



Rôle du glyoxal dans la sénescence cellulaire : implications dans le vieillissement de la peau

Rym Halkoum

► To cite this version:

Rym Halkoum. Rôle du glyoxal dans la sénescence cellulaire : implications dans le vieillissement de la peau. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS016 . tel-04095605

HAL Id: tel-04095605

<https://theses.hal.science/tel-04095605>

Submitted on 12 May 2023

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

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

Thèse de doctorat de Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du Vivant – ED515

Présentée par
Mme Rym HALKOUM

Pour obtenir le grade de
Docteur de Sorbonne Université

Laboratoires d'accueil :

- Adaptation Biologique et Vieillessement (SU - CNRS UMR8256, INSERM ERL U1164)
Équipe : Vieillessement Cellulaire Intégré et Inflammation
- LVMH Recherche – Parfums Christian Dior : Département Sciences du Vivant

Rôle du glyoxal dans la sénescence cellulaire : Implications dans le vieillissement de la peau

Date de soutenance : 10 mai 2021 devant le jury composé de :

Mme Sandrine BETUING
Professeure de Sorbonne Université

Présidente du jury

M. Serge ADNOT
Professeur des Universités-praticien hospitalier

Rapporteur

M. Frédéric J. TESSIER
Professeur de l'Université de Lille

Rapporteur

Mme Florence DEBACQ-CHAINIAUX
Chercheuse qualifiée FNRS

Examinatrice

Mme Isabelle PETROPOULOS
Professeure de Sorbonne Université

Directrice de thèse

Mme Carine NIZARD
*Directrice du département Sciences du Vivant
LVMH Recherche*

Invitée

*“In a dark place we find ourselves,
and a little more knowledge lights our way.”*
— Yoda

À papa, à maman

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont vécu avec moi cette inoubliable aventure qu'a été ma thèse. Chacun(e) d'entre vous a écrit à sa façon une partie de cette histoire et c'est grâce à vous que cette thèse a avant tout été une expérience humaine qui restera à jamais gravée en moi.

Tout d'abord, je souhaite remercier ma directrice de thèse Isabelle Petropoulos. Isabelle, ma profonde gratitude envers toi remonte en réalité à mon année de master 2 durant laquelle tu m'as mise en contact avec LVMH Recherche, ce qui m'a donné l'opportunité d'y réaliser mon stage, puis cette thèse CIFRE. Merci de n'avoir jamais cessé de croire en moi, de m'avoir fait confiance durant toutes ces années et de ton implication sans failles dans ce travail. Je te remercie pour toutes les connaissances que tu m'as apportées et pour les innombrables heures à échanger des résultats et rédactions. Merci de t'être toujours soucieuse de ma carrière, de mon évolution et de m'avoir toujours poussée à voler plus haut. Merci pour tes qualités humaines et ta bienveillance qui m'ont aidée à traverser les épreuves et à ne pas me décourager. Merci d'avoir toujours été à l'écoute professionnellement mais aussi personnellement. Merci d'avoir été présente quels que soient le jour et l'heure, pour tous nos rires et moments inoubliables (notamment à Athènes !). Merci de m'avoir prise sous ton aile afin que je puisse désormais prendre mon propre envol. Tu as toute ma gratitude et je ne doute pas que nos routes ne pourront que se recroiser dans le futur.

Je souhaite particulièrement remercier Carine Nizard sans qui cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu. Carine, tu m'as donnée l'opportunité rêvée de réaliser cette CIFRE au sein de LVMH Recherche et je t'en serais toujours reconnaissante. Merci de m'avoir accordée autant de confiance et de liberté quant à la réalisation de cette thèse. Grâce à toi, j'ai pu découvrir le monde de l'entreprise et une façon différente d'orienter mes réflexions scientifiques. Merci pour toutes ces discussions au cours desquelles tu m'as parlée de stratégies de recherche et de développement, élargissant ainsi ma vision de la recherche. Je te remercie pour ton enthousiasme inébranlable et tes encouragements durant toutes ces années. Merci d'avoir toujours gardé une pensée pour moi quand je n'étais pas avec vous (comme pour le kouglof !) et pour tous nos trajets en train ensemble.

Je remercie Bertrand Friguet de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire « adaptation biologique et vieillissement », pour sa bienveillance, sa disponibilité et sa bonne humeur quotidienne légendaire. Merci également pour votre aide et vos conseils dans la préparation de notre article.

Je tiens à remercier Karl Pays, directeur du département Recherche de LVMH, pour m'avoir accordée la chance de réaliser cette thèse CIFRE au sein du groupe LVMH mais également de m'avoir écoutée à plusieurs reprises présenter mes travaux de thèse. Merci pour les échanges enrichissants qui en ont découlés mais également pour m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse.

Je remercie Sandrine Betuing d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de thèse. Merci aux rapporteurs de ma thèse, Serge Adnot et Frédéric J. Tessier, d'avoir lu et évalué ce manuscrit ainsi que pour leurs retours très constructifs sur mes travaux.

Je tiens également à remercier Florence Debacq-Chainiaux d'avoir non seulement accepté d'être dans mon jury de thèse en tant qu'examinatrice, mais également dans mon comité de suivi de thèse en tant qu'experte scientifique. Son expertise dans le domaine de la sénescence cutanée induite par des stress m'a été d'une grande aide à travers la pertinence de ses remarques, ses conseils mais également sa bienveillance.

Je remercie les autres membres de mon comité de suivi de thèse, Han Li en tant que représentante de l'école doctorale et Pierre Joanne en tant que tuteur, pour tous nos échanges intéressants et constructifs ainsi que pour leur gentillesse.

Merci à mes collaboratrices de la plateforme de protéomique 3P5, Virginie Salnot et Morgane Le Gall, pour leur contribution dans l'étude du sécrétome par spectrométrie de masse et pour toutes ces heures passées sur les analyses statistiques.

Je tiens également à remercier Christophe Capallere, Christelle Plaza et Jean-Marie Botto, de la société Ashland (Sophia-Antipolis) pour tout leur travail sur le modèle d'épiderme reconstruit ainsi que pour toutes nos réunions et échanges scientifiques enrichissants et réguliers tout au long de ce projet de recherche.

A mes collègues du laboratoire « Adaptation Biologique et Vieillesse » :

Je ne pouvais pas ne pas commencer par mes deux piliers, mes « super nanas », mon eyeliner gang. Rachel et Sabrina, nous avons vécu tant de moments ensemble qu'il me serait difficile de tout évoquer, mais merci pour notre traditionnel « cov » du matin (midi pour Rachel...), avec des cafés aussi allongés que nos cernes au fil des mois, mais qui m'ont apporté ces doses d'amour et de motivation pour attaquer ma journée. Merci pour nos messages quotidiens, pour nos innombrables fous rires, pour nos « câlins-ours », pour nos merveilleux selfies pris au réveil et pour toutes les fois où vous m'avez remonté le moral.

Rach, Rachampionne, merci de m'avoir couvée et pris soin de moi et du Rymo pendant toutes ces années. Merci pour toutes les fois où tu as volé à mon secours sans hésitation aucune, que ce soit pour les aides techniques que tu résous en 2 minutes, pour avoir plongé ton bras dans l'azote et récupéré la boîte que j'ai faite tomber, pour toutes tes random petites attentions (« ça m'a fait penser à toi donc j'ai voulu te l'offrir »), pour avoir écouté mon drama (« je suis en hyperglycémie ») et mes monologues sur mes cheveux blancs en feignant un air compréhensif, et pour tous les autres moments inoubliables vécus ensemble, du concert de Florence à nos séjours à Gand/Ghent/Gant et Bruxelles (#javeer). Comme pour Harley, derrière ton air parfois féroce se cache une pépite d'amour et de douceur dotée d'une grande empathie. Notre aventure « labo » se termine mais cela ne représente que le début d'un nouveau chapitre d'une longue amitié (non pas qu'on soit toutes jeunes, mais bon...). Merci, merci pour tout.

Sabouna, Sasageyo, Saboss, ma brillante binôme et grande sœur de thèse, ma partenaire de souffrance, ma « moi de 2 mois dans le futur ». Notre amitié a commencé sous

les meilleurs auspices, ceux de notre admiration commune pour Petra, Rogelio et Rrrafael mais également du concert de Lizzo. Merci d'avoir toujours pris le temps de m'éclairer et me guider pendant cette fin de thèse, merci de m'avoir rassurée à chaque étape et de ne pas m'avoir laissé lâcher cette fameuse « rampe ». Merci pour nos rires et pleurs, « sssssouvent » les deux en même temps. Nous avons tant de projets business prévus qu'il me semble inévitable de ne pas réaliser au moins l'un d'entre eux un jour. Je pense notamment à toutes les chansons que nous avons écrites, composées et interprétées à la cantine ! Nous allons enfin passer des tachy(cardies) aux taki taki (Cardi). Merci pour tout et « tzoum tzoum » !

Je tiens à remercier Kevin, mon camarade de migraines toujours si « épanoui et rayonnant » que j'aurais aimé connaître bien plus tôt au cours de cette aventure. Merci pour tout ton soutien, tes conseils quotidiens, ton écoute et même pour ton sadisme ponctuel qui va tant me manquer. Je n'ai aucun doute sur la carrière brillante qui t'attend et sur toutes les merveilles que tu vas accomplir (histoire qu'on aille vraiment aux Seychelles un jour).

A mes petits doctorants en devenir :

- Merci au djin-ger Yokhène au cœur en or pour avoir été une véritable bouffée de gaieté et d'avoir illuminé nos journées au labo. Merci pour ta bienveillance, pour tous les mots gentils que tu nous balances au quotidien, pour tous ces sons et expressions particulières que tu as tenté de m'apprendre (j'ai encore du mal avec « crari ») et pour ta générosité (surtout pour les doowaps !). Tes sandwichs de l'enfer et tes petites danses aléatoires vont me manquer mais c'est avec fierté que je te cède la place de « plus vieux thésard du labo », en attendant de te voir tous nous éblouir à ta soutenance.

- Merci Tania pour ta grande gentillesse et pour ta générosité sans limites pour nous faire plaisir et qui me font oublier ta capacité à involontairement spoiler les films ou le fait que tu as aimé la nouvelle saga Star Wars... Parler de baby Yoda, de bouffe, des Sims ou même de poulpes avec toi va me manquer et je t'envoie toutes mes ondes positives pour le reste de ta thèse. Que la force soit avec toi !

- Je tiens à remercier Rémyche pour sa bienveillance, sa bonne humeur et sa gentillesse. Merci de m'avoir toujours encouragée tel un digne descendant d'Erwin Smith et merci pour toutes ces discussions interminables sur SNK. Je doute que des pistes de recherche pourront échapper à tes capacités d'observation et à ta perspicacité. Shinzou yo sasageyo !

- Taleen et Mazzarine, je vous souhaite beaucoup de courage et de réussite pour vos thèses et je vous remercie pour votre gentillesse (sauf sur Among Us où vous étiez de vraies sadiques en tant qu'imposteurs).

Je souhaite remercier notre dernière recrue Caroline. Carlos (pour les intimes), je suis contente d'avoir eu la chance de te croiser peu avant mon départ, même si j'ai l'impression de te connaître depuis bien plus longtemps. Je te remercie pour ton soutien, ta fraîcheur de vivre et ton humour (et toutes tes imitations d'accents un peu bancales). Je ne te promets rien mais je vais tenter de réduire ma consommation d'avocats !

Merci à Yara, mon acolyte de la pièce de culture et de la sénescence induite. Yara, merci pour ta douceur et ton calme légendaire, pour ton soutien pendant cette thèse et pour les M&M's et fruits secs que tu me proposais dès que j'avais une baisse de moral. J'espère sincèrement que nos chemins se recroiseront à l'avenir, notamment pour que je puisse revoir ma copine Chiara et son petit frère !

Je tiens également à remercier ma très chère Marie-Paule. MP, comment ne pas évoquer notre amour pour le fameux colin à la bordelaise de la cantine ? Pour les références F.R.I.E.N.D.S, le chocolat et les pâtisseries ? Merci pour ta grande gentillesse et pour m'avoir toujours aidée avec un grand sourire, que ce soit pour le FACS ou pour la relecture. Merci pour tous ces rires que l'on a partagés et d'avoir toujours répondu présente pour moi. Merci pour tout.

Merci Aurore, pour tout ton soutien et pour toutes les fois où tu as partagé tes connaissances théoriques et techniques avec moi. Je te remercie également pour tout ton travail et ton implication dans l'écriture de l'article ainsi que pour la bienveillance de tes conseils.

Je remercie Chahrazade, Khadija, Dominique, Vimala, Valérie et Nancy pour leur gentillesse et d'avoir toujours été souriantes. Nos discussions pendant les pauses-déjeuner me manqueront. Merci également à Eric pour sa bienveillance et toutes nos discussions autour du yoga, de la culture et de la gastronomie avec ses plats raffinés du midi. Merci également à Mustapha, Hilaire et Michel RJ.

Je tiens à remercier Kadiatou, notre petite maman du labo, dont la seule présence me réconfortait à chaque fois. Merci pour ta gentillesse et ton sourire tous les matins, merci pour tous les services que tu m'as rendus allant de mes demandes urgentes d'autoclave aux dépannages de capsules de café. T'entendre nous faire la morale parce qu'on ne range pas le bureau ou qu'on ne vide pas la machine à café va énormément me manquer.

Merci à Aurélie et Johanne pour leur disponibilité ainsi que leur aide concernant les commandes et autres soucis administratifs pas toujours évidents.

A celles que j'ai eu la chance de croiser et qui ont volé vers d'autres horizons :

Merci Lucille pour tes encouragements et tous nos rires. Merci pour nos petites escapades shopping et pour toutes les invitations aux expositions de Thomas. Je ne suis pas près d'oublier certains tableaux, je sais que tu reconnaitras lesquels ! Je te souhaite beaucoup de courage et de réussite pour ta thèse, je suis sûre qu'elle sera brillante.

Je remercie Monique d'avoir été présente lors de mes premiers mois de thèse, de m'avoir guidée et aidée à trouver prendre mes repères aussi bien à la paillasse que dans l'institut. Je te remercie pour ta bienveillance et ton enthousiasme.

Je tiens particulièrement à remercier Coline pour toute son aide au Western blot mais également pour son grand cœur (après tout, tu portes bien ton nom !) et son empathie. Merci d'avoir toujours pensé à moi, merci pour toutes tes petites attentions allant des tablettes de

chocolat blond (quelle découverte !) à tes délicieux cannelés, merci pour ton soutien. Merci pour tout.

Merci à ma petite stagiaire Joëlle pour son aide et sa gentillesse. Joëlle, je suis contente de voir que mon drama légendaire ne t'a pas découragée à commencer ta propre thèse avec un sujet passionnant sur la sénescence cutanée. Je te souhaite beaucoup de réussite et de vivre ta thèse à fond car il s'agit d'une aventure inoubliable qui en vaut grandement la peine (on s'en rend surtout compte à la fin).

Merci à Fanny de m'avoir guidée, conseillée et soutenue pendant cette thèse. Merci de m'avoir toujours tendu du chocolat pile quand j'en avais besoin, merci d'avoir partagé protocoles et astuces avec moi. Je n'oublierai pas notre petite retraite dans les yourtes et tous les rires et pleurs que nous avons partagés. Merci également à Elodie, ce concentré d'énergie et de bonne humeur, d'avoir toujours eu le mot (ou la blague, souvent la blague) juste pour me faire rire et m'encourager. Je suis contente d'avoir fait la connaissance d'une personne aussi pure et attachante que toi.

A mes collègues de LVMH Recherche :

Je souhaite tout d'abord remercier Sylvianne Schnebert, qui dirigeait le département Sciences du Vivant à mes débuts de thèse, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse CIFRE.

Merci à Emmanuelle de m'avoir toujours chaleureusement accueillie au sein du laboratoire d'efficacité *in vitro* et ce, depuis mon stage il y a déjà plus de 4 ans. Manue, merci pour toute ton aide et tes conseils techniques. Merci pour ta bienveillance, pour ton enthousiasme ainsi que pour toutes nos discussions pendant les pauses-déjeuner/café.

Je tiens à particulièrement remercier Juliette. Ma Juju, tout a commencé lorsque j'ai squatté ton bureau, il y a déjà tant d'années ! Plus qu'une collègue, j'ai trouvé une réelle amie qui m'a toujours conseillée et épaulée. Merci de t'être toujours occupée de moi, de m'avoir accueillie chez toi et de m'avoir tant soutenue. Merci pour toutes nos discussions et tes petites attentions. Merci pour ton aide à la paillasse et merci d'avoir pris le temps de gérer nos envois de cellules et d'échantillons, ce véritable casse-tête ! Merci pour ta gentillesse et la belle personne que tu es, merci pour tout.

Je souhaite remercier toute l'équipe Open Inno, Robin, Catherine, Jocelyne, Valérie, Anne-Laure sans oublier Marc, de m'avoir toujours écoutée ainsi que pour nos différents échanges.

Merci Tanesha pour ton aide en imagerie, ta bonne humeur et tes chocolats Papion !

Un grand merci à Marielle pour m'avoir prise sous son aile au début de ma thèse, pour toute son aide au WES et tous nos échanges scientifiques. Merci d'avoir toujours gardé une pensée pour moi quand je n'étais pas à SJDB et de m'avoir aidée à me familiariser avec le monde de l'entreprise (Accolade, les événements d'entreprise etc).

Merci à Kristell, Lauren, Milène, Olivier, Philippe, sans oublier Valentin, pour leur bienveillance, leur gentillesse, leurs encouragements ainsi que pour toutes nos discussions sciences.

Philippe, ne va surtout pas croire que tu as enfin réussi à te débarrasser de moi !

Merci à Andy pour toutes ses petites attentions, d'avoir tenté tant de fois de m'expliquer ce qu'est un « hors-jeu » ainsi que pour toutes nos discussions films et séries.

Merci à Clarisse pour m'avoir aidée à me procurer mes cellules et à Virginie pour son aide au Luminex.

Merci à Alexandre Marty pour toute son aide administrative (et tous les Cerfa remplis !) et pour sa bienveillance.

A ma famille, à mes amis :

Papa et maman, mes deux piliers, c'est à vous que je dédie cette thèse car elle est aussi un peu la vôtre. Merci pour vos innombrables sacrifices et d'avoir toujours fait de ma réussite une priorité. Merci de n'avoir jamais cessé de croire en moi et de m'avoir toujours poussée à surmonter les échecs et à continuer d'avancer. Sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui. Malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent, vous avez vécu avec moi les bons comme les mauvais moments de ces dernières années. Merci d'avoir toujours trouvé les mots justes pour me reconforter et de m'avoir guidée à faire les bons choix dans ma vie. Merci, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Après tout, il paraît que « les petits instruments peuvent aussi faire de grandes musiques ».

Merci à mes sœurs, Ferial, Radia et Sabrina, à mon frère Arslane et à ma sœur de cœur Sabrina Doudou. Merci pour votre soutien et d'avoir été là pour moi durant toutes ces années. Merci pour tous vos appels et vos messages d'encouragements, merci de vous être tant souciés de moi, de m'avoir tant (trop) de fois demandé si je dormais bien, si je mangeais bien... Merci.

Je tiens particulièrement à remercier mes amis et frères de cœur, Walid et Sofiane, avec lesquels j'ai explosé mes quotas de plaintes et de drama journaliers. Il n'y a pas eu un jour où vous n'avez pas répondu présents pour moi et je ne saurais dans quel état j'aurais été sans vous. Du plus profond de mon cœur, merci.

Walid (/Oualid), merci pour ton écoute et pour tes réponses toutes plus rassurantes et pertinentes les unes que les autres. Merci pour ta bienveillance, ton soutien inébranlable et d'avoir été aux petits soins avec moi pendant ma rédaction (et le 1^{er} confinement !).

Sofiane, je sais que tu voulais que je te consacre 10 pages de remerciements mais cela va à l'encontre de mon esprit UX. Alors, merci. Merci pour ton écoute, pour ton aide et tes conseils toujours avisés. Merci pour tous nos fous rires et pour nos voyages inoubliables qui ont été de véritables bouffées d'air frais.

Je remercie également tous mes véritables petits supporters, les « Honeys », Ahlem, Hadia, Ania, Khalil, Anaïs, Ness et Nicolas pour leurs encouragements et leurs petits mots d'amour. J'espère que vous aurez enfin la réponse à votre question : « mais en quoi consistent tes études ? ».

Pour finir, je souhaite remercier mes « Dinos », Sabrina, Fabien, Laurence, Florence, Melvyn, Kubra et Slim pour tout leur soutien et tous les bons moments que nous avons partagés.

RESUME

La sénescence est une réponse cellulaire au raccourcissement des télomères ou à l'exposition aux stress provoquant une accumulation de dommages à l'ADN et / ou un stress oxydant. Ce processus est caractérisé par des marqueurs spécifiques comme un arrêt irréversible du cycle cellulaire, une augmentation de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence ainsi que la sécrétion de cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et protéases. L'ensemble des facteurs sécrétés constitue le SASP, pour Senescence-Associated Secretory Phenotype, dont les rôles autocrine et paracrine contribuent au renforcement et à la propagation du phénotype sénéscent et au vieillissement. La composition du SASP et par conséquent son rôle, dépendent notamment du type cellulaire et de la nature du stress inducteur de sénescence. Du fait de sa fonction de barrière avec l'environnement externe, la peau est particulièrement soumise à différents types de stress induisant la sénescence des cellules et au vieillissement prématuré. Le glyoxal, composé dicarbonylé formé au cours des réactions de glycation, d'auto-oxydation du glucose ou de la peroxydation lipidique, est un précurseur des produits avancés de glycation impliqués dans le vieillissement normal et pathologique.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont permis de montrer que l'exposition de kératinocytes humains normaux à des doses subcytotoxiques et répétées de glyoxal induit la sénescence des cellules. L'établissement de cette sénescence est un processus dynamique dont l'initiation est due à l'activation de la voie d'arrêt du cycle cellulaire AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} peu décrite jusqu'à présent dans la sénescence des cellules normales. Cette phase précoce est suivie d'une phase tardive caractérisée par l'activation de la voie p16^{INK4A}/pRb. Nous avons également mis en évidence une accumulation de produits avancés de glycation et d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires suite aux traitements, traduisant un état de stress oxydant. La caractérisation du phénotype sécrétoire associé à la phase précoce de cette sénescence, que l'on a désigné GASP pour Glyoxal-Associated Secretory Phenotype, a été réalisée par spectrométrie de masse afin d'identifier des facteurs pouvant être ciblés par des ingrédients sénomorphiques, dans le but ultime de prévenir l'effet paracrine du GASP et la propagation du phénotype sénéscent.

Mots-clés : Sénescence cellulaire, SASP, phénotype sécrétoire, kératinocytes, stress dicarbonylé, glyoxal, produits avancés de glycation, stress oxydant, stratégie anti-âge.

ABSTRACT

Senescence is a cellular response to telomere shortening or stress exposures that provoke DNA damages accumulation and/or oxidative stress. This process is characterized by specific markers like a permanent cell cycle arrest, an increased senescence-associated β -galactosidase activity and secretion of cytokines, chemokines, growth factors and proteases. These secreted factors constitute the SASP, for Senescence-Associated Secretory Phenotype, which contributes to the reinforcement and propagation of the senescent phenotype and aging through its autocrine and paracrine roles. The beneficial or deleterious effect of the SASP depends on its composition which varies with the cell type and the stress triggering the senescence. Due to its barrier function with the external environment, the skin is particularly subjected to different stresses inducing cell senescence and premature aging. Glyoxal, a dicarbonyl compound formed during glycation reaction, glucose autooxidation or lipid peroxidation, is a precursor of advanced glycation end products involved in normal and pathological aging.

In this context, my thesis work has shown that exposure of normal human keratinocytes to repeated subcytotoxic doses of glyoxal induces cellular senescence. The establishment of the senescence is a dynamic process initiated by the activation of the cell cycle arrest pathway AKT/FOXO3a/p27^{KIP1}, a non-classical pathway of senescence. Following this early-stage, a late-stage senescence characterized by the p16^{INK4A}/pRb pathway activation was observed. Moreover, keratinocytes displayed an accumulation of intracellular advanced glycation end products and reactive oxygen species subsequent to glyoxal treatments, reflecting an oxidative stress state. The secretory phenotype associated to this early-stage senescence, that we called GASP for Glyoxal-Associated Secretory Phenotype, has been characterized using mass spectrometry. The identification of the GASP factors will allow to find new targets for senormorphic ingredients, in order to prevent the paracrine effect of GASP and ultimately the propagation of the senescent phenotype.

Key words: Cellular senescence, SASP, secretory phenotype, keratinocytes, dicarbonyl stress, glyoxal, advanced glycation end products, oxidative stress, anti-aging strategy.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
RESUME	11
ABSTRACT	12
SOMMAIRE	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	17
ABREVIATIONS.....	18
AVANT-PROPOS.....	22
INTRODUCTION.....	25
Chapitre I - Les caractéristiques du vieillissement	26
I. L'instabilité génomique	28
II. Le raccourcissement des télomères	30
III. Les altérations épigénétiques.....	30
IV. La perte de la protéostasie	31
V. La dérégulation de la sensibilité aux nutriments.....	31
VI. La dysfonction mitochondriale	34
VII. L'épuisement des cellules souches.....	35
Chapitre II : La sénescence cellulaire et le phénotype sécrétoire associé (SASP)	36
I. Description du processus de sénescence	36
1. Limite de Hayflick, sénescence répllicative et télomères.....	37
2. La sénescence induite prématurément par un stress	37
2.1 La sénescence induite par un stress oxydant et/ou des dommages l'ADN	38
2.2 La sénescence induite suite à des dysfonctionnements mitochondriaux	39
2.3 La sénescence induite par des oncogènes.....	41
3. Les biomarqueurs de la sénescence.....	41
3.1 Le changement morphologique.....	43
3.2 L'activité beta-galactosidase associée à la sénescence	43
3.3 La lipofuscine	44
3.4 Les foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF)	44
3.5 Les autres biomarqueurs de la sénescence cellulaire.....	45
4. Les voies de signalisation impliquées dans l'induction et le maintien de la sénescence cellulaire	46
4.1 L'activation de la voie p53/p21 ^{CIP1}	46
4.1.1 Le rôle central de p53 : entre cycle cellulaire et apoptose	46
4.1.2 p21 ^{CIP1} , un marqueur d'arrêt du cycle	48
4.2 L'activation de la voie p16 ^{INK4A}	49

4.3 L'activation de la voie p27 ^{KIP1}	50
5. Les faces lumineuse et obscure de la sénescence (« Bright and Dark side »).....	53
II. Le SASP, origine et conséquence de la sénescence.....	54
1. Caractéristiques du SASP : Description et effets autocrine versus paracrine	54
1.1 Description.....	54
1.2 Les voies de sécrétion	56
1.3 Effet autocrine du SASP et renforcement de l'état de sénescence	58
1.4 Mise en évidence de l'effet paracrine du SASP	59
1.5 L'élimination des cellules sénescents ou comment abolir l'effet paracrine du SASP	61
2. Les voies d'induction et de régulation du SASP	61
2.1 Mécanismes de régulation du facteur de transcription Nf-κB.....	62
2.2 Voies de dommages persistants à l'ADN	62
2.3 Stress oxydant et voie p38MAPK	63
2.4 Les autres acteurs de la régulation du SASP	64
3. Les effets délétères et bénéfiques du SASP dans le cadre du vieillissement et des pathologies... ..	65
3.1 Les effets bénéfiques du SASP	66
3.1.1 Rôle dans la plasticité cellulaire, la régénération et la cicatrisation	66
3.1.2 Rôle essentiel dans le développement embryonnaire	67
3.1.3 Rôle dans la surveillance immunitaire.....	67
3.2 Les effets délétères du SASP	69
3.2.1 Rôle dans le cancer.....	69
3.2.2 Rôle dans les pathologies liées à l'âge	70
4. Connaissances actuelles et méthodes expérimentales dans l'étude du SASP	71
4.1 La spectrométrie de masse : un screening de plus en plus complet et fiable	71
4.1.1 La méthode SILAC.....	71
4.1.2 Données obtenues par spectrométrie de masse en label-free	72
5. le SASP comme cible thérapeutique	74
5.1 L'élimination des cellules sénescents et l'émergence des sénolytiques	75
5.2 Les composés sénomorphiques	77
Chapitre III : La peau, indicateur visible direct du vieillissement	80
I. Structure de la peau	80
1. L'épiderme, terrain de prolifération et de différenciation des kératinocytes	80
2. Le derme	82
3. L'hypoderme.....	82
II. Les fonctions de la peau face aux stress environnementaux	82

1. Fonction de barrière physique et chimique	83
2. Fonction de barrière immunitaire	84
III. Le processus de sénescence dans les kératinocytes	84
1. La sénescence répliquative des kératinocytes, un événement atypique	85
2. Sénescence des kératinocytes induite par un stress	86
3. Le SASP des kératinocytes	87
IV. Vieillesse cutané.....	88
1. Vieillesse intrinsèque de la peau	88
2. Vieillesse extrinsèque de la peau et effets des stress environnementaux.....	88
2.1 Photo-vieillesse.....	89
2.2 Autres types de stress cutanés	89
Chapitre IV : La glycation, à l'origine de composés dicarbonylés et d'AGEs	90
I. La réaction de glycation, entre formation de composés dicarbonylés et d'AGEs.....	90
II. Autres origines des composés dicarbonylés et de formation d'AGEs	92
1. Sources endogènes des composés dicarbonylés.....	92
2. Apports exogènes en glyoxal et déséquilibre homéostatique	93
2.1 L'alimentation	94
2.2 Sources environnementales.....	94
3. Formation d'AGEs à partir des stress dicarbonylés.....	94
III. Voies de signalisation activées par les AGEs	96
1. Récepteur aux AGEs (RAGE)	96
1.1 Structure et fonction du RAGE.....	96
1.2 Voies de signalisation activées par RAGE	97
2. Les autres types de récepteurs.....	98
IV. Les mécanismes de détoxification.....	99
1. Le système des glyoxalases	99
1.1 Le mécanisme	99
1.2 Les glyoxalases dans la peau.....	101
1.3 Altérations du système des glyoxalases et implication dans les pathologies.....	101
2. Le système des aldo-céto réductases.....	102
V. Composés dicarbonylés, stress oxydant et pathologies.....	103
1. Implications des AGEs dans le vieillissement cutané	104
2. Implications des AGEs dans les maladies neurodégénératives.....	105
2.1 La maladie de Parkinson	105
2.2 La maladie d'Alzheimer.....	106
3. Implications des AGEs dans le diabète	107

