il a été montré des changements métaboliques mitochondriaux durant la sénescence. En effet, la perturbation de la chaîne de transport d'électrons, l'augmentation du ratio AMP/ATP liée à l'activation de l'AMPK ainsi qu'une grande génération de ROS conduisent à la sénescence cellulaire (Moiseeva et al. 2009; Ziegler, Wiley, et Velarde 2015; Wiley et al. 2016). Le découplage de la chaîne de transport mitochondrial est aussi capable d'induire la sénescence dans des fibroblastes (Stöckl et al. 2007) et dans des HMEC (Wiel et al. 2014). A l'inverse, l'utilisation d'antioxydants est capable de réverter la sénescence induite par la formation de contacts RE-mitochondrie (Ziegler et al. 2021). Ainsi, la mitochondrie est un organite clé durant la sénescence, puisqu'une perturbation de ces fonctions énergétiques et/ou métaboliques peut conduire à la sénescence. Une variation du niveau de calcium mitochondrial peut impacter ces fonctions, il serait intéressant d'étudier leur niveau dans cet organite.

Ainsi, dans les HMEC en OIS il est prévu d'étudier plus précisément les niveaux de calcium dans le réticulum et la mitochondrie grâce aux sondes ratiométriques génétiques MITO-GECO (ciblée à la mitochondrie) et SEPIA-ER (ciblée au RE). Il serait alors aussi intéressant de réaliser une cinétique de ces niveaux de calcium afin d'étudier le dynamisme des flux calciques durant l'OIS. Cela nous informera sur les mécanismes calciques qui peuvent être à l'origine de la sénescence et si CALB1 les impacte.

## 1.5 Importance des canaux calciques ?

### 1.5.1 Importance des canaux calciques intracellulaires

Les précédentes études réalisées par l'équipe ont montré l'importance de canaux calciques situés au niveau de la mitochondrie et du réticulum. Notamment, le canal ITPR2, permettant le relargage du calcium du RE, et le canal mitochondrial MCU, induisant la recapture du calcium dans la mitochondrie sont nécessaires à l'induction de sénescence (Wiel et al. 2014; X. Ma et al. 2018; Ziegler et al. 2021). De plus, il a récemment été montré par l'équipe qu'ITPR2 est impliqué dans la formation de MAMs, zones de contacts permettant de faire le pont entre le RE et la mitochondrie. Ces zones permettent notamment le transfert du calcium du RE à la mitochondrie. La création artificielle de ces structures par un « linker » est capable d'induire la sénescence, démontrant le rôle essentiel de ces structures dans la sénescence (Ziegler et al. 2021).



Outre le transfert de calcium, les MAMs permettent aussi le passage d'autres biomolécules, tels que des ROS ou des lipides. L'implication des ROS dans l'induction de la sénescence a été largement décrite et celle de phospholipides commence à être montrée (György Csordás, Weaver, et Hajnóczky 2018a). Ainsi, nous pouvons nous demander si les canaux ITPRs et MCU, composants des MAMs, permettent aussi le transfert du RE à la mitochondrie d'autres biomolécules, comme les ROS, ce qui conduirait à l'induction de sénescence. Ainsi le calcium pourrait être vu comme un activateur de canaux dépendants du calcium qui ont aussi un rôle dans le transfert de biomolécules essentielles à l'induction de sénescence.

### 1.5.2 Importance des canaux de la membrane plasmique

Il a été montré que la dépolarisation de la membrane plasmique était importante dans l'induction de sénescence (Lallet-Daher et al. 2013; Warnier et al. 2018). Certains canaux membranaires calciques, les VOCs, en induisant l'entrée du calcium dans le cytosol sont aussi capables d'induire une dépolarisation de la membrane plasmique, mais leur potentiel rôle durant la sénescence n'a pas encore été établi. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'expression ou l'activité de certains de ces canaux.

De plus, l'équipe a montré l'importance des canaux membranaires potassique KCNA1 et sodique SCN9A durant la sénescence (Lallet-Daher et al. 2013; Warnier et al. 2018). Ces canaux sont surexprimés durant la sénescence et leur invalidation conduit à la réversion de l'induction de sénescence durant l'OIS. Leur expression est associée à la dépolarisation de la membrane plasmique et l'induction de sénescence. Ces études démontrent au-delà des canaux calciques, l'importance d'autres types de canaux ioniques : potassiques et sodiques. Ainsi, d'une manière générale, il serait intéressant d'étudier durant la sénescence l'ensemble de la régulation des flux ioniques.

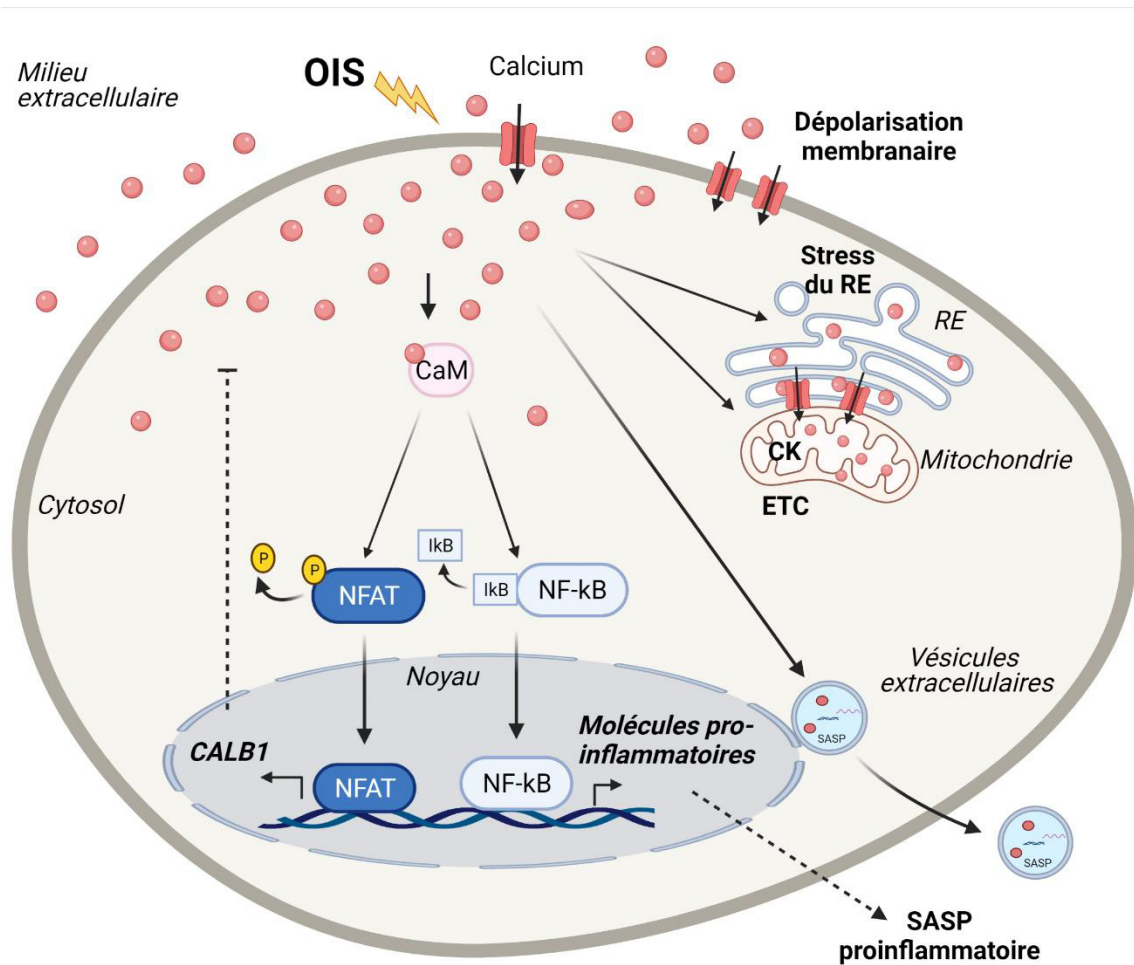
Il est possible que durant la sénescence le calcium n'agisse pas directement en tant que messenger secondaire, mais « seulement » en tant qu'ion, qui génère des influx électrochimiques et une dépolarisation de la membrane capable d'induire la sénescence cellulaire.

Pour le moment, un ensemble d'études a montré l'augmentation des niveaux de calcium durant la sénescence. Cependant le lien fonctionnel entre niveaux de calcium et sénescence reste encore clairement à déterminer. En effet, le calcium par ses propriétés physiques et qualités de second messenger peut jouer différents rôles au sein de la cellule et il est difficile d'incriminer un seul effet (dépolarisation de membranes, génération de ROS, activation de voies métaboliques, stress du RE, ...). De

plus, ces effets peuvent être médiés par d'autres acteurs (canaux potassique ou sodique, lipides, ...), ainsi la part du calcium dans ces effets reste discutable.

Cependant, il devient de plus en plus évident que l'altération des niveaux de calcium (cytosolique ou dans les organites) est retrouvée dans beaucoup de contextes de sénescence et pourrait être considérée comme une caractéristique de sénescence.

Au-delà des niveaux de calcium (cytosolique/mitochondrial/réticulaire), il est important de prendre en considération l'ensemble des effets moléculaires que peut engendrer le calcium : génération de dépolarisation de membranes, activation de voie de signalisation conduisant à l'expression de gènes cibles ou de différents processus biologiques. Ainsi pour mieux comprendre l'ampleur du rôle du calcium durant la sénescence, il serait intéressant de regarder dans la globalité ce qu'il peut impacter au sein de la cellule : l'activation de canaux calciques (membranaires ou des organites intracellulaires), les potentiels de membranes générés, l'expression de protéines tamponnant le calcium ou dépendantes du calcium ou l'activité de facteurs de transcription activés par le calcium. Ce travail considérable pourrait ainsi donner de véritables cartes calciques en fonction de l'état de la cellule. Elles pourraient ainsi peut-être expliquer les différences entre des processus cellulaires bien différents, étant impactés par des variations de niveau de calcium, par exemple entre sénescence et apoptose.



**Figure 25. Potentiels rôles de l'augmentation du calcium cytosolique dans les HMEC en OIS.**

L'augmentation du calcium cytosolique durant l'OIS pourrait permettre d'activer la translocation du facteur de transcription NFAT1c au noyau, induisant l'expression de CALB1, qui tamponne le calcium. En parallèle, le calcium pourrait aussi activer la CaMKII et la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau et l'expression des gènes cibles pro-inflammatoires et ainsi participer à l'expression du SASP. Le calcium pourrait aussi participer à la formation et sécrétion de vésicules extracellulaires, autres composants du SASP. Durant l'OIS, le calcium peut aussi participer au bon fonctionnement du cycle de Krebs (CK) et à la respiration mitochondriale grâce à la chaîne de transport d'électrons (ETC). Une augmentation trop importante des niveaux de calcium dans le RE pourrait induire un stress du RE induisant ou maintenant la sénescence.

## 1.6 Autres rôles de CALB1 durant la sénescence

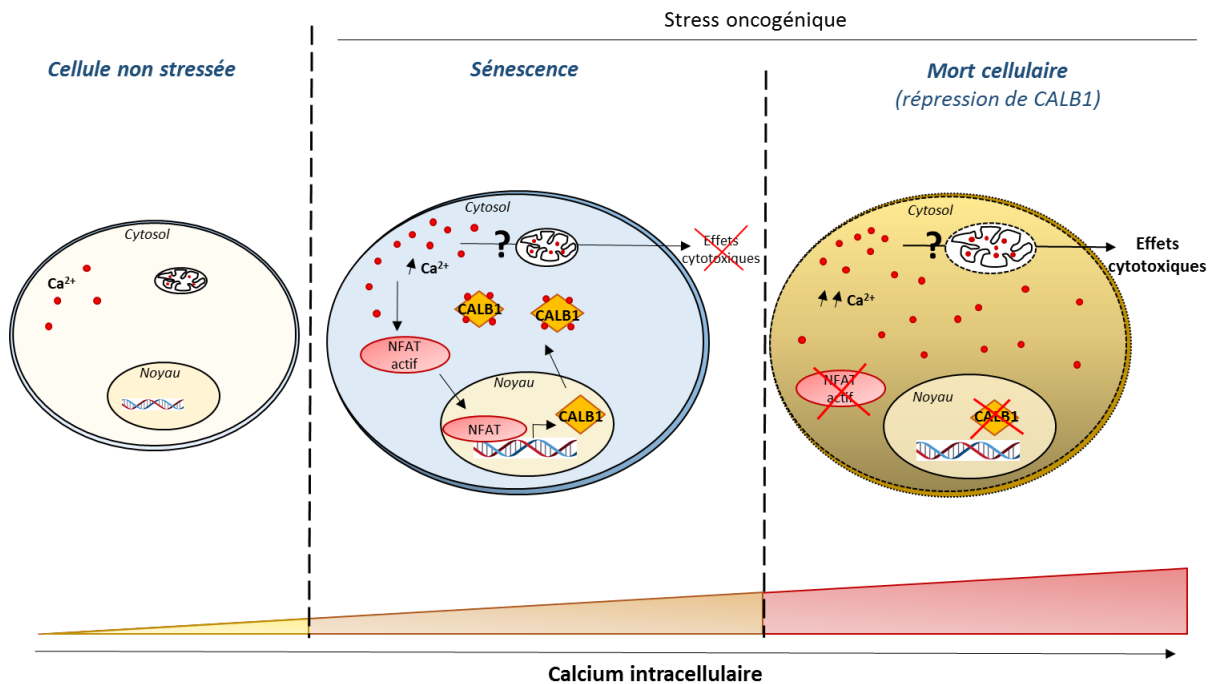
### 1.6.1 CALB1 et mort cellulaire

Comme il a été décrit en introduction, une trop forte concentration de calcium participe à la mort cellulaire, d'une part en précipitant avec le phosphate et d'autre part en activant des voies de signalisation pro-apoptotiques ou autophagiques. CALB1 en tamponnant et en évitant une trop forte concentration de calcium cytosolique protège de la mort cellulaire (K. Liu et al. 2020; Mattson, Chu, et Christakos, s. d.; Bellido 2000; Christakos et Liu 2004). De plus, CALB1 interagit de manière dépendante du calcium avec des protéines impliquées dans l'apoptose, ce qui conduit à l'inhibition de la mort cellulaire. Notamment, après fixation avec le calcium CALB1 peut interagir avec et inactiver la caspase 3 (Bobay et al. 2012), protéine clé dans le processus d'apoptose. Cette inhibition d'activité aboutit à la réversion de l'apoptose dans des ostéoblastes surexprimant CALB1 (Bellido 2000).

Afin d'analyser le potentiel rôle anti-apoptotique de CALB1 durant la sénescence, nous avons essayé d'utiliser dans les HMEC en OIS des short-hairpin RNA dirigés contre CALB1 pour invalider son expression et étudier les niveaux de calcium cytosolique et dans les stocks intracellulaires ainsi que le phénotype associé. Malheureusement les expériences réalisées avec les collaborateurs sur les niveaux de calcium ne permettent pas de conclure sur les niveaux de calcium durant la sénescence en absence de CALB1. Concernant le phénotype associé, nous restons mitigés quant aux résultats obtenus. Tout d'abord, le phénotype sénescence après activation de l'oncogène Mek:ER dans les HMEC n'était pas toujours bien établi. Ceci peut être dû à la fuite de l'oncogène Mek au niveau basal qui peut conduire à une adaptation des cellules en culture et à une moins bonne activation de la sénescence après ajout de tamoxifène (4-OHT). De plus, les outils rétro- et lentiviraux utilisés n'étaient pas toujours efficaces et le knock-down de CALB1 n'était pas toujours maîtrisé. Ainsi, il a été difficile d'avoir des conditions expérimentales optimales. Néanmoins, dans quelques expériences préliminaires, nous avons observé une diminution de la densité cellulaire pendant l'OIS en absence de CALB1 qui était corrélée à une augmentation de la mort cellulaire, observée au bleu de trypan. Ainsi l'augmentation de l'expression de CALB1 durant la sénescence pourrait jouer un rôle cytoprotecteur. Pour le moment, nous ne pouvons pas conclure sur une potentielle augmentation des niveaux de calcium durant l'OIS lors du knock-down de CALB1 et des effets phénotypiques associés. Nous souhaiterions donc utiliser une approche CRISPR/Cas-9 afin d'invalider CALB1 dans notre modèle.

L'hypothèse formulée ici serait que l'augmentation du calcium cytosolique pendant la sénescence serait aussi contrôlée par des protéines tamponnant le calcium, telle CALB1, dont l'expression serait activée par une voie de signalisation elle-même dépendante du calcium, la voie calcineurine/NFAT, afin d'effectuer une boucle de

rétrocontrôle sur les niveaux de calcium et éviter les effets cytotoxiques du calcium (**Figure 26**).



**Figure 26. Schéma du potentiel rôle cytoprotecteur de CALB1 comme tampon calcique lors de l'OIS.**

Lors de la sénescence induite par un oncogène, l'augmentation du calcium intracellulaire induit l'activation du facteur de transcription NFAT qui induit l'expression de CALB1, chélateur calcique. CALB1 permettrait alors de tamponner le calcium intracellulaire. Lorsque l'expression de CALB1 est réprimée, la cellule est amenée vers la mort cellulaire. Lors de l'OIS, CALB1 permettrait donc de protéger la cellule d'une trop forte augmentation de calcium intracellulaire et des effets cytotoxiques qui lui sont associés.

## 1.6.2 CALB1 en tant que senseur calcique durant la sénescence

CALB1 a été décrit comme un senseur calcique, c'est-à-dire que le changement conformationnel induit par la fixation du calcium permet à CALB1 d'interagir avec d'autres partenaires, notamment des protéines impliquées dans la signalisation calcique ou l'apoptose.

Récemment une étude a démontré un lien entre CALB1 et la sénescence. L'expression de CALB1 est augmentée dans des cellules cancéreuses ovariennes et la surexpression de CALB1 conduit à la prolifération et formation de colonies de ces cellules cancéreuses (L.-Q. Cao et al. 2019). CALB1 inhibe la sénescence en diminuant les niveaux de p21<sup>CIP1</sup> et de p27. Ceci est expliqué par le fait que CALB1 interagit avec MDM2, ce qui favorise son interaction avec p53 et conduit ainsi à sa dégradation et à

la diminution de l'expression de ses gènes cibles, comme p21<sup>CIP1</sup>. La diminution de l'expression de ces CKIs conduit donc à la réversion de l'induction de la sénescence. Cette étude a été la première à démontrer un rôle fonctionnel de CALB1 durant la sénescence mais n'a pas démontré un lien avec le calcium. Dans les HMEC en OIS nous n'observons pas cet effet. L'OIS dans les HMEC est induite par des mécanismes encore mal compris. En effet, la méthylation du promoteur de p16<sup>INK4a</sup> empêche l'expression de cette CKI et le rôle de p53 dans l'induction de la sénescence dans ce modèle cellulaire est encore controversé. Ainsi, la déstabilisation de p53 observée dans l'étude de Cao et al., n'est peut-être pas retrouvée dans notre modèle ou n'impacte pas la sénescence qui n'est pas dépendante de p53.

Ainsi, CALB1 joue un rôle dans la réponse cellulaire au calcium aussi en induisant des signalisations cellulaires dépendantes du calcium et il pourrait être intéressant d'analyser les partenaires protéiques de CALB1 dans nos modèles afin de déterminer son rôle physiologique.

Grâce à ce projet, nous avons pu déterminer que les niveaux de calcium étaient augmentés dans plusieurs types de sénescence dans des cellules épithéliales mammaires. En parallèle, nous avons observé que l'expression de CALB1, un senseur calcique, était elle aussi induite. CALB1, dont l'expression est régulée par une voie dépendante de calcium, la voie calcineurine/NFAT, permettrait de tamponner les niveaux de calcium lors de l'OIS mais le rôle précis de la régulation des niveaux de calcium reste encore à déterminer. Des approches de CRISPR-Cas9 sont envisagées afin d'invalider CALB1 pour étudier son effet. Les niveaux de calcium dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie vont être étudiés en présence et/ou en absence de CALB1 afin de déterminer la dynamique des flux calciques dans ce modèle. Enfin, nous avons commencé à décrire que la surexpression de CALB1 et potentiellement la diminution de calcium pourrait impacter l'expression et/ou la sécrétion du SASP pro-inflammatoire. Nous prévoyons d'étudier si la sécrétion de vésicules extracellulaires est aussi impactée lors de la surexpression de CALB1. Cela permettrait de potentiellement déterminer de nouveaux régulateurs, le calcium et CALB1, du SASP et éventuellement des effets sur la sénescence paracrine médiée par le SASP.



## 2 Chapitre 2 : SASP, calcium et différenciation neuroendocrine

---

Dans cette deuxième étude, nous avons déterminé un rôle inattendu du SASP : celui d'induire de la transdifférenciation neuroendocrine dans des cellules cancéreuses mammaires et prostatiques, positives pour le récepteur aux hormones (HR +) et p53 sauvage. Plus particulièrement, nous avons démontré que seul un SASP riche en molécules pro-inflammatoires était capable d'induire cette différenciation et que des niveaux élevés de calcium participaient au phénotype.

### 2.1 Signalisation calcique et différenciation neuroendocrine

#### 2.1.1 Rôle du calcium contenu dans les stocks intracellulaires ?

Nous avons observé que le niveau de calcium mitochondrial était augmenté tandis que celui du réticulum endoplasmique n'était pas altéré lors de la NED dans les MCF-7. La majorité des études sur les acteurs calciques durant la NED ont été réalisées dans des LNCaP et ont démontré l'importance des canaux calciques sans étudier directement les niveaux de calcium, il serait alors intéressant d'examiner si l'augmentation des niveaux de calcium cytosolique et mitochondrial après traitement au SASP est un mécanisme retrouvé aussi dans les cellules cancéreuses prostatiques, LNCaP.

D'autre part, durant la NED, il est possible que l'augmentation du niveau de calcium dans le cytosol soit due à l'augmentation de l'expression et à l'activité de certains canaux calciques de la membrane plasmique, comme cela a été suggéré dans des lignées prostatiques (Mariot et al. 2002; Gackière et al. 2008). Nous avons aussi examiné le niveau d'expression de CALB1 lors de la transdifférenciation neuroendocrine des MCF-7. De manière intéressante il est diminué à des temps courts. Ceci suggère qu'une diminution du pouvoir de tamponnage calcique par CALB1 pourrait aussi être à l'origine de l'augmentation des niveaux de calcium.

L'augmentation du calcium cytosolique pourrait être suivie par l'accumulation du calcium dans la mitochondrie afin de maintenir une certaine homéostasie calcique. Il serait alors intéressant d'examiner la cinétique d'induction des niveaux de calcium dans le cytosol et la mitochondrie. Enfin, il serait aussi possible de déterminer si l'augmentation du calcium mitochondrial est nécessaire au phénotype neuroendocrine, pour cela nous pourrions utiliser un siRNA dirigé contre MCU (canal calcique permettant l'entrée de calcium dans la mitochondrie) ou VDAC1 et étudier l'impact sur la différenciation neuroendocrine.



### 2.1.2 Régulation du calcium lors de la différenciation neuroendocrine

Pour le moment, nous n'avons pas démontré par quels mécanismes le calcium cytosolique et mitochondrial étaient augmentés. Il a été montré que différents éléments du SASP permettent d'activer une signalisation calcique de différentes manières. Tout d'abord, il est possible que certains éléments du SASP activent directement des canaux calciques membranaires et permettent l'entrée du calcium extracellulaire dans le cytosol. Il a jusqu'à maintenant été montré une augmentation de l'expression et de l'activité de certains canaux voltage-dépendant de type T (Hall et al., s. d.; Gackière et al. 2008; Mariot et al. 2002) et que cela participait à la sécrétion des cellules neuroendocrines d'une manière dépendante du calcium (Gackière et al. 2008; Monet et al. 2010). Pour le moment, aucune étude n'a démontré l'implication de canaux dépendants de ligands (« Receptor-Operated Channels », ROC), qui pourraient être activés par des molécules contenues dans le SASP.

Il a récemment été montré que le récepteur de calcium extracellulaire (« Calcium-Sensing Receptor », CaSR) un récepteur de surface couplée à la protéine G, est impliqué dans la différenciation neuroendocrine dans des lignées cellulaires de cancer de la prostate (PCa) en différenciation neuroendocrine (Bery et al. 2020). Ce récepteur est caractérisé par un domaine extracellulaire pouvant lier différents ligands incluant le calcium et l'IL-6 (Hannan et al. 2018) et participe à l'homéostasie calcique. Dans les PCa, CaSR a été décrit comme médiateur des effets du calcium sur la prolifération cellulaire et la progression tumorale (Bernichtein et al. 2017). Son expression dans des tissus humains de différents types de cancer de la prostate est associée à l'expression de marqueurs neuroendocrines. Son knock-down dans d'autres lignées prostatiques cancéreuses conduit à la diminution de l'expression de NEM (Bery et al. 2020). Ainsi, il est possible que l'IL-6 contenu dans le SASP puisse activer CaSR, impliqué dans l'homéostasie calcique, et participe à la différenciation neuroendocrine.

### 2.1.3 Voies de signalisation calcium dépendantes et NED

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, nous savons que le calcium est impliqué dans l'activation de nombreuses voies de signalisation. Durant la NED des MCF-7, nous avons donc cherché à identifier quelles voies de signalisation dépendantes du calcium étaient activées. Dans des LNCaP, le facteur de transcription NFAT est activé à la suite de l'augmentation de calcium et cela contribue à la prolifération cellulaire (Lehen'Kyj et al. 2007). Dans notre modèle, nous avons donc testé l'inhibition pharmacologique de l'activation de l'ensemble des membres de la famille NFAT, par le FK-506 ou la cyclosporine A, ou de la surexpression de NFAT1c sur la différenciation neuroendocrine. Cependant, nos données préliminaires ne reportent

pas d'effets sur le phénotype neuroendocrine ou l'expression des NEM, suggérant que cette voie n'est pas impliquée dans la NED des MCF-7 en réponse au SASP.

D'autre part, les facteurs de transcription CREB ou STAT3 peuvent être impliqués dans la NED de cellules cancéreuses prostatiques (Suarez, Deng, et Hu 2014; Spiotto et Chung, s. d.). Malheureusement, comme nous l'avons observé dans la **Figure 22**, l'inactivation de CREB ou d'autres membres de la famille ATF n'impacte pas le phénotype neuroendocrine. Comme les facteurs CREB et ATFs appartiennent à la même super famille, il est possible que nous devions utiliser une combinaison de plusieurs siRNAs afin d'inhiber la transcription des gènes cibles de ces facteurs de transcription. De plus, certains de ces facteurs, comme ATF2, sont connus pour être aussi des répresseurs; notamment l'expression constitutive d'une forme nucléaire d'ATF2 réprime l'induction de la différenciation neuroendocrine (Deng et al. 2008). En parallèle, nous prévoyons d'utiliser la même approche de siRNA dirigés contre STAT3.

Il est aussi possible que les mécanismes d'induction de la NED dans les tumeurs de patientes ne soient pas les mêmes que ceux observés *in vitro* dans la lignée cellulaire MCF-7 en transdifférenciation neuroendocrine, ce que je détaillerai un peu plus loin.

## 2.2 Quel lien entre NED, sénescence cellulaire et vieillissement ?

De manière intéressante, nous avons observé que la NED est associée à l'induction de la sénescence cellulaire dans les MCF-7. Il est intéressant de noter que ces deux phénotypes, sénescence et différenciation neuroendocrine, possèdent des caractéristiques communes telle une résistance à l'apoptose, un arrêt de prolifération et des acteurs moléculaires similaires, comme p21<sup>CIP1</sup> (Kanayama et al. 2017). Nous nous sommes donc demandé si ces phénotypes étaient interdépendants dans notre contexte.

Nous avons alors comparé la cinétique d'induction des deux phénotypes : la sénescence et la morphologie « neurite-like » dans les MCF-7 traitées au SASP. Nous avons remarqué un changement de morphologie dès 3 jours après un traitement au SASP : les cellules s'élargissent et s'étalent, possèdent plus de vacuoles intracellulaires et certaines sont multinuclées. Ces observations phénotypiques semblent s'apparenter aux caractéristiques morphologiques des cellules sénescents, cependant l'activité SA- $\beta$ -Gal reste faible à ce temps-ci. De plus, les marqueurs neuroendocrines (SCG2 et CHGB), ainsi que les molécules proinflammatoires, IL-6 et IL-8, sont déjà exprimés. Après 6 jours, nous observons l'induction très claire du phénotype « neurite-like » ainsi que l'augmentation de l'activité SA- $\beta$ -Gal. De plus, dans les MCF-7 la réversion de l'induction de la NED lors de la surexpression de CALB1 est accompagnée par une

diminution de l'activité SA- $\beta$ -Gal et de l'expression d'IL-6 et d'IL-8. Tout d'abord, ces observations suggèrent que l'induction des marqueurs moléculaires neuroendocrines précède celle du phénotype « neurite-like » et enfin que la transdifférenciation neuroendocrine et la sénescence semblent être deux phénomènes cellulaires ayant la même synchronicité.

Pour le moment, nous n'avons pas déterminé précisément les effecteurs de la NED dans les MCF-7 ; si nous y parvenons, nous pourrions utiliser un siRNA dirigé contre ce(s) régulateur(s) clé(s) afin d'inhiber l'induction de la NED et regarder l'impact sur la sénescence dans les MCF-7. Ou inversement nous allons réaliser un knock-down de régulateurs potentiels de la sénescence dans ce contexte (siRNA dirigés contre p53 et p21<sup>CIP1</sup>) et étudier les conséquences sur 1) la sénescence et 2) le phénotype neuroendocrine.

Pour étudier le lien entre NED et sénescence au sein de l'organisme, nous avons comparé l'expression de marqueurs de sénescence dans les tumeurs NBC comparés à l'ensemble des tumeurs lumineales. Hormis une diminution de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 et l'augmentation d'expression de SPYRT2, marqueur du SASP, nous n'avons détecté aucune différence d'expression sur d'autres marqueurs de sénescence. Les niveaux de p21<sup>CIP1</sup>, p16<sup>INK4a</sup> et de marqueurs pro-inflammatoires, tels IL-6, IL-8, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  restent similaires. Ces données suggèrent que même si le pourcentage de tumeurs NBC augmentent au cours du vieillissement, ces cellules tumorales ne sont pas elles-mêmes sénescents. Cependant, il est envisageable que les cellules environnantes de la tumeur soient devenues sénescents au cours du vieillissement et qu'elles contribuent *via* leur SASP à la (trans-)différenciation des cellules tumorales. Des données transcriptomiques issues de cellules stromales associées à celles des tumeurs mammaires correspondantes pourraient nous permettre de répondre à cette question.

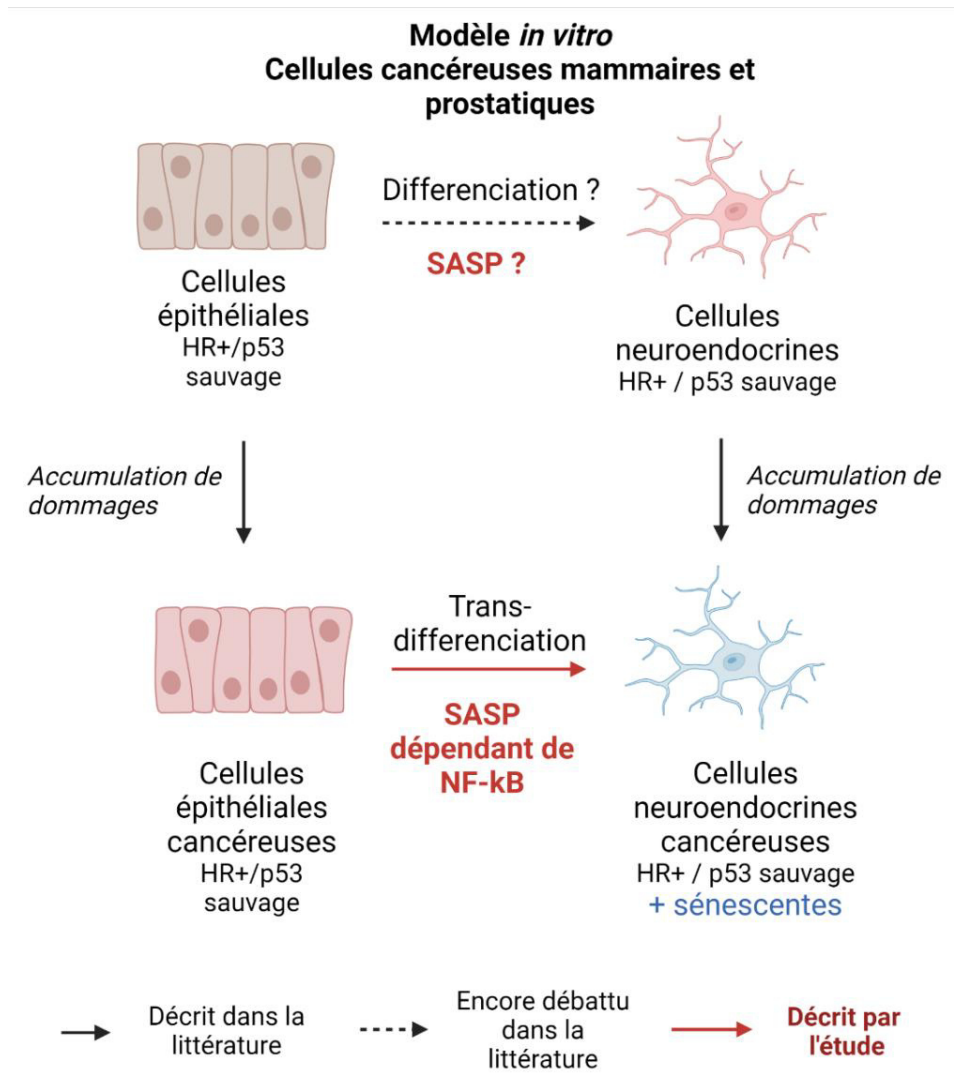
De part ces analyses, nous pouvons penser que même si la transdifférenciation neuroendocrine est associée à la sénescence cellulaire *in vitro* dans des lignées cancéreuses mammaires, les cellules des tumeurs mammaires neuroendocrines elles-mêmes ne sont pas sénescents. Ainsi cette observation soulève des différences moléculaires entre les cellules cancéreuses transdifférenciées par le SASP et les cellules tumorales des NBC, que nous allons développer dans la prochaine partie.

## 2.3 Transdifférenciation de lignées tumorales et tumeurs neuroendocrines : même phénotype ?

Dans notre modèle, nous avons décrit l'effet du SASP dans des cellules déjà transformées (MCF-7 pour le sein et LNCaP pour la prostate), nous avons donc parlé de transdifférenciation neuroendocrine. Cependant, il a été décrit dans certains types

cellulaires que des cellules normales pouvaient subir une différenciation neuroendocrine pour devenir neuroendocrines. Ces deux chemins de différenciation sont distincts et pourraient conduire à des caractéristiques phénotypiques ou cliniques distinctes. Comme il a été mentionné en introduction, l'origine des tumeurs neuroendocrines mammaires est encore débattue. Les questions restantes à notre étude sont donc si le SASP est capable d'induire une différenciation dans des cellules normales mammaires et à plus large échelle si les cellules tumorales des NBC sont d'abord passées par un stade neuroendocrine puis cancéreux, ou cancéreux puis neuroendocrine (**Figure 27**). Ce projet pourrait conduire à une meilleure compréhension des événements conduisant à ce sous-type de cancers du sein.

Nous avons donc traité des cellules épithéliales normales mammaires (HMEC et MCF10A) avec le SASP des fibroblastes en sénescence. Nos résultats préliminaires n'ont pas montré d'effets au niveau phénotypique ou moléculaire du SASP sur ces cellules. Cependant, les HMEC et MCF10A ne sont pas positives au récepteur à l'œstrogène à l'inverse des MCF-7 et des cellules tumorales des NBC. De plus, les études sur les tumeurs neuroendocrines mammaires les décrivent comme ER+, suggérant le rôle de ce récepteur sur le phénotype neuroendocrine. Certaines voies non génomiques du récepteur à l'œstrogènes affectent des voies de signalisation intracellulaire dépendantes du calcium. Nous avons donc prévu de surexprimer l'ER $\alpha$  dans les HMEC ou MCF10A même si cela peut induire un arrêt de prolifération des cellules et étudier leur réponse au traitement au SASP. Toutefois, si le traitement au SASP n'induit pas de différenciation neuroendocrine dans ces cellules, cela pourrait supposer que le phénotype neuroendocrine apparaît seulement dans des cellules cancéreuses, comme le suggèrent quelques études cliniques.



neuroendocrine dans les MCF-7. Ces résultats suggèrent que ces phénotypes semblent distincts.

Dans des tumeurs prostatiques, le phénotype neuroendocrine est associée à un moins bon pronostique pour le patient (Zhang et al. 2018) mais cet effet dans les tumeurs neuroendocrines mammaires reste débattu. Cependant, dans notre modèle *in vitro*, les MCF-7, cellules tumorales mammaires arrêtent de proliférer sous l'action du SASP. De plus, grâce aux analyses des données METABRIC, nous avons remarqué que les patientes présentant des NBC présentaient une expression de Ki67, marqueur de prolifération, plus faible et une plus faible proportion de tumeurs de grade 3, suggérant que les tumeurs mammaires avec des propriétés neuroendocrines sont moins agressives. Le phénotype neuroendocrine pourrait donc être associé à un meilleur pronostique dans le cadre du cancer du sein, à l'inverse de celui de la prostate. Pour compléter ces études, il serait intéressant d'étudier l'effet du SASP *in vivo*, en utilisant un modèle murin. Il serait alors possible dans une cohorte de souris de réaliser des xénogreffes de cellules cancéreuses MCF-7 dans des souris NMRI et après établissement de la tumeur injecter du SASP concentré en intrapéritonéal pendant plusieurs semaines. Nous pourrions alors comparer en temps final l'induction de marqueurs neuroendocrines à la fois dans la tumeur et dans les glandes mammaires saines (en ARN et IHC), ainsi que suivre l'évolution de la prise tumorale entre les souris traitées par un contrôle ou le SASP.

Ce projet nous a permis d'identifier un nouvel effet du SASP, et plus particulièrement des molécules dépendantes de NF- $\kappa$ B : celui d'induire de la transdifférenciation neuroendocrine dans des cellules cancéreuses mammaires et prostatiques. Si l'ensemble des effecteurs et régulateurs restent encore à déterminer, nous avons suggéré que l'augmentation des niveaux de calcium était nécessaire à l'induction de ce phénotype.

De plus, en utilisant les données génomiques et cliniques d'un large panel de patientes atteintes de cancer du sein, nous avons classé en sous-type les tumeurs neuroendocrines mammaires (NBC) sur la base de l'expression de quatre marqueurs neuroendocrines. Ces tumeurs étaient toutes positives pour l'ER et présentent majoritairement un p53 sauvage, comme indiqué dans la littérature. De manière intéressante ces tumeurs NBC étaient majoritairement retrouvées chez des patientes plus âgées, suggérant que l'accumulation des cellules sénescents et du SASP au cours du vieillissement puisse induire la formation de tumeurs NBC. L'origine des NBC reste encore aujourd'hui à élucider. Notre étude, en dénotant quelques différences

moléculaires entre les tumeurs NBC et la lignée tumorale MCF-7 transdifférenciée, suggère des mécanismes de différenciation distincts. Néanmoins, il serait actuellement important de valider nos observations *in vivo* dans un modèle murin et d'élargir le sous-type de tumeurs NBC à d'autres données de patientes.

Ainsi, ce projet permet non seulement de révéler un nouvel effet du SASP dans la biologie du cancer, mais apporte aussi de nouvelles connaissances sur les mécanismes à l'origine des tumeurs neuroendocrines mammaires, peu étudiées. Ainsi, cela pourrait permettre une meilleure compréhension du comportement de ce sous-type de cancers du sein, et surtout potentiellement amener de nouveaux biomarqueurs afin d'identifier ce sous-type plus facilement en clinique.

**- CONCLUSION  
GÉNÉRALE -**





## CONCLUSION GÉNÉRALE

---

Ces deux projets m'ont permis de mettre en avant l'importance du calcium dans la sénescence cellulaire et ses effets paracrines. Ils renforcent l'idée que le calcium est un second messenger indispensable à beaucoup (si ce n'est tous) les processus cellulaires et biologiques. Cependant les mécanismes permettant l'induction de l'augmentation des niveaux de calcium ou les voies de signalisation activées à la suite de cette augmentation sont encore à déterminer précisément dans ces projets.

Notamment, nous avons pu soulever l'importance de la régulation calcique dans les processus biologiques étudiés, à savoir lors de la sénescence cellulaire et de la transdifférenciation neuroendocrine. Si l'importance des flux calciques *via* l'activation de canaux calciques avaient déjà été déterminée dans ces processus, ce sont les premières études démontrant le rôle de la capacité de tamponnage du calcium. J'ai démontré que CALB1, senseur calcique, permettait de réguler les niveaux de calcium durant l'OIS et dans les effets paracrines du SASP.

En effet dans mon premier projet, j'ai entrouvert le rôle du calcium et son homéostasie par CALB1, induit par une voie dépendante du calcium, dans la génération de SASP pro-inflammatoire lors de l'OIS, les suggérant comme de nouveaux régulateurs du SASP. Dans le second projet, j'ai déterminé un nouveau rôle inattendu du SASP, à savoir la transdifférenciation neuroendocrine dans des cellules cancéreuses. Ce phénotype apparaît comme dépendant du calcium.

Outre l'importance calcique, mon deuxième projet apporte de nouvelles connaissances sur les tumeurs neuroendocrines mammaires, peu étudiées. Même si les mécanismes induisant la (trans-?)différenciation neuroendocrine dans les tumeurs mammaires restent incompris, notre étude suggère un lien entre vieillissement et augmentation des tumeurs neuroendocrines mammaires, qui semblent moins agressives que les autres tumeurs luminales.

Ces deux projets s'ajoutent à d'autres études dénotant l'importance du calcium et des flux calciques durant la sénescence, suggérant que l'augmentation des niveaux de calcium et qu'une signature calcique pourrait être une nouvelle caractéristique de la sénescence. Une meilleure compréhension des mécanismes calciques mis en jeu durant la sénescence ou lors des effets paracrines pourrait permettre de développer de nouveaux sénolytiques ciblant spécifiquement les signalisations calciques nécessaires à l'induction de la sénescence afin d'éviter les effets délétères des cellules sénescents comme lors du vieillissement ou dans le cas de cancers.



## LISTE des PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS ORALES

---

### **Publications :**

MA X, WARNIER M, **RAYNARD C**, FERRAND M, KIRSH O, DEFOSSEZ PA, MARTIN N, BERNARD D. The nuclear receptor RXRA controls cellular senescence by regulating calcium signaling. *Aging Cell*. 2018 Dec ;17(6):e12831.

**RAYNARD C**, MA X, HUNA A, TESSIER N, FLAMAN J-M, GOEHRIG D, MEDARD J-J, VINDRIEUX D, TREILLEUX I, HERNANDEZ-VARGAS H, DUCREUX S, MARTIN N and BERNARD D. The NF- $\kappa$ B-dependent secretome of senescent cells can trigger neuroendocrine transdifferentiation of breast cancer cells.

*En révision chez AgingCell*

### **Communications orales :**

#### **Posters :**

- 5<sup>ème</sup> journée du CRCL, Lyon, juin 2018 : 1<sup>er</sup> prix Communication Poster

*Role of calcium buffering by CALB1 in regulating Oncogene-Induced Senescence*

- Journées de l'Ecole Doctorale BMIC, novembre 2020 :

*The NF- $\kappa$ B-dependent secretome of senescent cells can trigger neuroendocrine transdifferentiation of breast cancer cells.*



**- ANNEXE -**





## The nuclear receptor RXRA controls cellular senescence by regulating calcium signaling

Xingjie Ma<sup>1</sup> | Marine Warnier<sup>1</sup> | Clotilde Raynard<sup>1</sup> | Mylène Ferrand<sup>1</sup> |  
Olivier Kirsh<sup>2</sup> | Pierre-Antoine Defossez<sup>2</sup> | Nadine Martin<sup>1,\*</sup> | David Bernard<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Inserm U1052, CNRS UMR 5286, Centre Léon Bérard, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup>Epigenetics and Cell Fate, Sorbonne Paris Cité, CNRS UMR 7216, Université Paris Diderot, Paris, France

### Correspondence

David Bernard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 28 rue Laennec, Lyon 69373, France.  
Email: david.bernard@lyon.unicancer.fr

### Funding information

Fondation ARC; China Scholarship Council; Fondation de France; Ligue Nationale Contre le Cancer

### Abstract

Calcium signaling is emerging as a key pathway controlling cellular senescence, a stable cell proliferation arrest playing a fundamental role in pathophysiological conditions, such as embryonic development, wound healing, cancer, and aging. However, how calcium signaling is regulated is still only partially understood. The inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 2 (ITPR2), an endoplasmic reticulum calcium release channel, was recently shown to critically contribute to the implementation of senescence, but how ITPR2 expression is controlled is unclear. To gain insights into the regulation of ITPR2 expression, we performed an siRNA screen targeting 160 transcription factors and epigenetic regulators. Interestingly, we discovered that the retinoid X receptor alpha (RXRA), which belongs to the nuclear receptor family, represses ITPR2 expression and regulates calcium signaling through ITPR2 and the mitochondrial calcium uniporter (MCU). Knockdown of RXRA induces the production of reactive oxygen species (ROS) and DNA damage via the ITPR2-MCU calcium signaling axis and consequently triggers cellular senescence by activating p53, whereas RXRA overexpression decreases DNA damage accumulation and then delays replicative senescence. Altogether, our work sheds light on a novel mechanism controlling calcium signaling and cellular senescence and provides new insights into the role of nuclear receptors.

### KEYWORDS

calcium, ITPR2, nuclear receptor, p53, senescence

## 1 | INTRODUCTION

Cellular senescence is a permanent cell proliferation arrest induced in response to a wide variety of stresses, including telomere shortening, oxidative stress, DNA damage, and strong mitogenic signals. Senescent cells are mainly characterized by a stable cell cycle arrest and the appearance of features such as senescence-associated- $\beta$ -

galactosidase activity (SA- $\beta$ -Gal) and senescence-associated secretory phenotype (SASP; Kuilman, Michaloglou, Mooi, & Peeper, 2010). Senescence plays a key role in many pathophysiological contexts, such as embryonic development, wound healing, cancer, and aging (He, & Sharpless, 2017). Understanding how senescence is controlled at the molecular and cellular level is therefore crucial. The senescence-associated cell cycle arrest is mainly induced by p53 and its downstream target p21, by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 and ultimately by RB which represses pro-proliferative E2F

\*These authors contributed equally.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2018 The Authors. *Aging Cell* published by the Anatomical Society and John Wiley & Sons Ltd.



target genes (Salama, Sadaie, Hoare, & Narita, 2014). Interestingly, calcium signaling is also emerging as a key player in the implementation of cellular senescence (Martin, & Bernard, 2017).

Intracellular calcium levels have been shown to increase in various cell types in response to senescence-inducing stresses (Borodkina et al., 2016; Wiel et al., 2014; Yu, Li, et al., 2013; Yu, Zhang, Zhou, Yao, & Li, 2013) and activation of the calcium-dependent transcription factor nuclear factor of activated T cells (NFAT) by the calcium/calmodulin/calcineurin pathway is known to regulate senescence (Manda et al., 2016; Wu et al., 2010). However, how calcium signaling is controlled is still only partially understood. We recently discovered that the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 2 (ITPR2), an endoplasmic reticulum (ER) calcium release channel, critically contributes to the implementation of cellular senescence (Wiel et al., 2014). Whereas ITPR2 activity has been shown to be modulated through protein interaction and post-translational modification (Vervloessem, Yule, Bultynck, & Parys, 2015), how ITPR2 is regulated at the expression level is unclear. To address this question, we performed a genetic screen for regulators of ITPR2 and thereby identified the retinoid X receptor alpha (RXRA) as a transcriptional repressor of ITPR2.

RXRA is part of the nuclear receptor (NR) superfamily. NRs mainly function as transcriptional regulators, controlling organismal development, homeostasis, and metabolism (Sever, & Glass, 2013). More particularly, RXRA belongs to the type II receptors, which reside in the nucleus bound to DNA and repress the expression of their target genes in the absence of ligand through interaction with corepressor complexes (Evans, & Mangelsdorf, 2014; Sever, & Glass, 2013). RXRA is known to be implicated in various biological processes, including cell differentiation, cell death, and lipid metabolism (Evans, & Mangelsdorf, 2014; Szanto et al., 2004). However, no link between RXRA and calcium signaling has been reported so far. In this study, we show that RXRA modulates calcium signaling by directly regulating ITPR2 expression and thereby controls cellular senescence.

## 2 | RESULTS

### 2.1 | An siRNA screen identifies the nuclear receptor RXRA as a transcriptional repressor of ITPR2

To identify proteins controlling *ITPR2* expression, we screened a library of 160 pools of four siRNAs targeting epigenetic regulators and transcription factors. *ITPR2* expression was analyzed using the Nanostring technology (Figure 1a, Supporting Information Figure S1a, and Table S1). This approach allowed us to identify several candidates which knockdown modulates *ITPR2* expression (Figure 1b, Supporting Information Table S1). Among them, 10 genes were able to upregulate *ITPR2* expression by at least two fold when knocked down (Figure 1b, Supporting Information Table S1). We retested the effect of some of these potential *ITPR2* gene repressors (based on their novelty in term of senescence regulation and/or calcium regulation) in three different strains of primary human lung

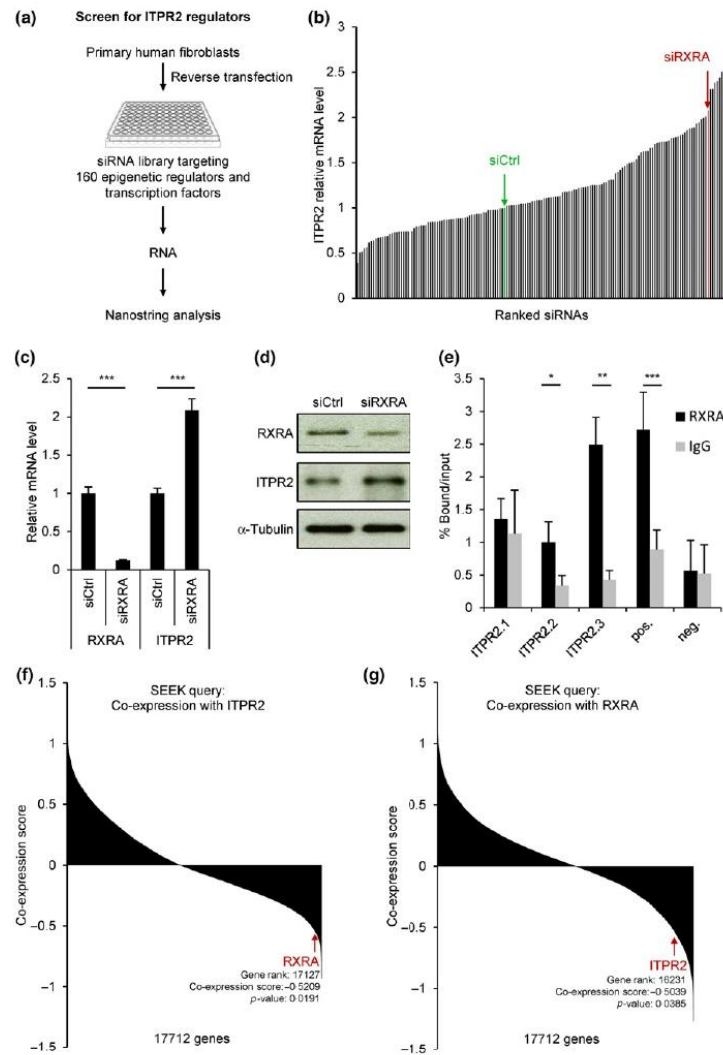
fibroblasts (IMR90, WI38 and MRC5) and observed the most significant and reproducible upregulation of *ITPR2* expression by knocking down the gene encoding the nuclear receptor RXRA (Supporting Information Figure S1b–d). We confirmed both at the mRNA and protein levels that RXRA knockdown induces *ITPR2* expression (Figure 1c,d). A similar observation was made using either a pool of four siRNAs targeting siRNAs or two individual siRNAs targeting RXRA (Supporting Information Figure S2a). As RXRA functions as a transcriptional repressor (Evans, & Mangelsdorf, 2014), we next asked whether RXRA could directly regulate *ITPR2*. We interrogated the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) ChIP-seq database and observed three peaks of RXRA on intron 2 of *ITPR2* in one dataset (Supporting Information Figure S2b–c). In MRC5 fibroblasts, RXRA was found to preferentially bind the region 3 of *ITPR2* (Figure 1e and Supporting Information Figure S2b,c). Altogether, these data indicate that the nuclear receptor RXRA directly represses *ITPR2* expression.

To test the relevance of this finding, we searched the Search-based exploration of expression compendium (SEEK) co-expression database and found out that RXRA is among the genes which expression is the most significantly inversely correlated with the one of *ITPR2* in lung noncancer samples from 63 datasets (Figure 1f). Conversely, *ITPR2* was found among the genes which expression is the most significantly inversely correlated with the one of RXRA in these samples (Figure 1g). These data are consistent with a repression of *ITPR2* by RXRA.