4. Implications des AGEs dans les maladies cardiovasculaires.....	108
5. Implications des AGEs dans les cancers	109
VI. Impact des composés dicarbonylés et des AGEs sur l'induction de la sénescence cellulaire	109
CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	111
Contexte du projet	112
But du projet et stratégie anti-âge	113
Objectifs	114
RESULTATS	116
Présentation de l'article	117
Résumé des résultats	162
I. Mise au point d'un protocole expérimental de traitement au glyoxal	162
II. Le glyoxal induit la sénescence des NHEK	163
III. Détermination des voies de signalisation impliquées dans l'initiation (phase précoce) et le maintien (phase tardive) de la sénescence cellulaire.....	164
IV. Le GO provoque un stress oxydant des NHEK.....	165
V. Caractérisation du GASP associé à la phase précoce de l'établissement de la sénescence cellulaire	166
VI. Effets du GO sur un modèle d'épiderme humain reconstruit.....	167
VII. Validation de notre modèle d'induction de la sénescence par le GO sur un deuxième donneur de NHEK	167
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	168
Discussion générale	169
I. Etude de l'effet du glyoxal dans l'induction de la sénescence des NHEK	170
II. Le GO provoque un état de stress oxydant des NHEK.....	173
III. Caractérisation du GASP précoce et sélection de cibles anti-âge potentielles	175
IV. Effets du glyoxal sur un modèle d'épiderme humain reconstruit.....	178
Conclusion générale	179
BIBLIOGRAPHIE	182

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Durée de vie moyenne en France en 2021.....	22
Figure 2. Les neuf caractéristiques (« Hallmarks ») du vieillissement.....	26
Figure 3. Interrelations fonctionnelles des caractéristiques du vieillissement.....	28
Figure 4. Les voies de réponses aux dommages à l'ADN (DDR).....	29
Figure 5. Les voies impliquées dans la sensibilité aux nutriments.....	33
Figure 6. Exemples de stress classiques inducteurs de sénescence cellulaire (SIS pour « stress-induced senescence »).....	38
Figure 7. Induction de la sénescence cellulaire suite à des dommages mitochondriaux.....	40
Figure 8. Modèles classiques d'induction de sénescence cellulaire in vitro.....	41
Figure 9. Biomarqueurs communs de la sénescence cellulaire.....	42
Figure 10. Les voies de signalisation classiques responsables de l'arrêt du cycle cellulaire lié à la sénescence.....	47
Figure 11. Régulation du cycle cellulaire.....	48
Figure 12. Modèle proposé de la voie de signalisation AKT/FOXO3a/p27 ^{KIP1}	52
Figure 13. Exemples de facteurs faisant partie du « core » SASP.....	55
Figure 14. Les différentes voies de sécrétion de sécrétion protéique.....	57
Figure 15. Les effets autocrines et paracrines du SASP dans de la peau.....	59
Figure 16. Voies de régulation du SASP médiées de Nf-κB.....	65
Figure 17. Les rôles bénéfiques et délétères du SASP.....	66
Figure 18. Rôle des cellules sénescents et du SASP dans le recrutement de cellules immunitaires et la régénération tissulaire.....	68
Figure 19. Exemples de quelques sénolytiques et sénormorphiques communément étudiés ainsi que leurs cibles.....	75
Figure 20. Evolution des accords passés et des financements reçus par les startups spécialisées dans l'étude sur la longévité entre 2013 et 2018.....	78
Figure 21. Structure et composition de la peau.....	80
Figure 22. Exposition de la peau à des stress environnementaux.....	83
Figure 23. Les étapes de l'établissement de la sénescence de kératinocytes humains in vitro.....	85
Figure 24. Réaction de Maillard et formation de composés dicarbonylés.....	91
Figure 25. Principales voies métaboliques de formation du glyoxal et du méthylglyoxal.....	93
Figure 26. Voies de formation d'AGEs à partir du glyoxal.....	95
Figure 27. Structure du récepteur aux AGEs, RAGE.....	96
Figure 28. Les voies de signalisation activées par l'induction d'ERO suite à la stimulation du RAGE... ..	98
Figure 29. Le système de détoxification des glyoxalases.....	100
Figure 30. Le système de détoxification des aldo-céto réductases (AKRs).....	103
Figure 31. Implication des AGEs dans de nombreuses pathologies dont certaines liées à l'âge.....	104
Figure 32. Effets des AGEs sur la peau.....	105
Figure 33. Objectifs du projet de thèse et stratégie anti-âge.....	115
Figure 34. Protocole d'induction in vitro de la sénescence de NHEK par stress GO.....	163
Figure 35. Modèle présentant les différentes étapes de l'installation du phénotype sénescents.....	171
Figure 36. La régulation de FOXO3a par les ERO.....	174
Figure 37. Protéines spécifiques du GASP présentes dans les bases de données « Secretome ».....	176
Figure 38. Modèle proposé du rôle du glyoxal dans l'induction de la sénescence des NHEK.....	181

ABREVIATIONS

A

A β : Peptide amyloïde bêta
ACYP2 : Acylphosphatase 2
ADN : Acide désoxyribonucléique
AGER : AGE-receptor AGER
AGEs : produits avancés de glycation
AICAR : Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide
AKRs : Aldo Keto Reductases
AKT ou PKB : Protein kinase B
AMP : Adenosine monophosphate
AMPK : AMP-activated protein kinase
APP : Amyloïd precursor protein
AREG : Amphireguline
ASF1A : Anti-Silencing Function 1A Histone Chaperone
ATG : Autophagy related protein
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adenosine triphosphate
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related
ATRIP : ATR Interacting Protein
ATV : Atazanavir

B

BCL : B-cell lymphoma
BER : Réparations par Excision de Base
bFGF : basic fibroblast growth factor
BMP : Bone morphogenetic protein
BRCA1 : Breast Cancer 1

C

CBX7 : Chromobox homolog 7
CCFs : Cytoplasmic chromatin fragments

CCL : Chemokine ligand
CDK : Cyclin-dependent kinase
CDKN : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
CEL : Carboxyethyl-Lysine
C/EBP β : CCAAT/enhancer-binding protein
cGAMP : cyclic GMP-AMP
cGAS : Cyclic GMP-AMP Synthase
CHK : Checkpoint Kinase
CIP : CDK interacting protein
CMA : N ω -(carboxymethyl)-arginine
CML : N ϵ -(Carboxyméthyl) Lysine
COX : Cyclooxygenase
CREB : cAMP response element-binding protein
CRP : C-reactive protein
CST6 : Cystatin-M
CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand
CXCR : C-X-C chemokine receptor

D

Daf : abnormal DAuer Formation
DDR : Réponse aux Dommages à l'ADN
DG : Deoxyglucosone
DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase
DNA-SCAR : DNA sequence characterized amplified regions
DNMT : DNA Methyltransferase
DSB : DNA Double Strand Break

E

EFNB : EFNB
EGF : Epidermal growth factor
EGF-R : Epidermal Growth Factor receptor
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK : Extracellular signal-regulated kinase

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ERN : Espèces réactives de l'azote

eSASP : SASP exosomal

EZH2 : Enhancer of zeste homologue 2

F

FAK : Focal Adhesion Kinase

FAT1 : Protocadherin Fat 1

FGF : Fibroblast growth factor

G

GASP : Glyoxal Associated Secretory Phenotype

GATA4 : GATA binding protein 4

GH : Growth Hormone

G-H1 : Nδ-(5-hydro-4-imidazolone-2-yl)-ornithine

GLB1 : Galactosidase Beta 1

GLO : Glyoxalase

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GO : glyoxal

GODIC : Glyoxal-Derived Imidazolium Crosslink

GOLA : Glyoxal-Lysine-Amide

GOLD : Glyoxal-Lysine Dimer

Gpx : Glutathione peroxidases

GSH : Glutathione

GSK3 : Glycogene Synthase Kinase 3

H

γH2AX : gamma H2A Histone Family

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

H3K9Me_{2/3} : di-/tri-methylated lysine 9 of histone H3

HDAC : histones désacétylases

HbA1c : Hémoglobine A1C

HGF : Hepatocyte growth factor

HKGS : Human Keratinocyte Growth Supplement

HMG : High mobility group

HP1 : Heterochromatin protein 1

HSCs : Cellules souches hématopoïétiques

hSKP : Human skin-derived precursors

HSP : Heat Shock protein

I

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule

IDF : International Diabetes Federation

IFN : Interferon

IGF-1 : Insulin-Growth Factor-1

IGFBP : Insulin-like growth factor-binding protein 1

IIS : Insulin/Insulin-Growth Factor-1 signaling

IL : Interleukines

IL-R : Récepteurs aux interleukines

INK : Inhibitor of CDK

IP-10 : Interferon gamma-induced protein 10

IRIS : Sénescence induite par radiations ionisantes

J

JAK-STAT : Janus kinases- signal transducers and activators of transcription

JMJD3 : Jumonji domain-containing protein D3

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

L

LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

LMNB1 : Lamin B1

LOX-1 : Lectin-like oxidized LDL receptor-1

M

MAP3K : MAP kinase kinase kinases

MCP : Membrane cofactor protein

MGO : Methylglyoxal

MiDAS : Mitochondrial dysfunction-associated senescence

MIF : Macrophage migration inhibitory factor

MIP : Macrophage Inflammatory Proteins

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

MK2 : Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2

MKK : Mitogen-activated protein kinase kinase

MMP : Matrix Metalloproteinase

MnSOD : Manganese superoxide dismutase

MOLD : Methylglyoxal-Lysine Dimer

mTOR : mammalian target of Rapamycin

N

NAD(H) : Nicotinamide adenine dinucleotide (réduit)

NBS1 : Nibrin

NEMO : Nf- κ B Essential Modulator

NER : Réparation par Excision de Nucléotides

Nf- κ B : nuclear factor-kappa B

NHEK : Normal Human Epidermal Keratinocytes

NOX : NADPH oxidase

NQO1 : NADPH:quinone oxidoreductase 1

O

OIS : Oncogene Induced Senescence

OMS : Organisation mondiale de la santé

P

p38MAPK : p38 mitogen-activated protein kinase

PAI : plasminogen activator inhibitor

PARP1 : poly(ADP-ribose) polymerase 1

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

PDGF-AA : Platelet-Derived Growth Factor AA

PKC-1 : Phosphoinositide-kinase 1

PGC1 α : PPAR γ coactivator-1 α

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PI3KCD : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PIASy : Protein inhibitor of activated STAT

PIGF : Placental growth factor

PML : Promyelocytic leukemia

Prb : retinoblastoma protein

PRC : Protein Regulator Of Cytokinesis

PTEN : Phosphatase and TENSin homolog

Q

qRT-PCR : Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain reaction

R

RAGE : Receptor for AGEs

RHE : Reconstructed Human Epidermis

RHOA : Ras homolog family member A

RPA : Replicative Protein A

RPL3 : 60S ribosomal protein L3

RPS7 : 40S ribosomal protein S7

S

S6K : S6 kinase 1

SAASP : Skin aging-associated secreted proteins

SAHF : Foci d'hétérochromatine associés à la sénescence

SASP : Senescence-Associated Secretory Phenotype

SA- β gal : Senescence-Associated beta-galactosidase

SR : Scavenger receptors

SCF : Stem cell factor

SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1

SGP130 : soluble glycoprotein 130

SILAC : Stable Isotope Labelling by Amino acids
in Cell culture

SIPS : Stress-Induced Premature Senescence

SIRT : Sirtuine

SMS : Senescence messaging secretome

SP1 : Specificity protein 1

sSASP : SASP soluble

SSB : DNA Single Strand Break

STING : Stimulator of Interferon Genes

sTNFRI : soluble tumor necrosis factor receptor

SOD : superoxyde dismutases

T

TAK1 : TGF β -activated kinase 1

TEAD1 : TEA Domain Transcription Factor 1

t-BHP : tert-butyl hydroperoxyde

TET : Ten-Eleven-Translocation proteins

TGF : Transforming growth factor

THBS2 : Thrombospondin-2

TIF : Telomere Dysfunction Induced Foci

TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinases

TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

TRAF3IP2 : TRAF3 Interacting Protein 2

TRAIL-R : Tumor-necrosis-factor related
apoptosis inducing ligand receptor

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase
dUTP nick end labeling

U

uPAR : urokinase-type plasminogen activator
receptor.

UPS : Unconventional protein secretion

UV : Rayons ultraviolets

V

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1

AVANT-PROPOS

Le vieillissement correspond au déclin progressif des fonctions vitales et de l'homéostasie des organes d'un individu, entraînant une augmentation de la susceptibilité aux pathologies. Les risques d'apparition de maladies cardio-vasculaires ou dégénératives, du diabète ou encore de cancers sont considérablement favorisés avec l'âge, entraînant une augmentation du taux de mortalité. Cependant, le vieillissement reste un processus complexe encore mal connu, très variable d'un individu à l'autre et dépendant de plusieurs facteurs aussi bien génétiques qu'externes comme le mode de vie, la pollution, le tabac, l'alimentation....

Grâce notamment à la recherche et aux progrès médicaux, la longévité de la population mondiale est en constant accroissement. Aujourd'hui, en France métropolitaine, la durée de vie moyenne est de 82.9 ans et les personnes de 75 ans ou plus représentent 9.5% de la population contre 7.1% en 2000 (**Figure 1**) (Insee).

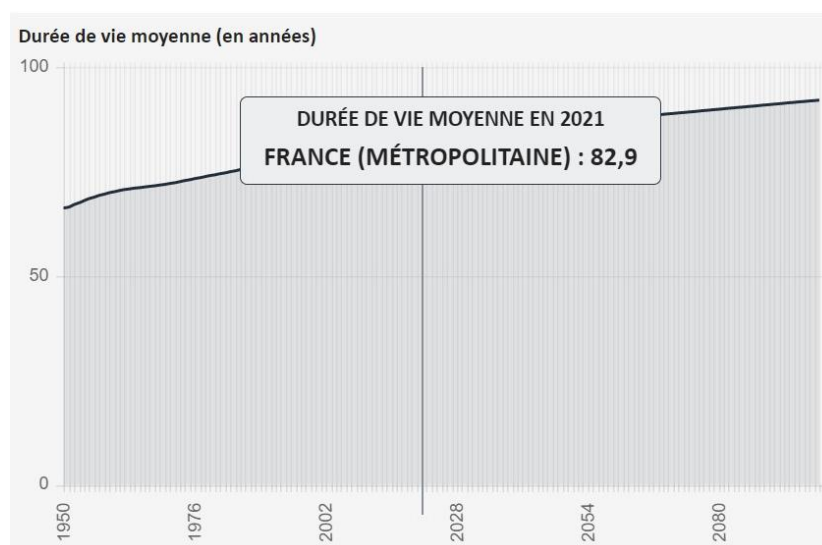


Figure 1. Durée de vie moyenne en France en 2021. Source : (Ined).

Cette augmentation de la longévité est corrélée avec une meilleure compréhension des pathologies liées au vieillissement et le développement de stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer la santé des individus. La peau en tant qu'organe externe constitue un indicateur visible du vieillissement ainsi que de certaines pathologies. La compréhension des mécanismes impliqués dans le vieillissement de la peau représente un enjeu majeur tant sur le point thérapeutique qu'esthétique.

Au cours de ces trois années de travaux de thèse, nous avons étudié l'effet du glyoxal, un composé dicarbonylé en partie issu de la glycation, sur la sénescence cellulaire de kératinocytes humains normaux et sur le phénotype sécrétoire associé.

- L'introduction de ce manuscrit de thèse s'articulera autour de quatre axes :

Le premier chapitre sera dédié à la description des principales caractéristiques du vieillissement telles que décrites par López-Otín (López-Otín et al., 2013).

La première partie du chapitre 2 sera donc consacrée au processus de sénescence cellulaire et aux mécanismes moléculaires associés. Son phénotype sécrétoire appelé SASP pour « Senescence-Associated Secretory Phenotype » occupera toute la deuxième partie du chapitre. Ainsi, nous présenterons les caractéristiques du SASP, sa régulation, ses différents rôles dans le vieillissement et le développement de pathologies. Nous terminerons cette partie en passant en revue les différents composés à activité sénotherapeutique développés au cours de ces dernières années et ayant pour cibles les cellules sénescents et/ou leurs effets délétères induits par le SASP. Les sénotherapies suscitant un intérêt particulier dans les stratégies anti-âge de l'industrie cosmétique, nous enchaînerons avec un troisième chapitre autour de la peau.

Ce troisième chapitre décrira la structure et les différentes fonctions de la peau ainsi que l'effet du vieillissement sur ce tissu. Nous porterons un intérêt particulier à la sénescence des kératinocytes, qui constituent le modèle d'étude principal de notre projet de recherche.

Le quatrième et dernier chapitre de cette introduction abordera la réaction de glycation et en particulier la formation des composés dicarbonylés, glyoxal et méthylglyoxal, et des produits avancés de glycation (AGEs) délétères qui en résultent. Enfin, nous présenterons l'implication des composés dicarbonylés et, par conséquent, des AGEs dans le vieillissement et l'apparition de certaines pathologies.

- Suite à cette introduction bibliographique, le contexte du projet ainsi que les but et objectifs de ces travaux de thèse seront présentés.

- L'ensemble des résultats obtenus lors ce projet seront synthétisés et exposés sous la forme d'un article scientifique. Les principaux résultats présentés dans l'article sont également repris dans un résumé en français.

- Ce manuscrit de thèse sera clos par une discussion générale des résultats obtenus lors de ces travaux suivie des perspectives envisagées pour la suite du projet.

INTRODUCTION

Chapitre I - Les caractéristiques du vieillissement

La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement constitue une nécessité majeure dans la quête de longévité. Etant donné la complexité et la variabilité du processus de vieillissement, neuf caractéristiques ont été déterminées par López-Otín et al. permettant une vision plus précise des différents facteurs clés impliqués dans le vieillissement chez les mammifères : l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, les altérations épigénétiques, la perte de la protéostasie, la dérégulation de la sensibilité aux nutriments, la dysfonction mitochondriale, l'épuisement des cellules souches, la sénescence cellulaire et l'altération de la communication intercellulaire (Figure 2) (López-Otín et al., 2013).



Figure 2. Les neuf caractéristiques (« Hallmarks ») du vieillissement. L'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, les altérations épigénétiques, la perte de la protéostasie, la dérégulation de la sensibilité aux nutriments, la dysfonction mitochondriale, l'épuisement des cellules souches, la sénescence cellulaire et l'altération de la communication intercellulaire. Ces caractéristiques ont été établies à partir de données obtenues chez plusieurs organismes modèles comme *C.elegans*, *D.melanogaster* ou encore *M.musculus*. D'après (López-Otín et al., 2013).

La détermination de ces caractéristiques se fonde sur plusieurs critères. D'abord, elles sont communes à tous les organismes modèles étudiés dans le cadre du vieillissement et de la longévité, dont l'Homme. Du fait de cette conservation des mécanismes de vieillissement entre plusieurs espèces de l'arbre phylogénétique, les chercheurs ont au départ utilisé des organismes modèles simples à étudier dans le but de pallier les obstacles expérimentaux rencontrés sur l'humain comme la longue durée de vie, l'hétérogénéité génétique, les influences environnementales ou encore les problématiques d'éthique. De ce fait, les premières études sur le vieillissement ont été réalisées sur des modèles toujours très communément utilisés comme le nématode *C.elegans*, la drosophile *D.melanogaster* ou encore des espèces de mammifères comme la souris *M.musculus*. Contrairement à l'humain, les avantages de ces modèles résident dans leurs durées de vie relativement courtes et la possibilité d'intervenir sur leurs génomes et environnements dans la caractérisation des processus impliqués dans la longévité, le vieillissement et les pathologies liées à l'âge (Mitchell et al., 2015).

Les neuf caractéristiques du vieillissement doivent idéalement s'observer lors du vieillissement normal des individus et provoquer un rallongement de l'espérance de vie lorsqu'elles sont expérimentalement reversées ou améliorées. A l'inverse, amplifier leurs effets devrait accélérer le processus de vieillissement de l'organisme modèle et provoquer une baisse de sa longévité.

Bien que pouvant être présentées indépendamment, ces caractéristiques sont interconnectées et coopèrent les unes avec les autres afin de réguler le vieillissement. Pour illustrer leurs interrelations, López-Otín et al. les ont divisées en trois groupes (**Figure 3**). Les caractéristiques primaires à savoir l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, les altérations épigénétiques et la perte de la protéostasie seraient à l'origine de dommages cellulaires en réponse desquels apparaîtraient les caractéristiques dites antagonistes que sont la dérégulation de la sensibilité aux nutriments, la dysfonction mitochondriale et la sénescence cellulaire. Lorsqu'elles sont de faible intensité, ces réponses antagonistes peuvent avoir un rôle bénéfique atténuant les dommages cellulaires mais deviennent délétères si elles sont présentes à des niveaux plus élevés. Les dommages supplémentaires causés par les réponses antagonistes du vieillissement favorisent la mise en place du dernier groupe, celui des caractéristiques intégratives : l'altération de la

communication intercellulaire et l'épuisement des cellules souches, responsables du phénotype de vieillissement comme l'altération de l'homéostasie des tissus et des organes.

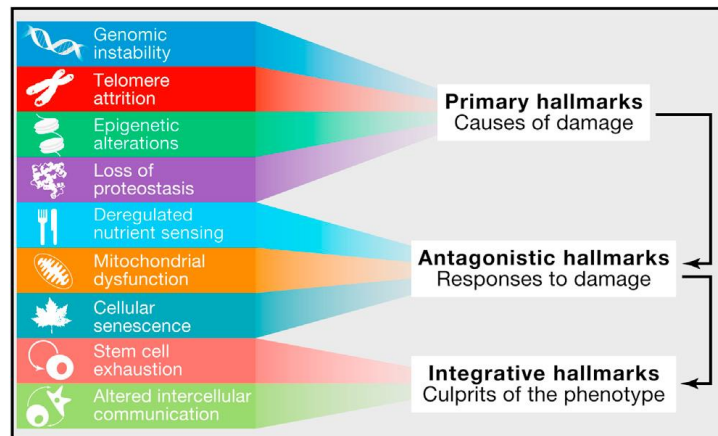


Figure 3. Interrelations fonctionnelles des caractéristiques du vieillissement. Les neuf caractéristiques du vieillissement peuvent être divisées en trois catégories : les caractéristiques primaires qui causent les dommages, les caractéristiques antagonistes impliquées dans la réponse aux dommages et les caractéristiques intégratives responsables du phénotype du vieillissement. D'après (López-Otín et al., 2013).

I. L'instabilité génomique

Avec l'âge, le génome d'un individu subit de plus en plus de dommages pouvant être aussi bien d'origine endogène, comme les erreurs lors de la réplication cellulaire ou bien l'action des espèces réactives de l'oxygène (ERO) que d'origine exogène (stress physiques ou chimiques, agents pathogènes...). Ces atteintes peuvent être impliquées dans l'accélération du processus de vieillissement ainsi que dans l'apparition de pathologies liées à l'âge. De nombreuses études, menées sur différents modèles incluant l'Homme, ont montré un lien entre les dommages à l'ADN et la sénescence cellulaire, l'apoptose, mais également les changements métaboliques et la perte de l'homéostasie (Niedernhofer et al., 2018). Les dommages à l'ADN peuvent être de différents types comme des cassures simples (SSB) ou double brin (DSB) ou encore des dommages oxydants. Cependant, il existe de nombreux mécanismes de réparation en réponse aux dommages à l'ADN. On peut citer notamment les réparations par excision de base (BER) ou de nucléotides (NER) ou encore par recombinaison homologue. Néanmoins, leur efficacité décline avec l'âge provoquant l'accumulation de lésions génomiques non réparées (Vijg and Suh, 2013). En plus de ces mécanismes de

réparation, il existe au niveau cellulaire des voies de réponse aux dommages à l'ADN (ou DDR pour DNA Damage Response) principalement régies par l'activation des voies ATM (ataxia telangiectasia mutated)-CHK2 (cell cycle the checkpoint kinase 2)-p53 ainsi que ATR (ataxia telangiectasia and rad3-related)-CHK1 (cell cycle checkpoint kinase 1)-CDKs (Cyclin-dependent kinases) (**Figure 4**) (Li et al., 2013a). ATM est une kinase recrutée au niveau des DSB par le complexe senseur MRN et qui active par phosphorylation des protéines comme CHK2, p53 et BRCA1 (Breast Cancer 1) impliquées dans des processus essentiels comme la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Marechal and Zou, 2013). ATR est plutôt recrutée par RPA (Replicative Protein A) en réponse aux SSB et à l'arrêt d'une fourche de réplication sous forme de complexe avec son partenaire ATRIP (ATR Interacting Protein). S'ensuit une cascade de signalisation résultant en la phosphorylation de CHK1 qui est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire par l'intermédiaire des CDKs.

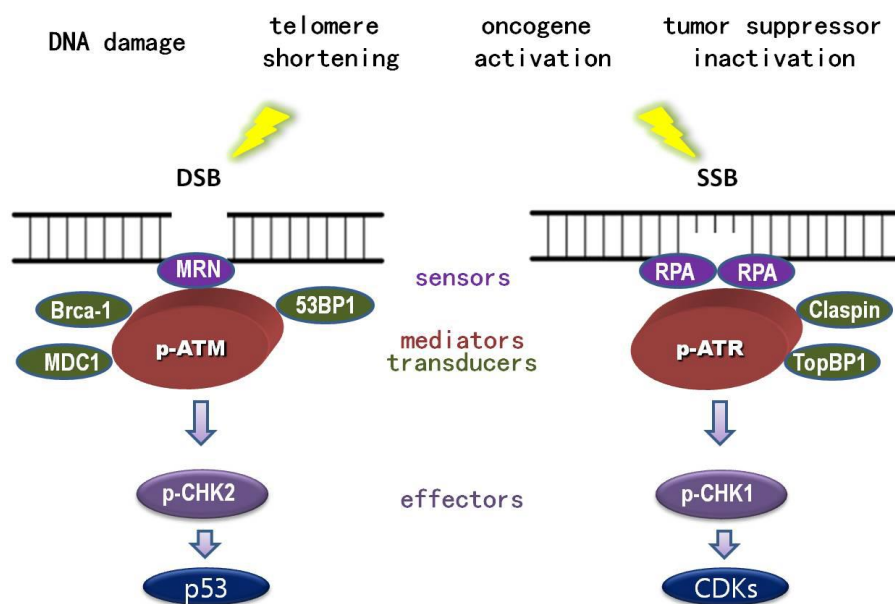


Figure 4. Les voies de réponses aux dommages à l'ADN (DDR). En fonction de leur nature, les dommages à l'ADN entraînent l'activation de ATM ou ATR impliquées dans plusieurs processus comme la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. D'après (Li et al., 2013a).

Suite à des dommages à l'ADN, ATM et ATR ont également la possibilité d'induire la phosphorylation de l'histone H2AX, appelée γ H2AX, et qui permettrait de décondenser la chromatine afin de favoriser le recrutement de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Podhorecka et al., 2010). L'accumulation de foyers de γ H2AX est donc considérée

comme un biomarqueur de l'activation persistante des DDR, et donc du vieillissement cellulaire.

II. Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques présentes à chaque extrémité des chromosomes afin de leur permettre de ne pas être reconnues comme des cassures d'ADN par les systèmes de réparation. Bien qu'essentiels à la préservation du génome, les télomères perdent une partie de leur structure à chaque division cellulaire, jusqu'à atteindre une taille critique entraînant les cellules en sénescence et/ou en apoptose. La diminution de la taille des télomères a été montrée comme étant impliquée dans la réduction de l'espérance de vie de plusieurs organismes ainsi que dans l'apparition de nombreuses pathologies liées à l'âge (Bekaert et al., 2005). La vitesse de raccourcissement des télomères peut dépendre de nombreux facteurs propres à chaque individu comme son patrimoine génétique, l'environnement épigénétique mais également ses mode et hygiène de vie (la cigarette, le manque d'activité sportive, le poids, la nutrition, les stress psychologiques, etc.) (Shammas, 2011). Ainsi, la longueur des télomères constitue un biomarqueur majeur du vieillissement, de l'espérance de vie mais également de la santé des individus.

III. Les altérations épigénétiques

Depuis plusieurs années, les études ont montré que des facteurs épigénétiques étaient impliqués dans la longévité des organismes. Il s'agit de processus affectant la chromatine et qui conduisent à l'altération de l'expression génique et par conséquent des fonctions cellulaires, favorisant ainsi le développement de maladies liées au vieillissement. Parmi ces mécanismes, on peut notamment citer la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones ainsi que le remodelage de la chromatine. La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout d'un groupement méthyl (-CH₃) sur les bases cytosines de dinucléotides cytosine-guanine dits « CpG », entraînant la condensation de la chromatine et la répression de la machinerie transcriptionnelle. Elle est médiée par l'action des ADN méthyltransférases comme DNMT1, DNMT3a et DNMT3b, tandis que la déméthylation est due à l'action des protéines TET (« Ten-Eleven-Translocation proteins ») (Sen et al., 2016).

L'état de méthylation de l'ADN est utilisé comme un outil d'estimation de l'âge biologique et représente ce qu'on appelle « l'horloge épigénétique » (Wagner, 2019). Par exemple, une étude réalisée sur des échantillons de sang périphérique provenant d'individus âgés de 14 à 94 ans a montré que 23% des changements de méthylation de l'ADN sont corrélés avec l'âge chronologique des sujets (Johansson et al., 2013).

Tout comme l'ADN, les histones peuvent également subir des modifications épigénétiques telles des méthylations et des acétylations, régulant ainsi l'expression des gènes et l'espérance de vie. Ainsi, on observe avec l'âge une diminution de la quantité et de l'activité de protéines comme HP1 (Heterochromatin protein 1), induisant une perte d'hétérochromatine liée directement ou indirectement au vieillissement et à la sénescence cellulaire (Pal and Tyler, 2016).

IV. La perte de la protéostasie

A l'état physiologique, la protéostasie des protéines représente un équilibre entre leur production et leur dégradation qui est très finement régulé par des mécanismes impliquant plusieurs acteurs tels que le protéasome, les ribosomes, les protéines chaperonnes, les ubiquitines ligases ou encore l'autophagie (Labbadia and Morimoto, 2015). Des dysfonctionnements au niveau de ces mécanismes de régulation ou une accumulation d'erreurs lors du processus de traduction peuvent survenir avec l'âge ou lors de certaines pathologies liées au vieillissement. Cela entraîne une perte de la protéostasie souvent accompagnée de la formation d'agrégats protéiques toxiques (Höhn et al., 2016). De plus, des facteurs exogènes ou endogènes comme le stress oxydant ou les chocs thermiques peuvent entraîner un mauvais repliement des protéines qui, si elles ne sont pas éliminées, formeront des agrégats contribuant à la progression de pathologies telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Powers et al., 2009).

V. La dérégulation de la sensibilité aux nutriments

Les voies de détection de nutriments, dont la plus étudiée est la voie Insuline/IGF-1 (IIS) en réponse à l'ingestion de glucose, participent à l'homéostasie cellulaire et sont impliquées dans les processus de longévité (López-Otín et al., 2013). La mutation de *daf-2*, le

gène codant pour le récepteur de IGF-1 chez *C.elegans*, a permis de doubler l'espérance de vie de ce modèle (Kenyon et al., 1993). Une baisse constitutive de l'axe GH/IGF-1 tendrait également à améliorer la longévité de plusieurs modèles de souris progéroïdes et de souris sauvages soumises à une restriction calorique qui consiste à réduire la consommation énergétique sans atteindre un stade de malnutrition (Schumacher et al., 2008).

L'induction de la voie IIS entraîne une cascade de signalisation débutant par l'activation de la kinase PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) qui permet le recrutement de la sérine/thréonine kinase AKT au niveau de la membrane plasmique où elle est activée par phosphorylation par la PDK-1 (phosphoinositide-kinase 1). En plus de sa capacité à activer mTOR (mammalian target of Rapamycin), impliquée entre autres dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, AKT pourra à son tour phosphoryler les facteurs de transcription FOXO afin d'induire leur séquestration dans le cytoplasme par l'intermédiaire de la protéine chaperonne 14-3-3 (**Figure 5**) (Dobson et al., 2011). Or, FOXO activé et transloqué dans le noyau a été montré comme induisant la transcription de gènes impliqués dans des mécanismes de réponse aux stress comme la détoxification des ERO, la DDR, l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. De ce fait, l'activation de la voie IIS nuirait aux effets bénéfiques de FOXO sur la longévité (Greer and Brunet, 2005).

D'autres voies de détection des nutriments impliquées dans la longévité font intervenir les sirtuines (SIRT) ainsi que les enzymes AMPK (AMP-activated protein kinase) et la sérine/thréonine kinase mTOR. Par exemple, l'inhibition de mTOR, par la restriction calorique ou après des traitements à la rapamycine, est connue pour allonger la durée de vie de plusieurs organismes (Harrison et al., 2009). Au contraire, les activations de l'AMPK et des SIRT auraient un effet bénéfique sur la longévité. Les SIRT font partie de la famille des déacétylases dépendantes de NAD⁺, et plus particulièrement des HDAC (histones désacétylases) de classe III. Chez les mammifères, il existe 7 SIRT ayant des activités enzymatiques et des compartimentations cellulaires différentes. La restriction calorique induit une accumulation de NAD⁺ qui serait capable d'activer des SIRT mitochondriales (SIRT3, 4 et 5) mais également la SIRT1 afin d'augmenter la masse et l'activité de la mitochondrie (**Figure 5**) (Guarente, 2008). La stimulation de la biogenèse mitochondriale serait en partie due à l'activation de PGC1 α par SIRT1 mais également par l'AMPK (Herzig and Shaw, 2018).

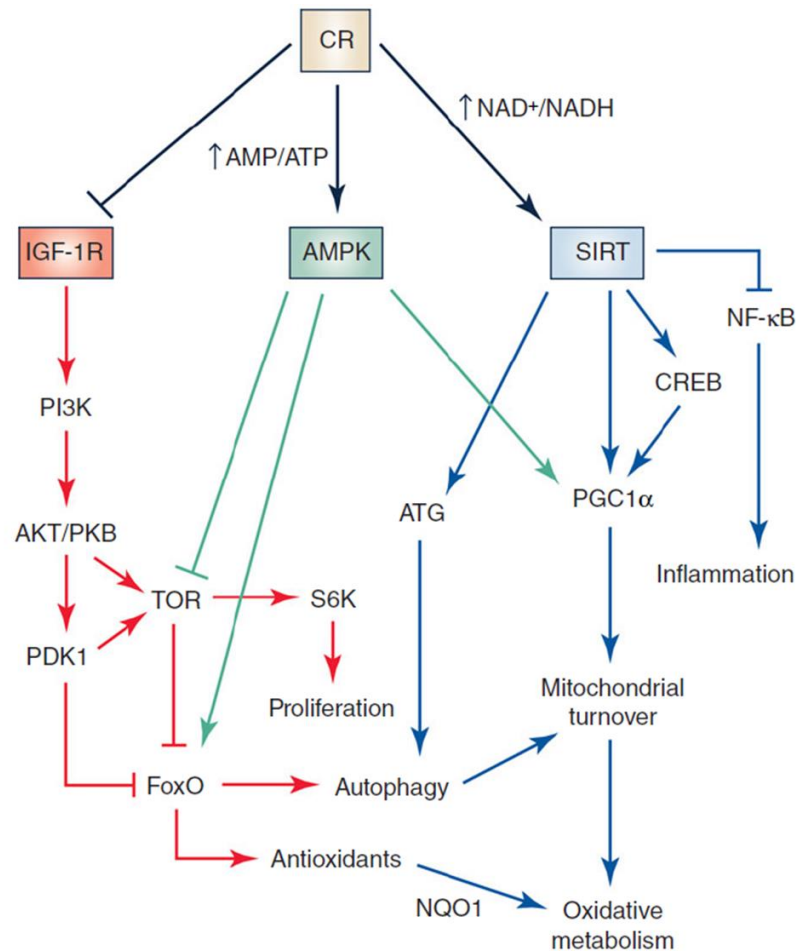


Figure 5. Les voies impliquées dans la sensibilité aux nutriments. L'activation des voies AMPK et SIRT et l'inhibition de la voie IIS médiée par IGF-1R, notamment par la restriction calorique (CR), ont un effet positif sur la longévité des organismes. La S6K induite par TOR correspond à la kinase ribosomale 6 impliquée dans l'induction de la prolifération cellulaire. CREB (cAMP response element-binding protein) est un facteur de transcription impliqué dans l'expression de PGC1α. ATG (autophagy related protein) est une protéine dont l'activation induit l'autophagie. En tant qu'enzyme détoxifiante, NQO1 (NADPH:quinone oxidoreductase 1) est impliquée dans la protection contre le stress oxydant. Le rôle des autres acteurs de ces voies de signalisation sont décrits dans le texte. D'après (López-Lluch and Navas, 2016).

Du fait de leurs implications dans les processus de vieillissement et de longévité, SIRT1 et SIRT6 ont suscité un intérêt particulier au sein de la communauté scientifique. En effet, la modulation des niveaux de SIRT1 et SIRT6 a mis en évidence leur rôle dans la protection des cellules contre l'entrée en sénescence. Dans le même sens, une surexpression des SIRT aurait un effet protecteur face à la sénescence cellulaire, en prévenant l'érosion télomérique et en favorisant la réparation des dommages à l'ADN (Lee et al., 2019). Certaines sirtuines agissent également négativement sur des acteurs clés du processus de sénescence en désacétylant la

protéine p53, la sous-unité RelA de $\text{Nf-}\kappa\text{B}$, un modulateur du SASP (« Senescence-Associated Secretory Phenotype ») et de l'inflammation, ainsi que les facteurs FOXO3 et FOXO4, responsables de la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Giannakou and Partridge, 2004; Kawahara et al., 2009).

L'AMPK est un autre senseur majeur impliqué dans l'homéostasie énergétique. Il est activé par une augmentation du ratio AMP/ATP, menant à une induction de l'autophagie. Il agirait sur la longévité en régulant négativement le complexe mTORC1 ce qui augmente l'autophagie dépendante de FOXO (**Figure 5**) (Alers et al., 2012). Sur un modèle de souris jeunes, l'activation de l'AMPK par administration de metformine permet d'augmenter la durée de vie et de retarder l'apparition de tumeurs (Anisimov et al., 2011). Cet effet bénéfique sur la longévité avait été préalablement montré sur d'autres modèles comme *C.elegans* et *D.melanogaster* (Apfeld et al., 2004; Funakoshi et al., 2011).

VI. La dysfonction mitochondriale

Bien que faisant partie des neuf principales caractéristiques du vieillissement décrites par López-Otín et al., l'implication des dysfonctionnements mitochondriaux dans la longévité et la santé des organismes reste probablement l'hypothèse la plus controversée et débattue à ce jour.

Avec l'âge, des dysfonctionnements mitochondriaux s'accumulent au sein de la cellule et provoquent l'apparition d'ERO au niveau de la chaîne de transport des électrons qui vont à leur tour induire des dommages au niveau de la mitochondrie. Il s'agit de la « théorie des radicaux libres » initialement proposée par Denham Harman en 1956 (Gladyshev, 2014). Ces ERO participeraient à l'altération par oxydation des protéines, des membranes, des lipides, des glucides mais également à l'apparition de lésions irréversibles sur l'ADN mitochondrial (Avery, 2011). Dans des conditions physiologiques normales, ces ERO dont le rôle peut être délétère ou bien bénéfique, sont rapidement éliminées par des enzymes de détoxification comme les superoxyde dismutases (SOD), les catalases, les glutathion peroxydases (Gpx) ainsi que les peroxyrédoxines (Gruber et al., 2013). Cependant, les activités de ces dernières sont

fortement diminuées avec l'âge, entraînant une accumulation d'ERO et de molécules oxydées souvent corrélée avec l'apparition de diverses pathologies liées à l'âge.

Néanmoins, depuis plusieurs années, la théorie radicalaire est très débattue et confrontée au principe d'hormèse qui décrit que l'exposition à un stress de faible dose permettrait de développer une résistance face à des doses plus élevées de ce stress. De ce fait, ce phénomène pourrait expliquer les effets bénéfiques des ERO observés sur la survie cellulaire et qui contredisent, du moins en partie, la théorie de Harman (Liu et al., 2014; Payne and Chinnery, 2015). En effet, des manipulations génétiques sur des souris permettant d'abolir l'expression d'enzymes détoxifiantes comme la Gpx1 et la MnSOD (manganese superoxyde dismutase) et donc d'induire une augmentation des dommages oxydants n'a pas eu d'impact négatif sur la durée de vie des individus (Zhang et al., 2009). De plus, chez la levure et *C.elegans*, une augmentation des ERO a même permis d'allonger l'espérance de vie (Doonan et al., 2008; Mesquita et al., 2010; Van Raamsdonk and Hekimi, 2009).

Des études permettent également de penser que les dysfonctionnements mitochondriaux peuvent contribuer au processus de vieillissement de façon indépendante des ERO (Edgar et al., 2009; Hiona et al., 2010). Par exemple, des souris accumulant des mutations au niveau de l'ADN mitochondrial suite à l'inactivation de la polymérase γ mitochondriale subissent un vieillissement prématuré sans induction significative d'ERO (Trifunovic et al., 2004).

VII. L'épuisement des cellules souches

L'épuisement des cellules souches a pour conséquence le déclin de leurs capacités régénératrices, ce qui induit des défauts de renouvellement et réparation tissulaires. Dans ce contexte, l'altération fonctionnelle des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) avec l'âge serait responsable de défaillances au niveau du système immunitaire en diminuant la production de cellules de la réponse immunitaire adaptative. Ce processus, qui constitue un des aspects de l'immuno-senescence, favoriserait l'anémie et l'apparition de tumeurs malignes myéloïdes chez les organismes âgés (Ren et al., 2017). Chez la souris âgée, les HSCs subissent une diminution de la prolifération due à une augmentation de l'expression du marqueur d'arrêt cycle cellulaire p16^{INK4A}, ainsi qu'une accumulation de dommages à l'ADN

(Rossi et al., 2007). L'épuisement des cellules souches serait donc favorisé par les dommages à l'ADN, la sénescence cellulaire mais également l'inflammation (Doles et al., 2012).

Aussi, la preuve *in vivo* de l'effet du déclin des cellules souches sur le phénotype associé au vieillissement a été apportée par des expériences de rajeunissement des cellules souches permettant d'inverser ce phénotype (Rando and Chang, 2012). Parmi ces expériences, on peut citer la technique de parabiose hétérochronique qui consiste à fusionner de façon chirurgicale deux individus d'âges différents, jeune et âgé, afin de permettre des échanges sanguins au sein d'un même système circulatoire. Ainsi, l'exposition de cellules souches musculaires adultes provenant d'une souris âgée à un environnement jeune a permis de restaurer leur capacité de prolifération et de régénération (Conboy et al., 2005).

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous intéresserons principalement et de façon détaillée à deux caractéristiques du vieillissement, à la sénescence cellulaire ainsi que l'altération de la communication intercellulaire dans un contexte de phénotype sécrétoire lié à la sénescence.

Chapitre II : La sénescence cellulaire et le phénotype sécrétoire associé (SASP)

I. Description du processus de sénescence

La sénescence cellulaire est un processus mis en place en réponse à différents types de stress et est principalement caractérisée par un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire. Elle peut avoir pour origine un stress réplicatif, oncogénique, oxydant, mitochondrial ou encore des dommages à l'ADN. Le phénotype sénescent est caractérisé par l'apparition de biomarqueurs comme la surexpression d'inhibiteurs d'arrêt du cycle cellulaire, l'augmentation de l'activité lysosomale ainsi que l'installation d'un phénotype sécrétoire dit SASP pour « Senescence-Associated Secretory Phenotype » (Voir chapitre II - partie II).

1. Limite de Hayflick, sénescence répllicative et télomères

La sénescence cellulaire a été initialement décrite par Leonard Hayflick et Paul Moorhead en 1961, sur des cellules primaires provenant de différents tissus. Ils ont remarqué qu'après un certain nombre de divisions cellulaires représentant la « limite de Hayflick », les fibroblastes en culture subissent un arrêt irréversible de la prolifération (Hayflick and Moorhead, 1961). Il s'agit là d'un mécanisme de « sénescence répllicative ». Commun à toutes les cellules somatiques, il n'affecte pas les cellules tumorales et certaines cellules souches et s'explique par le raccourcissement des télomères provoqué à chaque division (Voir chapitre I - partie II) (Campisi, 1997). Cette hypothèse a notamment été appuyée par le fait qu'une réintroduction de la télomérase, une enzyme impliquée dans le maintien de la longueur des télomères par l'ajout de séquences nucléotidiques répétitives, a permis de prévenir l'établissement du phénotype sénescence de fibroblastes et de cellules épithéliales humains (Bodnar, 1998). Les études se sont ensuite enchaînées afin de montrer que ce processus était commun à plusieurs types cellulaires et organismes et qu'il était lié au vieillissement chronologique (Childs et al., 2015).

Nous avons souvent tendance à distinguer la sénescence répllicative de la sénescence pouvant être induite prématurément par des stress (dite « SIPS » pour « Stress-Induced Premature Senescence »). Cependant, le raccourcissement des télomères peut également être accéléré par le stress oxydant résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial (Zglinicki et al., 2003). Une étude récente permet de penser que l'arrêt du cycle cellulaire lors de la sénescence répllicative n'est pas une réponse immédiate aux dysfonctionnements télomériques. En effet, cette équipe montre que certaines cellules continuent de se diviser lentement, en augmentant considérablement la durée du cycle, malgré la présence de dommages à l'ADN liés au raccourcissement des télomères (Nassrally et al., 2019).

2. La sénescence induite prématurément par un stress

Au-delà d'une sénescence dépendante des télomères, il existe une multitude de stress différents pouvant forcer les cellules à entrer dans un état de sénescence dit prématuré, tandis qu'elles se trouvent à un passage encore précoce comparé à leur limite de Hayflick (**Figure 6**). L'induction de cette SIPS dépend du type cellulaire mais également de la nature,

l'intensité et la durée du stress. Face à un stress de faible intensité, les cellules pourront réparer les dommages provoqués et continuer leur prolifération, tandis qu'un stress intense provoquera leur entrée en apoptose, voire en nécrose. De ce fait, et particulièrement *in vitro*, ce sont les stress subcytotoxiques d'une intensité modérée mais généralement à des doses répétées qui sont privilégiés lors de l'induction d'une sénescence prématurée (Toussaint et al., 2002).

De façon générale, les cellules sénescents sont souvent caractérisées par l'activation de la voie des DDR détaillée précédemment (Voir chapitre I - partie I) et pouvant être provoquée de façon prématurée par un état de stress oxydant ou un dysfonctionnement mitochondrial.

2.1 La sénescence induite par un stress oxydant et/ou des dommages l'ADN

In vitro, l'induction d'une sénescence par stress oxydant est souvent réalisée avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou du tert-butyl hydroperoxyde (t-BHP), mais également grâce à d'autres agents comme les cytokines, l'hyperoxie ou le cuivre.

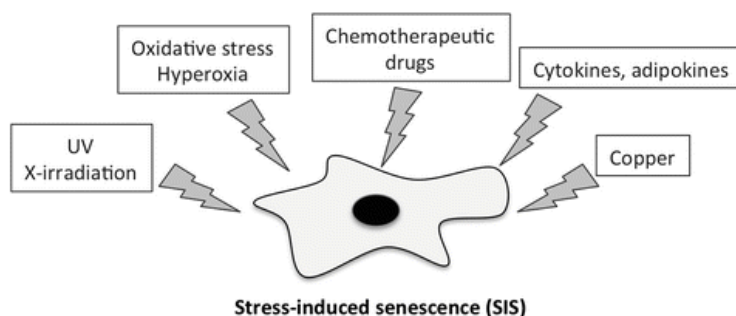


Figure 6. Exemples de stress classiques inducteurs de sénescence cellulaire (SIS pour « stress-induced senescence »). Les stress physiques (UV, les rayons X), oxydants, l'hyperoxie, les drogues chimio-thérapeutiques, les cytokines, adipokines ou encore le cuivre peuvent induire la sénescence. D'après (Debacq-Chainiaux et al., 2016).

Dans des conditions de culture en hyperoxie à 20% d'oxygène, des fibroblastes embryonnaires de souris accumulent plus de dommages à l'ADN induits par des ERO, comparés aux cellules cultivées en conditions physiologiques à 3% d'oxygène. Cette sensibilité

à l'oxygène provoque un ralentissement de la prolifération ainsi que l'entrée en sénescence prématurée des fibroblastes (Parrinello et al., 2003).

Les UVA (320-400nm) et les UVB (290-320nm) ont été largement étudiés dans la peau où ils peuvent induire une production d'ERO et causer des dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Les UVB ont été montrés comme inducteurs de SIPS sur des modèles de fibroblastes, le type cellulaire le plus étudié et caractérisé en sénescence, mais également dans des kératinocytes humains (Debacq-Chainiaux et al., 2012). Ces derniers sont encore peu étudiés dans le cadre de la sénescence prématurée et semblent se distinguer des autres types cellulaires lors de la sénescence répllicative qu'ils atteignent au bout d'un faible nombre de divisions cellulaires (Voir chapitre III - partie III).

La voie de réponse aux dommages à l'ADN responsable d'une sénescence prématurée peut être activée par des irradiations ou des molécules anti-cancéreuses comme la bléomycine ou la doxorubicine (Debacq-Chainiaux et al., 2016). Cette voie est également activée lors de la sénescence répllicative (d'Adda di Fagagna, 2008). Comme expliqué précédemment, la DDR se traduit par le recrutement de kinases comme ATM, ATR mais aussi DNA-PKcs (voir chapitre I- partie I). Une DDR persistante peut être caractérisée par des foci formés suite à un dysfonctionnement télomérique (TIF) et par des segments d'ADN présentant des altérations de la chromatine (DNA-SCAR) (Salama et al., 2014).

2.2 La sénescence induite suite à des dysfonctionnements mitochondriaux

En 2016, Wiley et al. ont réalisé une étude majeure dans la mise en évidence et la compréhension de la sénescence associée à des dysfonctionnements mitochondriaux. Une altération mitochondriale a été provoquée de différentes façons sur des fibroblastes *in vitro*, en déplaçant l'ADN mitochondrial ou la SIRT3 mitochondriale, ou encore via l'inhibition de la chaîne de transport des électrons.

Du fait du phénotype particulier lié à ce type de sénescence, ils lui ont donné le nom de « MiDAS » pour « mitochondrial dysfunction-associated senescence » (Wiley et al., 2016). En effet, ils ont remarqué que les cellules sénescents avaient un phénotype sécrétoire distinct du SASP classique régulé par des voies dépendantes d'IL-1/Nf-κB, puisque ne possédant pas la majorité des cytokines qui caractérisent habituellement le SASP (Voir

chapitre II - partie II) (**Figure 7**). Cela peut s'expliquer par le fait que ce type de sénescence ne provoque pas d'augmentation du niveau d'ERO cytoplasmiques ni d'activation des DDR. Cependant, le MiDAS entraîne une diminution du ratio de $NAD^+/NADH$, provoquant l'activation de la kinase AMPK et de p53. P53 activée provoque l'altération de l'activité du facteur de transcription $Nf-\kappa B$ et, par conséquent, l'inhibition de l'expression de plusieurs facteurs du SASP.

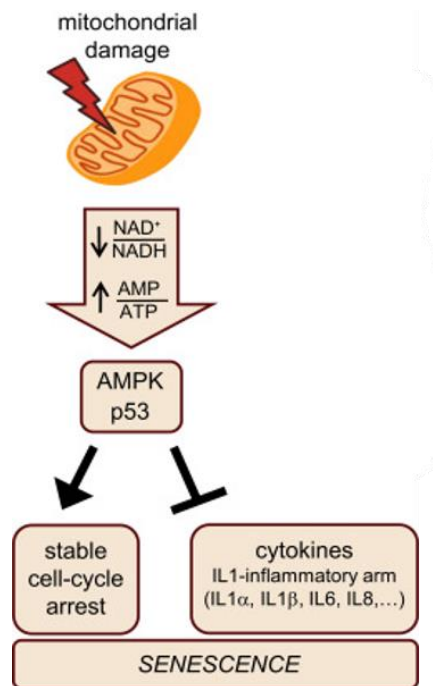


Figure 7. Induction de la sénescence cellulaire suite à des dommages mitochondriaux. Dans le modèle d'induction de sénescence par dysfonctionnements mitochondriaux de Wiley et al (Wiley et al., 2016), une diminution du ratio $NAD^+/NADPH$ concomitante à une augmentation de AMP/ATP entraîne une activation de la kinase AMPK et de p53. P53, en entrant en compétition avec le facteur de transcription $Nf-\kappa B$, va inhiber la production de cytokines dépendant de la voie $IL-1/Nf-\kappa B$. D'autre part, p53 induit un arrêt du cycle cellulaire et le phénotype sénéscent. Adapté de (Fernandez-Marcos and Serrano, 2016).

Avant cette étude, il avait été montré que les dysfonctionnements mitochondriaux impliqués dans l'induction de la sénescence étaient accompagnés d'une augmentation du niveau d'ERO (Moiseeva et al., 2009). Cette même étude a également constaté que des manipulations génétiques et chimiques affectant la chaîne de transport des électrons renforcent la sénescence de cellules ayant subi un stress oncogénique, montrant donc un lien

entre les dysfonctionnements mitochondriaux et l'OIS (pour « Oncogene-induced senescence »).

2.3 La sénescence induite par des oncogènes

Un autre modèle de sénescence prématurée bien caractérisé est celui induit par une activation ou une surexpression d'oncogènes (OIS), comme Ras, B-Raf ou encore la sérine/thréonine kinase BRAF. Cette OIS peut également être le résultat de l'inactivation de suppresseurs de tumeurs comme PTEN (Mooi and Peeper, 2006). Ce processus semble indépendant de l'altération des télomères mais est caractérisé par un stress réplicatif accompagné d'une réponse soutenue aux dommages à l'ADN et d'une augmentation de l'expression des voies de signalisation impliquant des inhibiteurs du cycle cellulaire comme les axes p53/p21^{CIP1} et p16^{INK4A}/pRb (Bartkova et al., 2006; Jones et al., 2000).

In vitro, il existe donc plusieurs modèles de sénescence induite par différents stress que nous évoquerons tout au long de ce manuscrit et qui sont résumés dans le tableau suivant (Figure 8) :

Senescence model	Abbreviation	Method of induction
Replicative senescence (RS)	RS	Short telomeres, linked to excess rounds of cell division
Stress-induced premature senescence (SIPS)	SIPS	H ₂ O ₂ , t-BH, cytokines, oxidizing agents, hyperoxia, copper, UV irradiation
DNA damage response- (DDR-) induced senescence	DDR	Bleomycin or doxorubicin, gamma irradiation
Oncogene-induced senescence (OIS)	OIS	Activation and/or overexpression of oncogenes
Mitochondrial dysfunction-associated senescence (MiDAS)	MiDAS	Inhibiting mitochondrial SIRT3

Figure 8. Modèles classiques d'induction de sénescence cellulaire in vitro. Ce tableau résume les modèles d'induction de sénescence *in vitro* décrits dans ce manuscrit. Adapté de (Sreekumar et al., 2020).

3. Les biomarqueurs de la sénescence

Bien que l'arrêt irréversible de la prolifération cellulaire soit une caractéristique primordiale du phénotype sénescence, il n'existe pas de marqueur unique, universel et exclusif permettant d'identifier une cellule sénescence. En effet, la complexité et l'hétérogénéité de

la sénescence cellulaire ne cessent de remettre en question la caractérisation de biomarqueurs, qui dépendent eux-mêmes de plusieurs facteurs comme le type cellulaire ou l'origine du stress inducteur de sénescence. De plus, la plupart des biomarqueurs communément utilisés sont exprimés à un niveau basal au sein de différents types cellulaires. La présence ou l'absence d'un marqueur n'est donc pas toujours informative, d'où la nécessité de bien estimer le seuil à partir duquel le marqueur devient pertinent. Afin de caractériser la sénescence aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, il convient donc de mettre en évidence une combinaison de plusieurs marqueurs connus parmi ceux décrits dans les sous-parties suivantes (**Figure 9**).

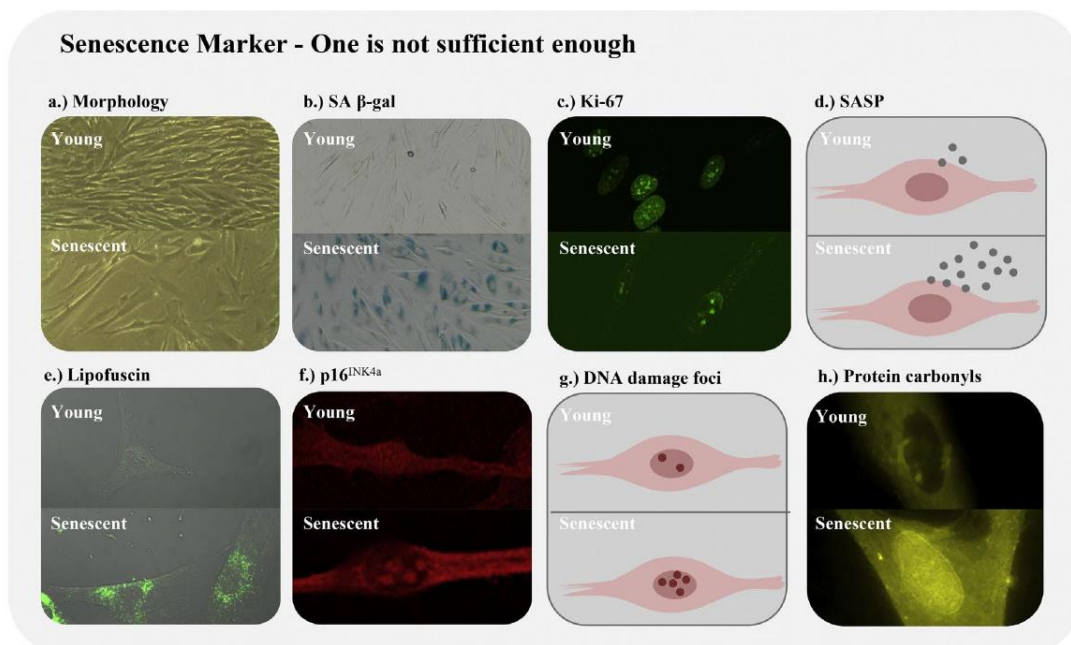


Figure 9. Biomarqueurs communs de la sénescence cellulaire. (a) *Changement morphologique généralement caractérisé par un aplatissement, allongement et/ou élargissement de la cellule sénescence comparée à la cellule proliférative.* (b) *Une augmentation de l'activité Senescence-Associated β -galactosidase au sein des cellules sénescences se traduisant par une coloration bleue en présence de X-gal.* (c) *Un arrêt du cycle cellulaire des cellules sénescences pouvant être évalué grâce à des marqueurs de la prolifération comme le Ki-67.* (d) *La mise en place d'un phénotype sécrétoire composé de divers facteurs associés à la sénescence (SASP).* (e) *L'accumulation d'agrégats protéiques comme la lipofuscine suite à une perte de la protéostasie au cours de la sénescence.* (f) *Une augmentation de l'inhibiteur du cycle cellulaire $p16^{INK4a}$ associée à l'arrêt de prolifération.* (g) *Des foci représentant des dommages à l'ADN sont retrouvés en plus grand nombre dans les cellules sénescences.* (h) *Les cellules sénescences suite à un stress chronique peuvent présenter une accumulation de protéines carbonylées.* D'après (Ott et al., 2018).

3.1 Le changement morphologique

Le marqueur le plus facilement observable est le changement morphologique que subissent les cellules sénescents en devenant aplaties ou allongées, et jusqu'à deux fois plus élargies que les cellules non-sénescents. Ce phénomène s'accompagne généralement d'une augmentation de la taille des noyaux et nucléoles, ainsi que de fragmentations nucléaires, mitochondriales et du réticulum endoplasmique (Goligorsky et al., 2009). Il est important de noter que ces changements dépendent du type cellulaire ainsi que du stress inducteur de la sénescence (Kuilman et al., 2010). Les mécanismes moléculaires responsables de ces altérations morphologiques sont encore mal connus. L'augmentation de la taille des cellules sénescents est en partie médiée par un réarrangement du cytosquelette, qui semble impliquer entre autres la signalisation mTOR. En effet, l'inhibition de mTORC1 et mTORC2 dans des fibroblastes humains par traitement au AZD8085 a permis d'inverser le phénotype de sénescence en provoquant entre autres une diminution de la taille et de la granulosité cellulaire, ainsi qu'une perte de l'activité beta-galactosidase associée à la sénescence (SA- β gal). Après traitement, les fibroblastes en sénescence précoce ont perdu leur aspect élargi, aplati et amorphe, pour retrouver une morphologie allongée caractéristique des fibroblastes prolifératifs à passages précoces (Walters et al., 2016). La protéine membranaire cavéoline-1 joue également un rôle important dans ces changements morphologiques en activant des molécules d'adhésion focale comme les FAK (« Focal Adhesion Kinase ») et les intégrines β 1, et en favorisant la formation de fibres de stress d'actine (Cho et al., 2004). Par ailleurs, une implication de la cavéoline-1 a été décelée dans le vieillissement chronologique de la peau, mais également dans le photo-vieillissement aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Kruglikov et al., 2019).

3.2 L'activité beta-galactosidase associée à la sénescence

Depuis son identification en 1995, l'activité SA- β gal est probablement le biomarqueur de sénescence le plus fréquemment utilisé (Dimri et al., 1995). Les cellules sénescents subissent une augmentation de la masse lysosomale corrélée à une augmentation de l'expression du gène *GLB1*, codant l'enzyme β gal lysosomale dont l'activité peut être dosée à un pH moins acide que celui auquel l'enzyme fonctionne habituellement (Lee et al., 2006). A pH 6, l'hydrolyse du substrat chromogène X-Gal peut être suivie par des méthodes de

détection cytochimiques, histochimiques ou même par fluorescence *in vitro* et *in vivo* (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Cependant, du fait d'un manque de spécificité, ce marqueur seul n'est pas suffisant afin de valider un phénotype sénescence. En effet, la confluence ou l'état de quiescence des cellules peuvent biaiser le marquage en induisant la détection de « faux-positifs » (Yang and Hu, 2005). Comme pour les autres biomarqueurs, le marquage SA- β gal est donc à considérer en combinaison avec d'autres marqueurs connus de sénescence. Ces contraintes techniques ont amené l'émergence d'un autre biomarqueur lysosomal, la lipofuscine.