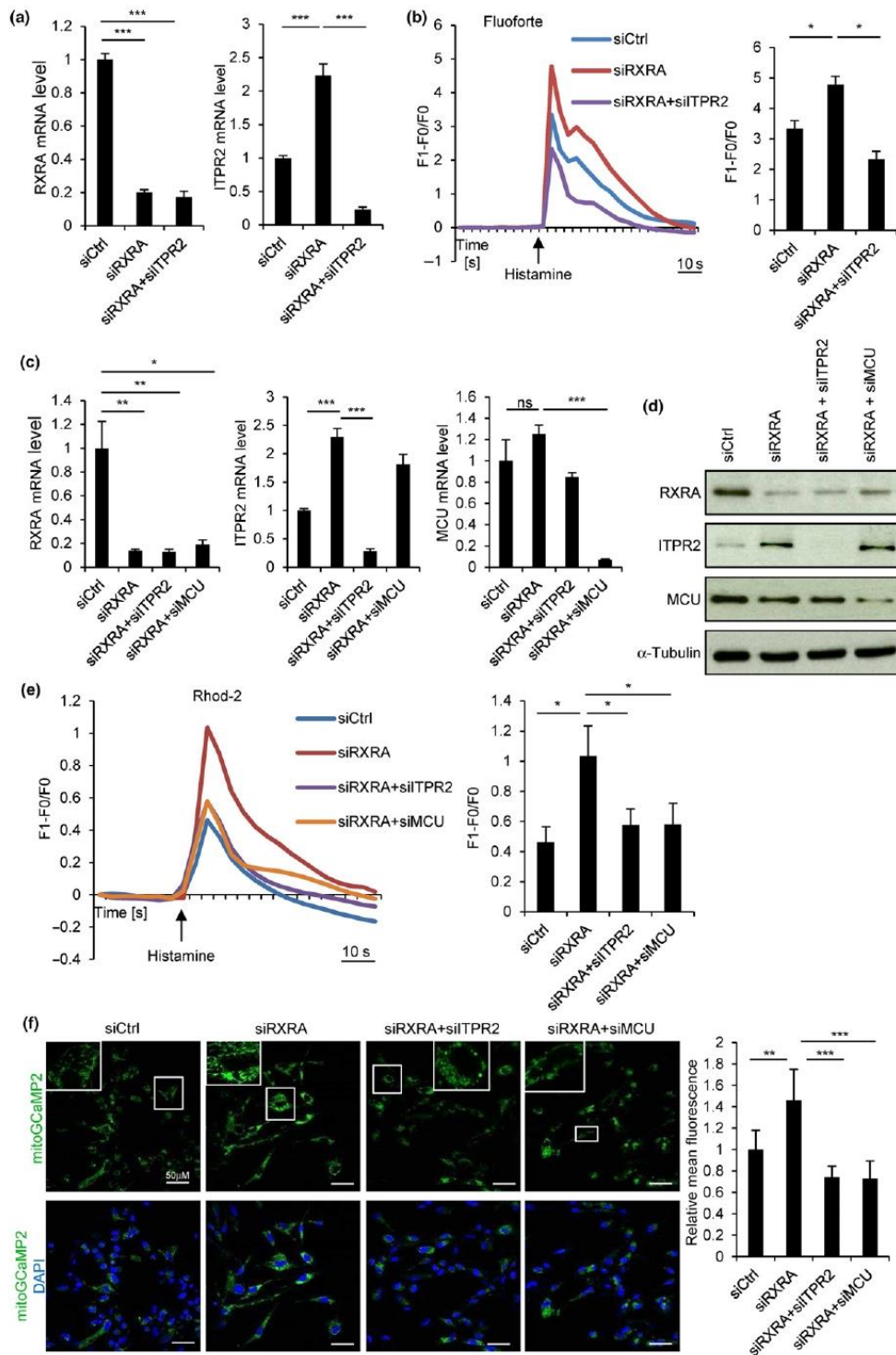
### 2.2 | RXRA regulates calcium release from the endoplasmic reticulum and accumulation in the mitochondria

As *ITPR2* is an endoplasmic reticulum (ER) calcium release channel, we next investigated whether RXRA, by repressing *ITPR2* expression, regulates calcium fluxes. Using the cytosolic calcium indicator Fluo-4 and calcium imaging, we observed that RXRA knockdown by a siRNA pool or two individual siRNAs increased histamine-induced calcium release from the ER (Figure 2a,b and Supporting Information Figure S3a) and that *ITPR2* knockdown (Figure 2a) impaired this effect (Figure 2b).

As calcium released by the ER can be transferred to mitochondria (de Brito, & Scorrano, 2010; Hayashi, Rizzuto, Hajnoczky, & Su, 2009), the impact of RXRA on mitochondrial calcium accumulation was then investigated using the Rhod-2 mitochondrial calcium indicator. RXRA knockdown by a siRNA pool or two individual siRNAs triggered an increase in mitochondrial calcium accumulation induced by histamine (Figure 2c–e and Supporting Information Figure S3b), and this was dependent on *ITPR2* (Figure 2c–e). When assessing the involvement of the mitochondrial calcium uniporter (MCU), which mediates calcium entry in mitochondria (de Brito, & Scorrano, 2010), we observed that *MCU* expression was not significantly regulated by RXRA (Figure 2c,d) but that MCU was contributing to the increased mitochondrial calcium accumulation triggered by RXRA knockdown upon histamine stimulation (Figure 2c–e).



**FIGURE 1** The nuclear receptor RXRA represses *ITPR2* expression. (a) Scheme depicting the screen for regulators of *ITPR2* expression. IMR90 primary human lung fibroblasts were transfected with an siRNA library containing a control nontargeting siRNA pool (siCtrl) and 160 siRNA pools each targeting an epigenetic regulator or a transcription factor with four different siRNAs. Four days after transfection, total RNA was prepared and *ITPR2* mRNA level was quantified by Nanostring technology. (b) Results of the screen. siRNAs were ranked according to *ITPR2* mRNA level compared to siCtrl. RXRA is one of the top repressors of *ITPR2*. (c) MRC5 primary human lung fibroblasts were transfected with a control nontargeting siRNA pool (siCtrl) or an siRNA pool targeting RXRA (siRXRA). Four days after transfection, RXRA and *ITPR2* mRNA levels were quantified by RT-qPCR. (d) Six days after MRC5 transfection with siCtrl or siRXRA, RXRA and *ITPR2* protein levels were analyzed by Western blot.  $\alpha$ -Tubulin was used as loading control. (e) Chromatin immunoprecipitation with RXRA antibody or control IgG was performed in MRC5 cells. The enrichment of bound chromatin fragments was quantified by qPCR either with primers amplifying regions of *ITPR2* showing RXRA binding in ENCODE ChIP-seq database (*ITPR2*), with primers amplifying a region described as a RXRA target (Varin et al., 2015) and used as positive control (pos.) or with primers amplifying a region showing no RXRA binding in ENCODE and used as negative control (neg.). See Supporting Information Figure S2 for further details on these regions. The experiments shown in panels c to e are representative of at least three biological replicates. Values are mean  $\pm$  SD, and statistical analyses were performed with Student's *t* test (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001). (f, g) The SEEK co-expression database was interrogated for genes co-expressed with *ITPR2* (f) or RXRA (g) in lung noncancer samples.





**FIGURE 2** RXRA regulates calcium fluxes. (a) MRC5 were transfected with a control nontargeting siRNA pool (siCtrl) or with siRNA pools targeting RXRA or ITPR2 as indicated. Four days later, knockdown efficiency was checked by RT-qPCR. (b) Six days after transfection, live cells were charged with cytosolic calcium indicator Fluoforte, treated with 100  $\mu$ M histamine, and fluorescence was analyzed by confocal microscopy. Fluorescence intensity over time (left) and at the maximum (right) is shown. (c) MRC5 were transfected with siCtrl pool or with siRNA pools targeting RXRA, ITPR2, or MCU as indicated. Four days later, knockdown efficiency was checked by RT-qPCR. (d) Six days after transfection, RXRA, ITPR2, and MCU protein levels were analyzed by Western blot.  $\alpha$ -Tubulin was used as loading control. (e) Six days after transfection, live cells were charged with mitochondrial calcium indicator Rhod-2, treated with 100  $\mu$ M histamine, and fluorescence was recorded by confocal microscopy. Fluorescence intensity over time (left) and at the maximum (right) is shown. (f) MRC5 infected with a retroviral vector encoding the mitochondrial calcium genetic reporter mitoGCaMP2 were transfected with siCtrl pool or with siRNA pools targeting RXRA, ITPR2, or MCU as indicated. Six days after transfection, fluorescence was recorded by confocal microscopy. Representative pictures (left) and fluorescence quantification (right) are shown. All the experiments shown are representative of at least three biological replicates. Statistical analysis was performed with Student's *t* test (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

To measure basal mitochondrial calcium concentration, we introduced mitoGCaMP2, a genetically encoded mitochondria-targeted calcium indicator (Chen et al., 2011), in MRC5 fibroblasts by retroviral infection. A higher concentration of calcium in the mitochondria was observed upon RXRA knockdown, and this increase was prevented when ITPR2 or MCU was concomitantly knocked down (Figure 2f). Altogether, these data indicate that RXRA regulates calcium release from the ER through ITPR2 and calcium accumulation in the mitochondria through MCU.

### 2.3 | RXRA controls ROS production and DNA damage through calcium signaling

Mitochondrial calcium accumulation has been shown to trigger the generation of reactive oxygen species (ROS; Gorchach, Bertram, Hudcová, & Krizanová, 2015). Therefore, we hypothesized that RXRA knockdown, by inducing calcium accumulation in the mitochondria, could cause ROS production. To monitor ROS, we introduced the ROS indicator roGFP2-ORP1 (Gutscher et al., 2009) by retroviral infection in MRC5 fibroblasts. RXRA knockdown in these cells by a siRNA pool or two individual siRNAs triggered the generation of ROS (Figure 3a and Supporting Information Figure S4a), which was prevented by treating cells with N-acetyl-L-cysteine (NAC), an antioxidant (Figure 3a). This production of ROS was dependent on ITPR2 and MCU (Figure 3b).

As ROS are known to cause DNA damage (Cadet, & Wagner, 2013), we then performed immunofluorescence staining of 53BP1 foci, which mark sites of DNA damage (Schultz, Chehab, Malikzay, & Halazonetis, 2000). RXRA knockdown by a siRNA pool or two individual siRNAs induced an increase in the number of 53BP1 foci (Figure 3c,d and Supporting Information Figure S4b), which was prevented by knocking down ITPR2 or MCU together with RXRA (Figure 3c,d). By treating cells with NAC (Figure 3e,f) or Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), another antioxidant (Supporting Information Figure S5), we observed that DNA damage induced by RXRA knockdown was due to ROS.

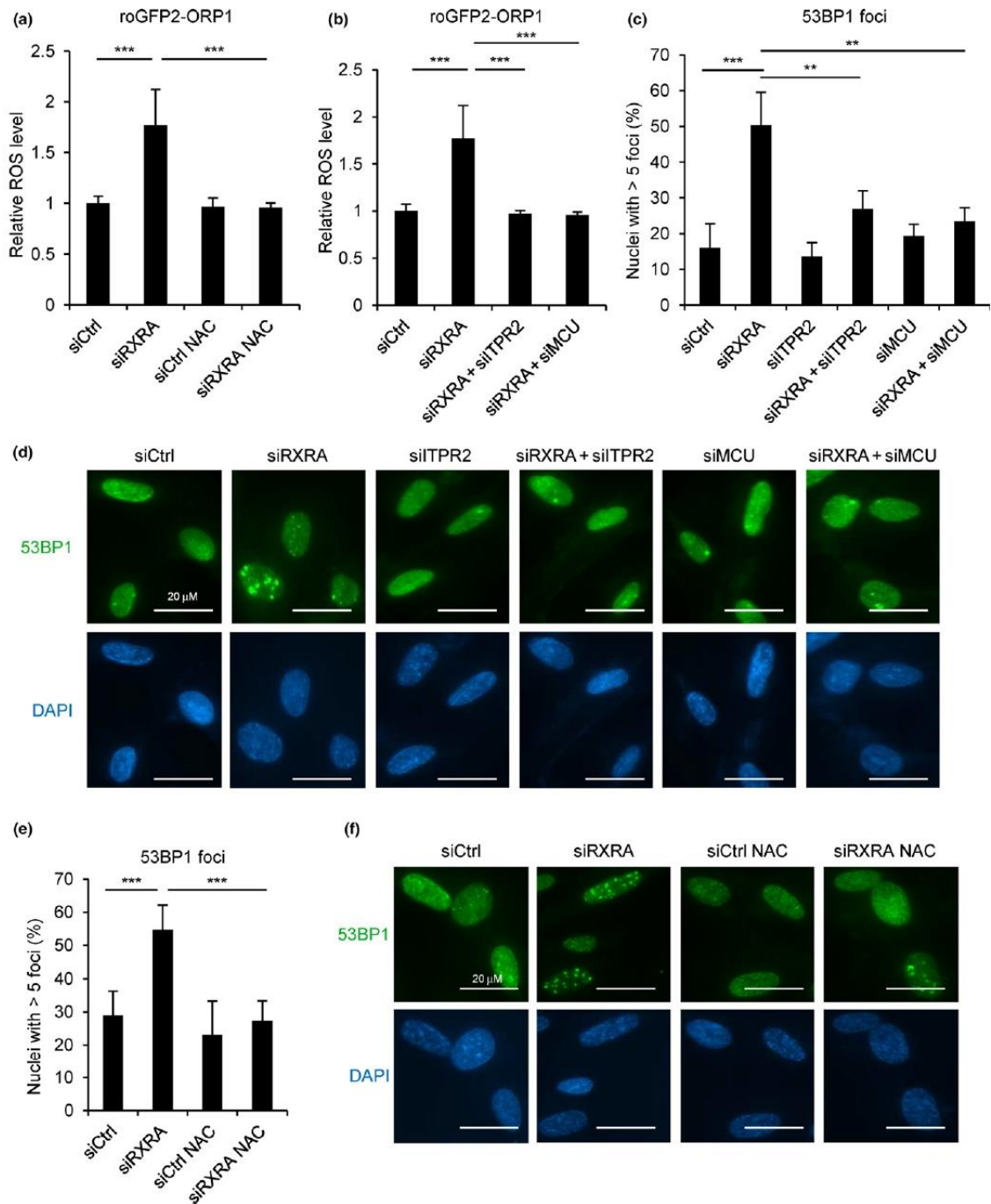
To assess whether calcium signaling is mediating these effects of RXRA, we used the intracellular calcium chelator BAPTA in RXRA knockdown experiments (Figure 4a). Calcium chelation not only prevented calcium accumulation in the mitochondria as expected

(Figure 4b,c), but also prevented ROS production (Figure 4d) and DNA damage (Figure 4e,f) induced by RXRA knockdown. Altogether, these data indicate that RXRA, by regulating calcium signaling through ITPR2 and MCU, controls ROS production and consequently DNA damage.

### 2.4 | RXRA knockdown triggers p53-dependent cellular senescence through ITPR2 and MCU

As DNA damage activates p53 (Lakin, & Jackson, 1999), we then tested the effect of RXRA knockdown (Figure 5a) on the expression of the p53 target gene *CDKN1A*, which encodes the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. An increase in *CDKN1A* mRNA level (Figure 5b) and p21 protein level (Figure 5c) was observed. By contrast, RXRA knockdown did not alter the expression of *CDKN1B*, *CDKN2A*, and *CDKN2B* encoding other cyclin-dependent kinase inhibitors (Supporting Information Figure S6a,b). RXRA knockdown also upregulated the expression of *GDF15*, a p53 target gene encoding a protein of the SASP (Figure 5d). A significant induction of the expression of several other genes encoding SASP components was observed (BMP2, COL3A1, IGFBP5, MMP3, PDGFA, VEGFA; Supporting Information Figure S6c). Interestingly, PDGFA and COL3A1 were recently described as part of the distinct SASP driven by NOTCH1 (Hoare et al., 2016). Furthermore, RXRA knockdown decreased cell proliferation as we observed a drop in the expression of the cell proliferation marker Ki-67 (Figure 5e and Supporting Information Figure S7) and a decrease in the number of cells (Figure 5f). Importantly, RXRA knockdown also caused an increased SA- $\beta$ -galactosidase activity (Figure 5g). Similar observations were made using either the siRXRA pool or individual siRNAs targeting RXRA, and both in MRC5 (Supporting Information Figure S8) and in IMR90 cells (Supporting Information Figure S9). Moreover, these effects of RXRA knockdown were rescued by overexpressing RXRA (Supporting Information Figure S10). Altogether, these data indicate that RXRA knockdown triggers cellular senescence.

To assess whether this senescent phenotype was dependent on ITPR2, we knocked down ITPR2 together with RXRA (Figure 5a). ITPR2 knockdown impaired the upregulation of *CDKN1A* (Figure 5b, c) and *GDF15* (Figure 5d). The proliferation arrest (Figure 5e,f and Supporting Information Figure S7) and the increase in SA- $\beta$ -galactosidase activity (Figure 5g) triggered by RXRA knockdown were also



impaired. Similar observations were made using either a siTPR2 pool or individual siRNAs targeting ITPR2 (Supporting Information Figure S11). Using the same approach, we further showed that cellular senescence induced by RXRA knockdown was also dependent on

MCU (Supporting Information Figure S12) and p53 (Supporting Information Figure S13). Altogether, these data indicate that RXRA knockdown triggers p53 activation and p53-dependent cellular senescence through ITPR2 and MCU.



**FIGURE 3** RXRA knockdown triggers ROS production and DNA damage. (a) MRC5 cells infected with a retroviral vector encoding the ROS reporter roGFP2-ORP1 were transfected with a control nontargeting siRNA pool (siCtrl) or with a siRNA pool targeting RXRA and were then treated with the NAC antioxidant (1  $\mu$ M) every 2 days where indicated. Six days after transfection, fluorescence was analyzed by confocal microscopy. (b) MRC5 cells stably expressing the ROS reporter roGFP2-ORP1 were transfected with siCtrl pool or with siRNA pools targeting RXRA, ITPR2, or MCU as indicated. Fluorescence was analyzed by confocal microscopy 6 days after transfection. (c, d) MRC5 cells were transfected with siCtrl pool or with siRNA pools targeting RXRA, ITPR2, or MCU as indicated. Six days after transfection, immunofluorescence staining using anti-53BP1 antibody was performed. Quantification of nuclei with more than five 53BP1 foci is shown (c) as well as representative pictures (d). (e, f) MRC5 cells were transfected with siCtrl or siRXRA pools and then treated with the NAC antioxidant (1  $\mu$ M) every 2 days where indicated. Immunofluorescence staining of 53BP1 was performed 6 days after transfection. Quantification of nuclei with more than five 53BP1 foci is shown (e) as well as representative pictures (f). All the experiments shown are representative of at least three biological replicates. Statistical analysis was performed with Student's *t* test (\*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

## 2.5 | RXRA constitutive expression delays replicative senescence

We then tested whether, conversely, RXRA overexpression impacts cellular senescence. RXRA was overexpressed in MRC5 primary human fibroblasts by lentiviral infection (Figure 6a,b), and the replicative potential of the cells was assessed. RXRA overexpression triggered an increase in the maximum number of population doublings (Figure 6c,d) and a decrease in SA- $\beta$ -galactosidase activity (Figure 6e). In parallel, a reduction in *ITPR2* expression, in mitochondrial calcium concentration, in DNA damage, and in *CDKN1A* expression was observed (Figure 6b,f-i). Altogether, these data indicate that RXRA constitutive expression regulates the ITPR2-mitochondrial calcium-DNA damage-p21 axis and delays replicative senescence.

## 3 | DISCUSSION

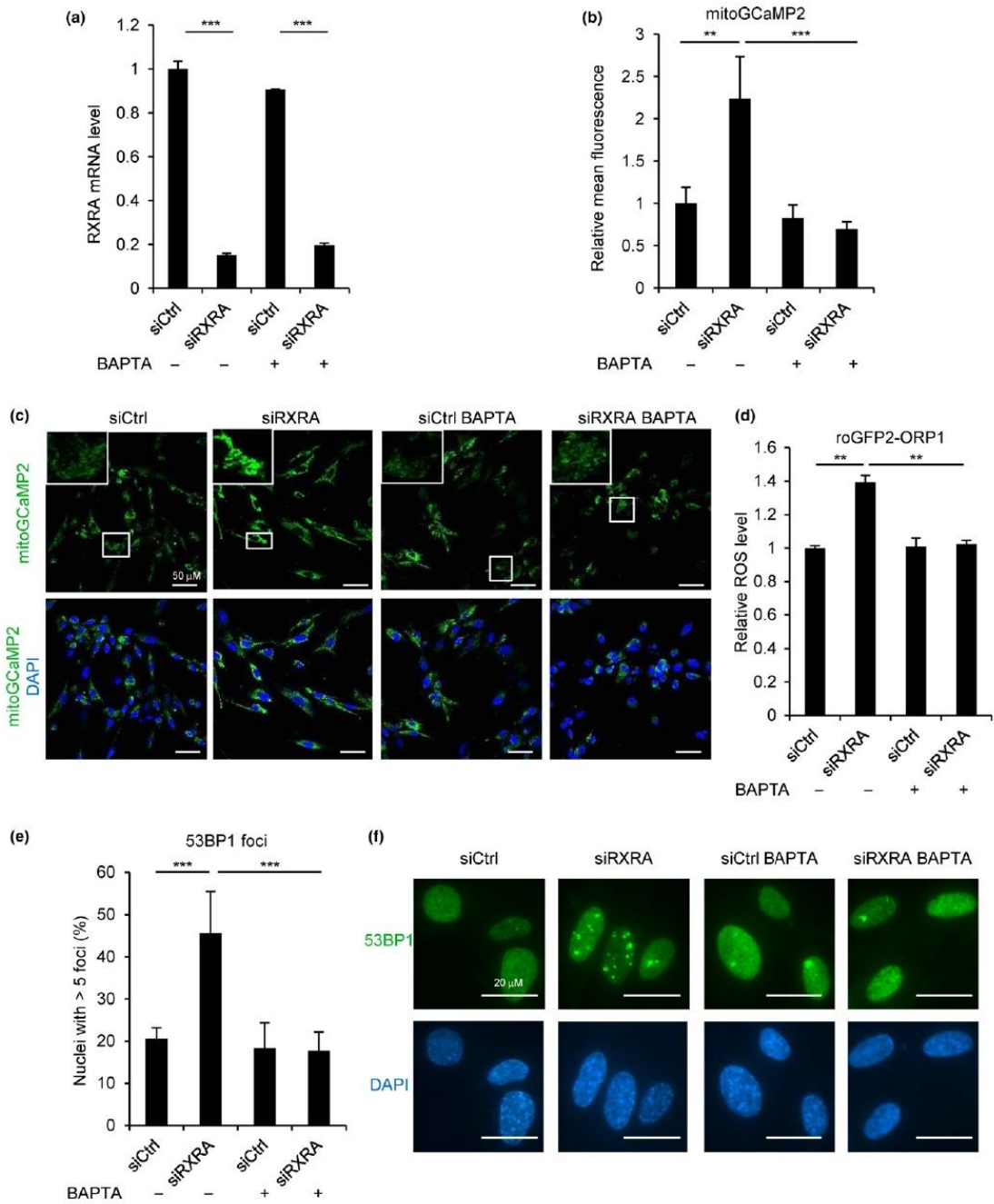
In this study, we identified the nuclear receptor RXRA as a novel regulator of calcium signaling and cellular senescence. Indeed, we observed that RXRA knockdown increases *ITPR2* expression and triggers calcium release from the ER and accumulation in the mitochondria. This calcium flux induces ROS production and DNA damage, which activates p53 and leads to cellular senescence through the p53-p21 pathway. Conversely, RXRA overexpression decreases *ITPR2* level, impairs the subsequent mitochondrial calcium-DNA damage-p21 signaling cascade, and delays replicative senescence.

Calcium signaling plays key roles in a number of biological processes including cellular senescence (Martin, & Bernard, 2017), but how calcium signaling is controlled is poorly understood. In particular, apart from the involvement of the calcineurin-NFAT pathway (Sankar, deTombe, & Mignery, 2014), only few things are known about the transcriptional regulation of *ITPR2* expression. Here, we identify RXRA as a transcriptional repressor of *ITPR2* and thus provide insights into *ITPR2* regulation, which is important for cell fate decisions (Vervloessem et al., 2015). ENCODE ChIP-seq data and our ChIP experiment point out RXRA as a direct regulator of *ITPR2*, although the identified RXRA binding site does not contain AGGTCA sequences which are the most frequent RXRA binding motifs (Evans, & Mangelsdorf, 2014; Sever, & Glass, 2013) and is located in the second intron of *ITPR2* rather than in its promoter. However, modulation of gene expression through the binding of transcriptional

regulators in introns is more and more documented (Neph et al., 2012). Our work is the first to link RXRA with calcium signaling. We show that RXRA controls calcium release from the ER and accumulation in the mitochondria. As some calcium released from the ER is not transferred to the mitochondria but rather goes in the cytosol, RXRA might regulate calcium signaling in this compartment as well.

We also unveil that RXRA regulates cellular senescence as RXRA knockdown provokes premature senescence and RXRA overexpression delays replicative senescence. We investigated the effect of retinoic acid, an agonist of RXRA, and observed an upregulation of *ITPR2* expression (Supporting Information Figure S14). In line with these data, an increase in *ITPR2* expression was observed in several transcriptomic analyses upon treatment of cells with retinoic acid (Yu, Li, et al., 2013; Yu, Zhang, et al., 2013; Zheng et al., 2005). However, in our experimental conditions, we did not observe any effect of retinoic acid on cell proliferation (Supporting Information Figure S14), suggesting that removing the repressive RXRA transcriptional activity (knockdown) and activating RXRA transcriptional activity (retinoic acid treatment) are not functionally equivalent even if both result in *ITPR2* gene expression. Beyond identifying RXRA impact on senescence, we deciphered the mechanisms underlying it. We show that RXRA knockdown triggers senescence by activating the ITPR2/MCU/ROS/DNA damage/p53/p21 cascade, whereas RXRA constitutive expression displays opposite effects. This signaling pathway supports the published reports showing that calcium regulates ROS generation (Gorlach et al., 2015). Interestingly, RXRA knockdown was found to decrease cyclin D1 and PCNA expression (Huang et al., 2015), which could also contribute to the induction of cellular senescence.

A few studies have recently revealed that cellular senescence can be regulated by nuclear receptors (Graziano, Johnston, Deng, Zhang, & Gonzalo, 2016; Jin et al., 2016; O'Loghlen et al., 2015; Wu et al., 2015; Zambrano et al., 2014; Zhu et al., 2014). Nuclear receptors form a large family, and only a few of them have been implicated so far in cellular senescence. RXRA is an additional example showing the key role of nuclear receptors in this process. Of note, knockdown of the vitamin D receptor (VDR) has been recently shown to cause DNA damage and cellular senescence. DNA damage accumulation has been attributed to the capacity of VDR to control the levels of some DNA repair factors such as BRCA1 (Graziano et al., 2016). We unveil here an alternative pathway (calcium



signaling and ROS) by which knockdown of nuclear receptors may promote DNA damage and cellular senescence.