3.3 La lipofuscine

Les agrégats protéiques sont le signe d'un état de sénescence cellulaire. C'est le cas de la lipofuscine intracellulaire qui est un agrégat constitué de produits issus de la dégradation de lipides et protéines oxydés ainsi que de cations métalliques. La lipofuscine s'accumule dans les organismes âgés. L'augmentation du niveau de lipofuscine dans des fibroblastes en sénescence répliquative ou en SIPS induite par des traitements au paraquat ou à l' H_2O_2 , constitue un bon modèle d'étude de la formation de ces agrégats (Ott et al., 2018). La lipofuscine a également montré une action inhibitrice de l'activité du protéasome et inductrice de la formation d'ERO par l'intermédiaire des ions métalliques présents dans les agrégats et pouvant médier la réaction de Fenton (Höhn et al., 2010). L'autofluorescence de la lipofuscine a longtemps été utilisée afin de détecter ces agrégats par microscopie, mais le manque de spécificité de cette autofluorescence a mené au développement d'autres méthodes de détection comme le marquage histochimique au GL-13, un composé biotinylé dérivé du « Sudan Black B » (Evangelou et al., 2017). De plus, une technique permettant la détection de lipofuscine dans des échantillons liquides provenant de cellules stressées ou endommagées a récemment été mise au point (Rizou et al., 2019).

3.4 Les foci d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF)

Les SAHF ont été initialement décrits en 2003 par Narita *et al.* comme étant présents au sein de la chromatine de fibroblastes dont la sénescence a été induite par un stress oncogénique, mais également par des dommages à l'ADN ou par réplication (Narita et al., 2003). Ces foci sont enrichis en protéines telles que HP1 (heterochromatin protein 1),

H3K9Me2/3 (di-/tri-methylated lysine 9 of histone H3), et macroH2A (histone H2A variant) (Zhang et al., 2007). Les SAHF représentent un remodelage de la chromatine dont l'activation est spécifiquement induite par la voie p16^{INK4A}/pRb, afin d'entraîner la séquestration du facteur d'élongation E2F responsable de l'activation du cycle cellulaire, induisant ainsi un arrêt de la prolifération cellulaire lié à la sénescence. Cependant, ce modèle reste débattu étant donné qu'il a été montré qu'une induction de sénescence accompagnée d'une formation de SAHF suite à la baisse de l'activité histone acétyltransférase p300 est indépendante des voies p16^{INK4A}/pRb et p53/p21^{CIP1}, mais également des DDR (Prieur et al., 2011). Nous savons désormais également que la formation des SAHF peut être modulée par d'autres acteurs comme les organelles sub-nucléaires PML (*promyelocytic leukemia*), les PIASy (*protein inhibitor of activated STAT*), ou encore certains membres de la famille des HMG (*high mobility group*) et des chaperonnes d'histones HIRA et ASF1A (Chandra, 2016). Par exemple, la translocation de HIRA vers les corps nucléaires PML, qui se déroule lors des étapes précoces de la mise en place de la sénescence, est essentielle à la formation des SAHF (Ye et al., 2007). Étant donné leur rôle important dans l'arrêt du cycle cellulaire et le renforcement du phénotype sénescence, les SAHF représentent un marqueur de sénescence couramment utilisé. Cependant, il est important de noter que leur formation durant la sénescence n'a pas toujours lieu et qu'elle dépendrait du type cellulaire étudié (Kennedy et al., 2010).

3.5 Les autres biomarqueurs de la sénescence cellulaire

Parmi les biomarqueurs classiques de la sénescence, on peut notamment citer l'augmentation de l'activité autophagique, la résistance à l'apoptose, l'accumulation de protéines carbonylées, mais également l'installation d'un phénotype sécrétoire du SASP (Voir chapitre II - partie II) et l'activation de voies de signalisation responsables de l'arrêt du cycle cellulaire auxquelles le prochain chapitre sera consacré.

4. Les voies de signalisation impliquées dans l'induction et le maintien de la sénescence cellulaire

4.1 L'activation de la voie p53/p21^{CIP1}

4.1.1 Le rôle central de p53 : entre cycle cellulaire et apoptose

Que l'on parle de sénescence réplivative ou de SIPS, les voies de signalisation mises en jeu dans l'arrêt du cycle cellulaire sont souvent communes et déclenchées par une réponse aux dommages à l'ADN. En effet, l'altération de l'ADN provoque l'activation de ATM et ATR, deux kinases responsables de la phosphorylation activatrice de la protéine p53. *TP53*, codant pour la protéine p53, est un gène suppresseur de tumeurs qui possède de multiples rôles, parfois même contradictoires, lui conférant le titre de « gardien du génome ».

La phosphorylation de p53 humaine sur la sérine 15 a été décrite, entre autres, sur des modèles de fibroblastes humains normaux en sénescence réplivative ou induite suite à un stress oncogène (Ferbeyre et al., 2000; Webley et al., 2000). L'induction d'un arrêt du cycle cellulaire permanent est connue comme étant un mécanisme de défense contre la prolifération aberrante des cellules cancéreuses. Pourtant, p53 possède également un rôle pro-apoptotique permettant de tuer des cellules cancéreuses, ainsi qu'un rôle en faveur de la mise en place d'un état de quiescence (Rufini et al., 2013).

Dans un contexte d'arrêt du cycle cellulaire suite à un stress, la protéine p53 activée va à son tour induire l'expression de p21^{CIP1} (aussi appelé CDKN1A ou WAF1/CIP1) (**Figure 10**), un inhibiteur des complexes régulateurs formés de CDK (cyclin-dependent kinases) et de cyclines comme celui de la Cycline E/CDK2 responsable de la transition de phase G1 à S du cycle cellulaire ainsi que ceux des Cycline D/CDK4 et Cycline D/CDK6 dont l'activation a lieu durant la phase G1 (**Figure 11**).

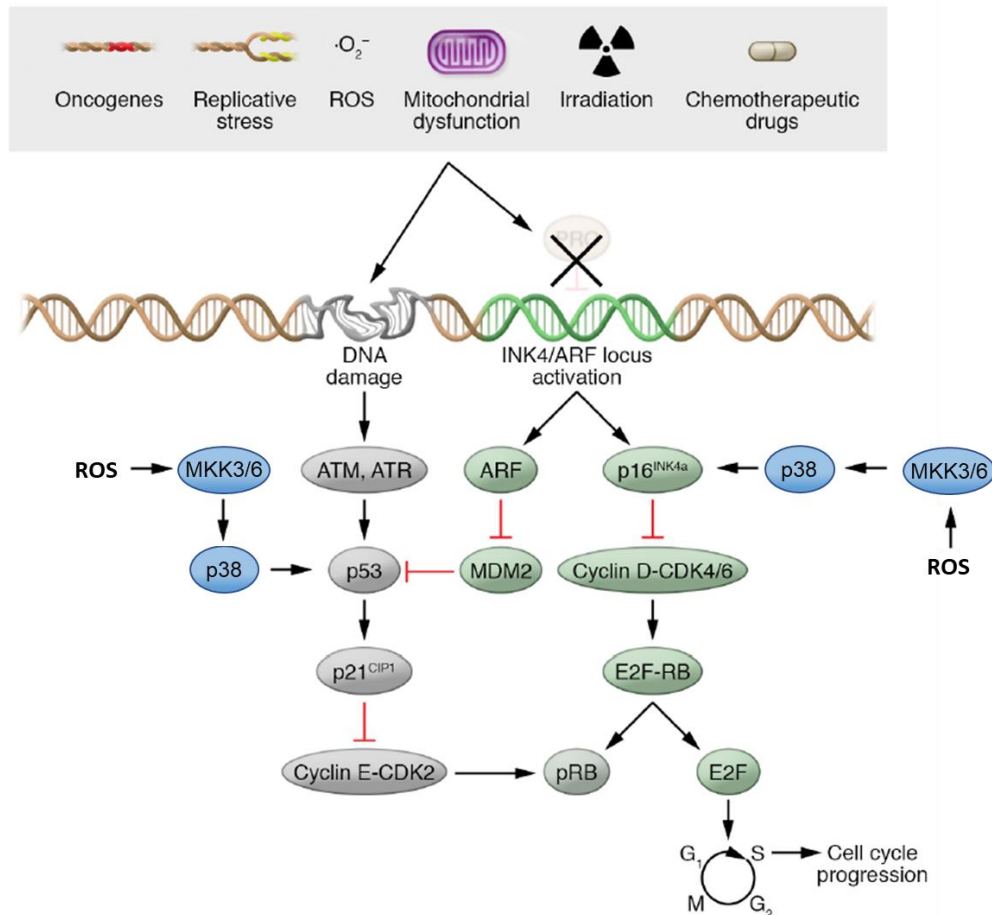


Figure 10. Les voies de signalisation classiques responsables de l'arrêt du cycle cellulaire lié à la sénescence. L'action d'un stress inducteur de sénescence provoque un arrêt du cycle cellulaire via l'activation de deux voies de signalisation principales : La voie $p53/p21^{CIP1}$ (en gris) ou la voie $p16^{INK4A}/pRb$ (en vert). Ces voies peuvent également être induites par la voie des MKK (Mitogen-activated protein kinase kinase) et de p38 (en bleu) suite à un stress oxydant. Quelle que soit la voie activée, cela aboutit à une déphosphorylation de pRb et la séquestration du facteur d'élongation E2F empêchant la progression du cycle cellulaire. Adapté de (Herranz and Gil, 2018).

L'inhibition de ces complexes empêche la phosphorylation de la protéine pRb et induit la séquestration du facteur d'élongation E2F sur lequel repose le bon déroulement de la réplication de l'ADN et de la mitose. $P21^{CIP1}$, codée par le gène humain *CDKN1A* localisé sur le chromosome 6 en position 6.p21.2, est donc considérée comme étant un régulateur des phases G1 et S du cycle cellulaire (Voir chapitre II - partie I.4.1.2) (Georgakilas et al., 2017).

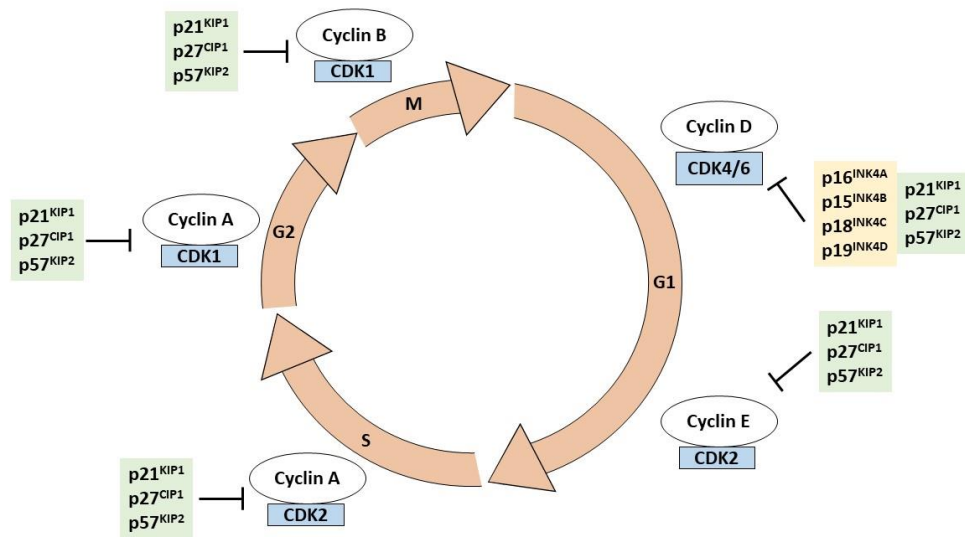


Figure 11. Régulation du cycle cellulaire. La progression du cycle cellulaire est assurée par des complexes Cycline - CDK qui peuvent être régulés par des inhibiteurs de CDK de la famille des CIP/KIP ou des INK4.

Cependant, p53 peut induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 d'une façon indépendante de p21^{CIP1}. En effet, suite à un traitement provoquant des dommages à l'ADN, p53 peut transactiver le gène codant la protéine 14-3-3-σ, qui va ainsi séquestrer le complexe Cycline B1/CDK2 dans le cytoplasme. Des cellules somatiques humaines dont le gène codant 14-3-3-σ a été invalidé se retrouvent ainsi dans l'incapacité de maintenir l'arrêt du cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN induits par la doxorubicine, un agent chimiothérapeutique (Chan et al., 1999).

HDM2 humain (aussi connu sous le nom de MDM2 chez la souris) représente un autre partenaire de p53. Il est capable d'induire son inhibition et même sa dégradation par ubiquitination. Tout ceci se déroule dans une boucle de rétrocontrôle négatif étant donné que la transcription de HDM2 est elle-même médiée par p53. Ce n'est qu'en réponse à un stress génotoxique provoquant la phosphorylation de p53 par ATM et CHK2 sur ses sérines 15 et 20 respectivement, que le complexe HDM2/p53 se dissocie (Qian and Chen, 2013).

4.1.2 p21^{CIP1}, un marqueur d'arrêt du cycle

P21^{CIP1} fait partie des inhibiteurs de CDK de la famille CIP/KIP, dans laquelle on peut également retrouver p27^{KIP1} et p57^{KIP2}. Tout comme son régulateur p53, la protéine p21^{CIP1} est

retrouvée au cœur de plusieurs mécanismes moléculaires en lien avec la sénescence cellulaire, la réparation de l'ADN ainsi que l'induction de l'apoptose, même si, contrairement à p53, p21^{CIP1} est également impliquée dans la répression de l'apoptose (Georgakilas et al., 2017). Il apparaît que le rôle de p21^{CIP1} dépend fortement de l'activité de p53. En effet, suite à une déficience ou une mutation perte de fonction de p53, p21^{CIP1} adopte des fonctions délétères en faveur d'une progression tumorale dans certains cancers, en permettant aux cellules d'échapper à l'arrêt du cycle cellulaire, à la sénescence et à l'apoptose (Georgakilas et al., 2017).

P21^{CIP1} peut moduler les processus de réparation de l'ADN, d'une part en inhibant le cycle cellulaire, ce qui évite l'entrée des cellules en apoptose et leur permet de réparer les dommages subis. D'autre part, p21^{CIP1} peut se lier au gène *PCNA* (Proliferating cell nuclear antigen), bloquant ainsi ses sites d'interactions avec d'éventuels autres partenaires comme l'ADN polymérase δ , ce qui inhibe ainsi la réplication de l'ADN mais également plusieurs processus responsables de la réparation de l'ADN (Abbas and Dutta, 2009).

Pendant la sénescence, l'activation de p53 et p21^{CIP1} est transitoire et leurs niveaux protéiques diminuent après l'établissement de l'arrêt du cycle cellulaire. Entre alors en jeu un autre inhibiteur des CDK, p16^{INK4A}, dont l'augmentation serait responsable du maintien de cet arrêt de prolifération cellulaire (Stein et al., 1999).

4.2 L'activation de la voie p16^{INK4A}

Le locus *INK4/ARF* code l'expression des suppresseurs de tumeurs p16^{INK4A}, p15^{INK4B} et ARF (aussi appelée p19^{ARF} chez la souris et p14^{ARF} chez l'Homme) qui appartiennent à la famille des inhibiteurs de CDK4. L'inhibition des CDK4 mais aussi des CDK6, qui ne dépend pas de p53/p21^{CIP1}, provoque un état prolongé d'hypophosphorylation de la protéine pRb, le maintien de l'association pRb/E2F et par conséquent, un arrêt du cycle cellulaire (**Figure 10**). L'activation de p16^{INK4A} est la conséquence de la perte de plusieurs acteurs dont le rôle est de réprimer le locus *INK4/ARF*. Parmi eux, nous pouvons citer les complexes Polycomb PRC1 et PRC2, composés de CBX7, BMI1 ou EZH2, ou encore d'autres régulateurs de ce locus comme MML1, JMJD3 ou ZRF1 (Herranz and Gil, 2018). Contrairement à p16^{INK4A}, ARF ne se lie pas aux CDK mais à MDM2 afin d'inhiber son activité E3 ubiquitine ligase. Etant donné que MDM2

peut ubiquitiner et induire la dégradation de p53, son inactivation par ARF entraîne la stabilisation de p53 et l'arrêt du cycle cellulaire, notamment par l'intermédiaire de p21^{CIP1} (Kim and Sharpless, 2006) (**Figure 10**).

L'activation de l'expression de p16^{INK4A}, qui est aujourd'hui un des biomarqueurs de sénescence les plus fiables, est un processus dynamique qui n'est pas observé (ou à un niveau très basal) chez des sujets sains et jeunes mais qui augmente considérablement au sein de tissus âgés *in vivo* (Krishnamurthy et al., 2004). Cependant, contrairement à la voie p53/p21^{CIP1}, celle impliquant p16^{INK4A} n'est pas activée suite au raccourcissement des télomères associé à l'induction de la sénescence (Herbig et al., 2004). Il a été montré que les types de sénescence médiés par la voie p16^{INK4A} sont ceux induits par des oncogènes ou des dommages à l'ADN suite à des irradiations aux UV (Rayess et al., 2012). De plus, des mutations causant la perte de fonction de p16^{INK4A} sont retrouvées dans de nombreux cancers humains, soulignant ainsi son potentiel rôle anti-cancéreux (Beroukhim et al., 2010).

L'expression de p16^{INK4A} dans différents modèles de fibroblastes humains sénescents induit un arrêt de la prolifération cellulaire mais ne semble pas avoir d'influence sur l'installation ou le maintien de leur SASP (Coppé et al., 2011).

4.3 L'activation de la voie p27^{KIP1}

Le rôle dans la sénescence d'un autre membre de la famille des CIP/KIP, p27^{KIP1} codé par le gène *CDKN1B*, est de plus en plus étudié. Ce dernier aurait également un rôle de suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération cellulaire et est retrouvé diminué dans plusieurs formes de cancers chez l'Homme (Collado and Serrano, 2010; Majumder et al., 2008). Sur un modèle de souris traitées aux radiations γ , les délétions de p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, séparément ou de façon combinée, augmentent l'agressivité tumorale et diminuent l'espérance de vie (Flores et al., 2014; García-Fernández et al., 2011). En 2018, Patki *et al.* ont mis en évidence le rôle de p27^{KIP1} dans la sénescence cellulaire dans une lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire surexprimant le récepteur aux glucocorticoïdes et traitée à la Dexaméthasone, ce qui traduit un stade clinique tumoral avancé. L'activation transcriptionnelle et l'accumulation de p27^{KIP1}, responsable d'un arrêt irréversible du cycle cellulaire, est corrélée à l'apparition d'autres marqueurs du phénotype sénescents (Patki et al.,

2018). Aussi, une diminution de l'acétylation de p27^{KIP1} par la SIRT6 induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, résultant en la suppression du phénotype sénescence de fibroblastes humains en sénescence répliquative (Zhao et al., 2016).

Les voies de signalisation impliquant p27^{KIP1} dans la sénescence cellulaire sont encore à ce jour très peu connues. Néanmoins, on sait que p27^{KIP1} interagit et bloque la cycline E/A-CDK2, la cycline B/CDK1 mais également les complexes cycline D/CDK4-6, ce qui affecte la phosphorylation de pRb et provoque un arrêt du cycle cellulaire (**Figure 11**) (Hnit et al., 2015). Tandis que le facteur de transcription oncogénique MYC réprime l'expression de p27^{KIP1}, les facteurs de la famille des FOXO (FOXO4, FOXO3a et FOXO1a) peuvent l'induire (Chandramohan et al., 2008).

Liu *et al.* ont étudié les voies de signalisation impliquées dans la sénescence répliquative des précurseurs dérivés de la peau humaines (hSKP). Malgré la présence de plusieurs marqueurs classiques de la sénescence (marquage SA-βgal, arrêt de la prolifération cellulaire, déphosphorylation de la protéine Rb), les SAHF n'étaient que très rarement présents dans les hSKP sénescents, ce qui est probablement dû au fait que cette sénescence n'était pas médiée par p16^{INK4A}. Dans leur modèle de sénescence, ils ont ainsi mis en évidence la voie AKT-FOXO3a-p27^{KIP1}/p15^{INK4B}. Au cours des passages de hSKP, une déphosphorylation de AKT se met en place entraînant son incapacité à phosphoryler le facteur de transcription FOXO3a, ce qui provoque sa translocation vers le noyau. FOXO3a ainsi activé va pouvoir initier l'expression transcriptionnelle de p27^{KIP1} et celle de p15^{INK4B}, ce qui a pour conséquence une déphosphorylation de pRb (**Figure 12**) (Liu et al., 2015). Ceci est cohérent avec les résultats d'une autre étude montrant que p27^{KIP1} est requis dans l'induction de la sénescence médiée par pRb sur une lignée humaine d'ostéosarcome (Alexander and Hinds, 2001).

Cette voie a également été décrite dans un contexte d'arrêt de la prolifération cellulaire induite par une hyperglycémie sur des cellules souches embryonnaires (McClelland Descalzo et al., 2016). L'exposition à 25 mM de glucose entraîne une augmentation d'ERO, suivie de la répression de AKT, la phosphorylation de JNK (« c-Jun N-terminal Kinase »), ainsi que l'activation de FOXO3a mais aussi de FOXO1. Indépendamment de AKT, la β-caténine a également été retrouvée accumulée dans le noyau. La formation du complexe β-caténine/FOXO3a dans le noyau provoque la transcription génique de régulateurs

du cycle cellulaire tels que p21^{CIP1} et p27^{KIP1}, mais également d'enzymes antioxydantes comme la MnSOD.

Une étude très récente a démontré l'implication de p27^{KIP1} dans l'induction de la sénescence de fibroblastes en régulant positivement l'accumulation de cofiline-1 et négativement le facteur de transcription TEAD1, celui-ci étant impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de la signalisation Hippo (Tsai et al., 2020). Ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils apportent de nouvelles pistes dans la compréhension des changements morphologiques liés au phénotype sénescence étant donné que la cofiline-1 joue un rôle dans la réorganisation du cytosquelette d'actine.

Ces études permettent d'étendre le champ des possibilités quant aux voies de signalisation pouvant induire la sénescence des cellules, notamment avec l'émergence d'une voie faisant intervenir l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{KIP1}.

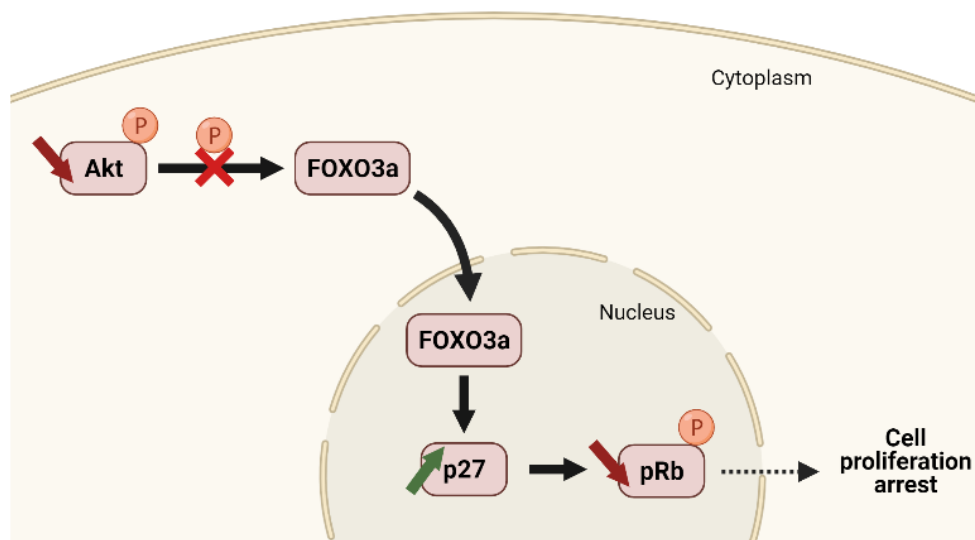


Figure 12. Modèle proposé de la voie de signalisation AKT/FOXO3a/p27^{KIP1}. Après certains stress comme l'entrée en sénescence répllicative (Liu et al., 2015) ou la production d'ERO suite à une hyperglycémie (McClelland Descalzo et al., 2016), on peut observer une déphosphorylation de la kinase AKT qui sera alors incapable de phosphoryler le facteur de transcription FOXO3a. FOXO3a non phosphorylé est transloqué dans le noyau et induit la transcription du gène codant p27^{KIP1}. Ce dernier en tant qu'inhibiteur du cycle cellulaire va provoquer une déphosphorylation de pRb et donc un arrêt de la prolifération cellulaire.

Cependant, le rôle de FOXO dans le vieillissement et l'espérance de vie des organismes semble équivoque. Dans le cadre de la longévité et de la voie IIS, nous avons expliqué précédemment que la phosphorylation de FOXO par AKT empêchait sa translocation nucléaire et que cela avait un impact négatif sur la longévité étant donné que FOXO ne pouvait pas induire la transcription de gènes impliqués dans la réponse aux stress (Voir chapitre I - partie V). Paradoxalement, dans cette partie consacrée à la voie AKT/FOXO3a/P27^{KIP1} dans le cadre de la sénescence cellulaire, c'est l'activation de FOXO suite à une déphosphorylation de AKT qui participe à l'induction de la sénescence cellulaire.

Etant donné que l'étude de McClelland Descalzo et al. décrite précédemment a montré l'induction d'enzymes antioxydantes par le complexe β -caténine/FOXO3a nucléaire (McClelland Descalzo et al., 2016), on peut se demander si la sénescence cellulaire induite par FOXO3a est un mécanisme de défense contre des stress oxydants en cohérence avec le rôle bénéfique de FOXO dans la longévité.

5. Les faces lumineuse et obscure de la sénescence (« Bright and Dark side »)

Longtemps, la sénescence a été considérée comme un processus délétère (« Dark Side ») participant au vieillissement et favorisant l'apparition de pathologies liées à l'âge comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ou encore métaboliques. Paradoxalement, les recherches ont également montré un côté bénéfique de la sénescence (« Bright Side ») par son intervention dans les processus de cicatrisation, le développement embryonnaire ou encore la protection contre la progression tumorale (Rhinn et al., 2019). Il est important de noter que la majorité de ces effets, qu'ils soient positifs ou négatifs pour l'organisme, se déroulent par l'intermédiaire du phénotype sécrétoire des cellules sénescents qui sera décrit plus en détails dans la partie correspondante (Voir chapitre II - partie II.3).

Dans un contexte de sénescence induite suite à des mutations oncogéniques, l'inactivation de l'expression génique d'acteurs clés tels que p53, p16^{INK4A} ou ARF permet de prévenir l'installation du phénotype sénescents et la progression tumorale, soulignant le rôle anticancéreux de la sénescence (Rhinn et al., 2019). Cependant, la présence prolongée de

cellules sénescents au sein d'un tissu tendrait plutôt à favoriser les cancers, principalement à cause de leur SASP (Voir chapitre II - partie II.3.2.1).

II. Le SASP, origine et conséquence de la sénescence

1. Caractéristiques du SASP : Description et effets autocrine versus paracrine

1.1 Description

L'entrée en sénescence des cellules s'accompagne d'une sécrétion de multiples facteurs solubles tels que des cytokines inflammatoires et des chimiokines (IL1, 1 α , IL-1 β , IL6, IL8, CXCL1, CXCL2), des facteurs de croissance (amphireguline AREG, epidermal growth factor EGF, bone morphogenetic protein BMP, fibroblast growth factor FGF, Vascular endothelial growth factor VEGF), des protéases (MMPs) ou encore des facteurs insolubles comme des composants de la matrice extracellulaire (Coppé et al., 2010). Il s'agit là du SASP, aussi appelé SMS (« Senescence messaging secretome ») par Kuilman *et al* en 2009 (Kuilman and Peeper, 2009). La composition du sécrétome dépend de plusieurs facteurs comme le type cellulaire, le type de stress ayant induit la sénescence, ou encore les voies de signalisation impliquées. Cependant, certains facteurs ont été retrouvés sur-sécrétés dans plusieurs modèles de sénescence et représentent donc des marqueurs classiques du SASP appelés « Core SASP » (**Figure 13**). La liste des facteurs du SASP pouvant servir de biomarqueurs de sénescence mais également de certaines pathologies ne cesse de s'allonger, notamment grâce à la caractérisation du SASP par des techniques de spectrométrie de masse (Voir chapitre II- partie II.4).

Soluble factors							
Interleukins		Chemokines		Other factors	Proteases and regulators	Growth factors and regulators	
IL-1 α	IL-1 β	IL-8	HCC-4	GM-CSF	MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14	Amphiregulin	SCF
IL-6	IL-13	GRO α , β , γ	Eotaxin-3	MIF	TIMP-2	bFGF	SDF-1
IL-15		MCP-2	MCP-4		PAI-1, -2	IGFBP-2, -3, -4, -6, -7	PIGF
		MIP-1 α	MIP-3 α		Cathepsin B	VEGF	HGF
						Angiogenin	

Soluble or shed receptors or ligands		Insoluble factors (ECM)
ICAM-1	uPAR	Collagens
sTNFRI	SGP130	Fibronectin
TRAIL-R3	EGF-R	
Fas		

Figure 13. Exemples de facteurs faisant partie du « core » SASP. Liste des facteurs dont la sécrétion augmente dans le SASP et classés par catégories par (Coppé et al., 2010). Les facteurs sur-sécrétés de façon très importante par rapport aux contrôles (d'un facteur 4 ou plus) sont représentés par les cases vertes, ceux qui augmentent modérément (d'un facteur entre 2 et 4) par la case orange, et ceux qui subissent une faible augmentation (d'un facteur inférieur à 2) par la case jaune. Les cases blanches représentent les protéines dont on ignore le facteur de sécrétion par rapport aux contrôles. L'estimation de ces facteurs de sécrétion a été réalisée suite à une étude bibliographique réalisée par (Freund et al., 2010). Abréviations : bFGF, basic fibroblast growth factor; EGF-R, Epidermal Growth Factor receptor; GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; HGF, hepatocyte growth factor; ICAM-1, intercellular adhesion molecule; IGFBP, Insulin-like growth factor-binding protein 1; MCP, membrane cofactor protein; MIF, Macrophage migration inhibitory factor; MIP, Macrophage Inflammatory Proteins; PAI, plasminogen activator inhibitor; PIGF, placental growth factor; SCF, stem cell factor; SDF-1, stromal cell-derived factor 1; SGP130, soluble glycoprotein 130; sTNFRI, soluble tumor necrosis factor receptor; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases; TRAIL-R, tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand receptor; uPAR, urokinase-type plasminogen activator receptor.

Le SASP étant sous constante régulation, sa composition, et de ce fait son rôle, ne sont pas figés dans le temps mais varient selon une dynamique temporelle et spatiale (Ito et al., 2017).

Depuis quelques années, et face à la complexité du SASP, des équipes tentent de dresser une classification des différents facteurs sécrétés. Par exemple, Borodkina *et al.* ont classé les facteurs du SASP en trois groupes comme suit :

- Les facteurs dont le mécanisme d'action dépend de leurs liaisons à leurs récepteurs. Il comprend surtout des interleukines, des chimiokines de la famille de GRO et CCL, ainsi que des facteurs de croissance (HGF, FGF, TGF...).
- Des facteurs pouvant agir directement sur les protéines membranaires, les molécules de différentes voies de signalisation, mais également celles impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Ce groupe est surtout composé des métalloprotéases (MMP-1, MMP-6 et MMP-10) mais aussi des ERO et des espèces réactives de l'azote (ERN).
- Le groupe rassemblant certains facteurs comme TIMP (tissue inhibitors of metalloproteases), PAI (plasminogen activator inhibitor) et IGFBP (insulin-like growth factor binding proteins), et dont le rôle est d'assurer la régulation des composants des deux groupes précédents (Borodkina et al., 2018).

Parmi les composants de la famille des cytokines, on retrouve les interleukines qui sont très étudiées et dont certaines sont particulièrement connues comme étant des biomarqueurs de sénescence. Par exemple, l'interleukine 6 est souvent retrouvée dans le SASP de cellules en sénescence répliquative ou induite par des oncogènes, mais également de cellules présentant une DDR persistante suite à des irradiations, c'est-à-dire durant laquelle les DSB ne peuvent pas être réparées (Rodier et al., 2009). Cela a été le cas dans plusieurs modèles étudiés dont des kératinocytes humains et murins, des mélanocytes, des monocytes, des fibroblastes ou encore des cellules épithéliales (Coppé et al., 2010).

La caractérisation du sécrétome rencontre une complexité supplémentaire du fait de l'existence de différentes voies de sécrétion des protéines vers le milieu extracellulaire.

1.2 Les voies de sécrétion

Il existe trois voies différentes de sécrétion de protéines, dont celles du SASP, vers le milieu extracellulaire : la voie classique, la voie non classique ainsi que celle du relargage par des exosomes (**Figure 14**) (Chenau et al., 2008; Nickel, 2003; Rabouille, 2017) :

- La voie classique : certaines protéines synthétisées possèdent un domaine transmembranaire et/ou un peptide signal spécifique de 15 à 30 acides aminés au

niveau de leur extrémité N-terminale. Cette séquence permet aux protéines de passer par le réticulum endoplasmique avant d'être clivées au niveau du peptide signal et de continuer leur route jusqu'à l'appareil de Golgi. Ces protéines seront ensuite prises en charge par des vésicules dérivées du Golgi qui fusionneront avec la membrane plasmique afin d'assurer leur sécrétion.

- La voie non classique (ou UPS pour « unconventional protein secretion ») : elle concerne les protéines ne possédant pas de peptide signal et qui ne transiteront donc ni par le réticulum endoplasmique ni par l'appareil de Golgi. Il s'agit en général de régulateurs de transcription, de facteurs de traduction, d'enzymes métaboliques, de protéines chaperonnes et de protéines mitochondriales. Elles pourront être sécrétées de différentes façons comme par exemple via des transporteurs membranaires, par recyclage endosomal suivi d'une exocytose (c'est le cas de l'IL-1 β et d'HMGB1 par exemple), ou encore par passage de la face interne vers la face externe de la membrane plasmique par un mécanisme de *flip-flop*.
- La voie de relargage par des exosomes correspond à un transport des protéines dans des vésicules membranaires afin qu'elles soient libérées dans le milieu extracellulaire.

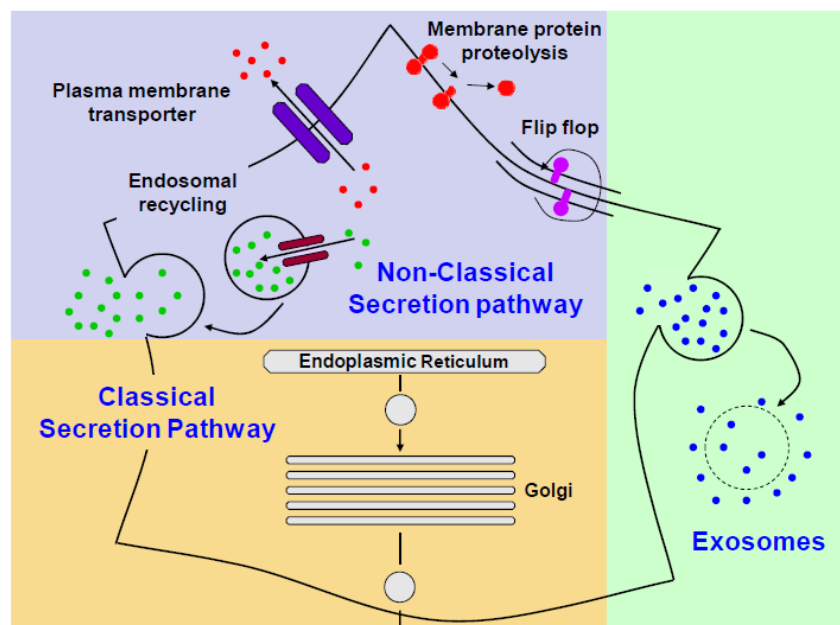


Figure 14. Les différentes voies de sécrétion de sécrétion protéique. La voie classique (encadré orange), la voie non classique (encadré violet) et la voie de relargage par des exosomes (encadré vert). D'après (Chenau et al., 2008).

Quelle que soit la voie adoptée, les composés sécrétés peuvent avoir plusieurs rôles, notamment dans l'établissement et le maintien de la communication cellulaire de façon autocrine (au sein de la même cellule) ou paracrine (avec les cellules environnantes).

1.3 Effet autocrine du SASP et renforcement de l'état de sénescence

Le rôle autocrine (ou « cell-autonomous function ») des facteurs du SASP est essentiel à l'induction, au maintien et au renforcement de l'état de sénescence de la cellule qui les a sécrétés. Ainsi, les interleukines IL-6 et IL-8 sont particulièrement connues et étudiées pour leur capacité à activer des voies de signalisation afin d'induire un sécrétome responsable d'un arrêt du cycle cellulaire sur le long terme. Dans des cellules exposées à un stress oncogénique, la délétion du gène codant pour IL-6 ou son récepteur IL-6R empêche l'induction et le maintien de la sénescence (Kuilman et al., 2008). Le renforcement de la sénescence par effet autocrine peut également être initié par certaines molécules de la famille des chimiokines GRO (α , β et γ), CXCL5 (ENA-78), CXCL6 (GCP2), et CXCL7 (NAP2), grâce à leurs liaisons avec le récepteur CXCR2. En effet, la déplétion de CXCR2 dans des fibroblastes a permis d'empêcher l'induction d'une DDR ainsi que l'entrée en sénescence répliquative ou en OIS. Au contraire, la surexpression de ce récepteur a induit l'OIS par la sécrétion de plusieurs facteurs dont les chimiokines listées précédemment qui sont des ligands dudit récepteur. L'utilisation d'anticorps neutralisants de ces ligands a permis d'atténuer l'OIS, soulignant ainsi leur rôle dans le renforcement du phénotype sénescence (Acosta et al., 2008).

Toujours dans un contexte de sénescence induite par un oncogène dans des mélanocytes humains primaires, la répression par ARN interférence de IGFBP7 (Insulin Growth Factor Protein 7) a également permis d'éviter l'entrée en sénescence des cellules (Wajapeyee et al., 2008). Alors que la surexpression du facteur PAI-1 induit l'entrée en sénescence de fibroblastes humains et murins, une déficience en PAI-1 permet, au contraire, une prolifération plus marquée (Kortlever et al., 2006). Cet arrêt de la prolifération cellulaire suite à un effet autocrine du SASP a des effets délétères dans le cadre du vieillissement de la peau. L'accumulation excessive de cellules sénescence entraîne une perte de la régénération et de l'homéostasie cutanée. Cependant, le processus de sénescence peut également bloquer

l'hyperprolifération cellulaire dans un contexte de cicatrisation de plaies, afin d'éviter l'apparition de lésions malignes ou pré-malignes (**Figure 15**) (Demaria et al., 2015).

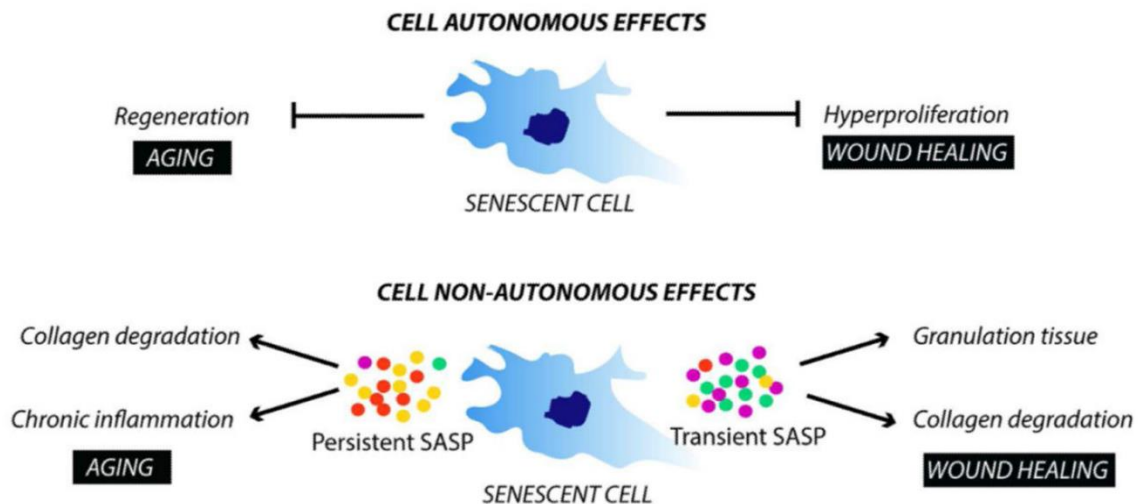


Figure 15. Les effets autocrines et paracrines du SASP dans de la peau. Dans un contexte de cicatrisation de la peau, la cellule sénescence peut prévenir l'hyperprolifération et le développement de lésions malignes par effet autocrine (« autonomous effects ») mais aussi entraîner la granulation tissulaire et la dégradation du collagène par effet paracrine de son SASP transitoire (« non-autonomous effects »). La présence de cellules sénescence peut également favoriser le vieillissement de la peau en altérant la régénération tissulaire par effet autocrine, et en induisant la dégradation du collagène ainsi qu'une inflammation chronique par la sécrétion d'un SASP persistant. D'après (Demaria et al., 2015).

1.4 Mise en évidence de l'effet paracrine du SASP

Les cellules sénescence peuvent altérer le microenvironnement tissulaire ainsi que les cellules avoisinantes à travers l'effet paracrine (ou « cell non-autonomous function ») de leur phénotype sécrétoire (Coppé et al., 2008). Cet effet peut induire la sénescence des cellules prolifératives environnantes, propageant ainsi le phénotype de vieillissement dans les tissus. Par exemple, dans la peau, l'effet paracrine d'un SASP peut avoir différents rôles : un SASP transitoire serait impliqué dans le processus de cicatrisation en entraînant une dégradation du collagène ainsi qu'une granulation du tissu, tandis qu'un SASP persistant provoquerait une inflammation chronique qui participerait au vieillissement de la peau (**Figure 15**) (Demaria et al., 2015).

Les travaux menés en 2013 par Acosta *et al.* présentent les premières démonstrations de cet effet paracrine. Sur des cocultures de fibroblastes humains sénescents suite à un stress oncogénique et de fibroblastes non-sénescents, ils ont pu observer l'apparition de plusieurs marqueurs de la sénescence dont un arrêt de prolifération des cellules non transfectées. Une expérience consistant à traiter les cellules prolifératives avec du milieu conditionné provenant des cellules OIS a permis de préciser que cet effet est spécifiquement médié par les facteurs du SASP (Acosta et al., 2013a). Il a également été montré que les facteurs du SASP TGF- β et IL-1, peuvent induire la sénescence de fibroblastes avoisinants de façon paracrine. On parle d'un effet « bystander » engendré par une production d'ERO et de dommages à l'ADN qui serait dépendante de NOX4 (NAPDH oxidase 4) (Hubackova et al., 2012; Nelson et al., 2012).

Plus récemment, cet effet a été étudié au niveau de la peau en utilisant sur des fibroblastes *in vitro* du milieu conditionné provenant de mélanocytes humains sénescents. Ces conditions ont provoqué l'apparition de dommages aux télomères ainsi qu'une diminution de la prolifération cellulaire des fibroblastes. Ces résultats ont également été observés grâce à une coculture de mélanocytes sénescents et de kératinocytes formant un modèle 3D d'épiderme humain. Cet effet « bystander » agit via un des composants du SASP des mélanocytes, l'IP-10, qui provoque une induction de la production d'ERO de façon CXCR3-dépendante, et par conséquent de dommages à l'ADN, dans les cellules prolifératives. D'ailleurs, l'utilisation d'un antioxydant ciblant la mitochondrie, le MitoQ, a empêché l'installation de la sénescence. Dans cette même étude, l'élimination directe des mélanocytes sénescents du modèle 3D d'épiderme grâce à une drogue sénolytique (ABT737) a permis d'atténuer l'effet paracrine de leur SASP sur les kératinocytes voisins, empêchant ainsi la propagation du phénotype sénescence (Victorelli et al., 2019).

Depuis quelques années, les études fondées sur des expériences visant à éliminer spécifiquement les cellules sénescences se multiplient. En effet, cette méthodologie constitue une stratégie d'étude de l'effet des cellules sénescences sur les tissus, les pathologies ou encore le vieillissement et l'espérance de vie d'un organisme et suscite d'un intérêt croissant dans le domaine de la recherche et développement (Dolgin, 2020).

1.5 L'élimination des cellules sénescences ou comment abolir l'effet paracrine du SASP

L'étude la plus connue car pionnière est celle réalisée en 2011 par Baker *et al.* sur un modèle de souris transgénique (INK-ATTAC) permettant la destruction spécifique des cellules sénescences exprimant p16^{INK4A}, et donc l'abolition de leur phénotype sécrétoire *in vivo*. Cette manipulation génétique a entraîné une apparition plus tardive des maladies liées au vieillissement dont la tumorigenèse, ainsi qu'un allongement de l'espérance de vie de souris ayant vieilli naturellement et de souris progéroïdes BubR1, modèle de vieillissement accéléré (Baker et al., 2011, 2016).

L'élimination de cellules sénescences au niveau des cerveaux de souris a retardé le déclin cognitif ainsi que l'apparition de maladies neurodégénératives en atténuant l'hyperphosphorylation de la protéine tau ainsi que les dépôts de nœuds neurofibrillaires (Bussian et al., 2018). Une autre étude portant sur l'essai d'un sénolytique, l'ABT263, a eu un effet bénéfique sur la capacité régénérative de cellules souches hématopoïétiques humaines âgées (Chang et al., 2016). En 2017, Baar *et al.* utilisent une autre technique qui consiste à inhiber l'interaction entre FOXO4 et p53 afin de provoquer spécifiquement l'apoptose des cellules sénescences. L'élimination des cellules sénescences a permis dans ce cas de restaurer les fonctions rénales de souris âgées et d'atténuer les dysfonctionnements tissulaires consécutifs à la chimiothérapie (Baar et al., 2017).

Au vu de ces résultats, l'élimination des cellules sénescences, et par conséquent du SASP, représente une des stratégies thérapeutiques majeures contre le vieillissement et l'apparition de maladies liées à l'âge (Voir chapitre II - partie II.5).

2. Les voies d'induction et de régulation du SASP

Contrairement à leurs rôles bien caractérisés dans l'établissement de l'arrêt du cycle cellulaire, les acteurs majeurs de la sénescence que sont p16^{INK4A} et p21^{CIP1} ne semblent pas impliqués dans la mise en place du phénotype sécrétoire (Coppé et al., 2011). Aussi, l'induction du SASP ne nécessite pas forcément l'activité de p53, et il semblerait même que cette dernière puisse empêcher son amplification (Coppé et al., 2008). Bien qu'encore peu connues, d'autres voies régulant l'induction du SASP ont été mises en évidence.

2.1 Mécanismes de régulation du facteur de transcription Nf-κB

Nf-κB et C/EBPβ sont deux facteurs de transcription pouvant coopérer afin de réguler l'expression génique des facteurs du SASP.

Nf-κB peut former au total une douzaine de dimères différents en combinant le plus communément les deux sous-unités p65 (RelA) et p50/p105 (Nf-κB1) qui constituent des médiateurs de la réponse pro-inflammatoire. Il peut également faire intervenir d'autres protéines comme RelB, c-Rel et p52/p100 (NF-κB2) (Hoffmann and Baltimore, 2006). A l'état physiologique, Nf-κB est séquestré dans le cytoplasme par des protéines inhibitrices de la famille des IκB (IκBα, IκBβ, IκBγ, IκBδ, IκBε, IκBζ et Bcl3). Lors de certains stimuli extracellulaires (cytokines, facteurs de croissance, mitogènes, composants microbiens ou encore des agents de stress), un complexe de kinases activatrices composé de deux sous-unités catalytiques à activité sérine/thréonine kinase (IKKα et IKKβ) et d'une sous-unité régulatrice (NEMO/Iκky) phosphoryle et inhibe IκB, libérant ainsi Nf-κB. Tandis que IκB est dégradé par le protéasome, Nf-κB est transloqué vers le noyau où il pourra activer la transcription des gènes de l'inflammation ou de l'immunité.

C/EBPβ est un régulateur transcriptionnel de la réponse inflammatoire mais également de l'arrêt du cycle cellulaire en agissant sur le complexe pRb/E2F (Salotti and Johnson, 2019). Il est capable de réguler négativement IκB, favorisant ainsi l'activité de Nf-κB (Cappello et al., 2009). De plus, C/EBPβ est essentiel à la mise en place de l'OIS et du phénotype sécrétoire associé notamment via sa liaison au promoteur du gène codant IL-6 (Kuilman et al., 2008).

2.2 Voies de dommages persistants à l'ADN

Les stimuli évoqués précédemment pour leur capacité à activer Nf-κB sont nombreux et dépendants du contexte. Après des dommages à l'ADN persistants, la réponse cellulaire passe par l'activation de la kinase ATM et, dans une moindre mesure, ATR. ATM est activée par ces dommages et phosphoryle NEMO sur sa sérine 35 afin de faciliter sa translocation dans le cytoplasme où elle agira sur IκB comme décrit précédemment (Salminen et al., 2012). De plus, la DDR empêche la dégradation de GATA4 (GATA binding protein 4) par autophagie

induite par p62. La stabilisation de GATA4 entraîne l'activation de l'IL-1 α et de TRAF3IP2 qui induisent la transcription de Nf- κ B et du SASP associé (**Figure 16**) (Kang et al., 2015).

Rodier *et al.* ont montré qu'ATM ne régule pas la totalité du SASP mais qu'elle est particulièrement nécessaire à la sécrétion de deux cytokines, IL-6 et IL-8. Il a par ailleurs été démontré que la délétion d'ATM sur des fibroblastes humains irradiés empêche la sécrétion d'IL-6 (Rodier et al., 2009). Une étude récente a conforté cette hypothèse en montrant que diminuer de façon génétique ou pharmacologique le niveau d'ATM sur des cultures cellulaires entraîne une baisse de l'activation de Nf- κ B et de la sénescence cellulaire (Zhao et al., 2020). D'autres facteurs comme NBS1 et CHK2 sont également activés suite à des dommages à l'ADN persistants. Leur répression a permis d'inhiber l'activation du SASP.

Sous OIS, Nf- κ B et C/EBP β sont sur-exprimés, activés et liés à la chromatine (Salama et al., 2014). Dans des fibroblastes humains sénescents suite à un stress oncogénique, la sous-unité p65 de Nf- κ B a été localisée, sous forme activée car phosphorylée sur sa sérine, au niveau de la chromatine (Chien et al., 2011).

Certains facteurs du SASP comme l'IL-6, l'IL-8, l'IL-1 ou encore le TGF- β semblent être d'importants effecteurs des signalisations Nf- κ B et C/EBP, après des dommages à l'ADN ou un stress oxydant, mettant ainsi en place une boucle de rétrocontrôle positive (Salama et al., 2014).

2.3 Stress oxydant et voie p38MAPK

La voie p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) est une voie de signalisation connue pouvant induire la sénescence de cellules soumises à des dommages à l'ADN ou des stress environnementaux et plus particulièrement oxydants. Lors de l'OIS ou d'un stress oxydant, les MAP3K (MAP kinase kinase kinases) sont phosphorylées et activent les MAPKK (MAP kinase kinases) qui vont à leur tour activer différentes isoformes de la protéine p38MAPK. p38MAPK phosphorylée est capable d'induire un arrêt du cycle cellulaire associé à la sénescence, notamment en activant p53 et p16^{INK4A} (Xu et al., 2014).

Dans le cadre de la régulation du SASP et indépendamment de la DDR, la voie p38MAPK a été décrite comme permettant la transcription de facteurs du SASP en favorisant l'activation de Nf- κ B et sa liaison à l'ADN (Freund et al., 2011). Sur un modèle de fibroblastes humains,

l'inhibition directe de p38MAPK a provoqué une diminution importante de l'expression des gènes du SASP (Alimbetov et al., 2016). p38MAPK peut être activée par le TGF- β via la kinase TAK1 (TGF β -activated kinase 1) (**Figure 16**) (Anerillas et al., 2020).

2.4 Les autres acteurs de la régulation du SASP

Aujourd'hui, on sait que les acteurs et les voies de régulation du SASP sont très nombreux et souvent interconnectés. Dans cette partie, nous aborderons quelques autres régulateurs du SASP dépendant de Nf- κ B. Ils sont illustrés par le schéma ci-dessous (**Figure 16**).

Comme mentionné précédemment, certains facteurs du SASP peuvent favoriser leur expression, et donc leur propre activité, selon une boucle de rétrocontrôle positive. C'est le cas de l'IL-1 α , décrite précédemment dans le cadre de l'activation de GATA4. IL-1 α peut être sécrétée dans le milieu extracellulaire avant de se lier et d'activer le récepteur IL-1R, entraînant une cascade de signalisation qui résulte en l'activation de Nf- κ B. IL-1 α est également induite par la voie mTOR, dont l'inhibition par la rapamycine provoque la suppression de l'activité de Nf- κ B et de la sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires (Laberge et al., 2015).

HMGB1 fait partie de la famille des DAMP (Damage-associated molecular patterns), aussi appelés alarmines, un groupe de protéines non-histones associées à la chromatine et impliquées dans les processus de transcription et de réplication. Sur des fibroblastes humains normaux dont la sénescence a été induite par irradiations, HMGB1 est sécrétée avant la mise en place du SASP, indépendamment de la DDR mais avec la contribution de p53 (Davalos et al., 2013). HMGB1 peut se lier aux récepteurs RAGE ([Voir chapitre IV, partie III.1.1](#)), TLR2 et TLR4 (Toll-like receptors) associés à l'activation de la voie Nf- κ B et du SASP.

Enfin, les CCFs (cytoplasmic chromatin fragments) sont des fragments de chromatine retrouvés dans le cytoplasme suite à la dégradation de l'enveloppe nucléaire provoquée par l'altération de la lamine B1 durant la sénescence. Les CCFs sont ensuite reconnus par les senseurs cytoplasmiques de l'ADN cGAS, qui produisent le second messager cyclique GMP-AMP appelé cGAMP afin d'activer STING et, par conséquent, Nf- κ B (Dou et al., 2017).

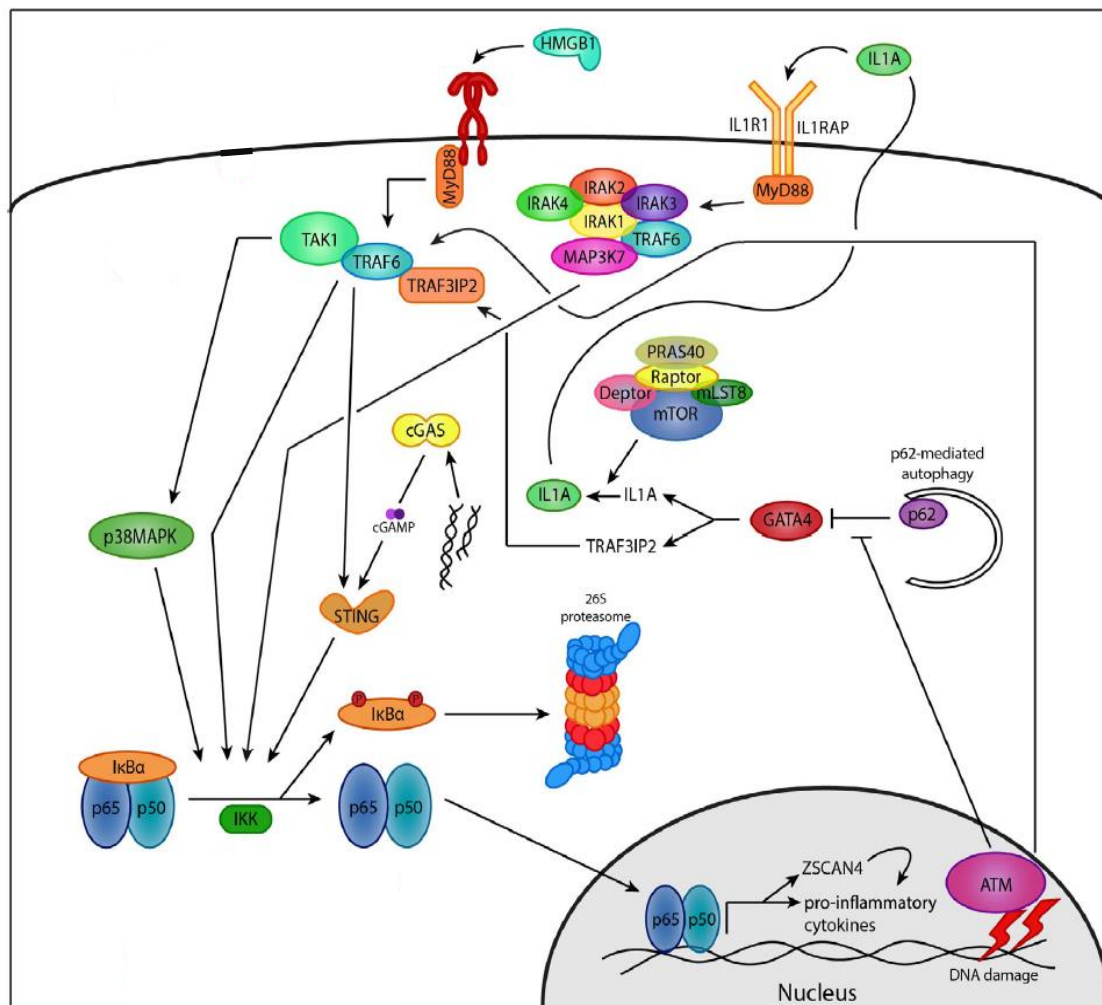


Figure 16. Voies de régulation du SASP médiées de $\text{Nf-}\kappa\text{B}$. Adapté de (Lopes-Paciencia et al., 2019).

3. Les effets délétères et bénéfiques du SASP dans le cadre du vieillissement et des pathologies

Comme évoqué précédemment, le SASP peut avoir des effets bénéfiques ou délétères pour l'organisme (**Figure 17**), d'où leur désignation sous le terme de « Bright and Dark side of the SASP » par Lecot et al (Lecot et al., 2016). Ces rôles souvent contradictoires semblent dépendre de plusieurs facteurs comme la composition du SASP, son évolution au cours du temps ou encore le contexte dans lequel la sénescence est apparue. Dans cette partie, nous allons décrire l'implication du SASP dans différents processus physiologiques.

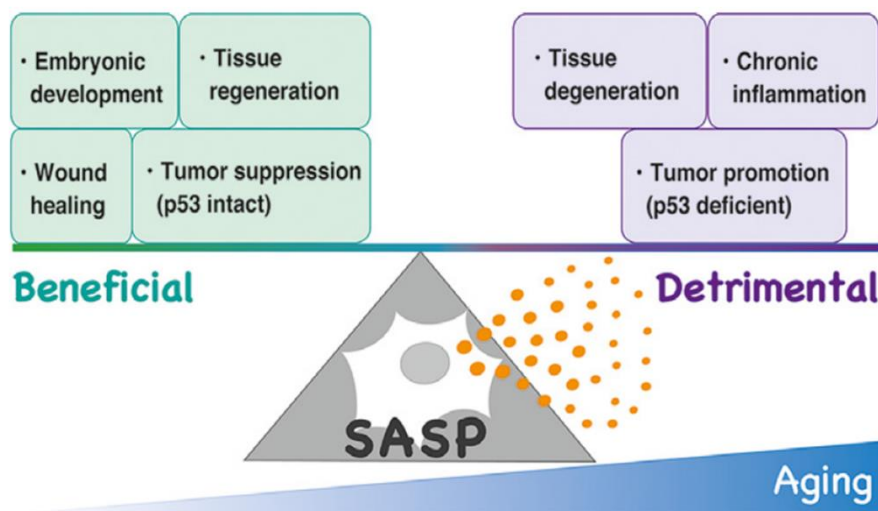


Figure 17. Les rôles bénéfiques et délétères du SASP. La présence du SASP est importante pour de nombreux processus biologiques comme le développement embryonnaire, la régénération tissulaire, la cicatrisation mais également la suppression tumorale. Paradoxalement, il peut participer au développement tumoral et à la dégénérescence tissulaire favorisant ainsi le vieillissement d'un organisme (Watanabe et al., 2017).

3.1 Les effets bénéfiques du SASP

3.1.1 Rôle dans la plasticité cellulaire, la régénération et la cicatrisation

Le groupe de Judith Campisi a utilisé un modèle de souris capable d'induire l'apoptose des cellules sénescents grâce à un transgène (« inducible senescence-to-apoptosis » mice). Après une blessure cutanée, ils ont remarqué qu'une importante et précoce apparition de la sénescence affectait les cellules endothéliales et fibroblastes mais pas les kératinocytes. Cela a eu pour effet l'installation d'un SASP avec, en particulier, la sécrétion du facteur de croissance PDGF-AA, qu'ils ont identifié comme essentiel à l'induction de la différenciation des myofibroblastes et donc à la cicatrisation. En effet, l'élimination ciblée de ces cellules sénescents a eu pour conséquence un retard de la cicatrisation de la plaie, effet qui a pu être reversé grâce à l'application directe du facteur PDGF-AA sur la plaie (Demaria et al., 2014). Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures montrant l'effet de la sénescence sur la régénération tissulaire et la limitation de la fibrose (Jun and Lau, 2010).

Il semblerait que cet effet positif du phénotype sécrétoire dépende très fortement de sa dynamique temporelle. En effet, un SASP transitoire serait plutôt associé à des effets

bénéfiques comme la régénération tissulaire tandis qu'une sécrétion plus persistante deviendrait délétère en induisant des dommages tissulaires chroniques. L'influence de la durée d'exposition au SASP a d'ailleurs été observée à travers l'augmentation des marqueurs du caractère « souche » ainsi que de la plasticité cellulaire de kératinocytes murins exposés de façon transitoire à un SASP provenant du milieu conditionné de kératinocytes soumis à une OIS (Ritschka et al., 2017).