In conclusion, our work sheds light on the link between nuclear receptors, calcium signaling, and cellular senescence. A challenge

ahead will be to investigate the relevance of these observations in different contexts of cellular senescence, age-related diseases, and aging.



**FIGURE 4** Calcium chelation prevents ROS production and DNA damage induced by RXRA knockdown. (a–c) MRC5 cells stably expressing the mitochondrial calcium indicator mitoGCaMP2 were transfected with a control nontargeting pool (siCtrl) or with a siRNA pool targeting RXRA and then treated with the intracellular calcium chelator BAPTA (1  $\mu$ M) every 2 days where indicated. Four days after transfection, RXRA mRNA level was checked with RT-qPCR (a). Fluorescence was analyzed by confocal microscopy 6 days after transfection. Fluorescence quantification (b) and representative pictures (c) are shown. (d) MRC5 cells stably expressing the ROS reporter roGFP2-ORP1 were transfected with siCtrl or siRXRA pools and were then treated with 1  $\mu$ M BAPTA every 2 days where indicated. Six days after transfection fluorescence was analyzed by confocal microscopy. (e, f) MRC5 cells were transfected with siCtrl or siRXRA pools and then treated with BAPTA (1  $\mu$ M) every 2 days where indicated. 53BP1 staining by immunofluorescence was performed 6 days after transfection. Quantification of nuclei with more than five 53BP1 foci is shown (e) as well as representative pictures (f). The experiments shown are all representative of at least three biological replicates. Statistical analysis was performed with Student's *t* test (\*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

## 4 | MATERIALS AND METHODS

### 4.1 | Cell culture and reagents

IMR90, WI38, and MRC5 human fetal lung fibroblasts (ATCC), GP-293 retroviral, or 293 T lentiviral packaging cells (Clontech) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) containing GlutaMax and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). Cells were maintained at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were tested for mycoplasma and when needed treated with Plasmocin (Invivogen) until they became mycoplasma-free before performing experiments. Experiments were performed in IMR90 at p14–p16, in WI38 at p21–24, and in MRC5 at p21–p25. NAC, Trolox, and 9-cis-retinoic acid were purchased from Sigma-Aldrich and used at 1  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, and 500 nM, respectively. BAPTA was purchased from Santa Cruz Biotechnology and used at 1  $\mu$ M.

### 4.2 | Vectors, transfection, and infection

pLNCX2-mito-GCaMP2 (Wiel et al., 2014) and pLPCx-roGFP2-ORP1 (Le et al., 2015) retroviral vectors were previously described. The lentiviral vector pLV-RXRA and the corresponding empty vector pLV were purchased from Vectorbuilder. GeneJuice transfection reagent was used according to the recommendations of the manufacturer (Merck Millipore) to transfect GP-293 cells with VSVg and the above-mentioned retroviral vectors and 293 T cells with gag-pol, env, and the above-mentioned lentiviral vectors. Two days after transfection, the viral supernatant was mixed with fresh medium and 8  $\mu$ g/mL hexadimethrine bromide (Sigma-Aldrich) and used to infect MRC5 cells. One day later, infected cells were selected with 100  $\mu$ g/ml neomycin (Life Technologies) or 500 ng/ml puromycin (Invivogen).

### 4.3 | siRNA transfection

For the siRNA screen and other knockdown experiments, an ON-TARGETplus nontargeting control pool (siCtrl), ON-TARGETplus siRNA SMARTpools targeting the genes of interest with four different siRNAs and ON-TARGETplus individual siRNAs were used (Dharmacon, GE Healthcare). Sequences of siRNAs comprised in the pools and of individual siRNAs are listed in Supporting Information Tables S2 and S3, respectively. Cells were reverse transfected with siRNAs

using Dharmafect 1 transfection reagent according to manufacturer's instructions (Dharmacon, GE Healthcare). siRNAs were used at 30 nM in the screen and at 15 nM in the following experiments. When transfecting two different siRNAs (pools or individuals) in the same well, each was transfected at 15 nM and siCtrl was used to keep the final concentration of siRNAs at 30 nM. Similar knockdown efficiencies were observed with these concentrations of siRNAs. Except if stated otherwise, reverse transfection was performed in 6-well plates.

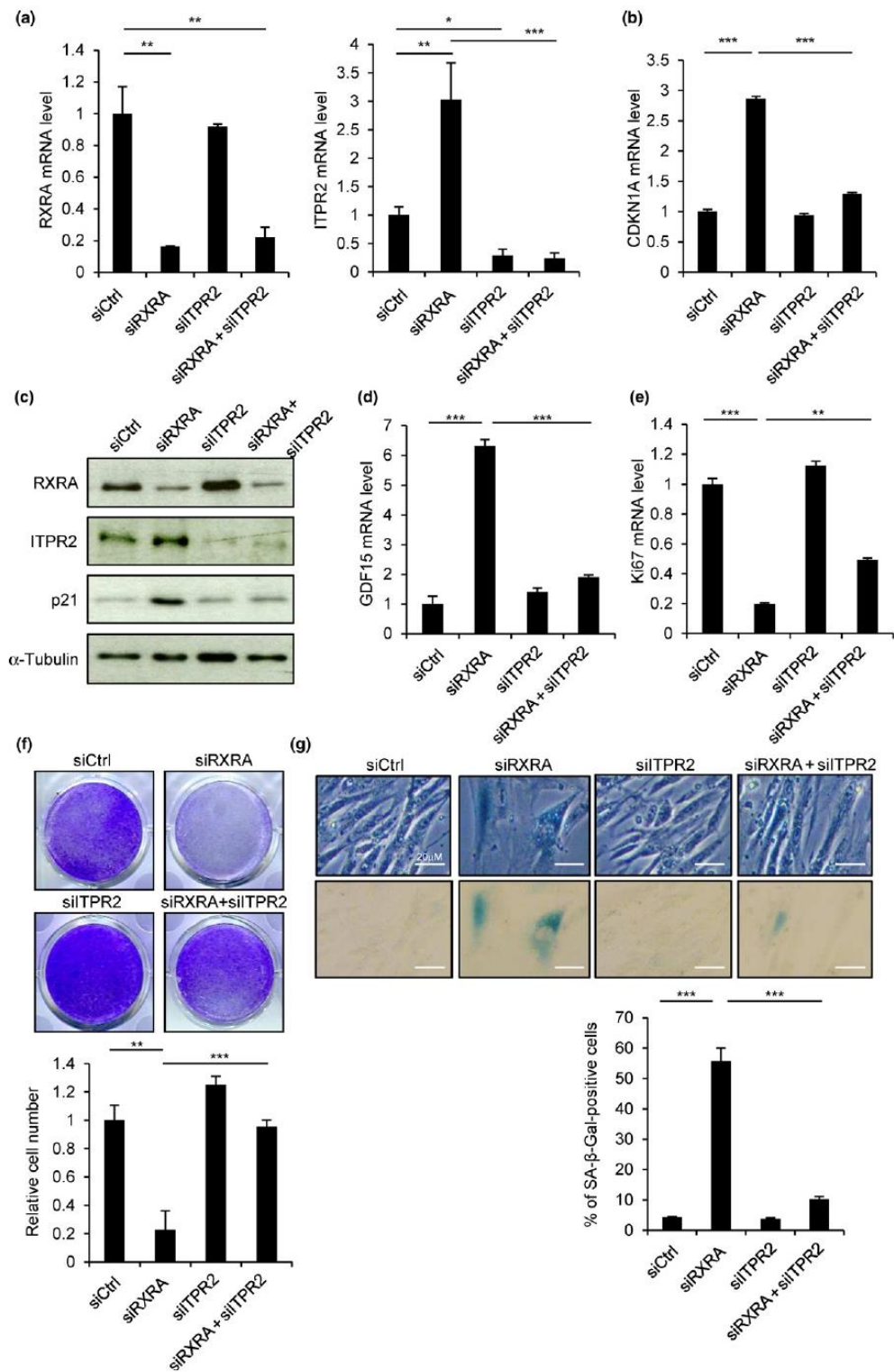
### 4.4 | Screening and Nanostring analysis

For the screen, a library of 160 siRNA pools each targeting an epigenetic regulator or a transcription factor was used. The full list of the 160 genes targeted by the library is displayed in Supporting Information Table S1. The library was divided into four groups, and for each of them, siRNA pools and a control nontargeting siRNA pool (30 nM final concentration) were reverse transfected. Seventy thousand IMR90 cells were seeded per well in 6-well plates for reverse transfection. Total RNAs were extracted 4 days after siRNA transfection using Upzol (Dutscher) and phenol-chloroform and were sent to the Genomics Platform of Institut Curie (Paris, France). RNAs were analyzed with the BioAnalyzer using Nano LabChip to assess their integrity (Bioanalyzer 2100 RNA 6000 Nano Kit from Agilent Technologies) and with Nanodrop (Thermo) to assess their purity and concentration. RNA abundance was then measured with Nanostring technology (Nanostring Flex nCounter analysis system). All RNA processed to analysis display a RIN > 7.6 and a ratio 260 nm/280 nm > 1.8. Raw counts were first normalized for platform source of variations (Nanostring controls) and with three housekeeping genes (PGK1, TBP, and TUBB2A) as recommended by Nanostring technology, Inc. Nanostring probes are displayed in Supporting Information Table S4. Relative expression of *ITPR2* was calculated for each siRNA pool according to its level in cells transfected with the control nontargeting siRNA pool.

### 4.5 | Reverse transcription and real-time quantitative PCR

The Maxima first-strand cDNA synthesis kit (Life Technologies) was used to synthesize cDNA from total RNA, according to manufacturer's instructions. cDNAs obtained by this reverse transcription





**FIGURE 5** Cellular senescence induced by RXRA knockdown depends on ITPR2. MRC5 cells were transfected with a control nontargeting pool (siCtrl) or siRNA pools targeting RXRA or ITPR2 as indicated. (a–c) Four days after transfection, mRNA levels of RXRA and ITPR2 (a) and CDKN1A (b) were checked by RT–qPCR. (c) Six days after transfection, RXRA, ITPR2, and p21 protein levels were analyzed by Western blot.  $\alpha$ -Tubulin was used as loading control. (d, e) mRNA levels of GDF15 (d) and Ki-67 (e) were also measured by RT–qPCR 4 days after transfection. (f) Six days after transfection, cells were stained with crystal violet (upper panel) and counted (lower panel). (g) SA- $\beta$ -galactosidase assay was also performed 6 days after transfection. Representative pictures are shown (upper panel) as well as the percentage of SA- $\beta$ -galactosidase-positive cells counted in each condition (lower panel). All the experiments shown are representative of at least three biological replicates. Statistical analysis was performed with Student's *t* test (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

(RT) were used as templates for quantitative PCR (qPCR). The qPCR mixture also contained TaqMan mix (Roche), 100  $\mu$ M of a Universal Probe Library probe (Roche), and 200 nM of primers (Sigma-Aldrich). Primer sequences are listed in Supporting Information Table S5. qPCRs were carried out on a FX96 Thermocycler (Bio-Rad). qPCRs were as follows: 95°C 10 min, followed with 40 cycles of 95°C 10 s, 59°C 30 s. The reactions were performed at least in duplicate. The relative amount of mRNA was calculated using the comparative Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) method, and data were normalized using two housekeeping genes (PGK1 and HPRT1).

#### 4.6 | Western blot

Cells were directly lysed in Laemmli buffer. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were then blocked with TBST-Milk 5% for 1 hr and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Primary antibodies and dilutions used are listed in Supporting Information Table S6. Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and sheep anti-mouse antibodies (Interchim) were used as secondary antibodies and incubated for 1 hr at room temperature. Detection was performed using ECL kit (Amersham).

#### 4.7 | Chromatin immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed with the Millipore ChIP Assay Kit (17-295). MRC5 cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 10 min at 37°C. Chromatin was prepared according to the Millipore protocol and sonicated to an average size of 300–500 bp using a Diagenode Bioruptor. Chromatin fragments were immunoprecipitated at 4°C overnight with RXRA antibody or normal rabbit IgG used as negative control (see references of antibodies in Supporting Information Table S6), and immune complexes were collected on Protein A agarose beads (ChIP assay kit, Millipore). Quantitative PCR was carried out using SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primers amplifying ITPR2 regions showing RXRA binding in the ENCODE ChIP-seq database were used, as well as primers for positive and negative controls. ENCODE data and location of primers that we used are presented in Supporting Information Figure S2. Primer sequences are indicated in Supporting Information Table S7. The amount of immunoprecipitated target DNA is represented as a percentage of input, which was calculated using a curve derived from serial dilutions of input chromatin.

#### 4.8 | SA- $\beta$ -Galactosidase assay and crystal violet staining

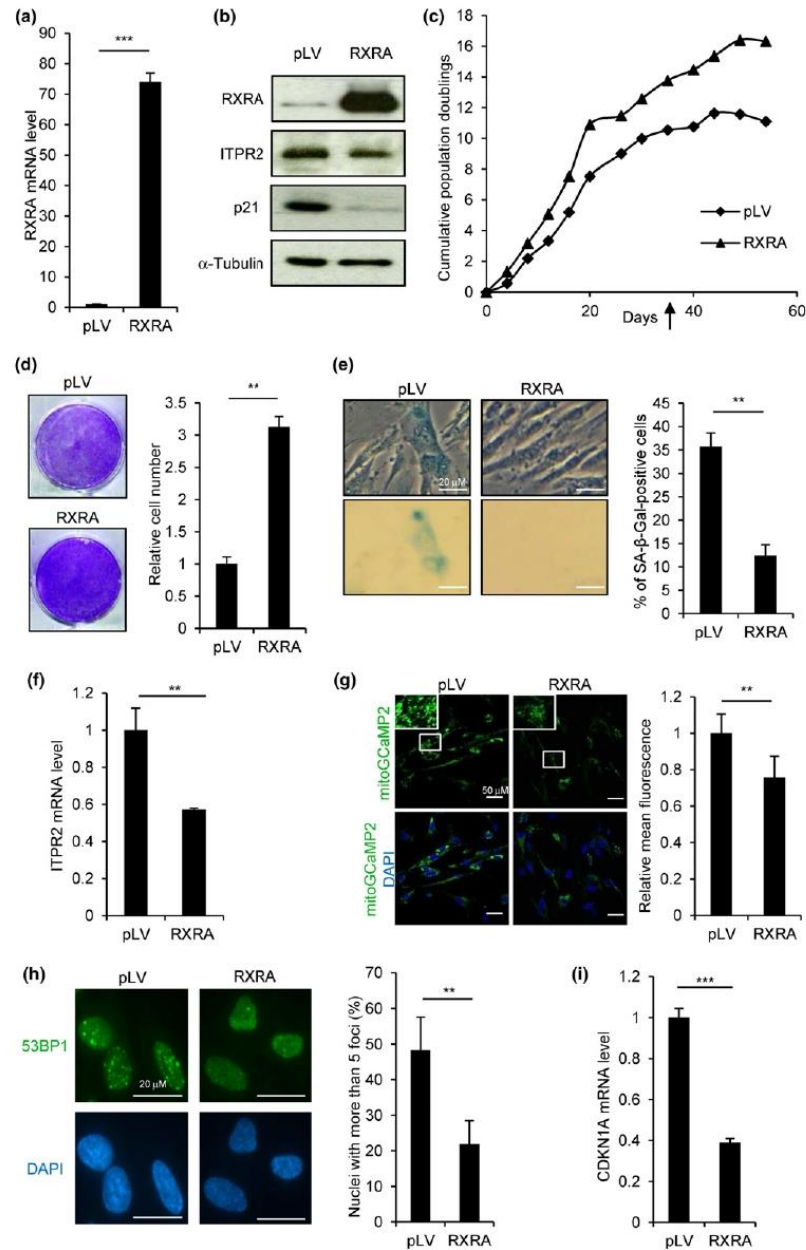
For SA- $\beta$ -galactosidase assay, cells were washed twice with PBS and fixed for 5 min in 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde. Cells were then rinsed twice in PBS and incubated at 37°C overnight in SA- $\beta$ -Gal solution as previously described (Dimri et al., 1995). For crystal violet staining, cells were washed with PBS, fixed for 15 min in 3.7% formaldehyde, and then stained with 0.5% crystal violet solution.

#### 4.9 | Calcium imaging

For Fluorforte and Rhod-2 calcium assays, 6 days after siRNA transfection in glass-bottom dishes (Thermo Scientific), live cells were treated either with 5  $\mu$ M Fluorforte (ENZ-52014, Enzo Life Sciences) or with 10  $\mu$ M Rhod-2 (R-1245MP, Thermo Scientific) for 1 hr at 37°C in Hank's balanced salt solution (HBSS) with calcium, magnesium, and no phenol red (14025050, Thermo Scientific). Cells were then washed and incubated in HBSS with no calcium, no magnesium, and no phenol red (14175053, Thermo Scientific) for calcium imaging. Fluorescence was recorded every 1.5 s using Zeiss LSM 780 confocal microscope. Histamine (H7125-1G, Sigma-Aldrich) was injected after 1 min of measurement at a final concentration of 100 nM. Average changes in fluorescence intensities in multiple regions of interest (ROI) were calculated. Results are shown as (F1-F0)/F0, where F0 is the mean of the intensities from 10 to 50 s. Alternatively, cells stably expressing mitoGCaMP2, a genetically encoded mitochondrially targeted calcium indicator, were transfected with siRNA in glass-bottom dishes. Six days later, fluorescence (Ex 488 nm/Em 500–570 nm) was monitored in live cells using Zeiss LSM 780 confocal microscope. Fluorescence intensity was quantified using the ImageJ software.

#### 4.10 | ROS detection

Six days after siRNA transfection in glass-bottom dishes (Thermo Scientific), cells stably expressing roGFP2-ORP1 were washed and incubated in HBSS with calcium, magnesium, and no phenol red (14025050, Thermo Scientific) for ROS detection. Fluorescence (Ex 405 and 488 nm/Em 500–554 nm) was monitored in live cells using Zeiss LSM 780 confocal microscope. The ImageJ software was used to quantify fluorescence intensity, and the ratio between 405 nm (oxidized state) and 488 nm (reduced state) was plotted, as previously described (Gutscher et al., 2009).



**FIGURE 6** RXRA overexpression delays replicative senescence. MRC5 cells were infected with a lentiviral vector encoding RXRA (RXRA) or the corresponding empty vector as control (pLV). (a) RXRA mRNA level was checked by RT-qPCR. (b) RXRA, ITPR2, and p21 protein levels were analyzed by Western blot.  $\alpha$ -Tubulin was used as loading control. (c) Cells were counted at each passage, and cumulative population doublings were calculated. At the time point indicated by the arrow, the following assays were performed. (d) Cells were stained with crystal violet (left) and counted (right). (e) SA- $\beta$ -galactosidase assay was performed. Representative pictures are shown (left) as well as the percentage of SA- $\beta$ -galactosidase-positive cells counted in each condition (right). (f) ITPR2 mRNA level was quantified by RT-qPCR. (g) MRC5 cells stably expressing the mitochondrial calcium indicator mitoGCaMP2 were infected with pLV or RXRA lentiviral vectors, and fluorescence was analyzed by confocal microscopy. Representative pictures (left) and fluorescence quantification (right) are shown. (h) 53BP1 was stained by immunofluorescence in MRC5 cells infected with pLV or RXRA vectors. Representative pictures are shown (left) as well as quantification of nuclei with more than five 53BP1 foci (right). (i) CDKN1A mRNA level was quantified by RT-qPCR. All the experiments shown are representative of at least two biological replicates. Statistical analysis was performed with Student's *t* test (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



#### 4.11 | Immunofluorescence staining

Six days after siRNA transfection in eight-chamber tissue culture glass slides (Falcon, Corning), cells were fixed in ice-cold methanol for 10 min at  $-20^{\circ}\text{C}$  and blocked in PBS-Tween 0.05% containing 20% FBS (PBST-FBS). Incubation with primary antibodies in PBST-FBS was performed overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Primary antibodies and dilutions used are listed in Supporting Information Table S6. After three washes with PBS, the slides were incubated with Alexa Fluor 488 dye-conjugated goat anti-rabbit antibody or chicken anti-mouse antibody diluted in PBST-FBS for 1 hr at room temperature. The slides were then mounted with DAPI Fluoromount G (SouthernBiotech) after three PBS washes. Images were acquired with a Nikon fluorescence microscope, and data were collected and analyzed with NIS software (Nikon). For 53BP1 foci, their number per nucleus was determined using the Focinator tool (Oeck, Malewicz, Hurst, Rudner, & Jendrossek, 2015). More than 200 nuclei were analyzed for each condition.

#### 4.12 | Statistical analysis

Graphs are presented with SD as errors bars, and Student's *t* test was used to determine the *p*-value. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the laboratory members for helpful discussions and the Genomics Platform of Institut Curie for Nanostring analysis. The work was carried out with the support of the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer to DB and of the AAP "Épigénome et Cancer" of the Plan Cancer (P030830) to PAD and DB. XM was supported by the China Scholarship Council (CSC), MW by the Fondation de France, and CR by the Ligue Nationale contre le Cancer. The Nanostring Platform of Institut Curie was initiated with the support of French grants (LabEx and EquipEx): ANR-10-IDEX-0001-02 PSL, ANR-11-LBX-0044, and « INCa-DGOS- 4654 » SIRIC11-002.

#### CONFLICT OF INTEREST

None declared.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.B. and N.M. conceived and supervised the project. D.B., N.M., and X.M. designed the experiments. X.M., M.F., M.W., C.R., and N.M. performed experiments. X.M., M.W., O.K., P.A.D., N.M., and D.B. performed data analysis. D.B., N.M., and X.M. wrote the manuscript.

#### ORCID

David Bernard  <http://orcid.org/0000-0002-1557-2074>

#### REFERENCES

- Borodkina, A. V., Shatrova, A. N., Deryabin, P. I., Griukova, A. A., Abushik, P. A., Antonov, S. M., ... Burova, E. B. (2016). Calcium alterations signal either to senescence or to autophagy induction in stem cells upon oxidative stress. *Aging*, 8, 3400–3418. <https://doi.org/10.18632/aging.101130>
- Cadet, J., & Wagner, J. R. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2), a012559–a12559. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012559>
- Chen, M., Wang, Y., Hou, T., Zhang, H., Qu, A., & Wang, X. (2011). Differential mitochondrial calcium responses in different cell types detected with a mitochondrial calcium fluorescent indicator, mito-GCaMP2. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 43, 822–830. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr075>
- de Brito, O. M., & Scorrano, L. (2010). An intimate liaison: Spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO Journal*, 29, 2715–2723. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.177>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., ... Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9363–9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2014). Nuclear receptors, RXR, and the big bang. *Cell*, 157, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>
- Gorlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology*, 6, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>
- Graziano, S., Johnston, R., Deng, O., Zhang, J., & Gonzalo, S. (2016). Vitamin D/vitamin D receptor axis regulates DNA repair during oncogene-induced senescence. *Oncogene*, 35, 5362–5376. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.77>
- Gutschner, M., Sobotta, M. C., Wabnitz, G. H., Ballikaya, S., Meyer, A. J., ... Dick, T. P. (2009). Proximity-based protein thiol oxidation by H2O2-scavenging peroxidases. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 31532–31540.
- Hayashi, T., Rizzuto, R., Hajnoczky, G., & Su, T. P. (2009). MAM: More than just a housekeeper. *Trends in Cell Biology*, 19, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.12.002>
- He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in health and disease. *Cell*, 169, 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
- Hoare, M., Ito, Y., Kang, T. W., Weekes, M. P., Matheson, N. J., Patten, D. A., ... Narita, M. (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature Cell Biology*, 18, 979–992. <https://doi.org/10.1038/ncb3397>
- Huang, G. L., Zhang, W., Ren, H. Y., Shen, X. Y., Chen, Q. X., & Shen, D. Y. (2015). Retinoid X receptor alpha enhances human cholangiocarcinoma growth through simultaneous activation of Wnt/beta-catenin and nuclear factor-kappaB pathways. *Cancer Science*, 106, 1515–1523.
- Jin, H., Lian, N., Zhang, F., Chen, L., Chen, Q., Lu, C., ... Zheng, S. (2016). Activation of PPARgamma/P53 signaling is required for curcumin to induce hepatic stellate cell senescence. *Cell Death & Disease*, 7, e2189.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peepers, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes and Development*, 24, 2463–2479. <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>
- Lakin, N. D., & Jackson, S. P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 18, 7644–7655. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203015>
- Le, G. K., Ibrahim, M. X., Wiel, C., Sayin, V. I., Akula, M. K., Karlsson, C., ... Bergö, M. O. (2015). Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science Translational Medicine*, 7, 308re8.