Il semblerait également que la régénération musculaire soit médiée par le secrétome des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux et, plus particulièrement, par l'action synergique entre la fraction soluble et les vésicules extracellulaires qui le composent (Mitchell et al., 2019).

3.1.2 Rôle essentiel dans le développement embryonnaire

Tandis que les mécanismes d'apoptose sont déjà connus pour leur implication fondamentale dans le développement embryonnaire, Storer *et al.* ont montré la présence de cellules sénescents au sein de tissus d'embryons, mettant en évidence un nouveau rôle de la sénescence (Storer et al., 2013). Des résultats similaires avaient été obtenus par Muñoz-Espín *et al.* qui ont également montré que cette sénescence associée au développement dépendait de p21^{CIP} (Muñoz-Espín et al., 2013). Dans ce contexte, le rôle du SASP serait de recruter des cellules immunitaires afin de participer à l'élimination de cellules sénescents. Cette hypothèse est renforcée par une étude montrant que la sénescence impliquée dans le développement des amphibiens dépendait de TGF- β (Davaapil et al., 2017).

3.1.3 Rôle dans la surveillance immunitaire

Suite à certains dommages, le SASP a la capacité de recruter des cellules du système immunitaire afin d'éliminer les cellules sénescents, permettant ainsi à une nouvelle population de cellules progénitrices de remodeler et régénérer le tissu. Dans un contexte de vieillissement, de certaines pathologies ou de dommages persistants, ce système dit de « sénescence-élimination-régénération » n'est plus efficace, ce qui entraîne un dysfonctionnement tissulaire suivi d'une fibrose (**Figure 18**) (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Le SASP peut atténuer les fibroses affectant différents types de tissus. Par exemple,

Krizhanovsky et al. ont provoqué une fibrose hépatique sur des souris en les traitant au CCL4, un agent générant des dommages au niveau du foie. Ce traitement a induit la sénescence de cellules étoilées intra-hépatiques activées et la production du SASP qui permet le recrutement de lymphocytes (Natural Killer cells), l'élimination des cellules sénescents et la régénération tissulaire (Krizhanovsky et al., 2008).

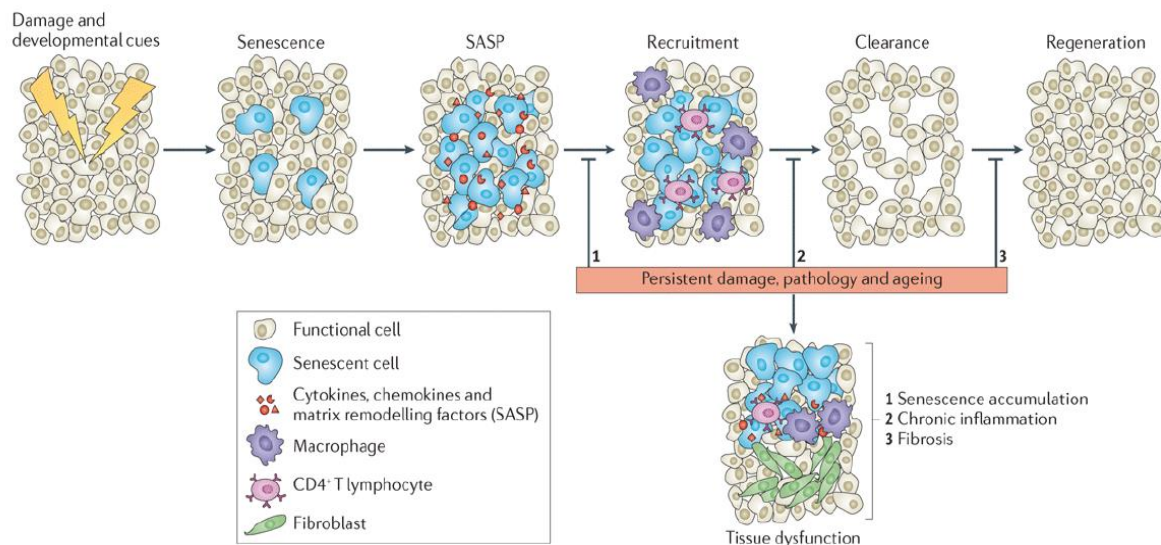


Figure 18. Rôle des cellules sénescents et du SASP dans le recrutement de cellules immunitaires et la régénération tissulaire. Au cours du développement ou suite à des dommages, l'apparition de cellules sénescents et du SASP associé permet le recrutement de diverses cellules du système immunitaire dont le rôle est d'éliminer les cellules sénescents afin de permettre la régénération tissulaire. Cependant, lors de dommages persistants, du vieillissement et de certaines pathologies, ce système est endommagé et mène à un dysfonctionnement tissulaire. D'après (Muñoz-Espín and Serrano, 2014).

Dans un modèle d'hépatocarcinome murin où l'activité de p53 est inhibée par shRNA inducible, la brève induction de son expression dans les cellules de foie a conduit à leur sénescence cellulaire accompagnée d'une réponse inflammatoire permettant le recrutement de neutrophiles, macrophages et lymphocytes. Cela a induit l'élimination des cellules tumorales par les cellules immunitaires et la diminution de la taille de la tumeur (Xue et al., 2007).

Une autre étude menée sur un modèle de souris a montré que les monocytes et macrophages assistent les lymphocytes T CD4+ afin d'éliminer les hépatocytes sénescents,

inhibant ainsi le développement du cancer du foie (Kang et al., 2011). Aussi, les cellules myéloïdes CCR2+ peuvent avoir soit un rôle protecteur en sécrétant un facteur du SASP, MCP-1, afin d'éliminer les hépatocytes sénescents pré-malins prévenant ainsi le développement tumoral, soit un rôle délétère via l'inhibition des lymphocytes une fois le cancer installé (Eggert et al., 2016).

Ainsi, le contexte et la temporalité déterminent fortement la destinée antitumorale ou pro-tumorale du SASP (Faget et al., 2019).

3.2 Les effets délétères du SASP

3.2.1 Rôle dans le cancer

La sénescence avait d'abord été considérée comme suppressive de tumeurs car elle induisait un arrêt du cycle cellulaire, empêchant ainsi la prolifération aberrante des cellules cancéreuses. Le SASP avait également été montré comme étant impliqué dans ce processus car il permet de renforcer, propager le phénotype sénescents et de recruter les cellules du système immunitaire.

Cependant plusieurs études, dont celle de Baker *et al.* que nous avons mentionnée précédemment (Voir chapitre II - partie II.1.5), ont par la suite montré que l'élimination spécifique des cellules sénescents sur un modèle de souris induit une diminution du risque de développer un cancer (Baker et al., 2016). *In vitro*, le SASP issu de fibroblastes sénescents peut avoir un effet paracrine sur des cellules épithéliales favorisant leur invasion et engendrant une altération de l'intégrité épithéliale et de la différenciation, communément associées à la tumorigenèse (Coppe et al., 2008).

Plus dangereux encore, il semblerait que certaines cellules devenues sénescents suite à des dommages à l'ADN ou des traitements avec des agents chimiothérapeutiques, aient la possibilité de sécréter des facteurs du SASP comme WNT16B, IL-6 ou TIMP-1, pouvant empêcher les cellules tumorales environnantes d'être détruites (Campisi, 2013). Le facteur AREG (amphiréguline) semble également impliqué dans la résistance tumorale (Xu et al., 2019).

Dans le cadre de l'obésité, des altérations du microbiote intestinal provoquent l'augmentation du niveau d'acide désoxycholique dans le foie. Ce métabolite induit la sénescence et le SASP des cellules étoilées intra-hépatiques activées favorisant la sécrétion de facteurs pro-tumoraux et le développement du cancer du foie des souris exposées à un carcinogène (Yoshimoto et al., 2013).

Le SASP est impliqué dans plusieurs autres types de cancers notamment cutanés (Ghosh and Capell, 2016; Krtolica et al., 2001; Liao et al., 2020). Par exemple, le traitement de cellules de mélanome avec de la cisplatine, une drogue chimiothérapeutique, provoque leur entrée en sénescence accompagnée d'un SASP robuste capable de favoriser l'hyperprolifération de cellules avoisinantes (Sun et al., 2018).

3.2.2 Rôle dans les pathologies liées à l'âge

Le SASP joue un rôle majeur dans le vieillissement ainsi que l'apparition des maladies liées à l'âge. Avec le temps s'installe une inflammation chronique de faible intensité appelée « inflammaging » responsable de plusieurs phénotypes de vieillissement et de dégénération tissulaire (Franceschi et al., 2007). Le SASP contribuerait de façon importante à l'établissement de l'inflammaging (Coppé et al., 2010).

Certaines études laissent penser que l'inflammation favoriserait la mise en place de la sarcopénie, un syndrome gériatrique se traduisant par une perte de la masse et de la force musculaire chez les personnes âgées. En effet, l'inflammation peut causer une diminution du niveau de IGF-1 dont la baisse est associée à cette maladie (Roth et al., 2006).

Les maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, sont souvent accompagnées d'une augmentation de plusieurs marqueurs de l'inflammation comme IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , PGE2, Nf- κ B, COX-2 et MCP-1 exprimés au niveau génique dans le cerveau (Wyss-Coray, 2006). Cette élévation est corrélée avec la quantité d'amyloïde bêta et la sévérité de la pathologie. TNF α , IL-1 β et IFN ont également été retrouvés au niveau de la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson (Liu et al., 2017).

Des marqueurs de l'inflammation comme IL-6 et CRP semblent également impliqués dans des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose (Chung et al., 2009).

4. Connaissances actuelles et méthodes expérimentales dans l'étude du SASP

4.1 La spectrométrie de masse : un screening de plus en plus complet et fiable

Ces dernières années, les études sur le sécrétome des cellules sénescents ont recours aux techniques de spectrométrie de masse et à l'analyse en « big data » permettant une représentation quasi-totale des protéines présentes dans le milieu de culture des cellules, et ce de façon non biaisée. Plusieurs méthodes existent mais nous traiterons ici des deux plus utilisées dans l'étude du SASP : les approches SILAC et « label-free ».

4.1.1 La méthode SILAC

La méthode SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture) permet de comparer deux conditions de culture cellulaire différentes en utilisant deux types de milieu de culture différents. Le premier contient des acides aminés naturellement présents dits « légers » tandis que l'on a remplacé dans un acide aminé comme l'arginine de la deuxième condition les atomes de carbone et d'azote par leurs isotopes lourds (^{13}C et ^{15}N). Ces isotopes seront ensuite incorporés lors de la synthèse protéique. Les cellules provenant des différentes conditions seront ensuite ensemencées ensemble à la même densité afin d'être traitées comme un seul échantillon, puis les protéines seront extraites et digérées par la trypsine. L'analyse par spectrométrie de masse LC-MS/MS (pour « Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry ») qui s'ensuit permettra de quantifier les différences du niveau des protéines présentes dans les différentes conditions de culture, en établissant le ratio entre les peptides contenant des acides aminés « lourds » et ceux contenant des acides aminés « légers ».

Une étude récente menée par Wiley *et al.* a utilisé la méthode SILAC pour l'étude du SASP, ce qui a permis de mettre en évidence son implication dans la régulation de l'hémostase (Wiley *et al.*, 2019). Pour cela, ils ont utilisé des milieux conditionnés issus de fibroblastes primaires de prépuces humains quiescents ou rendus sénescents suite à des irradiations. Parmi les 1047 protéines détectées au total, ils ont noté 343 protéines dont le taux de sécrétion est deux fois plus important dans les cellules sénescents comparées aux cellules contrôles. En 2013, Acosta *et al.* avaient également utilisé la méthode SILAC afin de

caractériser le sécrétome de cellules sénescents suite à un stress oncogénique (Acosta et al., 2013b).

Cependant, on peut noter plusieurs inconvénients relatifs à la méthode SILAC : le temps et le coût nécessaires au marquage isotopique, l'utilisation d'un milieu de culture spécifique, la limitation du nombre de conditions testées... Ces difficultés ont conduit au développement de nouvelles méthodes de quantification relative dites en « label-free », c'est-à-dire sans marquage préalable.

4.1.2 Données obtenues par spectrométrie de masse en label-free

Ces dernières années ont connu l'émergence de plusieurs études du SASP réalisées par spectrométrie de masse LC-MS/MS en « label-free ». Cette technique a notamment été rendue possible grâce au développement d'instruments d'analyse de haute résolution comme le spectromètre de type Orbitrap « Fusion ». De plus, libérée des contraintes liées au marquage isotopique, cette technique permet la comparaison d'un plus grand nombre d'échantillons.

Dans un contexte d'étude du SASP, le recours à cette méthode devient courant. En effet, elle permet une comparaison de la quantité relative des protéines sécrétées par des cellules sénescents suite à un ou plusieurs stress différents et dans des cellules contrôles non-sénescents.

Malgré des facteurs communs classiques retrouvés dans la majorité des phénotypes sécrétoires (dits « core SASP »), la composition totale du SASP semble être unique à chaque étude. Elle varie en fonction du modèle étudié (type cellulaire, modèle animal, tissu, lignées ou cellules primaires...), du stress ayant induit la sénescence (stress réplicatif, chimique, UVs, irradiations...) ainsi que de la durée du traitement, du nombre de doses de stress appliquées, mais également de la dynamique spatiotemporelle et le moment où le sécrétome a été récolté par rapport au processus d'installation de la sénescence.

Pour mieux comprendre cette complexité et hétérogénéité du SASP, et afin de caractériser des biomarqueurs fiables du vieillissement, l'équipe de Judith Campisi a pris l'initiative de créer une base de données (www.SASPAAtlas.com) visant à rassembler toutes les données et les résultats obtenus sur la caractérisation de différents SASP chez l'humain

(Basisty et al., 2019). Dans leur étude, Basisty *et al.* ont caractérisé les fractions solubles et exosomales du SASP de deux types cellulaires : des fibroblastes humains pulmonaires IMR90 et des cellules épithéliales rénales corticales, dont la sénescence a été induite par traitements aux rayons X, par un inhibiteur de protéases (ATV, Atazanavir) ou encore par la surexpression du facteur oncogénique RAS.

L'étude des milieux conditionnés par spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence l'existence d'un SASP propre aux exosomes (eSASP) en plus du SASP soluble (sSASP), avec des groupes de protéines sur-sécrétées lors de la sénescence mais aussi une minorité de groupes de facteurs pouvant être sous-sécrétés. En comparant les profils obtenus pour toutes ces conditions, ils ont dressé une liste de facteurs sur-sécrétés dans toutes les conditions analysées, qui avaient d'ailleurs été identifiés comme étant des biomarqueurs de diverses pathologies humaines. Il est à noter que ces nouveaux facteurs formant ce qu'ils ont appelé le « core sSASP » sont différents de ceux composant le « core SASP » précédemment décrit (**Figure 13**). Par rapport aux techniques d'étude du transcriptome, la spectrométrie de masse a donc permis d'élargir l'identification et la quantification des facteurs sécrétés.

En effet, une méta-analyse transcriptomique sur des cellules sénescents avait déjà exploré les différences d'expressions géniques en fonction de trois variables : le type cellulaire, le stress inducteur (sénescence répllicative, sénescence induite par irradiations ou par stress oncogénique) ainsi que le temps après l'induction de la sénescence. En plus de valider l'hypothèse selon laquelle la dynamique temporelle ajoute un niveau de complexité supplémentaire à la composition du SASP, 13 gènes différentiellement régulés dans toutes les conditions testées ont été identifiés (« core transcriptome signatures ») pour la première fois étant donné qu'ils ne font pas partie du « core SASP » originellement décrit (**Figure 13**) (Hernandez-Segura et al., 2017). En plus de la sénescence répllicative et des irradiations citées précédemment, d'autres stress inducteurs comme des traitements à l'H₂O₂ et à la doxorubicine avaient également été étudiés dans le cadre du sécrétome de cellules souches mésenchymateuses issues du tissu adipeux ou de moelle épinière, par spectrométrie de masse LC-MS/MS suivie d'une analyse par ontologie GO (Gene Ontology) des gènes. Cela a permis de distinguer quatre classes communes aux différentes conditions (jonctions cellulaires/cytosquelette/matrice extracellulaire ; processus métaboliques ; facteurs d'oxydo-réduction et des régulateurs de l'expression génique). Aussi, ils ont identifié 11 protéines sécrétées dans toutes les conditions de sénescence, dont 9 appartiennent aux 4 classes

identifiées par l'analyse par gène ontologie et qui n'étaient pas connues du « Core SASP » décrit précédemment (**Figure 13**) (Özcan et al., 2016).

En 2015, une étude menée par Waldera Lupa *et al.* s'est intéressée aux facteurs spécifiquement sécrétés par les cellules cutanées sénescents qu'ils ont regroupés sous le terme de « SAASP » pour « Skin aging-associated secreted proteins » (Waldera Lupa et al., 2015). Ainsi, ils ont pu comparer des fibroblastes humains normaux provenant de donneurs jeunes, d'âge moyen et âgés. L'étude des milieux conditionnés par spectrométrie de masse LC-MS/MS en label-free a permis d'identifier des protéines spécifiquement sécrétées par les fibroblastes intrinsèquement âgés et qui ne font pas partie du « core SASP » décrit par Coppe et al. (**Figure 13**) (Coppé et al., 2010).

5. le SASP comme cible thérapeutique

L'accumulation de cellules sénescents provoque une altération tissulaire pouvant être impliquée dans de nombreuses pathologies, ainsi qu'un phénotype de vieillissement accentué par l'effet paracrine de leur SASP. De ce fait et depuis quelques années, de plus en plus d'équipes s'intéressent à l'élimination des cellules sénescents, ou du moins du SASP, comme stratégie thérapeutique contre les dysfonctionnements tissulaires. Nous avons mentionné précédemment les travaux de Baker *et al.* impliquant une élimination des cellules sénescents via l'utilisation d'une construction génétique sur un modèle de souris, dont les résultats sur la santé et l'espérance de vie étaient prometteurs (Baker et al., 2011). Par la suite, de nombreuses équipes ont recherché des techniques non invasives pour éliminer les cellules sénescents, conduisant ainsi au développement des drogues sénolytiques et sénomorphiques (**Figure 19**).

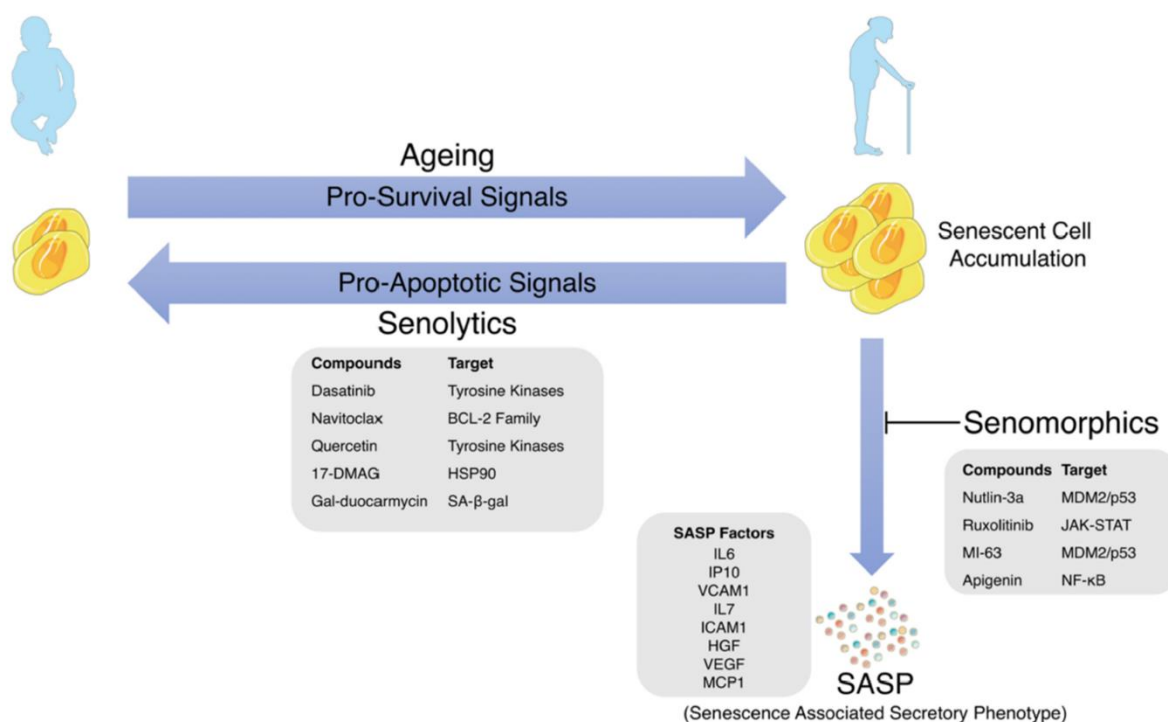


Figure 19. Exemples de quelques sénolytiques et sénomorphiques communément étudiés ainsi que leurs cibles. Les sénolytiques agissent sur les signaux pro-apoptotiques des cellules sénescents afin de limiter leur accumulation, tandis que les sénomorphiques agissent sur le SASP afin de le moduler et d'éviter ses effets paracrines. D'après (Thoppil and Riabowol, 2020).

5.1 L'élimination des cellules sénescents et l'émergence des sénolytiques

Les composés sénolytiques ont la capacité d'induire l'apoptose des cellules sénescents spécifiquement en épargnant les cellules prolifératives non-sénescents. L'utilisation des sénolytiques sur un modèle de souris a permis de retarder, voire prévenir, l'apparition de nombreuses pathologies liées à l'âge.

Cette approche exploite le phénomène de résistance à l'apoptose observé dans les cellules sénescents, mais également dans les cellules cancéreuses, et qui passe par une augmentation des protéines anti-apoptotiques de la famille des BCL-2 (BCL-W, BCL-2, BCL-XL...). Par exemple, l'utilisation d'agents thérapeutiques anti-cancéreux et inhibiteurs des membres de la famille BCL-2, ABT-263 (Navitoclax) et ABT-737 a permis l'élimination spécifique de plusieurs types de cellules sénescents (Chang et al., 2016; Yosef et al., 2016; Zhu et al., 2016). D'autres composés comme le Dasatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, et la Quercétine, un antioxydant polyphénol naturel, sont également capables d'induire une diminution significative du niveau de BCL-XL. La combinaison de ces deux composés (Dasatinib + Quercétine) a permis l'élimination de cellules sénescents chez des souris ayant été soumises

à des radiations, des dommages à l'ADN importants ou encore au cours d'un vieillissement chronologique (Zhu et al., 2015).

Dans cette même étude, Zhu *et al.* ont réalisé un screening utilisant des ARN interférents et identifié six cibles (EFNB1 et 3, p21^{CIP1}, PI3KCD, BCL-xl et PAI-2) dont l'invalidation a induit la mort de pré-adipocytes et cellules endothéliales sénescents.

Une autre voie de signalisation impliquée dans le processus d'apoptose est celle de p53 et sa E3 ubiquitine ligase, MDM2. L'interaction entre ces deux protéines entraîne l'inhibition de l'activité apoptotique de p53. Le traitement avec la drogue UBX0101 d'un modèle de souris atteintes d'ostéoarthrite a provoqué l'affaiblissement de cette interaction et l'augmentation de l'activité de p53, induisant ainsi l'apoptose des cellules sénescents impliquées dans le développement de la maladie. L'élimination des cellules sénescents a permis de créer un microenvironnement pro-régénératif et d'atténuer la dégénérescence du cartilage articulaire (Jeon et al., 2017).

Un autre flavonoïde polyphenol identifié comme étant un composé sénolytique est la fisétine. Le traitement de souris progéroïdes ou âgées avec la fisétine a atténué plusieurs marqueurs de sénescence au sein des tissus. Il a également permis de restaurer l'homéostasie tissulaire, de prévenir des pathologies liées à l'âge et d'améliorer l'espérance de vie (Yousefzadeh et al., 2018).

Récemment, plusieurs études se sont intéressées aux protéines de choc thermique comme cibles thérapeutiques contre la sénescence cellulaire. *In vivo*, l'inhibition de HSP70 avec le composé 17-DMAG sur des souris Ercc1^{-Δ}, dont le système de réparation des lésions induites sur l'ADN est déficient, augmentant leur susceptibilité d'entrer en sénescence, a diminué l'expression du marqueur p16, retardé l'apparition de différents symptômes dus à l'âge et augmenté la durée de vie des individus (Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017).

Aujourd'hui, de nombreux essais cliniques sont en cours afin de tester des molécules sénolytiques dans un cadre thérapeutique. Malgré des résultats prometteurs sur les modèles murins, les composés semblent ne pas avoir la même efficacité en fonction du type cellulaire et du tissu traité. De plus, une étude minutieuse des effets secondaires possibles doit être réalisée. Alternativement, d'autres stratégies moins radicales que l'élimination des cellules ont été envisagées et ont mené, entre autres, au développement de composés dits « sénomorphiques ».

5.2 Les composés sénomorphiques

Les drogues sénomorphiques consistent à atténuer les effets des cellules sénescents sans les éliminer, mais en réduisant la quantité de molécules du SASP et, de ce fait, leurs effets délétères. Ces inhibiteurs du SASP peuvent agir de deux façons différentes. La première consiste à agir directement sur le SASP des cellules sénescents afin d'éviter la propagation du phénotype sénescents par effet paracrine. Le deuxième moyen est de bloquer l'expression des facteurs inflammatoires responsables des déficiences immunitaires afin d'augmenter l'efficacité de l'immunosurveillance (Prata et al., 2018).

Parmi les composés sénomorphiques les plus connus et étudiés, on retrouve la rapamycine (aussi appelée sirolimus) qui est un immunosuppresseur connu de longue date pouvant inhiber la sécrétion de certains facteurs du SASP en se liant avec mTOR. L'expression de la cytokine IL-1 α en est affectée et, par conséquent, l'activité transcriptionnelle du facteur Nf- κ B et l'expression de plusieurs autres facteurs du SASP, ce qui a permis d'atténuer les effets de fibroblastes sénescents murins sur le développement tumoral *in vivo* (Laberge et al., 2015). Par ailleurs, la translocation nucléaire de Nf- κ B ainsi que la phosphorylation de IKK β peuvent être empêchées par la metformine, un antidiabétique désormais classé en tant que composé sénomorphique (Moiseeva et al., 2013).

Le ruxolitinib, un inhibiteur de la voie JAK-STAT responsable de diverses réponses pro-inflammatoires, a prouvé son efficacité en tant que sénomorphique *in vitro* sur des cellules humaines (Xu et al., 2015).

Les molécules permettant l'inhibition des kinases p38MAPK et MK2 représentent un autre moyen efficace de suppression du SASP en culture et permettraient également de prévenir les effets délétères de la sénescence cellulaire (Alimbetov et al., 2016; Hongo et al., 2017).

Bien que le vieillissement soit un processus physiologique inévitable, les stratégies visant à ralentir ou à atténuer l'effet de l'âge sur l'apparition de pathologies se multiplient. La sénothérapie, que nous avons traitée dans cette partie et qui consiste à cibler et éliminer de façon non invasive les cellules sénescents et/ou leurs effets délétères, connaît un réel essor. En effet, en plus des laboratoires de recherche, de plus en plus de startups spécialisées dans la quête de longévité voient le jour. En 2018 par exemple, on estime à 800 millions de dollars la somme investie dans ces startups, représentant une augmentation d'environ 800% comparé à 2015 (**Figure 20**) (CB Insights Research).

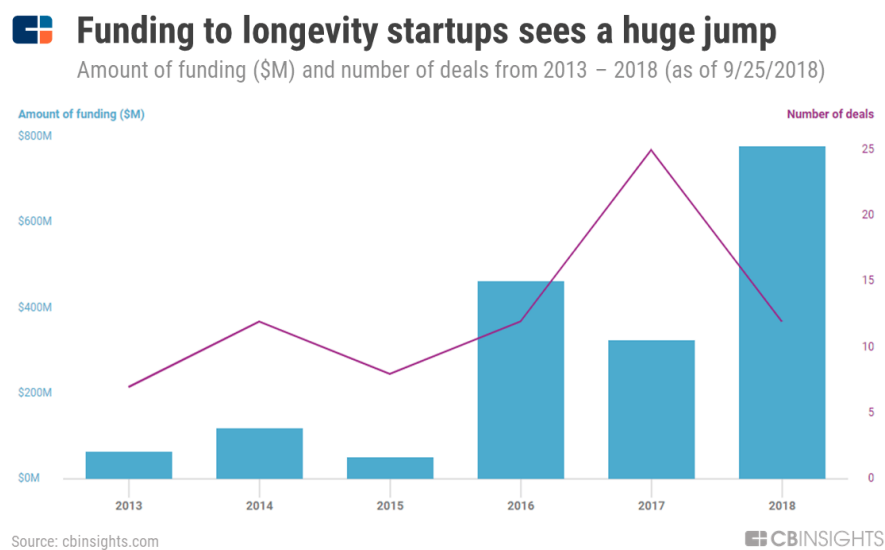


Figure 20. Evolution des accords passés et des financements reçus par les startups spécialisées dans l'étude sur la longévité entre 2013 et 2018. D'après une étude de CB Insights.

Les industries cosmétiques s'intéressent de près aux stratégies anti-âge visant à développer un produit à base de sénolytiques ou sénomorphiques dans le but de ralentir le vieillissement de la peau. En 2020, un premier produit visant à diminuer les effets délétères des cellules sénescents sur la peau a été mis sur le marché par OneSkin. Dans un article divulgué par Oneskin mais qui n'a pas encore été revu par des pairs, l'effet anti-âge observé *in vitro* sur des modèles de peau 3D, mais également *in vivo* sur l'aspect et la fonction de barrière de la peau humaine, est montré comme étant fondé sur l'action du peptide 14 (aussi appelé OS-01) qui agirait en tant que sénomorphique en modulant le SASP et la voie de

signalisation AKT/FOXO afin de diminuer l'accumulation de cellules sénescents (Dolgin, 2020; Zonari et al., 2020). Bien que des études sont encore nécessaires afin d'évaluer l'effet anti-âge de ce produit sur le long terme *in vivo*, l'intérêt suscité après du public et le nombre grandissant de startups créées autour de sénotherapie portent à croire qu'il s'agit du premier d'une longue série de produits cosmétiques développés à partir d'agents sénotherapeutiques.

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous intéresserons au vieillissement prématuré de la peau, et en particulier de l'épiderme, en étudiant les mécanismes associés à la sénescence induite par un stress dans des kératinocytes humains normaux dans le but de pouvoir cibler spécifiquement ces mécanismes dans le cadre de stratégies anti-âge innovantes.

Chapitre III : La peau, indicateur visible direct du vieillissement

I. Structure de la peau

1. L'épiderme, terrain de prolifération et de différenciation des kératinocytes

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau constituant ainsi une interface, voire une barrière de protection, entre l'organisme et l'environnement extérieur. Il est constitué à 90 % de kératinocytes, des cellules épithéliales qui adhèrent entre elles grâce à des jonctions serrées.

Les autres cellules présentes au niveau de l'épiderme sont les mélanocytes qui représentent 5 % du compartiment cellulaire. Ces cellules dendritiques synthétisent la mélanine, un pigment responsable de la coloration cutanée et de la protection contre les rayons UVs. Bien que principalement présentes dans les couches supra-basales de l'épiderme, on peut également retrouver dès la couche basale des cellules de Langerhans impliquées dans la fonction immunitaire. Enfin, les cellules de Merkel, qui sont au contact de terminaisons nerveuses, assurent une fonction de perception sensorielle (Prost-Squarcioni, 2006).

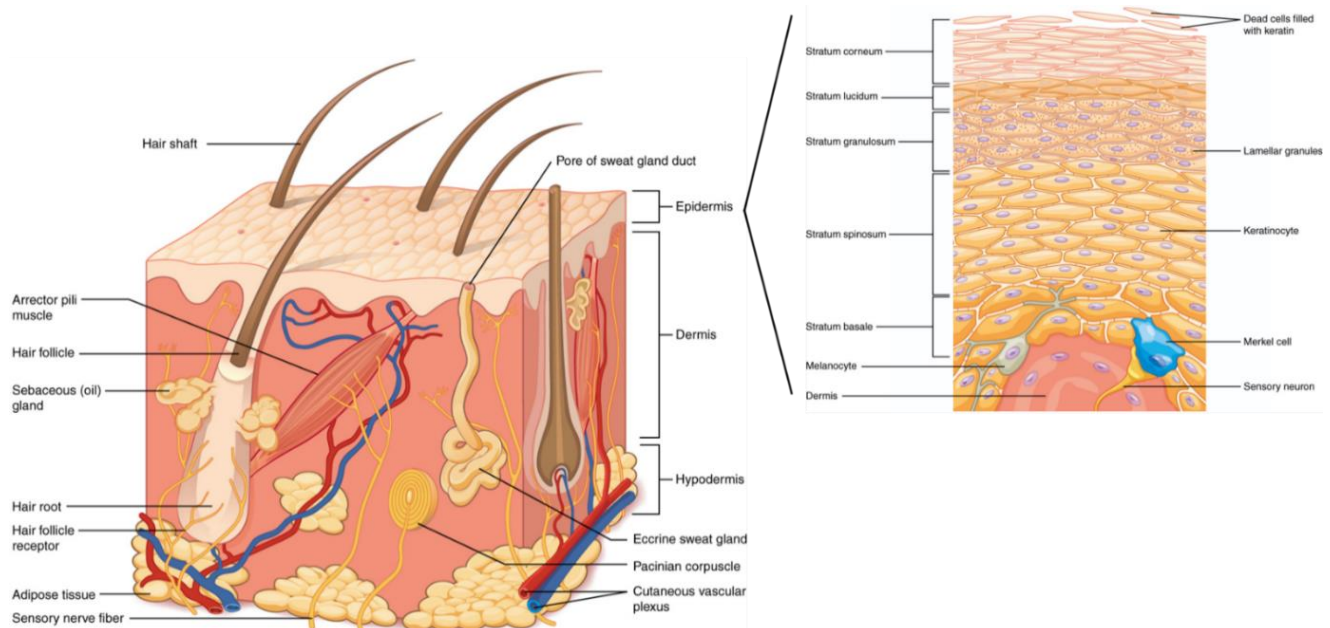


Figure 21. Structure et composition de la peau. La peau est composée de trois couches principales : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme (vue détaillée dans le schéma de droite) est lui-même divisé en plusieurs sous-couches composées majoritairement de kératinocytes à différents stades de différenciation. Adapté de (Betts et al., 2013).

L'épiderme est constitué de quatre, ou cinq dans le cas des tissus épais, sous-couches superposées soit de la plus profonde à la plus superficielle (**Figure 21**) (Eckhart et al., 2013; Simpson et al., 2011) :

- La couche basale ou *stratum germinativum* contient des cellules basales à haute capacité proliférative et précurseurs des kératinocytes. Les cellules formées dans cette couche peuvent avoir deux destins différents. Certaines formeront les cellules dites « souches » qui se divisent par mitose afin de produire et maintenir la population de kératinocytes. L'autre partie des cellules basales est repoussée vers les couches superficielles de l'épiderme par les nouvelles cellules en division. Ainsi débute leur processus de différenciation jusqu'à la surface, un phénomène essentiel au renouvellement de la peau.

- La couche épineuse, couche de Malpighi ou *stratum spinosum*, est le lieu où débute la kératinisation et la différenciation des kératinocytes. Ces derniers, compacts et de forme polygonale, ont un potentiel prolifératif diminué. Le cytoplasme de ces kératinocytes contient des filaments intermédiaires de kératine, appelés tonofilaments, qui s'insèrent aux desmosomes afin de permettre la liaison des cellules les unes avec les autres, et aux hémidesmosomes qui sont des jonctions serrées reliant les kératinocytes à la membrane basale.

- La couche granuleuse ou *stratum granulosum*, est formée de cellules contenant des grains de kératohyaline précurseurs de la kératine. La couche granuleuse participe à la fonction barrière de l'épiderme.

- La couche claire ou *stratum lucidum*, qui n'existe que dans les peaux épaisses (comme la paume des mains, les doigts ou la plante des pieds), est constituée d'une couche de kératinocytes aplatis et morts.

- La couche cornée ou *stratum corneum*, est principalement constituée de cornéocytes, cellules polyédriques anucléées et aplaties, remplies de kératines. Elles sont responsables de l'imperméabilité de la peau et de sa protection contre l'invasion des pathogènes. Bien que toujours biochimiquement actifs, les cornéocytes sont en réalité des kératinocytes ayant atteints le stade terminal de leur différenciation et qui seront éliminés par desquamation.

2. Le derme

Le derme, seconde couche de la peau, est relié à l'épiderme par la jonction dermo-épidermique (**Figure 21**). D'une épaisseur moyenne de 1 à 2 mm, il est constitué majoritairement de fibroblastes ancrés dans une matrice extracellulaire fibreuse et élastique composée de fibres de collagène et d'élastine lui conférant respectivement une résistance mécanique et d'élasticité.

Le derme est lui-même composé de deux couches :

- Le derme papillaire que forme la couche supérieure, est caractérisé par son organisation en papilles entre les crêtes de l'épiderme auquel il est connecté. Il constitue une zone où les fibroblastes ont les activités prolifératives et métaboliques les plus importantes.
- Le derme réticulaire est la couche la plus profonde du derme. Si les fibroblastes s'y font plus rares, le tissu conjonctif y est plus dense. En effet, le collagène, plus épais, forme un réseau entrecroisé tandis que les fibres d'élastine sont parallèles à la surface cutanée. Dans cette zone, on retrouve les glandes sudoripares, sébacées, ainsi que des follicules pileux.

3. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau (**Figure 21**). Rattaché au derme par des fibres de collagène et d'élastine, ce compartiment très vascularisé contient les adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage et la libération d'énergie sous forme de lipides. C'est donc un lieu de réserve énergétique qui assure également un rôle de thermorégulation cutanée.

II. Les fonctions de la peau face aux stress environnementaux

Du fait de sa localisation et de son rôle d'interface avec le milieu extérieur, la peau subit en permanence les effets des stress environnementaux, qu'ils soient physiques (UV et radiations ionisantes), chimiques (pollution, tabac...) ou encore biologiques (agents pathogènes) (**Figure 22**). Le terme « d'exposome » représente l'ensemble des expositions d'un individu à ces stress, de sa naissance à sa mort (Krutmann et al., 2017). Ils induisent un état de stress moléculaire dit oxydant qui est dû à un déséquilibre entre la production de

molécules pro-oxydantes et l'activité de systèmes antioxydants, ce qui entraîne des effets délétères sur les cellules de l'organisme. Ces stress environnementaux peuvent causer plusieurs dommages comme une détérioration des membranes cellulaires, des mutations de l'ADN ou des oxydations de protéines.

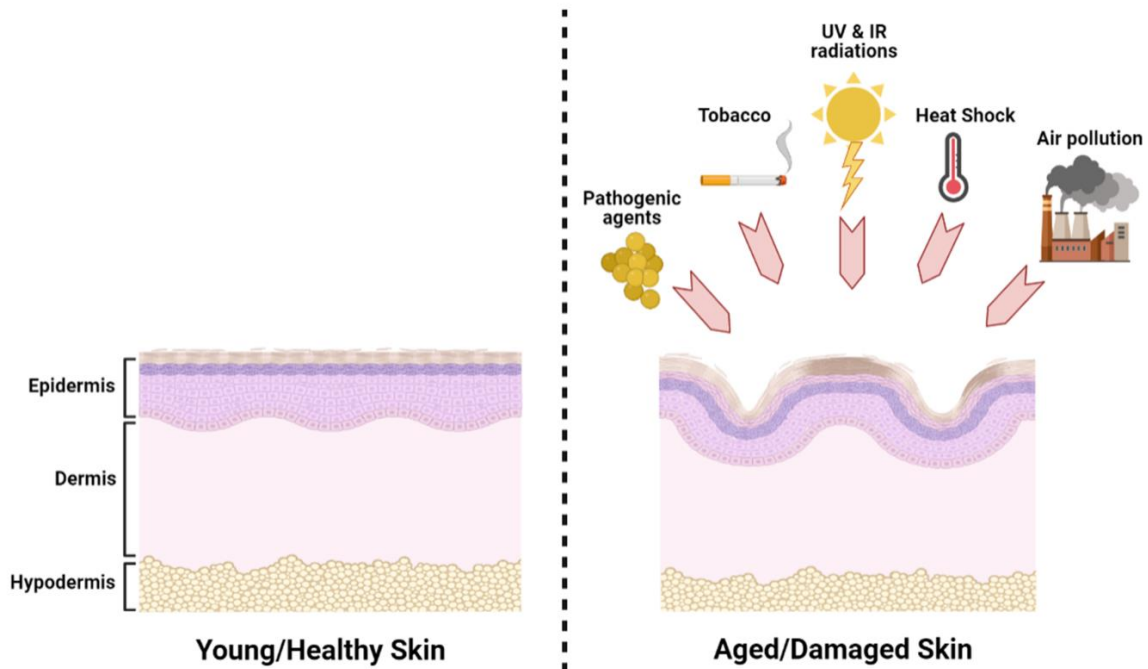


Figure 22. Exposition de la peau à des stress environnementaux. Une exposition chronique d'une peau saine à différents stress environnementaux (les UV, la fumée de cigarette, la pollution atmosphérique, les chocs thermiques ou encore les infections par des agents pathogènes) entraîne son endommagement avec des signes visibles de l'âge.

1. Fonction de barrière physique et chimique

L'épiderme, et plus précisément la couche cornée, constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les agressions physiques extérieures comme les chocs et les frottements.

La couche cornée a une structure très rigide composée d'un réseau de protéines synthétisées par les cornéocytes ainsi que de domaines intercellulaires riches en lipides. Sa capacité de résistance repose également sur les desmosomes qui permettent la cohésion entre deux cellules adjacentes (Kirschner and Brandner, 2012).

La propriété d'extension de l'épiderme, qui dépend en grande partie de l'élasticité des kératines, joue également un rôle important de défense. Les kératines, synthétisées par les kératinocytes, représentent environ 85% des protéines présentes au niveau de la couche cornée. En s'agréant, elles forment une matrice fibreuse intracornéocytaire dont l'élasticité

dépend majoritairement de la teneur en eau de l'épiderme.

Certaines protéines de l'enveloppe cellulaire des cornéocytes comme la filaggrine et l'involucrine agissent avec des lipides de surface, les céramides, afin de lier les molécules d'eau et d'empêcher la perte passive en eau de la peau (Hänel et al., 2013).

Toutes ces structures complexes formeront un réseau compact empêchant l'entrée de pathogènes tout en conservant les propriétés d'hydratation de la peau.

Les mélanocytes présents au niveau de l'épiderme jouent également un rôle dans la protection contre les rayons UV grâce à leur production de mélanine.

2. Fonction de barrière immunitaire

L'imperméabilité de la peau procurée par sa structure compacte n'assure pas une protection totale face à certains organismes du milieu extérieur. En effet, certains microbes parviennent à pénétrer dans l'épiderme voire dans le derme. A ce stade, la fonction immunitaire des kératinocytes prend le relais. Les kératinocytes sécrètent des protéines antimicrobiennes, comme le lysozyme et surtout la RNase 7. Cette dernière est une molécule dont la sécrétion est induite par des cytokines pro-inflammatoires, comme les interleukines IL-17 ou IL-22 ou des bactéries (Schröder and Harder, 2006). Elle est d'ailleurs très efficace dans la protection contre la colonisation de la peau par les bactéries intestinales *Gram+* comme *E.faecium* (Köten et al., 2009).

Les kératinocytes seraient également impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative en présentant l'antigène aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Black et al., 2007 ; Matejuk, 2018).

III. Le processus de sénescence dans les kératinocytes

Lors de ce projet de thèse, nous avons utilisé des kératinocytes humains normaux comme modèle d'étude, un type cellulaire encore peu étudié dans le cadre de la sénescence cellulaire. Dans cette partie, nous passerons donc en revue les modalités et particularités de la sénescence dans les kératinocytes.

1. La sénescence répllicative des kératinocytes, un événement atypique

En 2017, une revue publiée par Abbadie et al. illustre l'entrée atypique en sénescence répllicative des cellules épithéliales, dont les kératinocytes sur lesquels nous allons nous concentrer (**Figure 23**). En effet, *in vitro* et suite à un certain nombre de divisions, ces cellules atteignent un « premier plateau » caractérisé par plusieurs marqueurs classiques de sénescence, comme un changement morphologique, une augmentation de l'activité SA- β Gal, un phénotype sécrétoire ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire majoritairement en phase G1. Cependant, il a été remarqué qu'après quelques jours, une petite portion des kératinocytes, estimée à 1 cellule sur 10^4 , a la capacité de sortir de cet état de sénescence en reprenant la progression du cycle cellulaire, ce qui se traduit également par une perte de l'activité SA- β Gal. Ces cellules dites émergentes prolifèrent jusqu'à atteindre un « deuxième plateau » de sénescence où elles présentent à nouveau un phénotype sénéscent (Abbadie et al., 2017).

Les kératinocytes émergents qui ont quitté le premier plateau de sénescence possèdent un statut particulier de cellules (pré)tumorales ou (pré)néoplasiques. En effet, ces cellules transformées ont la capacité de former des tumeurs et expriment des gènes qui représentent des marqueurs de certains cancers dont ceux de la peau (Martin et al., 2014).

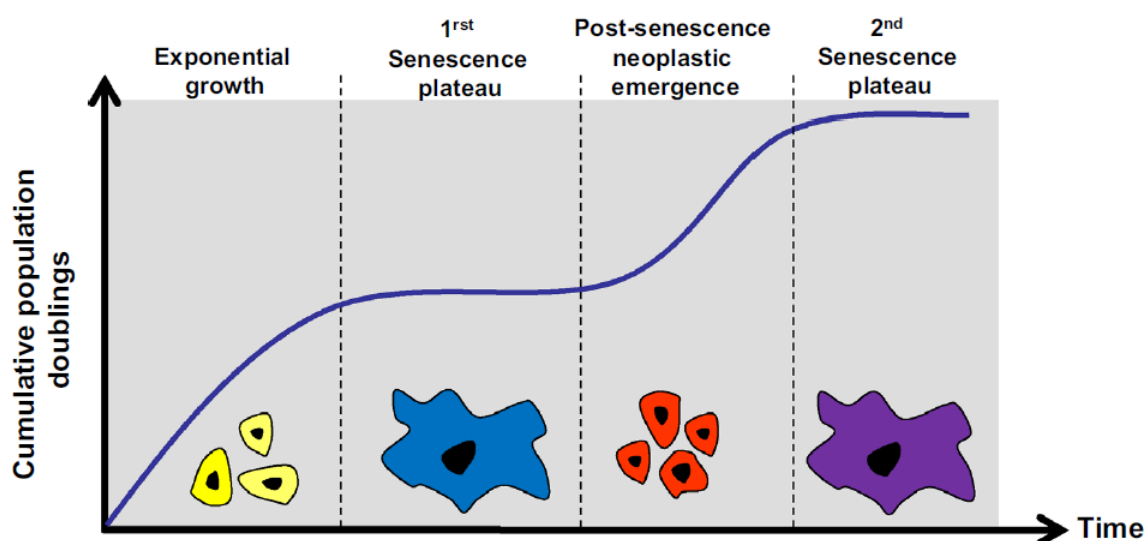


Figure 23. Les étapes de l'établissement de la sénescence de kératinocytes humains *in vitro*. D'après (Abbadie et al., 2017).

Concernant les voies de signalisation impliquées lors de la sénescence des kératinocytes *in vitro*, il a été montré qu'il n'y a pas d'induction de la DDR impliquant ATM et ATR et que la voie p53/p21^{CIP1} est inactivée, contrairement à ce qui est observé dans les modèles de fibroblastes. Cependant, les kératinocytes accumulent des SSB mais sans induction de la voie de réparation des SSB (SSBR) médiée par la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) qui est elle-même inactivée. La génération de SSB et la déficience de l'activité de PARP1 ont été montrées comme provoquées par le stress oxydant associé à une accumulation d'ERO lors de cette sénescence, ce qui provoque l'activation de la voie p38MAPK et, par conséquent, celle de p16^{INK4A}/pRb lors du premier plateau de sénescence (Nassour et al., 2016). La voie p16^{INK4A}/pRb est également activée dans les kératinocytes ayant atteint le deuxième plateau de sénescence.

2. Sénescence des kératinocytes induite par un stress

Bien que les études soient encore limitées, l'exposition à un stress peut induire la sénescence des kératinocytes.

En 2008, Lewis et al. ont montré qu'une seule dose d'UVB suffit à induire la sénescence prématurée de kératinocytes humains normaux par l'activation de la voie p53/p21^{CIP1} (Lewis et al., 2008). L'exposition répétée aux UV d'une lignée de kératinocytes humains immortalisée par l'introduction de la télomérase qui n'exprime pas p16^{INK4A}, a induit l'expression de marqueurs de la différenciation et non ceux de la sénescence (Bertrand-Vallery et al., 2010). Ces résultats ont permis de mettre en évidence la nécessité de l'activation de la voie p16 dans l'induction de la sénescence des kératinocytes. Aussi, il a été montré que l'induction de la sénescence des kératinocytes suite à des traitements à l'H₂O₂ est associée à l'activation de p53/p21^{CIP1}. Bien que H₂O₂ n'ait pas engendré de changements au niveau de l'activité de l'AMPK, l'activation de cette dernière par le resveratrol ou le aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) a permis de reverser le phénotype de sénescence en partie en inhibant p53 (Ido et al., 2012).

3. Le SASP des kératinocytes

Précédemment, nous avons évoqué le rôle du SASP de kératinocytes murins sous OIS dans la régénération tissulaire (Voir Chapitre II – partie II.3.1.1). Dans cette étude, les auteurs ont identifié par puce à ADN l'induction au niveau transcriptionnel de certains composants de ce SASP. L'expression de marqueurs connus de la sénescence et du SASP comme p15 (*CDKN2B*), *IL-1α*, and *HMGA2* ainsi que des facteurs associés au caractère « souche » des cellules est en partie due à l'activation de Nf-κB (Ritschka et al., 2017).

Dans la partie II.4.1.2 du chapitre 2, nous avons abordé les travaux de Hernandez-Segura et al. sur les signatures transcriptomiques de plusieurs types cellulaires dont la sénescence a été induite par différents stress comme l'OIS, la sénescence induite par radiations ionisantes (IRIS) ou la sénescence répllicative (Hernandez-Segura et al., 2017). Parmi les différentes conditions de sénescence, ils ont étudié un modèle de kératinocytes humains primaires sénescents suite à des radiations ionisantes et dont les ARN ont été extraits 4, 10 et 20 jours après le stress afin de prendre en compte les variations du SASP au cours du temps. En comparant la signature transcriptomique des kératinocytes en IRIS avec d'autres types cellulaires en sénescence, ils ont identifié 13 gènes exprimés quels que soient le type cellulaire, le stress inducteur et le moment de collecte des ARN. Parmi ces gènes, on peut notamment citer des facteurs impliqués dans la sénescence comme *PATZ1*, un répresseur transcriptionnel régulant négativement la sénescence, et *CCND1*, un régulateur de CDK4 et CDK6. On a également pu remarquer une augmentation de l'expression des *MMP1*, *MMP3* et *MMP10*, en particulier 10 jours et 20 jours après l'exposition des kératinocytes aux radiations. Marqueurs classiques du SASP, *MMP1* et *MMP3* ont déjà affiché une expression en hausse dans des kératinocytes sénescents par stress UV, à l'exception de *MMP10* (Quan et al., 2009).

Dans des biopsies de peau humaine provenant de donneurs d'âges différents, il a été observé une augmentation dépendante de l'âge de l'activité SA-βgal des kératinocytes au niveau de l'épiderme, mais également des fibroblastes dans le derme, montrant une accumulation de cellules sénescences dans la peau avec l'âge (Dimri et al., 1995). Ces cellules sénescents entraînent des dysfonctionnements cutanés et contribuent ainsi au vieillissement tissulaire.

IV. Vieillissement cutané

Les signes visibles de l'âge, comme les rides, apparaissent en premier lieu sur la peau. Le vieillissement cutané peut avoir deux origines : intrinsèque (chronologique et considérée comme « naturelle ») ou extrinsèque et prématurée (photo-vieillissement, effets néfastes des stress environnementaux...) (Wang and Dreesen, 2018).

1. Vieillissement intrinsèque de la peau

Le vieillissement intrinsèque est commun à tous les autres organes du corps et s'installe inévitablement au cours du temps. Dans la peau, il correspond à une dégradation lente du tissu conjonctif, avec une diminution de la synthèse du collagène et d'élastine.

Le degré d'influence des facteurs intrinsèques est unique pour chaque individu. L'ethnicité tient une part primordiale dans la vitesse de vieillissement. Par exemple, du fait de leur niveau élevé de pigmentation cutanée, les populations afro-américaines sont plus protégées face aux effets néfastes du photo-vieillissement ou de certains cancers associés de la peau. Aussi, l'apparition des rides se fait plus tardivement au sein de la population asiatique. Les variations de l'activité hormonale et le raccourcissement des télomères sont également des facteurs affectant inévitablement la vitesse du vieillissement (Farage et al., 2008).

2. Vieillissement extrinsèque de la peau et effets des stress environnementaux

Le vieillissement extrinsèque, quant à lui, est dû aux stress environnementaux et principalement à l'impact des UV et de la cigarette, induisant un vieillissement cutané accéléré (**figure 13**). Ce dernier est caractérisé par un épaissement de la peau, une pigmentation irrégulière (« taches de vieillesse »), des rides profondes, des anomalies des couches cornées et de la mélanogénèse dans l'épiderme, une élastose solaire ainsi qu'une diminution du collagène, de l'élastine et des fibroblastes du derme.

2.1 Photo-vieillessement

On estime que l'action des rayons du soleil représente plus de 90% des signes visibles de l'âge. Tout au long de la vie, les dommages qu'ils engendrent se superposent à ceux issus du vieillissement chronologique. Les UV regroupent trois types de rayonnements, les UVA, les UVB et les UVC. Bien que la couche d'ozone bloque intégralement les UVC et une partie des UVB, elle laisse passer la totalité des UVA. Ces derniers sont ceux qui pénètrent le plus profondément dans la peau, jusqu'à atteindre le derme où ils provoquent un stress oxydant et donc l'apparition d'ERO. De ce fait, on pense qu'ils favorisent également l'apparition de cancers de la peau. Les UVB pénètrent uniquement l'épiderme et provoquent des dommages au niveau de l'ADN des kératinocytes et des mélanocytes. L'altération de ces derniers peut, par exemple, entraîner l'apparition de taches pigmentaires appelées lentigines.

On note également que les rayons ultraviolets peuvent être à l'origine de l'activation de l'expression de certains gènes en altérant des voies de signalisation impliquées dans l'inflammation ou l'activité de récepteurs de cytokines ou facteurs de croissance (Heck et al., 2004).

2.2 Autres types de stress cutanés

La pollution de l'air due aux activités industrielles, au trafic aérien ou routier est également impliquée dans l'apparition de rides marquées et de taches pigmentaires. Ces conséquences peuvent aussi être dues à l'effet du tabagisme. Ce dernier ralentit la prolifération des fibroblastes, entraînant une diminution de l'efficacité de la cicatrisation. La nicotine, en tant que vasoconstricteur, entraîne une baisse de l'apport en nutriments et oxygène par le sang au derme. De plus, on note une augmentation de l'expression de MITF, un facteur de transcription impliqué dans la mélanogénèse, induisant ainsi une pigmentation anormale. La nutrition joue également un rôle dans le stress cutané. Il a été montré que la consommation élevée d'alcool, de viandes et de produits laitiers semble avoir un effet néfaste sur les lésions cutanées, contrairement aux antioxydants, fruits et légumes, qui semblent les prévenir. Au cours de la vie, l'accumulation de produits avancés de glycation (AGEs) issus de la réaction de glycation participe à l'installation des marques physiques du vieillissement, voire de certaines pathologies comme le diabète. Une consommation excessive de sucres favorisant la formation d'AGES va accélérer le processus de vieillissement.

Chapitre IV : La glycation, à l'origine de composés dicarbonylés et d'AGEs

I. La réaction de glycation, entre formation de composés dicarbonylés et d'AGEs

La réaction de glycation, aussi appelée réaction de Maillard, a été décrite pour la première fois en 1912 par Louis Camille Maillard qui observa un phénomène de brunissement après avoir chauffé du glucose avec de la glycine. La glycation des protéines est une réaction spontanée non enzymatique, qui se déroule naturellement au sein de l'organisme (Vistoli et al., 2013). Elle a lieu entre un groupement carbonyle d'un sucre réducteur et un groupement amine (NH₂) présent dans les acides aminés et, parfois même, dans un lipide ou un acide nucléique. Au sein de l'organisme, le sucre le plus présent étant le glucose, il est donc l'acteur majoritaire des réactions de glycation. Cependant, le fructose, le galactose, le mannose ou encore le ribose peuvent être impliqués dans cette réaction (Shen et al., 2020). Cette réaction réversible forme un composé instable appelé Base de Schiff. Des réarrangements de la base de Schiff entraîneront la formation de fructosamines ou « produits d'Amadori », bien plus stables.

A partir de là, deux scénarios sont possibles, le premier étant la formation directe à partir des produits d'Amadori de produits avancés de la glycation, plus couramment appelés AGEs pour « Advanced Glycation End Products » (**Figure 24**). Parmi les AGEs, on retrouve majoritairement les carboxyméthyllysines (ou CML), les pentosidines formées par voie oxydante et les pyrrolines par voie non oxydante.

Le deuxième scénario possible est la formation de composés 1,2-dicarbonylés comme le glyoxal (GO), le méthylglyoxal (MGO) ou le 3-deoxyglucosone (3-DG) lorsque le pH est acide, ou celle de 2,3-dicarbonyles comme le 1-deoxyglucosone (1-DG) lorsque le pH est basique (Vistoli et al., 2013) (**Figure 24**).

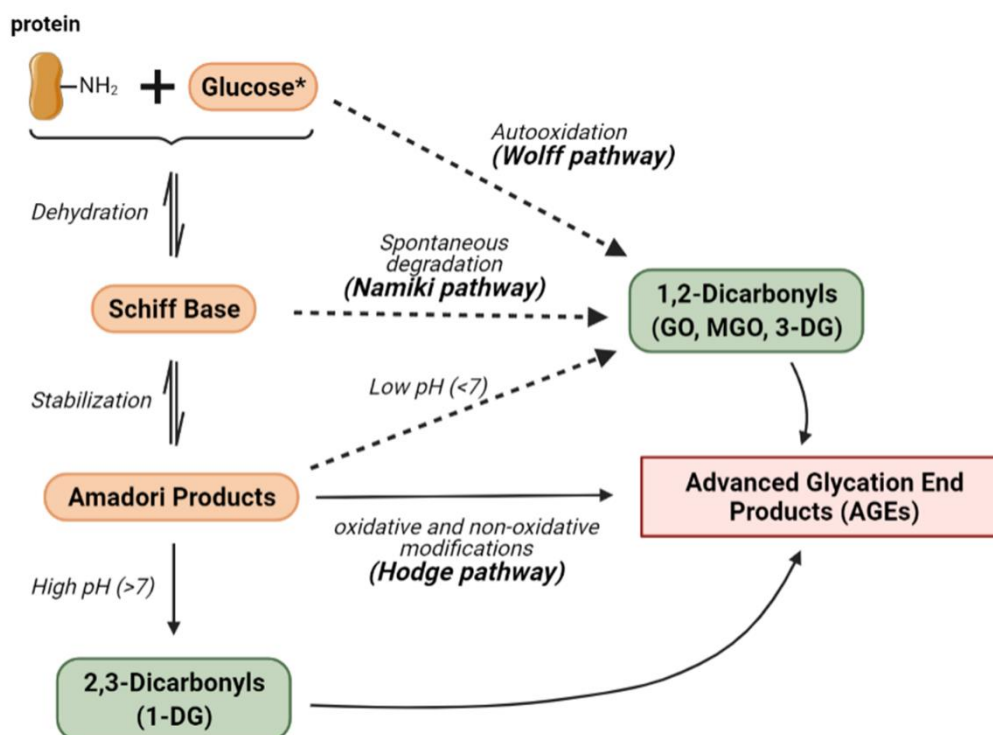


Figure 24. Réaction de Maillard et formation de composés dicarbonylés. La réaction Maillard a lieu entre un groupement amine d'une protéine (mais aussi potentiellement d'un lipide ou d'un acide nucléique) et le groupement carbonyle d'un sucre réducteur formant une Base de Schiff instable puis des produits d'Amadori. En fonction du pH, ces derniers vont donner lieu à différents types de composés dicarbonylés ou de produits avancés de glycation (AGEs) (Hodge pathway). On note également la formation de composés dicarbonylés suite à la dégradation de la base de Schiff (Namiki pathway) ou de l'auto-oxydation du glucose (Wolff pathway). Abbréviations : GO, glyoxal ; MGO, methylglyoxal ; 1-DG, 1-deoxyglucosone ; 3-DG, 3-deoxyglucosone. *Dans ce schéma, le glucose a été choisi afin de représenter le sucre réducteur mais il pourrait également s'agir de fructose, galactose ou encore de mannose.

Il est également à noter la formation possible de composés dicarbonylés à partir des produits d'Amadori et au travers de réactions de fission oxydative ou de fragmentation rétro-aldol. Bien que présents en quantités moins importantes, les composés dicarbonylés sont beaucoup plus réactifs que le glucose et servent également d'agents glycants pouvant interagir avec une protéine afin d'induire de nouvelles réactions de glycation (Thornalley et al., 1999).