- Manda, K. R., Tripathi, P., Hsi, A. C., Ning, J., Ruzinova, M. B., Liapis, H., ... Chen, F. (2016). NFATc1 promotes prostate tumorigenesis and overcomes PTEN loss-induced senescence. *Oncogene*, *35*, 3282–3292. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.389>
- Martin, N., & Bernard, D. (2017). Calcium signaling and cellular senescence. *Cell Calcium*, *70*, 16–23.
- Neph, S., Vierstra, J., Stergachis, A. B., Reynolds, A. P., Haugen, E., Verrot, B., ... Stamatoyannopoulos, J. A., (2012). An expansive human regulatory lexicon encoded in transcription factor footprints. *Nature*, *489*, 83–90. <https://doi.org/10.1038/nature11212>
- Oeck, S., Malewicz, N. M., Hurst, S., Rudner, J., & Jendrossek, V. (2015). The Focinator – a new open-source tool for high-throughput foci evaluation of DNA damage. *Radiation Oncology*, *10*, 163. <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0453-1>
- O’Loghlen, A., Martin, N., Krusche, B., Pemberton, H., Alonso, M. M., Chandler, H., ... Gil, J. (2015). The nuclear receptor NR2E1/TLX controls senescence. *Oncogene*, *34*, 4069–4077. <https://doi.org/10.1038/nc.2014.335>
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes and Development*, *28*, 99–114. <https://doi.org/10.1101/gad.235184.113>
- Sankar, N., deTombe, P. P., & Mignery, G. A. (2014). Calcineurin-NFATc regulates type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (InsP3R2) expression during cardiac remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, *289*, 6188–6198.
- Schultz, L. B., Chehab, N. H., Malikzay, A., & Halazonetis, T. D. (2000). p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *Journal of Cell Biology*, *151*, 1381–1390. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1381>
- Sever, R., & Glass, C. K. (2013). Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*, a016709. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016709>
- Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I. P., Davies, P. J., & Nagy, L. (2004). Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death and Differentiation*, *11*, S126–S143. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401533>
- Varin, A., Thomas, C., Ishibashi, M., Ménégaut, L., Gautier, T., Trousson, A., ... Masson, D. (2015). Liver X receptor activation promotes polyunsaturated fatty acid synthesis in macrophages: Relevance in the context of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *35*, 1357–1365. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305539>
- Vervloessem, T., Yule, D. I., Bultynck, G., & Parys, J. B. (2015). The type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing Ca-release channel. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1853*, 1992–2005.
- Wiel, C., Lallet-Daher, H., Gitenay, D., Gras, B., Le Calvé, B., Augert, A., ... Bernard, D. (2014). Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nature Communications*, *5*, 3792. <https://doi.org/10.1038/ncomms4792>
- Wu, X., Nguyen, B. C., Dziunycz, P., Chang, S., Brooks, Y., Lefort, K., ... Dotto, G. P. (2010). Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer. *Nature*, *465*, 368–372. <https://doi.org/10.1038/nature08996>
- Wu, D., Yu, S., Jia, L., Zou, C., Xu, Z., Xiao, L., ... Chan, F. L. (2015). Orphan nuclear receptor TLX functions as a potent suppressor of oncogene-induced senescence in prostate cancer via its transcriptional co-regulation of the CDKN1A (p21(WAF1) (I) (CIP1) ) and SIRT1 genes. *Journal of Pathology*, *236*, 103–115.
- Yu, X., Li, X., Jiang, G., Wang, X., Chang, H. C., Hsu, W. H., & Li, Q. (2013). Isradipine prevents rotenone-induced intracellular calcium rise that accelerates senescence in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience*, *246*, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.062>
- Yu, L., Zhang, Y. D., Zhou, J., Yao, D. M., & Li, X. (2013). Identification of target genes of transcription factor CEBPB in acute promyelocytic leukemia cells induced by all-trans retinoic acid. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *6*, 473–480. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60077-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60077-2)
- Zambrano, A., Garcia-Carpizo, V., Gallardo, M. E., Villamueva, R., Gomez-Ferrera, M. A., Pascual, A., ... Aranda, A. (2014). The thyroid hormone receptor beta induces DNA damage and premature senescence. *Journal of Cell Biology*, *204*, 129–146.
- Zheng, P. Z., Wang, K. K., Zhang, Q. Y., Huang, Q. H., Du, Y. Z., Zhang, Q. H., ... Zhang, J. (2005). Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 7653–7658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502825102>
- Zhu, B., Ferry, C. H., Markell, L. K., Blazantin, N., Glick, A. B., Gonzalez, F. J., & Peters, J. M. (2014). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPARbeta/delta) promotes oncogene-induced cellular senescence through repression of endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, *289*, 20102–20119.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Ma X, Warnier M, Raynard C, et al. The nuclear receptor RXRA controls cellular senescence by regulating calcium signaling. *Aging Cell*. 2018;17:e12831. <https://doi.org/10.1111/ace1.12831>

# **- BIBLIOGRAPHIE -**



## BIBLIOGRAPHIE

---

- Acosta, Juan C., Ana O'Lughlen, Ana Banito, Maria V. Guijarro, Arnaud Augert, Selina Raguz, Marzia Fumagalli, et al. 2008. « Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence ». *Cell* 133 (6): 1006-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.038>.
- Acosta, Juan Carlos, Ana Banito, Torsten Wuestefeld, Athena Georgilis, Peggy Janich, Jennifer P. Morton, Dimitris Athineos, et al. 2013. « A Complex Secretory Program Orchestrated by the Inflammasome Controls Paracrine Senescence ». *Nature Cell Biology* 15 (8): 978-90. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>.
- Aguayo-Mazzucato, Cristina, Joshua Andle, Terrence B. Lee, Ayush Midha, Lindsay Talemal, Vaja Chipashvili, Jennifer Hollister-Lock, Jan van Deursen, Gordon Weir, et Susan Bonner-Weir. 2019. « Acceleration of  $\beta$  Cell Aging Determines Diabetes and Senolysis Improves Disease Outcomes ». *Cell Metabolism* 30 (1): 129-142.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.006>.
- Ainscough, Joseph S., G. Frank Gerberick, Ian Kimber, et Rebecca J. Dearman. 2015. « Interleukin-1 $\beta$  Processing Is Dependent on a Calcium-Mediated Interaction with Calmodulin ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (52): 31151-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680694>.
- Alcorta, D. A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach, et J. C. Barrett. 1996. « Involvement of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P16 (INK4a) in Replicative Senescence of Normal Human Fibroblasts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24): 13742-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13742>.
- Alonso, Maria Teresa, et Javier García-Sancho. 2011. « Nuclear Ca<sup>2+</sup> Signalling ». *Cell Calcium, Ca<sup>2+</sup> signalling and gene regulation*, 49 (5): 280-89. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.004>.
- Alspach, Elise, Kevin C. Flanagan, Xianmin Luo, Megan K. Ruhland, Hui Huang, Ermira Pazolli, Maureen J. Donlin, et al. 2014. « P38MAPK Plays a Crucial Role in Stromal-Mediated Tumorigenesis ». *Cancer Discovery* 4 (6): 716-29. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0743>.
- Augert, Arnaud, Christine Payré, Yvan de Launoit, Jesus Gil, Gérard Lambeau, et David Bernard. 2009. « The M-Type Receptor PLA2R Regulates Senescence through the P53 Pathway ». *EMBO Reports* 10 (3): 271-77. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.255>.
- Azazmeh, Narmen, Benjamin Assouline, Eitan Winter, Shmuel Ruppó, Yuval Nevo, Alexander Maly, Karen Meir, et al. 2020. « Chronic Expression of P16INK4a in the Epidermis Induces Wnt-Mediated Hyperplasia and Promotes Tumor Initiation ». *Nature Communications* 11 (1): 2711. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16475-3>.
- Bading, H. 2000. « Transcription-Dependent Neuronal Plasticity: The Nuclear Calcium Hypothesis ». *European Journal of Biochemistry* 267 (17): 5280-83. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01565.x>.
- Bagur, Rafaela, et György Hajnóczky. 2017. « Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling ». *Molecular Cell* 66 (6): 780-88. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028>.
- Baker, Darren J., Bennett G. Childs, Matej Durik, Melinde E. Wijers, Cynthia J. Sieben, Jian Zhong, Rachel A. Saltness, et al. 2016. « Naturally Occurring P16(Ink4a)-Positive Cells Shorten Healthy Lifespan ». *Nature* 530 (7589): 184-89. <https://doi.org/10.1038/nature16932>.
- Baker, Darren J., Tobias Wijshake, Tamar Tchkonja, Nathan K. LeBrasseur, Bennett G. Childs, Bart van de Sluis, James L. Kirkland, et Jan M. van Deursen. 2011. « Clearance of P16Ink4a-Positive Senescent Cells Delays Ageing-Associated Disorders ». *Nature* 479 (7372): 232-36. <https://doi.org/10.1038/nature10600>.
- Bakkenist, Christopher J., Rachid Drissi, Jing Wu, Michael B. Kastan, et Jeffrey S. Dome. 2004. « Disappearance of the Telomere Dysfunction-Induced Stress Response in Fully Senescent Cells ». *Cancer Research* 64 (11): 3748-52. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0453>.



- Barbacid, Mariano. 1986. « Oncogenes and Human Cancer: Cause or Consequence? » *Carcinogenesis* 7 (7): 1037-42. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.7.1037>.
- Bartling, B. 2013. « Cellular Senescence in Normal and Premature Lung Aging ». *Zeitschrift Für Gerontologie Und Geriatrie* 46 (7): 613-22. <https://doi.org/10.1007/s00391-013-0543-3>.
- Bavik, Claes, Ilsa Coleman, James P. Dean, Beatrice Knudsen, Steven Plymate, et Peter S. Nelson. 2006. « The Gene Expression Program of Prostate Fibroblast Senescence Modulates Neoplastic Epithelial Cell Proliferation through Paracrine Mechanisms ». *Cancer Research* 66 (2): 794-802. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1716>.
- Bellido, T. 2000. « Calbindin-D28k Is Expressed in Osteoblastic Cells and Suppresses Their Apoptosis by Inhibiting Caspase-3 Activity ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (34): 26328-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003600200>.
- Berggard, T., S. Miron, P. Onnerfjord, E. Thulin, K. S. Akerfeldt, J. J. Enghild, M. Akke, et S. Linse. 2002. « Calbindin D28k Exhibits Properties Characteristic of a Ca<sup>2+</sup> Sensor ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (19): 16662-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200415200>.
- Berggård, Tord, Olga Szczepankiewicz, Eva Thulin, et Sara Linse. 2002. « Myo-Inositol Monophosphatase Is an Activated Target of Calbindin D<sub>28k</sub> ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 41954-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203492200>.
- Bernichtein, Sophie, Natascha Pigat, Nicolas Barry Delongchamps, Florence Boutillon, Virginie Verkarre, Philippe Camparo, Edouard Reyes-Gomez, et al. 2017. « Vitamin D3 Prevents Calcium-Induced Progression of Early-Stage Prostate Tumors by Counteracting TRPC6 and Calcium Sensing Receptor Upregulation ». *Cancer Research* 77 (2): 355-65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0687>.
- Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, et H. Llewelyn Roderick. 2003. « Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (7): 517-29. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>.
- Bery, Fanny, Mathilde Cancel, Aurélie Chantôme, Roseline Guibon, Franck Bruyère, François Rozet, Karine Mahéo, et Gaëlle Fromont. 2020. « The Calcium-Sensing Receptor Is A Marker and Potential Driver of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer ». *Cancers* 12 (4): 860. <https://doi.org/10.3390/cancers12040860>.
- Bindreither, Daniel, et Peter Lackner. 2009. « Structural Diversity of Calcium Binding Sites ». *General Physiology and Biophysics* 28 Spec No Focus: F82-88.
- Birch, Jodie, et João F. Passos. 2017. « Targeting the SASP to Combat Ageing: Mitochondria as Possible Intracellular Allies? » *BioEssays* 39 (5): 1600235. <https://doi.org/10.1002/bies.201600235>.
- Blazanin, Nicholas, Jeongin Son, Alayna B. Craig-Lucas, Christian L. John, Kyle J. Breech, Michael A. Podolsky, et Adam B. Glick. 2017. « ER Stress and Distinct Outputs of the IRE1 $\alpha$  RNase Control Proliferation and Senescence in Response to Oncogenic Ras ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (37): 9900-9905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701757114>.
- Bobay, Benjamin G., Amanda L. Stewart, Ashley T. Tucker, Richele J. Thompson, Kristen M. Varney, et John Cavanagh. 2012. « Structural Insights into the Calcium-Dependent Interaction between Calbindin-D28K and Caspase-3 ». *FEBS Letters* 586 (20): 3582-89. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.032>.
- Bodnar, A. G. 1998. « Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells ». *Science* 279 (5349): 349-52. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>.
- Bogina, Giuseppe, Enrico Munari, Matteo Brunelli, Laura Bortesi, Marcella Marconi, Marco Sommaggio, Gianluigi Lunardi, et al. 2016. « Neuroendocrine Differentiation in Breast Carcinoma: Clinicopathological Features and Outcome ». *Histopathology* 68 (3): 422-32. <https://doi.org/10.1111/his.12766>.
- Bojko, Agnieszka, Joanna Czarnecka-Herok, Agata Charzynska, Michal Dabrowski, et Ewa Sikora. 2019. « Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents ». *Cells* 8 (12): 1501. <https://doi.org/10.3390/cells8121501>.

- Borghesan, Michela, Juan Fafián-Labora, Olga Eleftheriadou, Paula Carpintero-Fernández, Marta Paez-Ribes, Gema Vizcay-Barrena, Avital Swisa, et al. 2019. « Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-Cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3 ». *Cell Reports* 27 (13): 3956-3971.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.095>.
- Borodkina, Aleksandra V., Alla N. Shatrova, Pavel I. Deryabin, Anastasiia A. Griukova, Polina A. Abushik, Sergei M. Antonov, Nikolay N. Nikolsky, et Elena B. Burova. 2016a. « Calcium Alterations Signal Either to Senescence or to Autophagy Induction in Stem Cells upon Oxidative Stress ». *Aging* 8 (12): 3400-3418. <https://doi.org/10.18632/aging.101130>.
- . 2016b. « Calcium Alterations Signal Either to Senescence or to Autophagy Induction in Stem Cells upon Oxidative Stress ». *Aging* 8 (12): 3400-3418. <https://doi.org/10.18632/aging.101130>.
- Bracken, Adrian P., Daniela Kleine-Kohlbrecher, Nikolaj Dietrich, Diego Pasini, Gaetano Gargiulo, Chantal Beekman, Kim Theilgaard-Mönch, et al. 2007. « The Polycomb Group Proteins Bind throughout the INK4A-ARF Locus and Are Disassociated in Senescent Cells ». *Genes & Development* 21 (5): 525-30. <https://doi.org/10.1101/gad.415507>.
- Braig, Melanie, Soyoung Lee, Christoph Loddenkemper, Cornelia Rudolph, Antoine H.F.M. Peters, Brigitte Schlegelberger, Harald Stein, Bernd Dörken, Thomas Jenuwein, et Clemens A. Schmitt. 2005. « Oncogene-Induced Senescence as an Initial Barrier in Lymphoma Development ». *Nature* 436 (7051): 660-65. <https://doi.org/10.1038/nature03841>.
- Brookes, Sharon, Janice Rowe, Margarida Ruas, Susana Llanos, Paula A. Clark, Martine Lomax, Marion C. James, et al. 2002. « INK4a-Deficient Human Diploid Fibroblasts Are Resistant to RAS-Induced Senescence ». *The EMBO Journal* 21 (12): 2936-45. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf289>.
- Buchholz, Malte, Alexandra Schatz, Martin Wagner, Patrick Michl, Thomas Linhart, Guido Adler, Thomas M. Gress, et Volker Ellenrieder. 2006. « Overexpression of C-Myc in Pancreatic Cancer Caused by Ectopic Activation of NFATc1 and the Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin Signaling Pathway ». *The EMBO Journal* 25 (15): 3714-24. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601246>.
- Bultynck, G., E. Vermassen, K. Szlufcik, P. De Smet, R. A. Fissore, G. Callewaert, L. Missiaen, H. De Smedt, et J. B. Parys. 2003. « Calcineurin and Intracellular Ca<sup>2+</sup>-Release Channels: Regulation or Association? » *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311 (4): 1181-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.084>.
- Burd, Christin E., Jessica A. Sorrentino, Kelly S. Clark, David B. Darr, Janakiraman Krishnamurthy, Allison M. Deal, Nabeel Bardeesy, Diego H. Castrillon, David H. Beach, et Norman E. Sharpless. 2013. « Monitoring Tumorigenesis and Senescence in Vivo with a P16(INK4a)-Luciferase Model ». *Cell* 152 (1-2): 340-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.010>.
- Bussolati, G., P. Gugliotta, A. Sapino, V. Eusebi, et R. V. Lloyd. 1985. « Chromogranin-Reactive Endocrine Cells in Argyrophilic Carcinomas ("carcinoids") and Normal Tissue of the Breast ». *The American Journal of Pathology* 120 (2): 186-92.
- Busuttill, Rita A., Miguel Rubio, Martijn E. T. Dollé, Judith Campisi, et Jan Vijg. 2003. « Oxygen Accelerates the Accumulation of Mutations during the Senescence and Immortalization of Murine Cells in Culture ». *Aging Cell* 2 (6): 287-94. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2003.00066.x>.
- Campisi, Judith. 2005. « Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors ». *Cell* 120 (4): 513-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.003>.
- . 2013. « Aging, Cellular Senescence, and Cancer ». *Annual review of physiology* 75: 685-705. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183653>.
- Canaff, L., S. Bevan, D. G. Wheeler, A. J. Moulant, R. P. Rehfuss, J. H. White, et G. N. Hendy. 1998. « Analysis of Molecular Mechanisms Controlling Neuroendocrine Cell Specific Transcription of the Chromogranin A Gene ». *Endocrinology* 139 (3): 1184-96. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5851>.

- Cao, Long-Qiao, Ya-Nan Wang, Ming Liang, et Mei-Zhou Pan. 2019. « CALB1 Enhances the Interaction between P53 and MDM2, and Inhibits the Senescence of Ovarian Cancer Cells ». *Molecular Medicine Reports* 19 (6): 5097-5104. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10212>.
- Cao, Xiaoxiao, Lixiang Xue, Limin Han, Liwei Ma, Tianda Chen, et Tanjun Tong. 2011. « WW Domain-Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1 (WWP1) Delays Cellular Senescence by Promoting P27(Kip1) Degradation in Human Diploid Fibroblasts ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (38): 33447-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.225565>.
- Carreras-Sureda, Amado, Philippe Pihán, et Claudio Hetz. 2018. « Calcium Signaling at the Endoplasmic Reticulum: Fine-Tuning Stress Responses ». *Cell Calcium* 70 (mars): 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.08.004>.
- Castro, Claudia Y, Mark Stephenson, Margaret M Gondo, L Jeffrey Medeiros, et Philip T Cagle. 2000. « Prognostic Implications Of Calbindin-D28k Expression in Lung Cancer: Analysis of 452 Cases ». *Modern Pathology* 13 (7): 808-13. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880141>.
- Chan, Simon W-L, et Elizabeth H Blackburn. 2002. « New Ways Not to Make Ends Meet: Telomerase, DNA Damage Proteins and Heterochromatin ». *Oncogene* 21 (4): 553-63. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205082>.
- Chandra, Tamir, et Masashi Narita. 2013. « High-Order Chromatin Structure and the Epigenome in SAHFs ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 4 (1): 23-28. <https://doi.org/10.4161/nucl.23189>.
- Chang, Jianhui, Yingying Wang, Lijian Shao, Remi-Martin Laberge, Marco Demaria, Judith Campisi, Krishnamurthy Janakiraman, et al. 2016. « Clearance of Senescent Cells by ABT263 Rejuvenates Aged Hematopoietic Stem Cells in Mice ». *Nature Medicine* 22 (1): 78-83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>.
- Chen, Hongshan, Penelope D. Ruiz, Wendy M. McKimpon, Leonid Novikov, Richard N. Kitsis, et Matthew J. Gamble. 2015. « MacroH2A1 and ATM Play Opposing Roles in Paracrine Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype ». *Molecular Cell* 59 (5): 719-31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.011>.
- Chen, Q., et B. N. Ames. 1994. « Senescence-like Growth Arrest Induced by Hydrogen Peroxide in Human Diploid Fibroblast F65 Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (10): 4130-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4130>.
- Chen, Q., A. Fischer, J. D. Reagan, L. J. Yan, et B. N. Ames. 1995. « Oxidative DNA Damage and Senescence of Human Diploid Fibroblast Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (10): 4337-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4337>.
- Chen, Zhenbang, Lloyd C. Trotman, David Shaffer, Hui-Kuan Lin, Zohar A. Dotan, Masaru Niki, Jason A. Koutcher, et al. 2005. « Crucial Role of P53-Dependent Cellular Senescence in Suppression of Pten-Deficient Tumorigenesis ». *Nature* 436 (7051): 725-30. <https://doi.org/10.1038/nature03918>.
- Cheng, Li-Qin, Zhu-Qin Zhang, Hou-Zao Chen, et De-Pei Liu. 2017. « Epigenetic Regulation in Cell Senescence ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 95 (12): 1257-68. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1581-x>.
- Cheron, Guy, David Gall, Laurent Servais, Bernard Dan, Reinoud Maex, et Serge N. Schiffmann. 2004. « Inactivation of Calcium-Binding Protein Genes Induces 160 Hz Oscillations in the Cerebellar Cortex of Alert Mice ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24 (2): 434-41. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3197-03.2004>.
- Chien, Y., C. Scuoppo, X. Wang, X. Fang, B. Balgley, J. E. Bolden, P. Premririt, et al. 2011. « Control of the Senescence-Associated Secretory Phenotype by NF- B Promotes Senescence and Enhances Chemosensitivity ». *Genes & Development* 25 (20): 2125-36. <https://doi.org/10.1101/gad.17276711>.
- Christakos, Sylvania, et Yan Liu. 2004. « Biological Actions and Mechanism of Action of Calbindin in the Process of Apoptosis ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90 (1-5): 401-4. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.03.007>.

- Chung, Hae Young, Matteo Cesari, Stephen Anton, Emanuele Marzetti, Silvia Giovannini, Arnold Young Seo, Christy Carter, Byung Pal Yu, et Christiaan Leeuwenburgh. 2009. « Molecular Inflammation: Underpinnings of Aging and Age-Related Diseases ». *Ageing Research Reviews* 8 (1): 18-30. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.07.002>.
- Clapham, David E. 2007. « Calcium Signaling ». *Cell* 131 (6): 1047-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>.
- Collado, Manuel, Jesús Gil, Alejo Efeyan, Carmen Guerra, Alberto J. Schuhmacher, Marta Barradas, Alberto Benguría, et al. 2005. « Tumour Biology: Senescence in Premalignant Tumours ». *Nature* 436 (7051): 642. <https://doi.org/10.1038/436642a>.
- Contrepois, Kévin, Clément Coudereau, Bérénice A. Benayoun, Nadine Schuler, Pierre-François Roux, Oliver Bischof, Régis Courbeyrette, et al. 2017. « Histone Variant H2A.J Accumulates in Senescent Cells and Promotes Inflammatory Gene Expression ». *Nature Communications* 8 (1): 14995. <https://doi.org/10.1038/ncomms14995>.
- Coppé, Jean-Philippe, Pierre-Yves Desprez, Ana Krtolica, et Judith Campisi. 2010. « The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5 (1): 99-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>.
- Coppé, Jean-Philippe, Katalin Kauser, Judith Campisi, et Christian M. Beauséjour. 2006. « Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (40): 29568-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200>.
- Coppé, Jean-Philippe, Christopher K. Patil, Francis Rodier, Yu Sun, Denise P. Muñoz, Joshua Goldstein, Peter S. Nelson, Pierre-Yves Desprez, et Judith Campisi. 2008. « Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the P53 Tumor Suppressor ». *PLoS Biology* 6 (12): 2853-68. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>.
- Correia-Melo, Clara, Francisco D. M. Marques, Rhys Anderson, Graeme Hewitt, Rachael Hewitt, John Cole, Bernadette M. Carroll, et al. 2016. « Mitochondria Are Required for Pro-Ageing Features of the Senescent Phenotype ». *The EMBO Journal* 35 (7): 724-42. <https://doi.org/10.15252/emboj.201592862>.
- Cottage, Christopher T., Norman Peterson, Jennifer Kearley, Aaron Berlin, Ximing Xiong, Anna Huntley, Weiguang Zhao, et al. 2019. « Targeting P16-Induced Senescence Prevents Cigarette Smoke-Induced Emphysema by Promoting IGF1/Akt1 Signaling in Mice ». *Communications Biology* 2 (1): 307. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0532-1>.
- Crabtree, G. R. 2001. « Calcium, Calcineurin, and the Control of Transcription ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (4): 2313-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000024200>.
- Crescenzi, Elvira, Giuseppe Palumbo, et Hugh J. M. Brady. 2003. « Bcl-2 Activates a Programme of Premature Senescence in Human Carcinoma Cells ». *The Biochemical Journal* 375 (Pt 2): 263-74. <https://doi.org/10.1042/BJ20030868>.
- Csordás, G., et G. Hajnóczky. 2001. « Sorting of Calcium Signals at the Junctions of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria ». *Cell Calcium* 29 (4): 249-62. <https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0191>.
- Csordás, G., A. P. Thomas, et G. Hajnóczky. 1999. « Quasi-Synaptic Calcium Signal Transmission between Endoplasmic Reticulum and Mitochondria ». *The EMBO Journal* 18 (1): 96-108. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.96>.
- Csordás, György, David Weaver, et György Hajnóczky. 2018a. « Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions ». *Trends in Cell Biology* 28 (7): 523-40. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.009>.
- . 2018b. « Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions ». *Trends in Cell Biology* 28 (7): 523-40. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.009>.
- Davaapil, Hongorzul, Jeremy P. Brookes, et Maximina H. Yun. 2017. « Conserved and Novel Functions of Programmed Cellular Senescence during Vertebrate Development ». *Development (Cambridge, England)* 144 (1): 106-14. <https://doi.org/10.1242/dev.138222>.

- Davalos, Albert R., Misako Kawahara, Gautam K. Malhotra, Nicholas Schaum, Jiahao Huang, Urvi Ved, Christian M. Beausejour, Jean-Philippe Coppe, Francis Rodier, et Judith Campisi. 2013. « P53-Dependent Release of Alarmin HMGB1 Is a Central Mediator of Senescent Phenotypes ». *The Journal of Cell Biology* 201 (4): 613-29. <https://doi.org/10.1083/jcb.201206006>.
- De Cecco, Marco, Takahiro Ito, Anna P. Petrashen, Amy E. Elias, Nicholas J. Skvir, Steven W. Criscione, Alberto Caligiana, et al. 2019. « L1 Drives IFN in Senescent Cells and Promotes Age-Associated Inflammation ». *Nature* 566 (7742): 73-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>.
- Dechat, Thomas, Katrin Pflieger, Kaushik Sengupta, Takeshi Shimi, Dale K. Shumaker, Liliana Solimando, et Robert D. Goldman. 2008. « Nuclear Lamins: Major Factors in the Structural Organization and Function of the Nucleus and Chromatin ». *Genes & Development* 22 (7): 832-53. <https://doi.org/10.1101/gad.1652708>.
- Decuyper, Jean-Paul, Geert Bultynck, et Jan B. Parys. 2011. « A Dual Role for Ca(2+) in Autophagy Regulation ». *Cell Calcium* 50 (3): 242-50. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.04.001>.
- Demaria, Marco, Naoko Ohtani, Sameh A. Youssef, Francis Rodier, Wendy Toussaint, James R. Mitchell, Remi-Martin Laberge, et al. 2014. « An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA ». *Developmental Cell* 31 (6): 722-33. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>.
- Demaria, Marco, Monique N. O'Leary, Jianhui Chang, Lijian Shao, Su Liu, Fatouma Alimirah, Kristin Koenig, et al. 2017. « Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse ». *Cancer Discovery* 7 (2): 165-76. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0241>.
- Deng, Xuehong, Han Liu, Jiaoti Huang, Liang Cheng, Evan T. Keller, Sarah J. Parsons, et Chang-Deng Hu. 2008. « Ionizing Radiation Induces Prostate Cancer Neuroendocrine Differentiation through Interplay of CREB and ATF2: Implications for Disease Progression ». *Cancer Research* 68 (23): 9663-70. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2229>.
- Denton, Richard M. 2009. « Regulation of Mitochondrial Dehydrogenases by Calcium Ions ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1787 (11): 1309-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2009.01.005>.
- Di Micco, Raffaella, Marzia Fumagalli, Angelo Cicalese, Sara Piccinin, Patrizia Gasparini, Chiara Luise, Catherine Schurra, et al. 2006. « Oncogene-Induced Senescence Is a DNA Damage Response Triggered by DNA Hyper-Replication ». *Nature* 444 (7119): 638-42. <https://doi.org/10.1038/nature05327>.
- Dimri, G. P., K. Itahana, M. Acosta, et J. Campisi. 2000. « Regulation of a Senescence Checkpoint Response by the E2F1 Transcription Factor and P14(ARF) Tumor Suppressor ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (1): 273-85. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.1.273-285.2000>.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, et O. Pereira-Smith. 1995. « A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (20): 9363-67.
- Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, C. C. Goodnow, et J. I. Healy. 1997. « Differential Activation of Transcription Factors Induced by Ca<sup>2+</sup> Response Amplitude and Duration ». *Nature* 386 (6627): 855-58. <https://doi.org/10.1038/386855a0>.
- Dou, Zhixun, Kanad Ghosh, Maria Grazia Vizioli, Jiajun Zhu, Payel Sen, Kirk J. Wangensteen, Johayra Simithy, et al. 2017. « Cytoplasmic Chromatin Triggers Inflammation in Senescence and Cancer ». *Nature* 550 (7676): 402-6. <https://doi.org/10.1038/nature24050>.
- Drummond-Barbosa, Daniela. 2008. « Stem Cells, Their Niches and the Systemic Environment: An Aging Network ». *Genetics* 180 (4): 1787-97. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.098244>.
- Efeyan, Alejo, Ana Ortega-Molina, Susana Velasco-Miguel, Daniel Herranz, Lyubomir T. Vassilev, et Manuel Serrano. 2007. « Induction of P53-Dependent Senescence by the MDM2 Antagonist Nutlin-3a in Mouse Cells of Fibroblast Origin ». *Cancer Research* 67 (15): 7350-57. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0200>.

- Erusalimsky, Jorge D., et David J. Kurz. 2005. « Cellular Senescence in Vivo: Its Relevance in Ageing and Cardiovascular Disease ». *Experimental Gerontology* 40 (8-9): 634-42. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.04.010>.
- Ewald, Jonathan A., Joshua A. Desotelle, George Wilding, et David F. Jarrard. 2010. « Therapy-Induced Senescence in Cancer ». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 102 (20): 1536-46. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq364>.
- Fafián-Labora, Juan Antonio, et Ana O'Loghlen. 2020. « Classical and Nonclassical Intercellular Communication in Senescence and Ageing ». *Trends in Cell Biology* 30 (8): 628-39. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.05.003>.
- Fagagna, Fabrizio d'Adda di. 2008. « Living on a Break: Cellular Senescence as a DNA-Damage Response ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (7): 512-22. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>.
- Fagagna, Fabrizio d'Adda di, Philip M. Reaper, Lorena Clay-Farrace, Heike Fiegler, Philippa Carr, Thomas Von Zglinicki, Gabriele Saretzki, Nigel P. Carter, et Stephen P. Jackson. 2003. « A DNA Damage Checkpoint Response in Telomere-Initiated Senescence ». *Nature* 426 (6963): 194-98. <https://doi.org/10.1038/nature02118>.
- Farfariello, Valerio, Oksana Iamshanova, Emmanuelle Germain, Ingrid Fliniaux, et Natalia Prevarskaya. 2015. « Calcium Homeostasis in Cancer: A Focus on Senescence ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1853 (9): 1974-79. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.005>.
- Felsher, D. W., et J. M. Bishop. 1999. « Reversible Tumorigenesis by MYC in Hematopoietic Lineages ». *Molecular Cell* 4 (2): 199-207. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80367-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80367-6).
- Fernández-Duran, Irene, Núria Tarrats, Priya Hari, et Juan Carlos Acosta. 2019. « Measuring the Inflammasome in Oncogene-Induced Senescence ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1896: 57-70. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8931-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8931-7_7).
- Flach, Johanna, Sietske T. Bakker, Mary Mohrin, Pauline C. Conroy, Eric M. Pietras, Damien Reynaud, Silvia Alvarez, et al. 2014. « Replication Stress Is a Potent Driver of Functional Decline in Ageing Haematopoietic Stem Cells ». *Nature* 512 (7513): 198-202. <https://doi.org/10.1038/nature13619>.
- Fleischmann, Roy, Richard Stern, et Imran Iqbal. 2004. « Anakinra: An Inhibitor of IL-1 for the Treatment of Rheumatoid Arthritis ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 4 (8): 1333-44. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.8.1333>.
- Freund, Adam, Remi-Martin Laberge, Marco Demaria, et Judith Campisi. 2012. « Lamin B1 Loss Is a Senescence-Associated Biomarker ». *Molecular Biology of the Cell* 23 (11): 2066-75. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0884>.
- Freund, Adam, Arturo V. Orjalo, Pierre-Yves Desprez, et Judith Campisi. 2010. « Inflammatory Networks during Cellular Senescence: Causes and Consequences ». *Trends in Molecular Medicine* 16 (5): 238-46. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>.
- Freund, Adam, Christopher K Patil, et Judith Campisi. 2011. « P38MAPK Is a Novel DNA Damage Response-Independent Regulator of the Senescence-Associated Secretory Phenotype: P38 Regulates the Senescence Secretory Phenotype ». *The EMBO Journal* 30 (8): 1536-48. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.69>.
- Fumagalli, Marzia, Francesca Rossiello, Michela Clerici, Sara Barozzi, Davide Cittaro, Jessica M. Kaplunov, Gabriele Bucci, et al. 2012. « Telomeric DNA Damage Is Irreparable and Causes Persistent DNA-Damage-Response Activation ». *Nature Cell Biology* 14 (4): 355-65. <https://doi.org/10.1038/ncb2466>.
- Funayama, Ryo, Motoki Saito, Hiroko Tanobe, et Fuyuki Ishikawa. 2006. « Loss of Linker Histone H1 in Cellular Senescence ». *The Journal of Cell Biology* 175 (6): 869-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604005>.
- Furumoto, K., E. Inoue, N. Nagao, E. Hiyama, et N. Miwa. 1998. « Age-Dependent Telomere Shortening Is Slowed down by Enrichment of Intracellular Vitamin C via Suppression of Oxidative Stress ». *Life Sciences* 63 (11): 935-48. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00351-8](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00351-8).

- Gackière, Florian, Gabriel Bidaux, Philippe Delcourt, Fabien Van Coppenolle, Maria Katsogiannou, Etienne Dewailly, Alexis Bavencoffe, et al. 2008. « CaV3.2 T-Type Calcium Channels Are Involved in Calcium-Dependent Secretion of Neuroendocrine Prostate Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (15): 10162-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707159200>.
- Garcia, M. Iveth, et Darren Boehning. 2017. « Cardiac Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1864 (6): 907-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.017>.
- Genazzani, A. A., E. Carafoli, et D. Guerini. 1999. « Calcineurin Controls Inositol 1,4,5-Trisphosphate Type 1 Receptor Expression in Neurons ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10): 5797-5801. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5797>.
- Gifford, Jessica L., Michael P. Walsh, et Hans J. Vogel. 2007. « Structures and Metal-Ion-Binding Properties of the Ca<sup>2+</sup>-Binding Helix-Loop-Helix EF-Hand Motifs ». *The Biochemical Journal* 405 (2): 199-221. <https://doi.org/10.1042/BJ20070255>.
- Gil, Jesús, David Bernard, Dolores Martínez, et David Beach. 2004. « Polycomb CBX7 Has a Unifying Role in Cellular Lifespan ». *Nature Cell Biology* 6 (1): 67-72. <https://doi.org/10.1038/ncb1077>.
- Gill, Sean E., et William C. Parks. 2008. « Metalloproteinases and Their Inhibitors: Regulators of Wound Healing ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (6-7): 1334-47. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.10.024>.
- Ginos, Matthew A., Grier P. Page, Bryan S. Michalowicz, Ketan J. Patel, Sonja E. Volker, Stefan E. Pambuccian, Frank G. Ondrey, George L. Adams, et Patrick M. Gaffney. 2004. « Identification of a Gene Expression Signature Associated with Recurrent Disease in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck ». *Cancer Research* 64 (1): 55-63. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2144>.
- Goldstein, S., E. J. Moerman, R. A. Jones, et R. C. Baxter. 1991. « Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 Accumulates to High Levels in Culture Medium of Senescent and Quiescent Human Fibroblasts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (21): 9680-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9680>.
- Gosselin, Karo, Sébastien Martien, Albin Pourtier, Chantal Vercamer, Peter Ostoich, Luc Morat, Laure Sabatier, et al. 2009. « Senescence-Associated Oxidative DNA Damage Promotes the Generation of Neoplastic Cells ». *Cancer Research* 69 (20): 7917-25. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2510>.
- Guo, Q., S. Christakos, N. Robinson, et M. P. Mattson. 1998. « Calbindin D28k Blocks the Proapoptotic Actions of Mutant Presenilin 1: Reduced Oxidative Stress and Preserved Mitochondrial Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6): 3227-32.
- Hajibeigi, Asghar, Elhadji M. Dioum, Jianfei Guo, et Orhan K. Öz. 2015. « Identification of Novel Regulatory NFAT and TFII-I Binding Elements in the Calbindin-D28k Promoter in Response to Serum Deprivation ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 465 (3): 414-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.024>.
- Hajnóczky, György, György Csordás, Sudipto Das, Cecilia Garcia-Perez, Masao Saotome, Soumya Sinha Roy, et Muqing Yi. 2006. « Mitochondrial Calcium Signalling and Cell Death: Approaches for Assessing the Role of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Uptake in Apoptosis ». *Cell Calcium* 40 (5-6): 553-60. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.016>.
- Hall, Megan, Bryan Todd, Edwin D Allen Jr, Nga Nguyen, Yoon-Jung Kwon, Vu Nguyen, et Miguel Martin-Caraballo. s. d. « Androgen Receptor Signaling Regulates T-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Expression and Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer Cells », 16.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hannan, Fadil M., Enikő Kallay, Wenhan Chang, Maria Luisa Brandi, et Rajesh V. Thakker. 2018. « The Calcium-Sensing Receptor in Physiology and in Calcitropic and Noncalcitropic Diseases ». *Nature Reviews. Endocrinology* 15 (1): 33-51. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0115-0>.

- Hardingham, G. E., F. J. Arnold, et H. Bading. 2001. « Nuclear Calcium Signaling Controls CREB-Mediated Gene Expression Triggered by Synaptic Activity ». *Nature Neuroscience* 4 (3): 261-67. <https://doi.org/10.1038/85109>.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, et S. J. Elledge. 1993. « The P21 Cdk-Interacting Protein Cip1 Is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases ». *Cell* 75 (4): 805-16. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90499-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90499-g).
- Harr, Michael W., et Clark W. Distelhorst. 2010. « Apoptosis and Autophagy: Decoding Calcium Signals That Mediate Life or Death ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (10): a005579. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005579>.
- Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz, et M. Oren. 1997. « Mdm2 Promotes the Rapid Degradation of P53 ». *Nature* 387 (6630): 296-99. <https://doi.org/10.1038/387296a0>.
- Hayflick, L., et P. S. Moorhead. 1961. « The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains ». *Experimental Cell Research* 25 (décembre): 585-621.
- He, Shenghui, et Norman E. Sharpless. 2017. « Senescence in Health and Disease ». *Cell* 169 (6): 1000-1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>.
- Herbig, Utz, Wendy A. Jobling, Benjamin P. C. Chen, David J. Chen, et John M. Sedivy. 2004. « Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, P53, and P21(CIP1), but Not P16(INK4a) ». *Molecular Cell* 14 (4): 501-13. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00256-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00256-4).
- Hernandez-Segura, Alejandra, Tristan V. de Jong, Simon Melov, Victor Guryev, Judith Campisi, et Marco Demaria. 2017. « Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells ». *Current Biology* 27 (17): 2652-2660.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.033>.
- Herranz, Nicolás, Suchira Gallage, Massimiliano Mellone, Torsten Wuestefeld, Sabrina Klotz, Christopher J. Hanley, Selina Raguz, et al. 2015. « MTOR Regulates MAPKAPK2 Translation to Control the Senescence-Associated Secretory Phenotype ». *Nature Cell Biology* 17 (9): 1205-17. <https://doi.org/10.1038/ncb3225>.
- Hoare, Matthew, Yoko Ito, Tae-Won Kang, Michael P. Weekes, Nicholas J. Matheson, Daniel A. Patten, Shishir Shetty, et al. 2016. « NOTCH1 Mediates a Switch between Two Distinct Secretomes during Senescence ». *Nature Cell Biology* 18 (9): 979-92. <https://doi.org/10.1038/ncb3397>.
- Hoare, Matthew, et Masashi Narita. 2013. « Transmitting Senescence to the Cell Neighbourhood ». *Nature Cell Biology* 15 (8): 887-89. <https://doi.org/10.1038/ncb2811>.
- Hobbs, Carey A., Leesa J. Deterding, Lalith Perera, Benjamin G. Bobay, Richele J. Thompson, Thomas A. Darden, John Cavanagh, et Kenneth B. Tomer. 2009. « Structural Characterization of the Conformational Change in Calbindin-D<sub>28k</sub> upon Calcium Binding Using Differential Surface Modification Analyzed by Mass Spectrometry ». *Biochemistry* 48 (36): 8603-14. <https://doi.org/10.1021/bi900350q>.
- Hogan, Patrick G., Lin Chen, Julie Nardone, et Anjana Rao. 2003. « Transcriptional Regulation by Calcium, Calcineurin, and NFAT ». *Genes & Development* 17 (18): 2205-32. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>.
- Hou, T. T., J. D. Johnson, et J. A. Rall. 1993. « Role of Parvalbumin in Relaxation of Frog Skeletal Muscle ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 332: 141-51; discussion 151-153. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2872-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2872-2_13).
- Huang, Zhengxiang, Guojun Fan, et Dongliang Wang. 2017. « Downregulation of Calbindin 1, a Calcium-Binding Protein, Reduces the Proliferation of Osteosarcoma Cells ». *Oncology Letters* 13 (5): 3727-33. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5931>.
- Iannello, Alexandre, et David H Raullet. 2014. « Immunosurveillance of Senescent Cancer Cells by Natural Killer Cells ». *Onc Immunology* 3 (2): e27616. <https://doi.org/10.4161/onci.27616>.
- Ikura, M. 1996. « Calcium Binding and Conformational Response in EF-Hand Proteins ». *Trends in Biochemical Sciences* 21 (1): 14-17.
- Inno Alessandro, Bogina Giuseppe, Turazza Monica, Bortesi Laura, Duranti Simona, Massocco Alberto, Zamboni Giuseppe, et al. 2016. « Neuroendocrine Carcinoma of the Breast: Current



- Evidence and Future Perspectives ». *The Oncologist* 21 (1): 28-32.  
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0309>.
- Itahana, Koji, Ying Zou, Yoko Itahana, Jose-Luis Martinez, Christian Beausejour, Jacqueline J. L. Jacobs, Maarten Van Lohuizen, Vimla Band, Judith Campisi, et Goberdhan P. Dimri. 2003. « Control of the Replicative Life Span of Human Fibroblasts by P16 and the Polycomb Protein Bmi-1 ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (1): 389-401. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.1.389-401.2003>.
- Jain, Meenakshi, Constadina Arvanitis, Kenneth Chu, William Dewey, Edith Leonhardt, Maxine Trinh, Christopher D. Sundberg, J. Michael Bishop, et Dean W. Felsher. 2002. « Sustained Loss of a Neoplastic Phenotype by Brief Inactivation of MYC ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5578): 102-4. <https://doi.org/10.1126/science.1071489>.
- Janzen, Viktor, Randolph Forkert, Heather E. Fleming, Yoriko Saito, Michael T. Waring, David M. Dombkowski, Tao Cheng, Ronald A. DePinho, Norman E. Sharpless, et David T. Scadden. 2006. « Stem-Cell Ageing Modified by the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P16INK4a ». *Nature* 443 (7110): 421-26. <https://doi.org/10.1038/nature05159>.
- Jeyapalan, Jessie C., Mark Ferreira, John M. Sedivy, et Utz Herbig. 2007. « Accumulation of Senescent Cells in Mitotic Tissue of Aging Primates ». *Mechanisms of Ageing and Development* 128 (1): 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.008>.
- Jun, Joon-Il, et Lester F. Lau. 2010. « The Matricellular Protein CCN1 Induces Fibroblast Senescence and Restricts Fibrosis in Cutaneous Wound Healing ». *Nature Cell Biology* 12 (7): 676-85. <https://doi.org/10.1038/ncb2070>.
- Kahl, Christina R., et Anthony R. Means. 2004. « Calcineurin Regulates Cyclin D1 Accumulation in Growth-Stimulated Fibroblasts ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (4): 1833-42. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-10-0730>.
- Kamijo, T., J. D. Weber, G. Zambetti, F. Zindy, M. F. Roussel, et C. J. Sherr. 1998. « Functional and Physical Interactions of the ARF Tumor Suppressor with P53 and Mdm2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (14): 8292-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8292>.
- Kamijo, T., F. Zindy, M. F. Roussel, D. E. Quelle, J. R. Downing, R. A. Ashmun, G. Grosveld, et C. J. Sherr. 1997. « Tumor Suppression at the Mouse INK4a Locus Mediated by the Alternative Reading Frame Product P19ARF ». *Cell* 91 (5): 649-59. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80452-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80452-3).
- Kanayama, Mayuko, Toshiya Hayano, Michinori Koebis, Tatsuya Maeda, Yoko Tabe, Shigeo Horie, et Atsu Aiba. 2017. « Hyperactive MTOR Induces Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer Cell with Concurrent Up-Regulation of IRF1 ». *The Prostate* 77 (15): 1489-98. <https://doi.org/10.1002/pros.23425>.
- Kang, Chanhee, Qikai Xu, Timothy D. Martin, Mamie Z. Li, Marco Demaria, Liviu Aron, Tao Lu, Bruce A. Yankner, Judith Campisi, et Stephen J. Elledge. 2015. « The DNA Damage Response Induces Inflammation and Senescence by Inhibiting Autophagy of GATA4 ». *Science (New York, N.Y.)* 349 (6255): aaa5612. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5612>.
- Kang, Mo K., Reuben H. Kim, Ki-Hyuk Shin, Weiguong Zhong, Kym F. Faull, et No-Hee Park. 2005. « Senescence-Associated Decline in the Intranuclear Accumulation of HOGG1-Alpha and Impaired 8-Oxo-DG Repair Activity in Senescing Normal Human Oral Keratinocytes in Vivo ». *Experimental Cell Research* 310 (1): 186-95. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.019>.
- Kang, Sang Soo, Kyung-Seok Han, Bo Mi Ku, Yeon Kyung Lee, Jinpyo Hong, Hye Young Shin, Antoine G. Almonte, et al. 2010. « Caffeine-Mediated Inhibition of Calcium Release Channel Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Subtype 3 Blocks Glioblastoma Invasion and Extends Survival ». *Cancer Research* 70 (3): 1173-83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2886>.
- Kang, Tae-Won, Tetyana Yevsa, Norman Woller, Lisa Hoenicke, Torsten Wuestefeld, Daniel Dauch, Anja Hohmeyer, et al. 2011. « Senescence Surveillance of Pre-Malignant Hepatocytes Limits Liver Cancer Development ». *Nature* 479 (7374): 547-51. <https://doi.org/10.1038/nature10599>.

- Kapahi, Pankaj, Di Chen, Aric N. Rogers, Subhash D. Katewa, Patrick Wai-Lun Li, Emma L. Thomas, et Lutz Kockel. 2010. « With TOR, Less Is More: A Key Role for the Conserved Nutrient-Sensing TOR Pathway in Aging ». *Cell Metabolism* 11 (6): 453-65. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.001>.
- Karsdal, Morten A., Georg Schett, Paul Emery, Olivier Harari, Inger Byrjalsen, Andy Kenwright, Anne C. Bay-Jensen, et Adam Platt. 2012. « IL-6 Receptor Inhibition Positively Modulates Bone Balance in Rheumatoid Arthritis Patients with an Inadequate Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy: Biochemical Marker Analysis of Bone Metabolism in the Tocilizumab RADIATE Study (NCT00106522) ». *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 42 (2): 131-39. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2012.01.004>.
- Kato, Kosuke, Naomi J. Logsdon, Yoon-Joo Shin, Sunny Palumbo, Adam Knox, Joseph D. Irish, Skye P. Rounseville, et al. 2020. « Impaired Myofibroblast Dedifferentiation Contributes to Nonresolving Fibrosis in Aging ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 62 (5): 633-44. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0092OC>.
- Kaul, Zeenia, Anthony J. Cesare, Lily I. Huschtscha, Axel A. Neumann, et Roger R. Reddel. 2011. « Five Dysfunctional Telomeres Predict Onset of Senescence in Human Cells ». *EMBO Reports* 13 (1): 52-59. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.227>.
- Kim, Jung-Eun, Sang Yong Kim, Sue Yeon Lim, Elliott Kieff, et Yoon-Jae Song. 2014. « Role of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Kinase II–IRAK1 Interaction in LMP1-Induced NF- $\kappa$ B Activation ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (3): 325-34. <https://doi.org/10.1128/MCB.00912-13>.
- Kim, Kwang Seok, Min-Sun Kim, Young Bae Seu, Hae Young Chung, Jung Hye Kim, et Jae-Ryong Kim. 2007. « Regulation of Replicative Senescence by Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 3 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells ». *Aging Cell* 6 (4): 535-45. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00315.x>.
- Kim, Kwang Seok, Young Bae Seu, Suk-Hwan Baek, Mi Jin Kim, Keuk Jun Kim, Jung Hye Kim, et Jae-Ryong Kim. 2007. « Induction of Cellular Senescence by Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5 through a P53-Dependent Mechanism ». *Molecular Biology of the Cell* 18 (11): 4543-52. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-03-0280>.
- Kirkland, James L., et Tamara Tchkonja. 2017. « Cellular Senescence: A Translational Perspective ». *EBioMedicine* 21 (juillet): 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.013>.
- Kiviluoto, Santeri, Tim Vervliet, Hristina Ivanova, Jean-Paul Decuypere, Humbert De Smedt, Ludwig Missiaen, Geert Bultynck, et Jan B. Parys. 2013. « Regulation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors during Endoplasmic Reticulum Stress ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (7): 1612-24. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.01.026>.
- Kiyono, T., S. A. Foster, J. I. Koop, J. K. McDougall, D. A. Galloway, et A. J. Klingelutz. 1998. « Both Rb/P16INK4a Inactivation and Telomerase Activity Are Required to Immortalize Human Epithelial Cells ». *Nature* 396 (6706): 84-88. <https://doi.org/10.1038/23962>.
- Kojetin, Douglas J., Ronald A. Venters, David R. Kordys, Richele J. Thompson, Rajiv Kumar, et John Cavanagh. 2006. « Structure, Binding Interface and Hydrophobic Transitions of Ca<sup>2+</sup>-Loaded Calbindin-D(28K) ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (7): 641-47. <https://doi.org/10.1038/nsmb1112>.
- Kolodkin-Gal, Dror, Lior Roitman, Yossi Ovadya, Narmen Azazmeh, Benjamin Assouline, Yehuda Schlesinger, Rachel Kalifa, et al. 2021. « Senolytic Elimination of Cox2-Expressing Senescent Cells Inhibits the Growth of Premalignant Pancreatic Lesions ». *Gut*, mars, gutjnl-2020-321112. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-321112>.
- Kornhauser, Jon M., Christopher W. Cowan, Adam J. Shaywitz, Ricardo E. Dolmetsch, Eric C. Griffith, Linda S. Hu, Chia Haddad, Zhengui Xia, et Michael E. Greenberg. 2002. « CREB Transcriptional Activity in Neurons Is Regulated by Multiple, Calcium-Specific Phosphorylation Events ». *Neuron* 34 (2): 221-33.
- Kosar, Martin, Jirina Bartkova, Sona Hubackova, Zdenek Hodny, Jiri Lukas, et Jiri Bartek. 2011. « Senescence-Associated Heterochromatin Foci Are Dispensable for Cellular Senescence,

- Occur in a Cell Type- and Insult-Dependent Manner and Follow Expression of P16(Ink4a) ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (3): 457-68. <https://doi.org/10.4161/cc.10.3.14707>.
- Kovac, Jason R., Tom Chrones, et Stephen M. Sims. 2008. « Temporal and Spatial Dynamics Underlying Capacitative Calcium Entry in Human Colonic Smooth Muscle ». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 294 (1): G88-98. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00305.2007>.
- Krebs, Joachim, Luis B. Agellon, et Marek Michalak. 2015. « Ca(2+) Homeostasis and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress: An Integrated View of Calcium Signaling ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460 (1): 114-21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.004>.
- Krizhanovsky, Valery, Monica Yon, Ross A. Dickins, Stephen Hearn, Janelle Simon, Cornelius Miething, Herman Yee, Lars Zender, et Scott W. Lowe. 2008. « Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis ». *Cell* 134 (4): 657-67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>.
- Krtolica, Ana, Simona Parrinello, Stephen Lockett, Pierre-Yves Desprez, et Judith Campisi. 2001. « Senescent Fibroblasts Promote Epithelial Cell Growth and Tumorigenesis: A Link between Cancer and Aging ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (21): 12072-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.211053698>.
- Kuilman, Thomas, Chrysiis Michaloglou, Liesbeth C. W. Vredeveld, Sirith Douma, Remco van Doorn, Christophe J. Desmet, Lucien A. Aarden, Wolter J. Mooi, et Daniel S. Peeper. 2008. « Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network ». *Cell* 133 (6): 1019-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>.
- Kurz, D. J., S. Decary, Y. Hong, et J. D. Erusalimsky. 2000. « Senescence-Associated (Beta)-Galactosidase Reflects an Increase in Lysosomal Mass during Replicative Ageing of Human Endothelial Cells ». *Journal of Cell Science* 113 ( Pt 20) (octobre): 3613-22.
- Laberge, Remi-Martin, Yu Sun, Arturo V. Orjalo, Christopher K. Patil, Adam Freund, Lili Zhou, Samuel C. Curran, et al. 2015. « MTOR Regulates the Pro-Tumorigenic Senescence-Associated Secretory Phenotype by Promoting IL1A Translation ». *Nature Cell Biology* 17 (8): 1049-61. <https://doi.org/10.1038/ncb3195>.
- Lallet-Daher, H el ene, Clotilde Wiel, Delphine Gitenay, Naveenan Navaratnam, Arnaud Augert, Benjamin Le Calv e, St ephanie Verbeke, et al. 2013. « Potassium Channel KCNA1 Modulates Oncogene-Induced Senescence and Transformation ». *Cancer Research* 73 (16): 5253-65. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3690>.
- Lavigne, Marion, Emmanuelle Menet, Jean-Christophe Tille, Marick Lae, Laetitia Fuhrmann, Claire Bonneau, Gabrielle Denizaut, et al. 2018. « Comprehensive Clinical and Molecular Analyses of Neuroendocrine Carcinomas of the Breast ». *Modern Pathology* 31 (1): 68-82. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.107>.
- Lee, A. C., B. E. Fenster, H. Ito, K. Takeda, N. S. Bae, T. Hirai, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, B. H. Howard, et T. Finkel. 1999. « Ras Proteins Induce Senescence by Altering the Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 7936-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7936>.
- Lee, Bo Yun, Jung A. Han, Jun Sub Im, Amelia Morrone, Kimberly Johung, Edward C. Goodwin, Wim J. Kleijer, Daniel DiMaio, et Eun Seong Hwang. 2006. « Senescence-Associated  $\beta$ -Galactosidase Is Lysosomal  $\beta$ -Galactosidase ». *Aging Cell* 5 (2): 187-95. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>.
- Lee, David, Alexander G. Obukhov, Qi Shen, Yan Liu, Puneet Dhawan, Martha C. Nowycky, et Sylvia Christakos. 2006. « Calbindin-D28k Decreases L-Type Calcium Channel Activity and Modulates Intracellular Calcium Homeostasis in Response to K+ Depolarization in a Rat Beta Cell Line RINr1046-38 ». *Cell Calcium* 39 (6): 475-85. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.01.010>.
- Lee, Geum-Hwa, Hyun-Kyung Kim, Soo-Wan Chae, Do-Sung Kim, Ki-Chan Ha, Mike Cuddy, Christina Kress, John C. Reed, Hyung-Ryong Kim, et Han-Jung Chae. 2007. « Bax Inhibitor-1 Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Reactive Oxygen Species and Heme Oxygenase-1

- Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (30): 21618-28.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M700053200>.
- Lee, Hsin-Chen, Pen-Hui Yin, Chin-Wen Chi, et Yau-Huei Wei. 2002. « Increase in Mitochondrial Mass in Human Fibroblasts under Oxidative Stress and during Replicative Cell Senescence ». *Journal of Biomedical Science* 9 (6 Pt 1): 517-26. <https://doi.org/10.1007/BF02254978>.
- Lehen'Kyj, V., M. Flourakis, R. Skryma, et N. Prevarskaia. 2007. « TRPV6 Channel Controls Prostate Cancer Cell Proliferation via Ca<sup>2+</sup>/NFAT-Dependent Pathways ». *Oncogene* 26 (52): 7380-85. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210545>.
- Lehmann, Brian D., Matthew S. Paine, Adam M. Brooks, James A. McCubrey, Randall H. Renegar, Rong Wang, et David M. Terrian. 2008. « Senescence-Associated Exosome Release from Human Prostate Cancer Cells ». *Cancer Research* 68 (19): 7864-71. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6538>.
- Leonardo, A. Di, S. P. Linke, K. Clarkin, et G. M. Wahl. 1994. « DNA Damage Triggers a Prolonged P53-Dependent G1 Arrest and Long-Term Induction of Cip1 in Normal Human Fibroblasts. » *Genes & Development* 8 (21): 2540-51. <https://doi.org/10.1101/gad.8.21.2540>.
- Levine, A. J. 1997. « P53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division ». *Cell* 88 (3): 323-31. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81871-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81871-1).
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, et X. Wang. 1997. « Cytochrome c and DATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade ». *Cell* 91 (4): 479-89. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80434-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80434-1).
- Li, Ruo-Jing, Jing Xu, Chenglai Fu, Jing Zhang, Yujun George Zheng, Hao Jia, et Jun O Liu. 2016. « Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin ». Édité par Michael Czech. *eLife* 5 (octobre): e19360. <https://doi.org/10.7554/eLife.19360>.
- Lin, A. W., M. Barradas, J. C. Stone, L. van Aelst, M. Serrano, et S. W. Lowe. 1998. « Premature Senescence Involving P53 and P16 Is Activated in Response to Constitutive MEK/MAPK Mitogenic Signaling ». *Genes & Development* 12 (19): 3008-19. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.3008>.
- Lin, Jing, Qingyuan Yang, Paul T. Wilder, France Carrier, et David J. Weber. 2010. « The Calcium-Binding Protein S100B down-Regulates P53 and Apoptosis in Malignant Melanoma ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (35): 27487-98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155382>.
- Liu, Dan, et Peter J. Hornsby. 2007. « Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion ». *Cancer Research* 67 (7): 3117-26. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3452>.
- Liu, Kang, Jianfeng Zhao, Liushu Yang, Meng Guan, Ling Yuan, et Yu Geng. 2020. « Protective Effects of Calbindin-D28K on the UVB Radiation-induced Apoptosis of Human Lens Epithelial Cells ». *International Journal of Molecular Medicine* 45 (6): 1793-1802. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4552>.
- Lloyd, Ricardo V. 2003. « Practical Markers Used in the Diagnosis of Neuroendocrine Tumors ». *Endocrine Pathology* 14 (4): 293-301. <https://doi.org/10.1385/ep:14:4:293>.
- Lorda-Diez, Carlos I., Beatriz Garcia-Riart, Juan A. Montero, Joaquín Rodríguez-León, Juan A. Garcia-Porrero, et Juan M. Hurlle. 2015. « Apoptosis during Embryonic Tissue Remodeling Is Accompanied by Cell Senescence ». *Aging* 7 (11): 974-85. <https://doi.org/10.18632/aging.100844>.
- Lowe, Scott W, et Charles J Sherr. 2003. « Tumor Suppression by Ink4a–Arf: Progress and Puzzles ». *Current Opinion in Genetics & Development* 13 (1): 77-83. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00013-8).
- Lu, Teng, et Toren Finkel. 2008. « Free Radicals and Senescence ». *Experimental Cell Research* 314 (9): 1918-22. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.01.011>.

- Lukas, J., D. Parry, L. Aagaard, D. J. Mann, J. Bartkova, M. Strauss, G. Peters, et J. Bartek. 1995. « Retinoblastoma-Protein-Dependent Cell-Cycle Inhibition by the Tumour Suppressor P16 ». *Nature* 375 (6531): 503-6. <https://doi.org/10.1038/375503a0>.
- Lutz, Ward, Elena M. Frank, Theodore A. Craig, Richele Thompson, Ronald A. Venters, Doug Kojetin, John Cavanagh, et Rajiv Kumar. 2003. « Calbindin D28K Interacts with Ran-Binding Protein M: Identification of Interacting Domains by NMR Spectroscopy ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303 (4): 1186-92. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00499-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00499-6).
- Ma, Huan, Rachel D. Groth, Samuel M. Cohen, John F. Emery, Boxing Li, Esthelle Hoedt, Guoan Zhang, Thomas A. Neubert, et Richard W. Tsien. 2014. «  $\Gamma$ CaMKII Shuttles  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM to the Nucleus to Trigger CREB Phosphorylation and Gene Expression ». *Cell* 159 (2): 281-94. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.019>.
- Ma, Xingjie, Marine Warnier, Clotilde Raynard, Mylène Ferrand, Olivier Kirsh, Pierre-Antoine Defossez, Nadine Martin, et David Bernard. 2018. « The Nuclear Receptor RXRA Controls Cellular Senescence by Regulating Calcium Signaling ». *Aging Cell* 17 (6): e12831. <https://doi.org/10.1111/ace1.12831>.
- Magini, Alessandro, Alice Polchi, Alessandro Tozzi, Brunella Tancini, Michela Tantucci, Lorena Urbanelli, Tiziana Borsello, Paolo Calabresi, et Carla Emiliani. 2015. « Abnormal Cortical Lysosomal  $\beta$ -Hexosaminidase and  $\beta$ -Galactosidase Activity at Post-Synaptic Sites during Alzheimer's Disease Progression ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 58 (janvier): 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.11.001>.
- Makretsov, Nikita, C. Blake Gilks, Andrew J Coldman, Malcolm Hayes, et David Huntsman. 2003. « Tissue Microarray Analysis of Neuroendocrine Differentiation and Its Prognostic Significance in Breast Cancer ». *Human Pathology* 34 (10): 1001-8. [https://doi.org/10.1053/S0046-8177\(03\)00411-8](https://doi.org/10.1053/S0046-8177(03)00411-8).
- Malaquin, Nicolas, Aurélie Martinez, et Francis Rodier. 2016. « Keeping the Senescence Secretome under Control: Molecular Reins on the Senescence-Associated Secretory Phenotype ». *Experimental Gerontology* 82 (septembre): 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.05.010>.
- Manda, K R, P Tripathi, A C Hsi, J Ning, M B Ruzinova, H Liapis, M Bailey, et al. 2016. « NFATc1 Promotes Prostate Tumorigenesis and Overcomes PTEN Loss-Induced Senescence ». *Oncogene* 35 (25): 3282-92. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.389>.
- Marchi, Saverio, Mart Bittremieux, Sonia Missiroli, Claudia Morganti, Simone Patergnani, Luigi Sbrano, Alessandro Rimessi, et al. 2017. « Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Communication Through  $\text{Ca}^{2+}$  Signaling: The Importance of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 997: 49-67. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4567-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4567-7_4).
- Marchi, Saverio, et Paolo Pinton. 2014. « The Mitochondrial Calcium Uniporter Complex: Molecular Components, Structure and Physiopathological Implications ». *The Journal of Physiology* 592 (5): 829-39. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.268235>.
- Marcotte, Richard, Chantale Lacelle, et Eugenia Wang. 2004. « Senescent Fibroblasts Resist Apoptosis by Downregulating Caspase-3 ». *Mechanisms of Ageing and Development* 125 (10-11): 777-83. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.007>.
- Mariot, Pascal, Karine Vanoverberghe, Nathalie Lalevée, Michel F. Rossier, et Natalia Prevarskaya. 2002. « Overexpression of an A1H (Cav3.2) T-Type Calcium Channel during Neuroendocrine Differentiation of Human Prostate Cancer Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (13): 10824-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108754200>.
- Martin, Nadine, et David Bernard. 2017. « Calcium Signaling and Cellular Senescence ». *Cell Calcium*, avril. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.04.001>.
- Matsumoto, Yutaka, et James L. Maller. 2002. « Calcium, Calmodulin, and CaMKII Requirement for Initiation of Centrosome Duplication in Xenopus Egg Extracts ». *Science (New York, N.Y.)* 295 (5554): 499-502. <https://doi.org/10.1126/science.1065693>.

- Mattson, Mark P, Ching Chu, et Sylvia Christakost. s. d. « Evidence for Calcium-Reducing and Excitoprotective Roles for the Calcium-Binding Protein Calbindin-D28k in Cultured Hippocampal Neurons ». *Intracellular Calcium*, 11.
- Mattson, Mark P., Barbara Rychlik, Ching Chu, et Sylvia Christakost. 1991. « Evidence for Calcium-Reducing and Excitoprotective Roles for the Calcium-Binding Protein Calbindin-1328k in Cultured Hippocampal Neurons ». *Neuron* 6 (1): 41-51. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90120-O](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90120-O).
- Maubach, Gunter, Olga Sokolova, Markus Wolfien, Hermann-Josef Rothkötter, et Michael Naumann. 2013. « Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Kinase II Contributes to Inhibitor of Nuclear Factor- $\kappa$ B Kinase Complex Activation in Helicobacter Pylori Infection ». *International Journal of Cancer* 133 (6): 1507-12. <https://doi.org/10.1002/ijc.28148>.
- McCarthy, Donald A., Ryan R. Clark, Toni R. Bartling, Mohamed Trebak, et J. Andres Melendez. 2013. « Redox Control of the Senescence Regulator Interleukin-1 $\alpha$  and the Secretory Phenotype ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (45): 32149-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.493841>.
- Mensà, Emanuela, Michele Guescini, Angelica Giuliani, Maria Giulia Bacalini, Deborah Ramini, Giacomo Corleone, Manuela Ferracin, et al. 2020. « Small Extracellular Vesicles Deliver MiR-21 and MiR-217 as pro-Senescence Effectors to Endothelial Cells ». *Journal of Extracellular Vesicles* 9 (1): 1725285. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1725285>.
- Miao, Jinhua, Jiafeng Liu, Jing Niu, Yunfang Zhang, Weiwei Shen, Congwei Luo, Yahong Liu, et al. 2019. « Wnt/ $\beta$ -Catenin/RAS Signaling Mediates Age-Related Renal Fibrosis and Is Associated with Mitochondrial Dysfunction ». *Aging Cell* 18 (5): e13004. <https://doi.org/10.1111/ace1.13004>.
- Michaloglou, C, L C W Vredeveld, W J Mooi, et D S Peeper. 2008. « BRAFE600 in Benign and Malignant Human Tumours ». *Oncogene* 27 (7): 877-95. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210704>.
- Miremadi, A., S. E. Pinder, A. H. S. Lee, J. A. Bell, E. C. Paish, P. Wencyk, C. W. Elston, et al. 2002. « Neuroendocrine Differentiation and Prognosis in Breast Adenocarcinoma ». *Histopathology* 40 (3): 215-22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01336.x>.
- Misra, Uma Kant, Govind Gawdi, et Salvatore Vincent Pizzo. 2003. « Induction of Mitogenic Signalling in the 1LN Prostate Cell Line on Exposure to Submicromolar Concentrations of Cadmium<sup>+</sup> ». *Cellular Signalling* 15 (11): 1059-70. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(03\)00117-7](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(03)00117-7).
- Miyachi, Hideyuki, Tohru Minamino, Kaoru Tateno, Takeshige Kunieda, Haruhiro Toko, et Issei Komuro. 2004. « Akt Negatively Regulates the in Vitro Lifespan of Human Endothelial Cells via a P53/P21-dependent Pathway ». *The EMBO Journal* 23 (1): 212-20. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600045>.
- Moiseeva, Olga, Véronique Bourdeau, Antoine Roux, Xavier Deschênes-Simard, et Gerardo Ferbeyre. 2009. « Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (16): 4495-4507. <https://doi.org/10.1128/MCB.01868-08>.
- Molofsky, Anna V., Shalom G. Slutsky, Nancy M. Joseph, Shenghui He, Ricardo Pardal, Janakiraman Krishnamurthy, Norman E. Sharpless, et Sean J. Morrison. 2006. « Increasing P16INK4a Expression Decreases Forebrain Progenitors and Neurogenesis during Ageing ». *Nature* 443 (7110): 448-52. <https://doi.org/10.1038/nature05091>.
- Monet, Michaël, V'yacheslav Lehen'kyi, Florian Gackiere, Virginie Firlej, Matthieu Vandenberghe, Morad Roudbaraki, Dimitra Gkika, et al. 2010. « Role of Cationic Channel TRPV2 in Promoting Prostate Cancer Migration and Progression to Androgen Resistance ». *Cancer Research* 70 (3): 1225-35. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2205>.
- Moscat, Jorge, María T. Diaz-Meco, et Paul Rennert. 2003. « NF- $\kappa$ B Activation by Protein Kinase C Isoforms and B-Cell Function ». *EMBO Reports* 4 (1): 31-36. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor704>.
- Muñoz-Espín, Daniel. s. d. « Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development », 15.

- Muñoz-Espín, Daniel, et Manuel Serrano. 2014. « Cellular Senescence: From Physiology to Pathology ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (7): 482-96. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>.
- Muntoni, Alessandra, et Roger R. Reddel. 2005. « The First Molecular Details of ALT in Human Tumor Cells ». *Human Molecular Genetics* 14 (suppl\_2): R191-96. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi266>.
- Narita, Masashi, Sabrina Núñez, Edith Heard, Masako Narita, Athena W. Lin, Stephen A. Hearn, David L. Spector, Gregory J. Hannon, et Scott W. Lowe. 2003. « Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence ». *Cell* 113 (6): 703-16. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00401-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00401-x).
- Nasrabady, Sara E., Batool Rizvi, James E. Goldman, et Adam M. Brickman. 2018. « White matter changes in Alzheimer's disease: a focus on myelin and oligodendrocytes ». *Acta Neuropathologica Communications* 6 (mars). <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0515-3>.
- Neuzillet, Cindy, Annemiläi Tijeras-Raballand, Romain Cohen, Jérôme Cros, Sandrine Faivre, Eric Raymond, et Armand de Gramont. 2015. « Targeting the TGFβ Pathway for Cancer Therapy ». *Pharmacology & Therapeutics* 147 (mars): 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.001>.
- Noble, James W., Rehab Almalki, S. Mark Roe, Armin Wagner, Ramona Duman, et John R. Atack. 2018. « The X-Ray Structure of Human Calbindin-D28K: An Improved Model ». *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology* 74 (Pt 10): 1008-14. <https://doi.org/10.1107/S2059798318011610>.
- Nouredine Hibo, Gary-Bobo Guillaume, Alifano Marco, Marcos Elisabeth, Saker Mirna, Vienney Nora, Amsellem Valérie, et al. 2011. « Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Senescence Is a Pathogenic Mechanism for Pulmonary Hypertension in Chronic Lung Disease ». *Circulation Research* 109 (5): 543-53. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.241299>.
- Ogrodnik, Mikolaj, Yi Zhu, Larissa G.P. Langhi, Tamar Tchkonja, Patrick Krüger, Edward Fielder, Stella Victorelli, et al. 2019. « Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis ». *Cell Metabolism* 29 (5): 1233. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.01.013>.
- Ohuchida, Kenoki, Kazuhiro Mizumoto, Mitsuhiro Murakami, Li-Wu Qian, Norihiro Sato, Eishi Nagai, Kunio Matsumoto, Toshikazu Nakamura, et Masao Tanaka. 2004. « Radiation to Stromal Fibroblasts Increases Invasiveness of Pancreatic Cancer Cells through Tumor-Stromal Interactions ». *Cancer Research* 64 (9): 3215-22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2464>.
- Oliva, Jose L., M. Cecilia Caino, Adrian M. Senderowicz, et Marcelo G. Kazanietz. 2008. « S-Phase-Specific Activation of PKC Alpha Induces Senescence in Non-Small Cell Lung Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5466-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707576200>.
- Olivieri, Fabiola, Francesco Prattichizzo, Johannes Grillari, et Carmela R. Balistreri. 2018. « Cellular Senescence and Inflammation in Age-Related Diseases ». *Mediators of Inflammation* 2018: 1-6. <https://doi.org/10.1155/2018/9076485>.
- Olsen, Catherine L., Betty Gardie, Paul Yaswen, et Martha R. Stampfer. 2002. « Raf-1-Induced Growth Arrest in Human Mammary Epithelial Cells Is P16-Independent and Is Overcome in Immortal Cells during Conversion ». *Oncogene* 21 (41): 6328-39. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205780>.
- Opresko, Patricia L., Jinshui Fan, Shamika Danzy, David M. Wilson, et Vilhelm A. Bohr. 2005. « Oxidative Damage in Telomeric DNA Disrupts Recognition by TRF1 and TRF2 ». *Nucleic Acids Research* 33 (4): 1230-39. <https://doi.org/10.1093/nar/gki273>.
- Osorio, Fernando G., Clea Bárcena, Clara Soria-Valles, Andrew J. Ramsay, Félix de Carlos, Juan Cobo, Antonio Fueyo, José M. P. Freije, et Carlos López-Otín. 2012. « Nuclear Lamina Defects Cause ATM-Dependent NF-κB Activation and Link Accelerated Aging to a Systemic Inflammatory Response ». *Genes & Development* 26 (20): 2311-24. <https://doi.org/10.1101/gad.197954.112>.

- O'Sullivan, Roderick J., Stefan Kubicek, Stuart L. Schreiber, et Jan Karlseder. 2010. « Reduced Histone Biosynthesis and Chromatin Changes Arising from a Damage Signal at Telomeres ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (10): 1218-25. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1897>.
- Ovadya, Yossi, Tomer Landsberger, Hanna Leins, Ezra Vadai, Hilah Gal, Anat Biran, Reut Yosef, et al. 2018. « Impaired Immune Surveillance Accelerates Accumulation of Senescent Cells and Aging ». *Nature Communications* 9 (1): 5435. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07825-3>.
- Paluvai, Harikrishnareddy, Eros Di Giorgio, et Claudio Brancolini. 2020. « The Histone Code of Senescence ». *Cells* 9 (2): E466. <https://doi.org/10.3390/cells9020466>.
- Pande, G., N. A. Kumar, et P. S. Manogaran. 1996. « Flow Cytometric Study of Changes in the Intracellular Free Calcium during the Cell Cycle ». *Cytometry* 24 (1): 55-63. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960501\)24:1<55::AID-CYTO7>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960501)24:1<55::AID-CYTO7>3.0.CO;2-H).
- Panner, Amith, et Robert D. Wurster. 2006. « T-Type Calcium Channels and Tumor Proliferation ». *Cell Calcium* 40 (2): 253-59. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.04.029>.
- Pareja, Fresia, et Timothy M. D'Alfonso. 2020. « Neuroendocrine Neoplasms of the Breast: A Review Focused on the Updated World Health Organization (WHO) 5th Edition Morphologic Classification ». *The Breast Journal* 26 (6): 1160-67. <https://doi.org/10.1111/tbj.13863>.
- Park, Hyejin, Chun-Ho Kim, Jae-Hoon Jeong, Myungjin Park, et Kwang Seok Kim. 2016. « GDF15 Contributes to Radiation-Induced Senescence through the ROS-Mediated P16 Pathway in Human Endothelial Cells ». *Oncotarget* 7 (9): 9634-44. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7457>.
- Parrinello, Simona, Jean-Philippe Coppe, Ana Krtolica, et Judith Campisi. 2005. « Stromal-Epithelial Interactions in Aging and Cancer: Senescent Fibroblasts Alter Epithelial Cell Differentiation ». *Journal of Cell Science* 118 (Pt 3): 485-96. <https://doi.org/10.1242/jcs.01635>.
- Parrinello, Simona, Enrique Samper, Ana Krtolica, Joshua Goldstein, Simon Melov, et Judith Campisi. 2003. « Oxygen Sensitivity Severely Limits the Replicative Lifespan of Murine Fibroblasts ». *Nature Cell Biology* 5 (8): 741-47. <https://doi.org/10.1038/ncb1024>.
- Parry, Aled J., Matthew Hoare, Dóra Bihary, Robert Hänsel-Hertsch, Stephen Smith, Kosuke Tomimatsu, Elizabeth Mannion, et al. 2018. « NOTCH-Mediated Non-Cell Autonomous Regulation of Chromatin Structure during Senescence ». *Nature Communications* 9 (1): 1840. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04283-9>.
- Passos, João F., Glyn Nelson, Chunfang Wang, Torsten Richter, Cedric Simillion, Carole J. Proctor, Satomi Miwa, et al. 2010. « Feedback between P21 and Reactive Oxygen Production Is Necessary for Cell Senescence ». *Molecular Systems Biology* 6: 347. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.5>.
- Pereira, Branca I., Oliver P. Devine, Milica Vukmanovic-Stejic, Emma S. Chambers, Priya Subramanian, Neil Patel, Alex Virasami, et al. 2019. « Senescent Cells Evade Immune Clearance via HLA-E-Mediated NK and CD8+ T Cell Inhibition ». *Nature Communications* 10 (1): 2387. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10335-5>.
- Pertusa, M., S. García-Matas, E. Rodríguez-Farré, C. Sanfeliu, et R. Cristòfol. 2007. « Astrocytes Aged in Vitro Show a Decreased Neuroprotective Capacity ». *Journal of Neurochemistry* 101 (3): 794-805. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04369.x>.
- Poenie, M., J. Alderton, R. Steinhardt, et R. Tsien. 1986. « Calcium Rises Abruptly and Briefly throughout the Cell at the Onset of Anaphase ». *Science (New York, N.Y.)* 233 (4766): 886-89. <https://doi.org/10.1126/science.3755550>.
- Prevarskaya, N, R Skryma, G Bidaux, M Flourakis, et Y Shuba. 2007. « Ion Channels in Death and Differentiation of Prostate Cancer Cells ». *Cell Death & Differentiation* 14 (7): 1295-1304. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402162>.
- Rasmussen, C. D., et A. R. Means. 1989. « Calmodulin Is Required for Cell-Cycle Progression during G1 and Mitosis ». *The EMBO Journal* 8 (1): 73-82.
- Rebbaa, Abdelhadi, Xin Zheng, Pauline M. Chou, et Bernard L. Mirkin. 2003. « Caspase Inhibition Switches Doxorubicin-Induced Apoptosis to Senescence ». *Oncogene* 22 (18): 2805-11. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206366>.



- Reynisdóttir, I., K. Polyak, A. Iavarone, et J. Massagué. 1995. « Kip/Cip and Ink4 Cdk Inhibitors Cooperate to Induce Cell Cycle Arrest in Response to TGF-Beta ». *Genes & Development* 9 (15): 1831-45. <https://doi.org/10.1101/gad.9.15.1831>.
- Robles, S. J., et G. R. Adami. 1998. « Agents That Cause DNA Double Strand Breaks Lead to P16INK4a Enrichment and the Premature Senescence of Normal Fibroblasts ». *Oncogene* 16 (9): 1113-23. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201862>.
- Rodier, Francis, et Judith Campisi. 2011. « Four Faces of Cellular Senescence ». *The Journal of Cell Biology* 192 (4): 547-56. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>.
- Rodier, Francis, Judith Campisi, et Dipa Bhaumik. 2007. « Two Faces of P53: Aging and Tumor Suppression ». *Nucleic Acids Research* 35 (22): 7475-84. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm744>.
- Rodier, Francis, Jean-Philippe Coppé, Christopher K. Patil, Wieteke A. M. Hoeijmakers, Denise P. Muñoz, Saba R. Raza, Adam Freund, Eric Campeau, Albert R. Davalos, et Judith Campisi. 2009. « Persistent DNA Damage Signalling Triggers Senescence-Associated Inflammatory Cytokine Secretion ». *Nature Cell Biology* 11 (8): 973-79. <https://doi.org/10.1038/ncb1909>.
- Rong, Yi-Ping, Paul Barr, Vivien C. Yee, et Clark W. Distelhorst. 2009. « Targeting Bcl-2 Based on the Interaction of Its BH4 Domain with the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793 (6): 971-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.015>.
- Roninson, Igor B., Eugenia V. Broude, et Bey-Dih Chang. 2001. « If Not Apoptosis, Then What? Treatment-Induced Senescence and Mitotic Catastrophe in Tumor Cells ». *Drug Resistance Updates* 4 (5): 303-13. <https://doi.org/10.1054/drup.2001.0213>.
- Ryu, S. J., Y. S. Oh, et S. C. Park. 2007. « Failure of Stress-Induced Downregulation of Bcl-2 Contributes to Apoptosis Resistance in Senescent Human Diploid Fibroblasts ». *Cell Death and Differentiation* 14 (5): 1020-28. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402091>.
- Sagiv, Adi, Dominick G. A. Burton, Zhana Moshayev, Ezra Vadai, Felix Wensveen, Shifra Ben-Dor, Ofra Golani, Bojan Polic, et Valery Krizhanovsky. 2016. « NKG2D Ligands Mediate Immunosurveillance of Senescent Cells ». *Aging* 8 (2): 328-44. <https://doi.org/10.18632/aging.100897>.
- Salminen, Antero, Johanna Ojala, Kai Kaarniranta, Annakaisa Haapasalo, Mikko Hiltunen, et Hilikka Soininen. 2011. « Astrocytes in the Aging Brain Express Characteristics of Senescence-Associated Secretory Phenotype ». *European Journal of Neuroscience* 34 (1): 3-11. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07738.x>.
- Sancak, Yasemin, Andrew L. Markhard, Toshimori Kitami, Erika Kovács-Bogdán, Kimberli J. Kamer, Namrata D. Udeshi, Steven A. Carr, et al. 2013. « EMRE Is an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex ». *Science (New York, N.Y.)* 342 (6164): 1379-82. <https://doi.org/10.1126/science.1242993>.
- Sang, Meixiang, Mohit Hulsurkar, Xiaochong Zhang, Haiping Song, Dayong Zheng, Yan Zhang, Min Li, et al. 2016. « GRK3 Is a Direct Target of CREB Activation and Regulates Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer Cells ». *Oncotarget* 7 (29): 45171-85. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9359>.
- Sapino, A., M. Papotti, L. Righi, P. Cassoni, L. Chiusa, et G. Bussolati. 2001. « Clinical Significance of Neuroendocrine Carcinoma of the Breast ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 12 Suppl 2: S115-117. [https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl\\_2.s115](https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl_2.s115).
- Satrústegui, Jorgina, Beatriz Pardo, et Araceli Del Arco. 2007. « Mitochondrial Transporters as Novel Targets for Intracellular Calcium Signaling ». *Physiological Reviews* 87 (1): 29-67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2006>.
- Schmidt, Hartmut. 2012. « Three Functional Facets of Calbindin D-28k ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 5: 25. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00025>.
- Schneider, Gunter, Franz Oswald, Christian Wahl, Florian R. Greten, Guido Adler, et Roland M. Schmid. 2002. « Cyclosporine Inhibits Growth through the Activating Transcription Factor/CAMP-Responsive Element-Binding Protein Binding Site in the Cyclin D1 Promoter ».

- The Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 43599-607.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M204787200>.
- Schwaller, B. 2009. « The Continuing Disappearance of “Pure” Ca<sup>2+</sup> Buffers ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (2): 275-300. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8564-6>.
- . 2010. « Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Buffers ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (11): a004051-a004051. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004051>.
- Schwaller, Beat. 2010. « Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Buffers ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (11): a004051. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004051>.
- . 2012. « The Regulation of a Cell’s Ca<sup>2+</sup> Signaling Toolkit: The Ca<sup>2+</sup> Homeostasome ». In *Calcium Signaling*, édité par Md. Shahidul Islam, 740:1-25. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_1).
- Scorrano, Luca, Scott A. Oakes, Joseph T. Opferman, Emily H. Cheng, Mia D. Sorcinelli, Tullio Pozzan, et Stanley J. Korsmeyer. 2003. « BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>: A Control Point for Apoptosis ». *Science (New York, N.Y.)* 300 (5616): 135-39. <https://doi.org/10.1126/science.1081208>.
- Seluanov, A., V. Gorbunova, A. Falcovitz, A. Sigal, M. Milyavsky, I. Zurer, G. Shohat, N. Goldfinger, et V. Rotter. 2001. « Change of the Death Pathway in Senescent Human Fibroblasts in Response to DNA Damage Is Caused by an Inability to Stabilize P53 ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (5): 1552-64. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1552-1564.2001>.
- Sen, Payel, Yemin Lan, Catherine Y. Li, Simone Sidoli, Greg Donahue, Zhixun Dou, Brian Frederick, et al. 2019. « Histone Acetyltransferase P300 Induces De Novo Super-Enhancers to Drive Cellular Senescence ». *Molecular Cell* 73 (4): 684-698.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.021>.
- Serra, Violeta, Thomas von Zglinicki, Mario Lorenz, et Gabriele Saretzki. 2003. « Extracellular Superoxide Dismutase Is a Major Antioxidant in Human Fibroblasts and Slows Telomere Shortening ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 6824-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207939200>.
- Serrano, M., G. J. Hannon, et D. Beach. 1993. « A New Regulatory Motif in Cell-Cycle Control Causing Specific Inhibition of Cyclin D/CDK4 ». *Nature* 366 (6456): 704-7. <https://doi.org/10.1038/366704a0>.
- Serrano, M., H. Lee, L. Chin, C. Cordon-Cardo, D. Beach, et R. A. DePinho. 1996. « Role of the INK4a Locus in Tumor Suppression and Cell Mortality ». *Cell* 85 (1): 27-37. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81079-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81079-x).
- Serrano, Manuel, Athena W Lin, Mila E McCurrach, David Beach, et Scott W Lowe. 1997. « Oncogenic Ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of P53 and P16INK4a ». *Cell* 88 (5): 593-602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9).
- Sharpless, Norman E. 2005. « INK4a/ARF: A Multifunctional Tumor Suppressor Locus ». *Mutation Research* 576 (1-2): 22-38. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.08.021>.
- Shay, Jerry W. 1997. « Telomerase in Human Development and Cancer ». *Journal of Cellular Physiology* 173 (2): 266-70. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199711\)173:2<266::AID-JCP33>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<266::AID-JCP33>3.0.CO;2-B).
- Shay, Jerry W., et Igor B. Roninson. 2004. « Hallmarks of Senescence in Carcinogenesis and Cancer Therapy ». *Oncogene* 23 (16): 2919-33. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207518>.
- Shelton, Dawne N., Edwin Chang, Peter S. Whittier, Donghee Choi, et Walter D. Funk. 1999. « Microarray Analysis of Replicative Senescence ». *Current Biology* 9 (17): 939-45. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80420-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80420-5).
- Sherr, C. J., et J. M. Roberts. 1999. « CDK Inhibitors: Positive and Negative Regulators of G1-Phase Progression ». *Genes & Development* 13 (12): 1501-12. <https://doi.org/10.1101/gad.13.12.1501>.
- Spiotto, Michael T, et Theodore D K Chung. s. d. « STAT3 Mediates IL-6-Induced Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer Cells », 10.

- Stab, Bernd R., Laura Martinez, Adriana Grismaldo, Alejandra Lerma, María L. Gutiérrez, Luis A. Barrera, Jhon J. Sutachan, et Sonia L. Albarracín. 2016. « Mitochondrial Functional Changes Characterization in Young and Senescent Human Adipose Derived MSCs ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 8: 299. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00299>.
- Stanfel, Monique N., Lara S. Shamieh, Matt Kaerberlein, et Brian K. Kennedy. 2009. « The TOR Pathway Comes of Age ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1790 (10): 1067-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.06.007>.
- Stein, G. H., L. F. Drullinger, A. Soulard, et V. Dulić. 1999. « Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors P21 and P16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (3): 2109-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.2109>.
- Stöckl, Petra, Christina Zankl, Eveline Hütter, Hermann Unterluggauer, Peter Laun, Gino Heeren, Edith Bogengruber, Dietmar Herndler-Brandstetter, Michael Breitenbach, et Pidder Jansen-Dürr. 2007. « Partial Uncoupling of Oxidative Phosphorylation Induces Premature Senescence in Human Fibroblasts and Yeast Mother Cells ». *Free Radical Biology & Medicine* 43 (6): 947-58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.005>.
- Storer, Mekayla. s. d. « Senescence Is a Developmental Mechanism That Contributes to Embryonic Growth and Patterning », 12.
- Suarez, Christopher D., Xuehong Deng, et Chang-Deng Hu. 2014. « Targeting CREB Inhibits Radiation-Induced Neuroendocrine Differentiation and Increases Radiation-Induced Cell Death in Prostate Cancer Cells ». *American Journal of Cancer Research* 4 (6): 850-61.
- Suzuki, Junji, Kazunori Kanemaru, Kuniaki Ishii, Masamichi Ohkura, Yohei Okubo, et Masamitsu Iino. 2014. « Imaging Intraorganellar Ca<sup>2+</sup> at Subcellular Resolution Using CEPIA ». *Nature Communications* 5 (juin): 4153. <https://doi.org/10.1038/ncomms5153>.
- Swoap, S. J., R. B. Hunter, E. J. Stevenson, H. M. Felton, N. V. Kansagra, J. M. Lang, K. A. Esser, et S. C. Kandarian. 2000. « The Calcineurin-NFAT Pathway and Muscle Fiber-Type Gene Expression ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 279 (4): C915-924. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.4.C915>.
- Takai, Hiroyuki, Agata Smogorzewska, et Titia de Lange. 2003. « DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres ». *Current Biology: CB* 13 (17): 1549-56. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00542-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00542-6).
- Tasdemir, Nilgun, Ana Banito, Jae-Seok Roe, Direna Alonso-Curbelo, Matthew Camiolo, Darjus F. Tschaharganeh, Chun-Hao Huang, et al. 2016. « BRD4 Connects Enhancer Remodeling to Senescence Immune Surveillance ». *Cancer Discovery* 6 (6): 612-29. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0217>.
- Taylor, James T., Luping Huang, Jonathan E. Pottle, Kai Liu, Yali Yang, Xiangbin Zeng, Brian M. Keyser, Krishna C. Agrawal, J. Bondo Hansen, et Ming Li. 2008. « Selective Blockade of T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Suppresses Human Breast Cancer Cell Proliferation ». *Cancer Letters* 267 (1): 116-24. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.032>.
- Terlecki-Zaniewicz, Lucia, Vera Pils, Madhusudhan Reddy Bobbili, Ingo Lämmermann, Ida Perrotta, Tonja Grillenberger, Jennifer Schwestka, et al. 2019. « Extracellular Vesicles in Human Skin: Cross-Talk from Senescent Fibroblasts to Keratinocytes by MiRNAs ». *Journal of Investigative Dermatology* 139 (12): 2425-2436.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.05.015>.
- Théâtre, Emilie, Vincent Bours, et Cécile Oury. 2009. « A P2X Ion Channel-Triggered NF-KappaB Pathway Enhances TNF-Alpha-Induced IL-8 Expression in Airway Epithelial Cells ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 41 (6): 705-13. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0452OC>.
- Tilstra, Jeremy S., Andria R. Robinson, Jin Wang, Siobhán Q. Gregg, Cheryl L. Clauson, Daniel P. Reay, Luigi A. Nasto, et al. 2012. « NF-KB Inhibition Delays DNA Damage-Induced Senescence and Aging in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (7): 2601-12. <https://doi.org/10.1172/JCI45785>.

- Tombes, R. M., et G. G. Borisy. 1989. « Intracellular Free Calcium and Mitosis in Mammalian Cells: Anaphase Onset Is Calcium Modulated, but Is Not Triggered by a Brief Transient ». *The Journal of Cell Biology* 109 (2): 627-36. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.2.627>.
- Toruner, Gokce A., Celal Ulger, Mualla Alkan, Anthony T. Galante, Joseph Rinaggio, Randall Wilk, Bin Tian, et al. 2004. « Association between Gene Expression Profile and Tumor Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma ». *Cancer Genetics and Cytogenetics* 154 (1): 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.01.026>.
- Triana-Martínez, Francisco, Pilar Piccallos-Rabina, Sabela Da Silva-Álvarez, Federico Pietrocola, Susana Llanos, Verónica Rodilla, Enrica Soprano, et al. 2019. « Identification and Characterization of Cardiac Glycosides as Senolytic Compounds ». *Nature Communications* 10 (1): 4731. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12888-x>.
- Tsang, William Y., Alexander Spektor, Daniel J. Luciano, Vahan B. Indjeian, Zhihong Chen, Jeffery L. Salisbury, Irma Sánchez, et Brian David Dynlacht. 2006. « CP110 Cooperates with Two Calcium-Binding Proteins to Regulate Cytokinesis and Genome Stability ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (8): 3423-34. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-04-0371>.
- Tyler, Eleanor J., Ana Gutierrez del Arroyo, Bethany K. Hughes, Ryan Wallis, James C. Garbe, Martha R. Stampfer, Jim Koh, Robert Lowe, Michael P. Philpott, et Cleo L. Bishop. 2021. « Early Growth Response 2 (EGR2) Is a Novel Regulator of the Senescence Programme ». *Aging Cell* 20 (3): e13318. <https://doi.org/10.1111/accel.13318>.
- Tyner, Stuart D., Sundaresan Venkatachalam, Jene Choi, Stephen Jones, Nader Ghebranious, Herbert Igelmann, Xiongbin Lu, et al. 2002. « P53 Mutant Mice That Display Early Ageing-Associated Phenotypes ». *Nature* 415 (6867): 45-53. <https://doi.org/10.1038/415045a>.
- Urbanelli, Lorena, Sandra Buratta, Krizia Sagini, Brunella Tancini, et Carla Emiliani. 2016. « Extracellular Vesicles as New Players in Cellular Senescence ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (9): 1408. <https://doi.org/10.3390/ijms17091408>.
- Vallabhaneni, Haritha, Nathan O'Callaghan, Julia Sidorova, et Yie Liu. 2013. « Defective Repair of Oxidative Base Lesions by the DNA Glycosylase Nth1 Associates with Multiple Telomere Defects ». *PLoS Genetics* 9 (7): e1003639. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003639>.
- Venters, Ronald A., Linda M. Benson, Theodore A. Craig, Kerian H. Paul, David R. Kordys, Richele Thompson, Stephen Naylor, Rajiv Kumar, et John Cavanagh. 2003. « The Effects of Ca<sup>2+</sup> Binding on the Conformation of Calbindin D28K: A Nuclear Magnetic Resonance and Microelectrospray Mass Spectrometry Study ». *Analytical Biochemistry* 317 (1): 59-66. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00084-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00084-8).
- Vicente, Rita, Anne-Laure Mausset-Bonnefont, Christian Jorgensen, Pascale Louis-Plence, et Jean-Marc Brondello. 2016. « Cellular Senescence Impact on Immune Cell Fate and Function ». *Aging Cell* 15 (3): 400-406. <https://doi.org/10.1111/accel.12455>.
- Vizioli, Maria Grazia, Tianhui Liu, Karl N. Miller, Neil A. Robertson, Kathryn Gilroy, Anthony B. Lagnado, Arantxa Perez-Garcia, et al. 2020. « Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence ». *Genes & Development* 34 (5-6): 428-45. <https://doi.org/10.1101/gad.331272.119>.
- Vliet, Alexander R. van, Tom Verfaillie, et Patrizia Agostinis. 2014. « New Functions of Mitochondria Associated Membranes in Cellular Signaling ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 (10): 2253-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.009>.
- Volonté, D., F. Galbiati, R. G. Pestell, et M. P. Lisanti. 2001. « Cellular Stress Induces the Tyrosine Phosphorylation of Caveolin-1 (Tyr(14)) via Activation of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Src Kinase. Evidence for Caveolae, the Actin Cytoskeleton, and Focal Adhesions as Mechanical Sensors of Osmotic Stress ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (11): 8094-8103. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009245200>.
- Wallis, Ryan, Hannah Mizen, et Cleo L. Bishop. 2020. « The Bright and Dark Side of Extracellular Vesicles in the Senescence-Associated Secretory Phenotype ». *Mechanisms of Ageing and Development* 189 (juillet): 111263. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111263>.

- Wang, E. 1995. « Senescent Human Fibroblasts Resist Programmed Cell Death, and Failure to Suppress Bcl2 Is Involved ». *Cancer Research* 55 (11): 2284-92.
- Wang, Tao, Yan Yuan, Hui Zou, Jinlong Yang, Shiwen Zhao, Yonggang Ma, Yi Wang, et al. 2016. « The ER Stress Regulator Bip Mediates Cadmium-Induced Autophagy and Neuronal Senescence ». *Scientific Reports* 6 : 38091. <https://doi.org/10.1038/srep38091>.
- Wang, Weiping, Joan X. Chen, Rong Liao, Qingdong Deng, Jennifer J. Zhou, Shuang Huang, et Peiqing Sun. 2002. « Sequential Activation of the MEK-Extracellular Signal-Regulated Kinase and MKK3/6-P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediates Oncogenic Ras-Induced Premature Senescence ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (10): 3389-3403. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.10.3389-3403.2002>.
- Warnier, Marine, Jean-Michel Flaman, Christophe Chouabe, Clotilde Wiel, Baptiste Gras, Audrey Griveau, Elena Blanc, et al. 2018. « The SCN9A Channel and Plasma Membrane Depolarization Promote Cellular Senescence through Rb Pathway ». *Aging Cell* 17 (3): e12736. <https://doi.org/10.1111/acer.12736>.
- Watanabe, H., M. Imaizumi, T. Ojika, T. Abe, T. Hida, et K. Kato. 1994. « Evaluation of Biological Characteristics of Lung Cancer by the Human 28 KDa Vitamin D-Dependent Calcium Binding Protein, Calbindin-D28k ». *Japanese Journal of Clinical Oncology* 24 (3): 121-27.
- Wei, Bing, Tian Ding, Yan Xing, Wei Wei, Zhen Tian, Feng Tang, Susan Abraham, Khazi Nayeemuddin, Kelly Hunt, et Yun Wu. 2010. « Invasive Neuroendocrine Carcinoma of the Breast: A Distinctive Subtype of Aggressive Mammary Carcinoma ». *Cancer* 116 (19): 4463-73. <https://doi.org/10.1002/cncr.25352>.
- Wei, W., R. M. Hemmer, et J. M. Sedivy. 2001. « Role of P14(ARF) in Replicative and Induced Senescence of Human Fibroblasts ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (20): 6748-57. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.6748-6757.2001>.
- Weigelt, B., H. M. Horlings, B. Kreike, M. M. Hayes, M. Hauptmann, L. F. A. Wessels, D. de Jong, M. J. Van de Vijver, L. J. Van't Veer, et J. L. Peterse. 2008. « Refinement of Breast Cancer Classification by Molecular Characterization of Histological Special Types ». *The Journal of Pathology* 216 (2): 141-50. <https://doi.org/10.1002/path.2407>.
- Weinstein, I. B. 2000. « Disorders in Cell Circuitry during Multistage Carcinogenesis: The Role of Homeostasis ». *Carcinogenesis* 21 (5): 857-64. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.5.857>.
- Wheeler, Damian G., Curtis F. Barrett, Rachel D. Groth, Parsa Safa, et Richard W. Tsien. 2008. « CaMKII Locally Encodes L-Type Channel Activity to Signal to Nuclear CREB in Excitation-Transcription Coupling ». *The Journal of Cell Biology* 183 (5): 849-63. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805048>.
- Wiel, Clotilde, Hélène Lallet-Daher, Delphine Gitenay, Baptiste Gras, Benjamin Le Calvé, Arnaud Augert, Mylène Ferrand, et al. 2014. « Endoplasmic Reticulum Calcium Release through ITPR2 Channels Leads to Mitochondrial Calcium Accumulation and Senescence ». *Nature Communications* 5 (mai): 3792. <https://doi.org/10.1038/ncomms4792>.
- Wiley, Christopher D., Su Liu, Chandani Limbad, Anna M. Zawadzka, Jennifer Beck, Marco Demaria, Robert Artwood, et al. 2019. « SILAC Analysis Reveals Increased Secretion of Hemostasis-Related Factors by Senescent Cells ». *Cell Reports* 28 (13): 3329-3337.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.049>.
- Wiley, Christopher D., Michael C. Velarde, Pacome Lecot, Su Liu, Ethan A. Sarnoski, Adam Freund, Kotaro Shirakawa, et al. 2016. « Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype ». *Cell Metabolism* 23 (2): 303-14. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>.
- Wu, Xunwei, Bach-Cuc Nguyen, Piotr Dziunycz, Sungeun Chang, Yang Brooks, Karine Lefort, Günther F. L. Hofbauer, et G. Paolo Dotto. 2010. « Opposing Roles for Calcineurin and ATF3 in Squamous Skin Cancer ». *Nature* 465 (7296): 368-72. <https://doi.org/10.1038/nature08996>.
- Xu, Ming, Tamar Pirtskhalava, Joshua N. Farr, Bettina M. Weigand, Allyson K. Palmer, Megan M. Weivoda, Christina L. Inman, et al. 2018. « Senolytics Improve Physical Function and Increase

- Lifespan in Old Age ». *Nature Medicine* 24 (8): 1246-56. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>.
- Xu, Yingxi, Na Li, Rong Xiang, et Peiqing Sun. 2014. « Emerging Roles of the P38 MAPK and PI3K/AKT/MTOR Pathways in Oncogene-Induced Senescence ». *Trends in Biochemical Sciences* 39 (6): 268-76. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.04.004>.
- Xue, Wen, Lars Zender, Cornelius Miething, Ross A. Dickins, Eva Hernando, Valery Krizhanovsky, Carlos Cordon-Cardo, et Scott W. Lowe. 2007. « Senescence and Tumour Clearance Is Triggered by P53 Restoration in Murine Liver Carcinomas ». *Nature* 445 (7128): 656-60. <https://doi.org/10.1038/nature05529>.
- Yamakoshi, Kimi, Akiko Takahashi, Fumiko Hirota, Rika Nakayama, Naozumi Ishimaru, Yoshiaki Kubo, David J. Mann, et al. 2009. « Real-Time in Vivo Imaging of P16Ink4a Reveals Cross Talk with P53 ». *The Journal of Cell Biology* 186 (3): 393-407. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904105>.
- Yang, G., D. G. Rosen, Z. Zhang, R. C. Bast, G. B. Mills, J. A. Colacino, I. Mercado-Uribe, et J. Liu. 2006. « The Chemokine Growth-Regulated Oncogene 1 (Gro-1) Links RAS Signaling to the Senescence of Stromal Fibroblasts and Ovarian Tumorigenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (44): 16472-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605752103>.
- Yang, Nae-Cherng, et Miao-Lin Hu. 2005. « The Limitations and Validities of Senescence Associated-Beta-Galactosidase Activity as an Aging Marker for Human Foreskin Fibroblast Hs68 Cells ». *Experimental Gerontology* 40 (10): 813-19. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.07.011>.
- Yosef, Reut, Noam Pilpel, Ronit Tokarsky-Amiel, Anat Biran, Yossi Ovadya, Snir Cohen, Ezra Vadai, et al. 2016. « Directed Elimination of Senescent Cells by Inhibition of BCL-W and BCL-XL ». *Nature Communications* 7 (avril): 11190. <https://doi.org/10.1038/ncomms11190>.
- Yu, X., X. Li, G. Jiang, X. Wang, H. C. Chang, W. H. Hsu, et Qinglin Li. 2013. « Isradipine Prevents Rotenone-Induced Intracellular Calcium Rise That Accelerates Senescence in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells ». *Neuroscience* 246 : 243-53. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.062>.
- Yuan, Gongsheng, Bingxuan Hua, Tingting Cai, Lirong Xu, Ermin Li, Yiqing Huang, Ning Sun, Zuoqin Yan, Chao Lu, et Ruizhe Qian. 2017. « Clock Mediates Liver Senescence by Controlling ER Stress ». *Aging* 9 (12): 2647-65. <https://doi.org/10.18632/aging.101353>.
- Zeng, G., H. M. McCue, L. Mastrangelo, et A. J. Millis. 1996. « Endogenous TGF-Beta Activity Is Modified during Cellular Aging: Effects on Metalloproteinase and TIMP-1 Expression ». *Experimental Cell Research* 228 (2): 271-76. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0326>.
- Zglinicki, T. von, R. Pilger, et N. Sitté. 2000. « Accumulation of Single-Strand Breaks Is the Major Cause of Telomere Shortening in Human Fibroblasts ». *Free Radical Biology & Medicine* 28 (1): 64-74. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00207-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00207-5).
- Zhang, Yan, Dayong Zheng, Ting Zhou, Haiping Song, Mohit Hulsurkar, Ning Su, Ying Liu, et al. 2018. « Androgen Deprivation Promotes Neuroendocrine Differentiation and Angiogenesis through CREB-EZH2-TSP1 Pathway in Prostate Cancers ». *Nature Communications* 9 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06177-2>.
- Zhao, Yongxin, Satoko Araki, Jiahui Wu, Takayuki Teramoto, Yu-Fen Chang, Masahiro Nakano, Ahmed S. Abdelfattah, et al. 2011. « An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca<sup>2+</sup> Indicators ». *Science (New York, N.Y.)* 333 (6051): 1888-91. <https://doi.org/10.1126/science.1208592>.
- Zhou, Fang, Shigemitsu Onizawa, Atsushi Nagai, et Kazutetsu Aoshiba. 2011. « Epithelial Cell Senescence Impairs Repair Process and Exacerbates Inflammation after Airway Injury ». *Respiratory Research* 12 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-12-78>.
- Zhu, J., D. Woods, M. McMahon, et J. M. Bishop. 1998. « Senescence of Human Fibroblasts Induced by Oncogenic Raf ». *Genes & Development* 12 (19): 2997-3007.
- Zhu, Yi, Ewald J. Doornebal, Tamar Pirtskhalava, Nino Giorgadze, Mark Wentworth, Heike Fuhrmann-Stroissnigg, Laura J. Niedernhofer, Paul D. Robbins, Tamara Tchkonja, et James L. Kirkland. 2017. « New Agents That Target Senescent Cells: The Flavone, Fisetin, and the BCL-XL Inhibitors, A1331852 and A1155463 ». *Aging* 9 (3): 955-63. <https://doi.org/10.18632/aging.101202>.

- Zhu, Yi, Tamara Tchkonina, Heike Fuhrmann-Stroissnigg, Haiming M. Dai, Yuanyuan Y. Ling, Michael B. Stout, Tamar Pirtskhalava, et al. 2016. « Identification of a Novel Senolytic Agent, Navitoclax, Targeting the Bcl-2 Family of Anti-Apoptotic Factors ». *Aging Cell* 15 (3): 428-35.  
<https://doi.org/10.1111/accel.12445>.
- Ziegler, Dorian V., David Vindrieux, Delphine Goehrig, Sara Jaber, Guillaume Collin, Audrey Griveau, Clotilde Wiel, et al. 2021. « Calcium Channel ITPR2 and Mitochondria-ER Contacts Promote Cellular Senescence and Aging ». *Nature Communications* 12 (1): 720.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-20993-z>.
- Ziegler, Dorian V., Christopher D. Wiley, et Michael C. Velarde. 2015. « Mitochondrial Effectors of Cellular Senescence: Beyond the Free Radical Theory of Aging ». *Aging Cell* 14 (1): 1-7.  
<https://doi.org/10.1111/accel.12287>.
- Zurgil, U, A Ben-Ari, K Atias, N Isakov, R Apte, et E Livneh. 2014. « PKC $\eta$  Promotes Senescence Induced by Oxidative Stress and Chemotherapy ». *Cell Death & Disease* 5 (11): e1531-e1531.  
<https://doi.org/10.1038/cddis.2014.481>.