La formation de composés dicarbonylés à partir des produits d'Amadori est également connue sous le nom de voie d'Hodge (« Hodge pathway »). Cependant, le clivage des Bases de Schiff (« Namiki Pathway ») et l'auto-oxydation de certains monosaccharides comme le

glucose (« Wolff Pathway ») peuvent aussi entraîner la formation de composés 1,2-dicarbonylés et, par conséquent, la formation d'AGEs (Ott et al., 2014) (**Figure 24**).

II. Autres origines des composés dicarbonylés et de formation d'AGEs

1. Sources endogènes des composés dicarbonylés

Ce projet de thèse portant principalement sur l'étude du glyoxal, nous traiterons essentiellement le cas du glyoxal et, dans une moindre mesure, du méthylglyoxal. Les autres types de composés dicarbonylés ainsi que leurs spécificités ne seront pas abordés.

Comme mentionné précédemment, le glyoxal provient de la réaction de glycation et, plus particulièrement, des produits d'Amadori suite à des réactions d'énolisation. Cependant, il peut également être produit suite à l'auto-oxydation du glucose et à partir de produits de la peroxydation lipidique (Requena et al., 1996). Le méthylglyoxal résulte de la dégradation enzymatique ou non-enzymatique des intermédiaires triose phosphate, glyceraldéhyde 3-phosphate et dihydroxyacétone phosphate, de la glycolyse. Les voies du métabolisme des acides gras (et des acétoacétates) peuvent également être à l'origine de la formation de méthylglyoxal suite à la transformation de l'acétone en acétol par le cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) (Rabbani et al., 2016) (**Figure 25**).

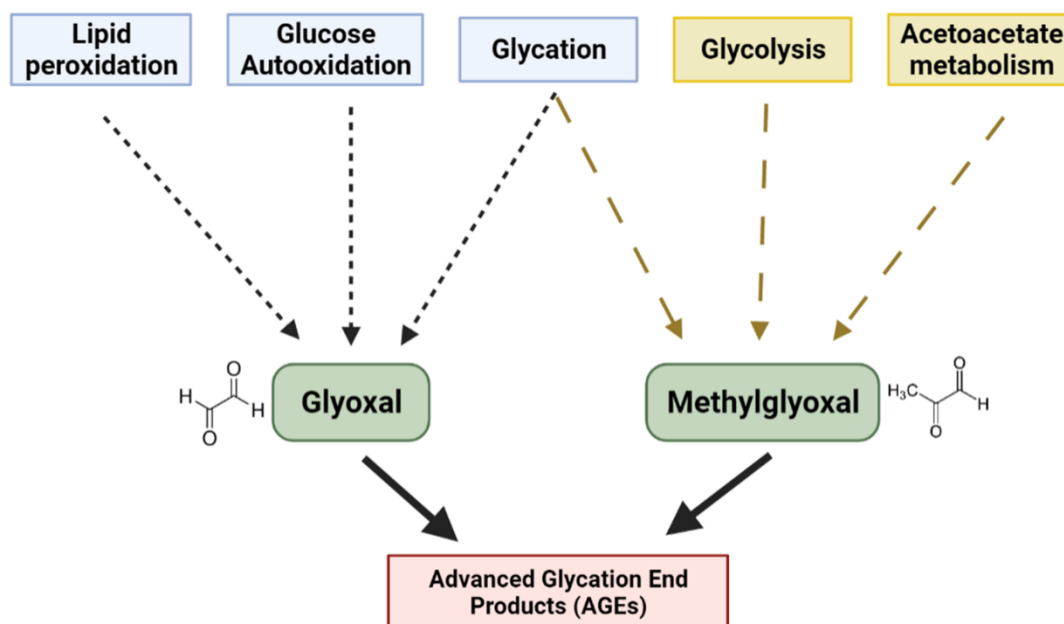


Figure 25. Principales voies métaboliques de formation du glyoxal et du méthylglyoxal. La glycation entraîne la formation de glyoxal et de méthylglyoxal à partir des produits d'Amadori et de la Base de Schiff. Cependant, d'autres voies métaboliques peuvent être impliquées. Tandis que le glyoxal peut être formé suite à l'auto-oxydation du glucose ou à la peroxydation lipidique, la formation du méthylglyoxal peut provenir de la dégradation des triosphosphates lors de la glycolyse ou du métabolisme des acétoacétates avec la conversion de l'acétone en acéto puis en méthylglyoxal.

2. Apports exogènes en glyoxal et déséquilibre homéostasique

Le glyoxal peut provenir de diverses réactions in vivo, mais il a également des origines exogènes pouvant entraîner une accélération de la production d'AGEs. Ces sources exogènes peuvent être de nature alimentaire comme la nourriture ou les boissons, ou encore environnementale comme la pollution. De plus en plus, on s'intéresse à la présence de glyoxal dans les textiles, le papier, le sol ou encore les produits biopharmaceutiques. Un apport externe trop important en glyoxal entraîne une hyperglycémie, une hyperlipidémie et un stress oxydant, ce qui peut altérer l'équilibre entre la production et l'élimination des composés dicarbonylés (Voir chapitre IV - partie IV). Ces derniers vont altérer la conformation structurale de plusieurs macromolécules, entraînant une perte de leurs fonctions biologiques et, de ce fait, de l'homéostasie cellulaire (Barlovic et al., 2010).

2.1 L'alimentation

Lors de la réaction de Maillard, les composés carbonylés peuvent produire des polymères de hauts poids moléculaires appelés mélanoidines et responsables de la couleur marron de certains aliments ayant subi une cuisson à haute température ou des conditions de stockage particulières. Souvent réalisés dans une quête de saveurs et d'apparence attractive, les processus de cuisson visant à dorer les aliments (grillades, fritures, cuissons par un four, barbecue...) sont pourtant générateurs d'une quantité très importante de composés dicarbonylés et d'AGES. Au-delà de la température, un pH élevé, une faible teneur en eau et une quantité importante en lipides et protéines de l'aliment influencent la formation d'AGES (Uribarri et al., 2005).

En 2004, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a publié un rapport portant, entre autres, sur les sources et la toxicité du glyoxal. Il en ressort que les sources alimentaires où le glyoxal a été mesuré en concentrations les plus élevées sont les aliments fermentés et/ou grillés. On peut par exemple citer le café, le pain, le soja, les yaourts, la bière ou encore vin comme sources importantes de glyoxal (World Health Organization, glyoxal report, 2004).

2.2 Sources environnementales

L'exposition au glyoxal peut également être due à des sources environnementales. Son absorption va alors se faire à travers l'intestin, les poumons ou encore la peau. Le glyoxal atmosphérique est présent dans la fumée de cigarette, les pots d'échappements des voitures ou encore la fumée générée suite aux feux de bois résidentiels (World Health Organization, glyoxal report, 2004).

Le glyoxal a également été détecté dans le sol, les eaux souterraines, l'eau de mer et certains sédiments (Fu et al., 2008). Cependant, il est rapidement transformé par des réactions abiotiques faisant intervenir des radicaux hydroxyles (da Silva, 2010).

3. Formation d'AGES à partir des stress dicarbonylés

Au-delà de leur synthèse à partir des produits d'Amadori, les AGES sont en grande majorité formés par les composés dicarbonylés intermédiaires. En se liant spécifiquement à une lysine d'une protéine, le glyoxal va essentiellement former des CML (« N ϵ -Carboxymethyl-

Lysine ») et des dimères de glyoxal-lysine appelés GOLD (pour « Glyoxal-Lysine Dimer ») (**Figure 26**) (Vistoli et al., 2013). De la même façon, le méthylglyoxal va plutôt produire des CEL (« Carboxyethyl-Lysine ») et des MOLD (« Methylglyoxal-Lysine Dimer »).

Suite à des liaisons entre l'arginine, la lysine et le glyoxal, se produit la formation de GODIC (« Glyoxal-Derived Imidazolium Crosslink »). Enfin, la liaison du glyoxal avec deux lysines conduit à un composé appelé GOLA (« Glyoxal-Lysine-Amide »).

La réaction du glyoxal avec un résidu arginine va induire la formation de deux intermédiaires dihydroxyimidazolidine, aboutissant à trois composés finaux : N ω -(carboxyméthyl)-arginine (CMA) ainsi que la N δ -(5-hydro-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (G-H1) et ses deux isomères G-H2 et G-H3.

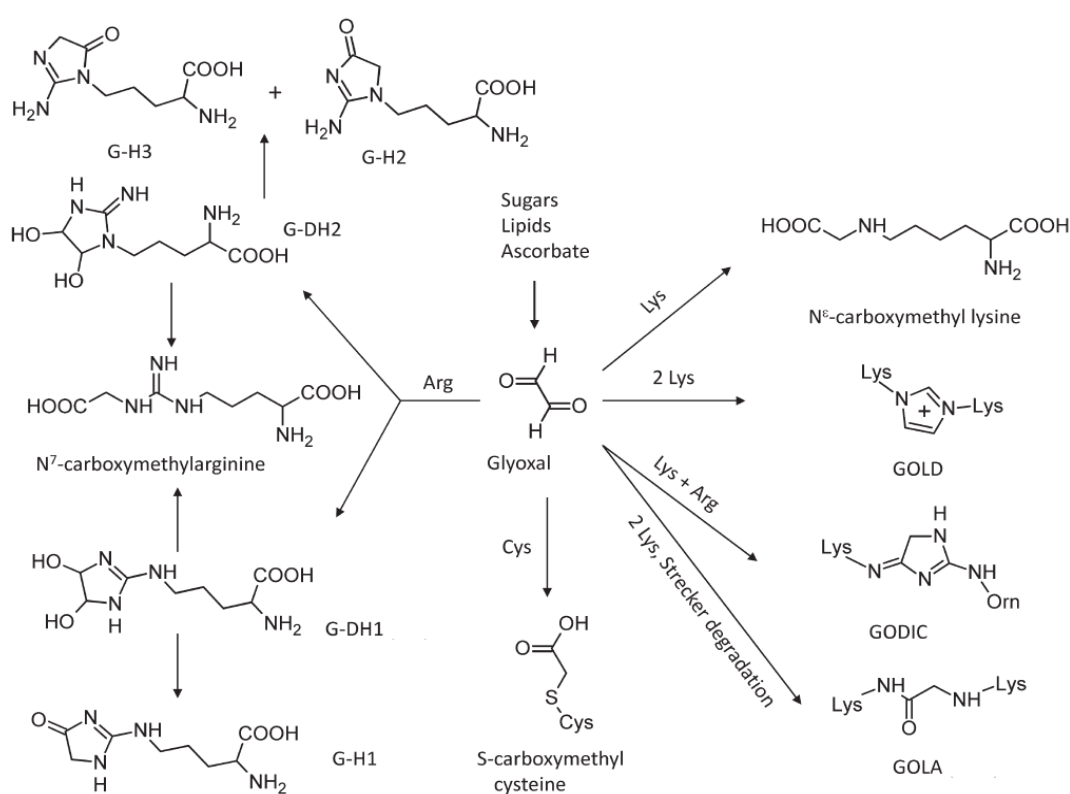


Figure 26. Voies de formation d'AGEs à partir du glyoxal. En fonction du résidu d'acide aminé avec lequel il réagit, le glyoxal peut entraîner la formation de différents types d'AGEs. D'après (Vistoli et al., 2013).

III. Voies de signalisation activées par les AGEs

1. Récepteur aux AGEs (RAGE)

1.1 Structure et fonction du RAGE

Le récepteur cellulaire aux AGEs le plus important et le plus étudié est le RAGE (« Receptor for AGEs »). Il a été décrit comme étant exprimé dans plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes, les kératinocytes, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes, les cellules endothéliales, les cellules dendritiques ainsi que dans les neurones et la glie (Ott et al., 2014). Il s'agit d'un récepteur transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines, comportant un domaine extracellulaire, une hélice transmembranaire et un domaine intracellulaire. La partie extracellulaire est composée d'un domaine variable (V) sur lequel se fixent les ligands et de deux autres domaines constants (C1 et C2) (**Figure 27**). Il existe plusieurs dizaines de ligands aux RAGE comme HMGB1 (« High-Mobility Group Box 1 »), les S100/calgranulines, les peptides β -amyloïdes, mais également les protéines du complément (Asadipooya and Uy, 2019).

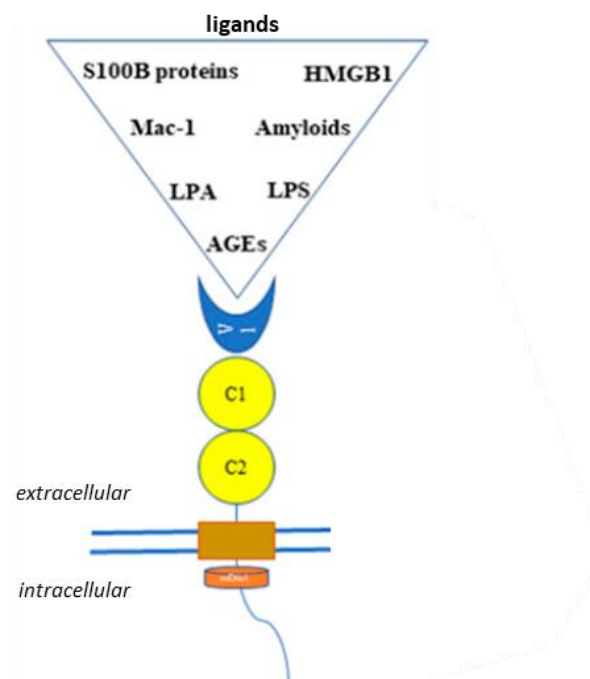


Figure 27. Structure du récepteur aux AGEs, RAGE. RAGE est un récepteur transmembranaire constitué d'une partie variable V1 sur laquelle se fixent différents ligands (HMGB1, AGEs, LPS (lipopolysaccharides), LPA (lipoprotéine(a)), les amyloïdes, Mac-1 (Macrophage-1 antigen) et les protéines S100B) et de deux domaines constants C1 et C2. Adapté de (Asadipooya and Uy, 2019).

1.2 Voies de signalisation activées par RAGE

Il est maintenant connu que les récepteurs sont impliqués dans les effets que les AGEs peuvent avoir sur la cellule via l'activation d'une cascade de signalisation. La fixation des AGEs sur le RAGE entraîne la formation délétère d'ERO et, de ce fait, l'induction d'un stress oxydant. En effet, plusieurs équipes ont montré une augmentation des niveaux intracellulaires de certaines ERO (H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ et NO) dans des cellules endothéliales, des macrophages et des cardiomyocytes après traitements aux AGEs (Cepas et al., 2020). Cette génération d'ERO a été démontrée comme passant, en partie du moins, par l'activation des NOX (Wautier et al., 2001) qui, par la suite, activera le facteur de transcription Nf- κ B (Gloire et al., 2006). Il est important de noter que le RAGE ne possédant pas d'activité tyrosine kinase, l'induction des différentes voies de signalisation par ce récepteur passe par le recrutement de la proto-oncogène tyrosine-protéine kinase c-SRC (Xie et al., 2013). De ce fait, l'activation de RAGE activerait NOX formant des ERO capables d'induire l'activité de c-SRC. Cette dernière activerait ensuite la PI3K, potentiellement par l'intermédiaire de la cavéoline-1 et IGF-1R, ce qui résulte en l'activation par phosphorylation de AKT (Yang et al., 2013). L'activation de AKT par la liaison AGE-RAGE induit l'inhibition de FOXO et l'activation de Nf- κ B, ce qui participe à l'induction de l'inflammation. En effet, comme mentionné précédemment, Nf- κ B tient un rôle crucial dans l'induction de plusieurs facteurs pro-inflammatoires en activant la transcription génique de cytokines, de facteurs de croissance et de molécules d'adhésion (Gloire et al., 2006; Prasad and Mishra, 2018). Depuis plusieurs dizaines d'années, il est connu que l'activation par la liaison AGEs-RAGE de Nf- κ B ainsi que d'un deuxième facteur de transcription, SP1, forme une boucle de rétrocontrôle positif car elle favorise l'expression du gène *RAGE* codant ce récepteur, ce qui participe à l'amplification et au maintien du dysfonctionnement cellulaire (Li and Schmidt, 1997; Tanaka et al., 2000).

D'autres voies de signalisation activées par RAGE et médiées par les ERO peuvent conduire à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans des processus comme l'inflammation, la prolifération cellulaire et l'apoptose. On peut notamment citer l'induction des voies des MAPK avec l'activation des kinases ERK-1 et ERK-2 par Ras, mais également celle de p38MAPK et de JNK, ainsi que de la voie des JAK-STAT (Fleming et al., 2010; Prasad et al., 2017; Rowan et al., 2018) (**Figure 28**).

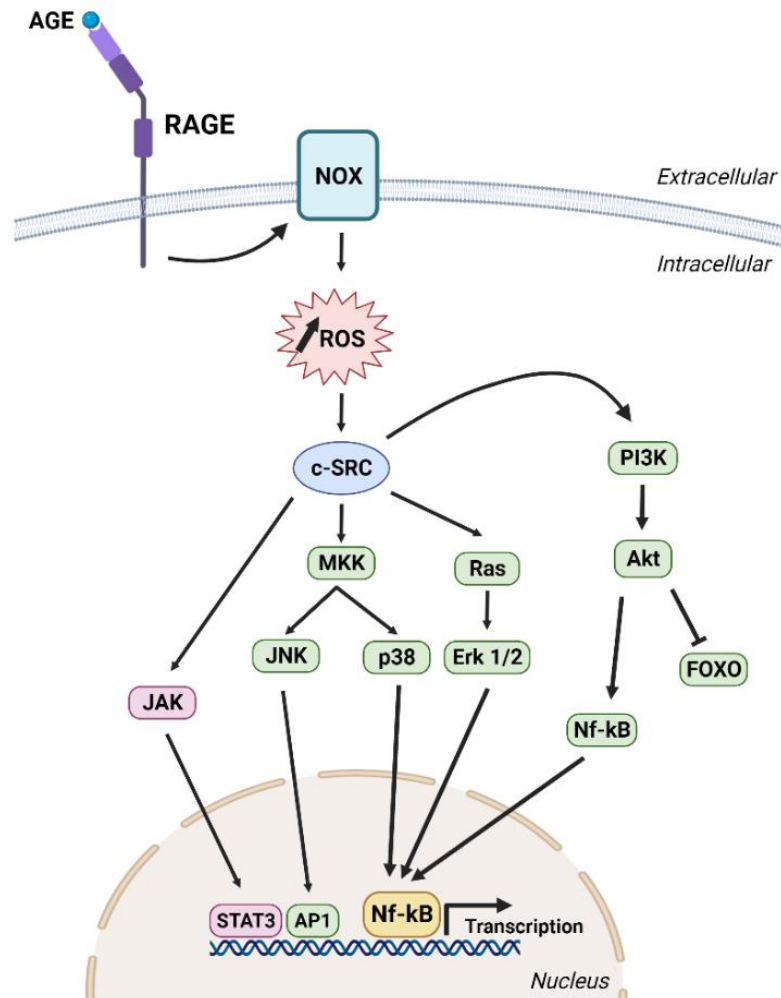


Figure 28. Les voies de signalisation activées par l'induction d'ERO suite à la stimulation du RAGE.

2. Les autres types de récepteurs

Il existe plusieurs autres types de récepteurs aux AGEs comme AGER1 correspondant à la protéine p60/OST-48, AGER2 (80 K-H phosphoprotéine) ou encore AGER3 aussi appelé galectine-3 ou Mac-2. Ils appartiennent à la famille des « AGE-receptor » (AGER) et forment tous les trois un complexe au niveau de la membrane cellulaire, en majorité à la surface des macrophages. Ces derniers possèdent également un autre type de récepteurs aux AGEs appartenant à la famille des « scavenger receptors » comme le SR-A, le cluster de différenciation SR-B/CD36, le SR-B1, SR-E/LOX-1 (« Lectin-like oxidized LDL receptor-1 »), ou encore les récepteurs FEEL-1 et FEEL2 (« Link-containing scavenger receptor 1 & 2 »).

Contrairement au RAGE qui potentialise l'effet délétère des AGEs à travers l'induction de la production de ROS et l'activation de Nf- κ B, les AGE-R servent de mécanisme de défense contre les AGEs (Prasad and Mishra, 2018). Par exemple AGER1, dont le rôle a été le plus étudié, est impliqué dans la capture et la dégradation des AGEs et capable d'entraver l'induction du stress oxydant en inhibant la signalisation RAGE (Lu et al., 2004). Cependant, en plus de ces récepteurs AGER, nous pouvons distinguer d'autres acteurs endogènes impliqués dans la défense contre la formation des AGEs.

IV. Les mécanismes de détoxification

1. Le système des glyoxalases

1.1 Le mécanisme

In vivo, il existe plusieurs mécanismes de défense contre la glycation permettant d'éviter une production excessive et néfaste de composés dicarbonylés. Le plus important est celui faisant intervenir les enzymes glyoxalases 1 (GLO1), 2 (GLO2) et 3 (GLO3). Les glyoxalases 1 et 2 agissent en tandem avec le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur. Elles convertissent les α -cétoaldéhydes glyoxal et méthylglyoxal en D-hydroxyacides.

La glyoxalase 1 catalyse les réactions de transformation du glyoxal et du méthylglyoxal en S-glycolylglutathione et en S-D-lactoylglutathione respectivement.

La glyoxalase 2, une thiol esterase, prend ensuite le relais afin de transformer le S-glycolylglutathione en glycolate et le S-D-lactoylglutathione en D-lactate (Radjei et al., 2014) (**Figure 29**). Ces enzymes agissent donc en amont de la formation d'AGEs.

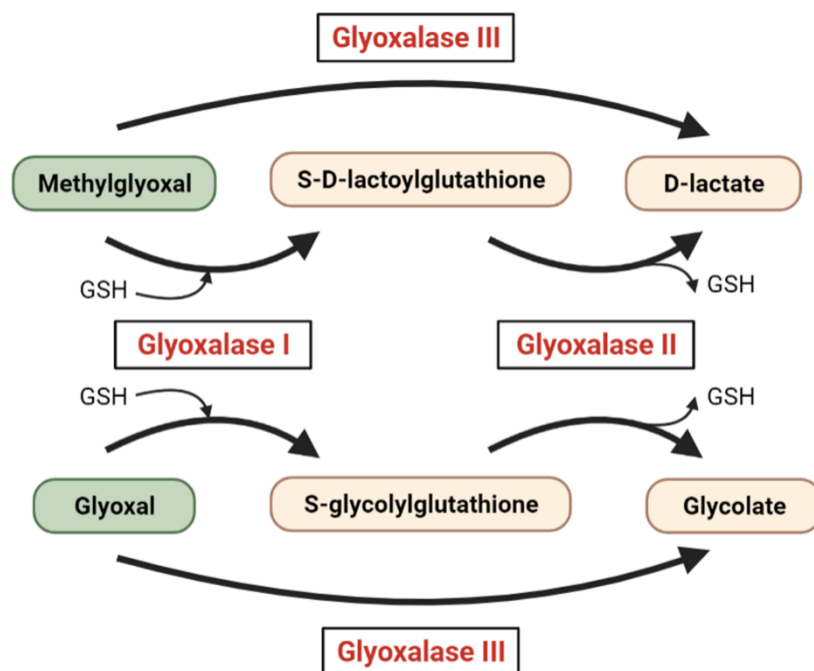


Figure 29. Le système de détoxification des glyoxalases. Les composés dicarbonylés peuvent être éliminés grâce aux enzymes glyoxalases. La glyoxalase I catalyse les conversions GSH-dépendantes du méthylglyoxal en S-D-lactoylglutathion et du glyoxal en S-glycolylglutathion. La glyoxalase II participe à la transformation de ces derniers en D-lactate et en glycolate respectivement et permet de régénérer le GSH consommé lors de la première étape. Moins efficace que les glyoxalases I et II, la glyoxalase III (ou DJ-1) permettrait également la détoxification du glyoxal et du méthylglyoxal.

D'autres protéines comme la glyoxalase 3 décrite chez *Escherichia coli*. et la protéine déglycane (DJ-1) chez l'homme, aussi connue sous le nom de PARK7, possèdent une activité glyoxalase et agissent de façon indépendante du GSH afin de catalyser la transformation du méthylglyoxal en D-lactate. Au fil des études, plusieurs fonctions ont été attribuées à DJ-1 : celles de facteur de transcription, de régulateur de l'activité mitochondriale, de protéine chaperonne, de protéase...Ceci peut expliquer le fait qu'on puisse la localiser dans le cytoplasme, le noyau mais également dans la mitochondrie (Ariga et al., 2013).

La protéine DJ-1 humaine ainsi que ses homologues chez la souris et *C.elegans* a un rôle protecteur contre la mort cellulaire induite par la toxicité du glyoxal (Lee et al., 2012). Elle pourrait de plus réparer les acides aminés et les protéines glyquées par le glyoxal ou le méthylglyoxal. En 2017, Richarme *et al.* ont montré que DJ-1 peut même prévenir la glycation des acides nucléiques (Richarme et al., 2017).

1.2 Les glyoxalases dans la peau

Le rôle des glyoxalases dans les processus de vieillissement de la peau demeure encore mal connu. Cependant, une étude réalisée sur des fibroblastes de souris a montré que la baisse de l'efficacité des mécanismes de cicatrisation avec l'âge est associée à une diminution de l'expression et de l'activité de la GLO1, même si aucun mécanisme moléculaire n'a été décrit (Fleming et al., 2013).

Cependant, une étude menée par Radjei *et al.* sur des coupes de peau a montré que GLO1 et GLO2 sont principalement détectées au niveau de l'épiderme et très faiblement dans le derme, en plus d'être surexprimées chez les donneurs âgés par rapport aux donneurs jeunes. Il a également été montré que, lors du chrono-vieillessement, le niveau de CML était drastiquement diminué dans l'épiderme comparé aux tissus jeunes. Ce résultat peut s'expliquer par la surexpression des glyoxalases dont l'activité détoxifiante joue un rôle protecteur contre le vieillissement au niveau de l'épiderme mais qui peut être compromis lors du photo-vieillessement (Radjei et al., 2016).

D'autres pathologies, comme le diabète, peuvent être associées à une diminution de l'activité des glyoxalases induisant une augmentation importante du niveau d'AGEs. Par exemple, dans un modèle de peau élaboré à partir de cellules cutanées issues de patients diabétiques et de neurones sensoriels de porc, la diminution de la capacité des cellules à développer des neurites, signe d'une interaction neuro-cutanée, est liée à une diminution de l'activité de la GLO1 qui n'assure plus la détoxification du méthylglyoxal (Reichert et al., 2017).

DJ-1 joue également un rôle de défense contre la glycation au niveau de la peau, étant donné que sa surexpression dans des cultures de kératinocytes humains HaCaT induit une réduction du niveau d'AGEs (Advedissian et al., 2016).

1.3 Altérations du système des glyoxalases et implication dans les pathologies

Etant donné leur rôle d'enzymes détoxifiantes, plusieurs études se sont intéressées à l'implication des glyoxalases dans l'apparition ou l'aggravation de pathologies.

Par exemple, un déficit du niveau de GLO1 ou de son activité semble favoriser la mise en place de l'obésité. En effet, une surexpression de GLO1 empêche le gain de poids et d'adiposité chez un modèle de souris suivant un régime alimentaire riche en graisses (Rabbani

and Thornalley, 2019). L'effet bénéfique de cette surexpression est également retrouvé dans le cadre du diabète et de ses complications car il permet de prévenir la néphropathie diabétique, la rétinopathie ainsi que la neuropathie (Rabbani and Thornalley, 2019). Récemment, il a été reporté chez des patients atteints de rétinopathie diabétique une diminution de l'expression génique de GLO1 qui contribuerait au développement de la pathologie (Rasul et al., 2018).

Le bon fonctionnement du système des glyoxalases semble crucial dans la protection contre les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Jiang et al., 2018; Solti et al., 2020). Aussi, une mutation de DJ-1 favorise le développement de la maladie de Parkinson (Tao and Tong, 2003) tandis que sa surexpression réduit l'agrégation de l' α -synucléine dans des cellules Neuro-2A suite à un stress méthylglyoxal (Sharma et al., 2019).

L'expression et l'activité de la GLO1 ont été montrées accrues dans plusieurs types de tumeurs, suite à une augmentation du niveau cellulaire de méthylglyoxal due aux adaptations glycolytiques des cellules cancéreuses (appelé effet Warburg) (Bair et al., 2010). Cette suractivation de GLO1 pourrait promouvoir la survie et le caractère invasif des cellules tumorales ainsi que la résistance multidrogues. Cette résistance peut également impliquer une surexpression de GLO2 (Thornalley and Rabbani, 2011).

2. Le système des aldo-céto réductases

Au-delà des glyoxalases, les aldo-céto réductases (« AKRs » pour « Aldo Keto Reductases ») peuvent également détoxifier la cellule des effets des stress dicarboxylés, de façon NADPH-dépendante. Elles catalysent la conversion du méthylglyoxal très majoritairement en hydroxyacétone (acétol), mais aussi possiblement en propylène glycol. Quant au glyoxal, elles le transforment en glycoaldéhyde et en éthylène glycol (**Figure 30**) (Ko et al., 2005; Kwon et al., 2012; Rabbani and Thornalley, 2018).

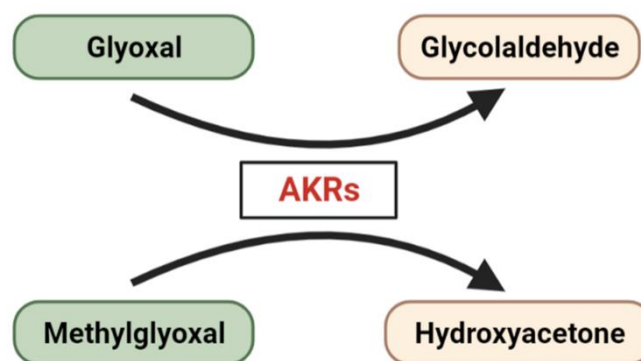


Figure 30. Le système de détoxification des aldose-céto réductases (AKRs). Les AKRs catalysent majoritairement la conversion du glyoxal en glycolaldéhyde et du méthylglyoxal en hydroxyacétone.

L'inhibition pharmacologique ou par délétion génique de l'aldose réductase induit une accumulation d'AGEs dans des cellules endothéliales soumises à de fortes doses de glucose ainsi *qu'in vivo* chez des souris diabétiques, ce qui met en évidence son rôle dans la détoxification des AGEs et la prévention de complications liées au diabète (Baba et al., 2009).

V. Composés dicarbonylés, stress oxydant et pathologies

L'accumulation des AGEs et la stimulation du récepteur RAGE entraînent des effets toxiques au niveau cellulaire et, plus généralement, sur l'organisme. Les composés dicarbonylés comme le glyoxal, en plus d'être une grande source d'AGEs, peuvent être formés via des réactions comme la peroxydation lipidique et produire des molécules oxydantes. Il existe un lien indéniable entre le phénomène de glycation et d'oxydation, regroupé sous le terme de « glycoxydation ». Très délétère, ce phénomène a été montré comme étant impliqué dans l'accélération du processus de vieillissement ainsi que dans de nombreuses pathologies comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer ainsi que certaines formes de cancer (**Figure 31**) (Aldini et al., 2013) .

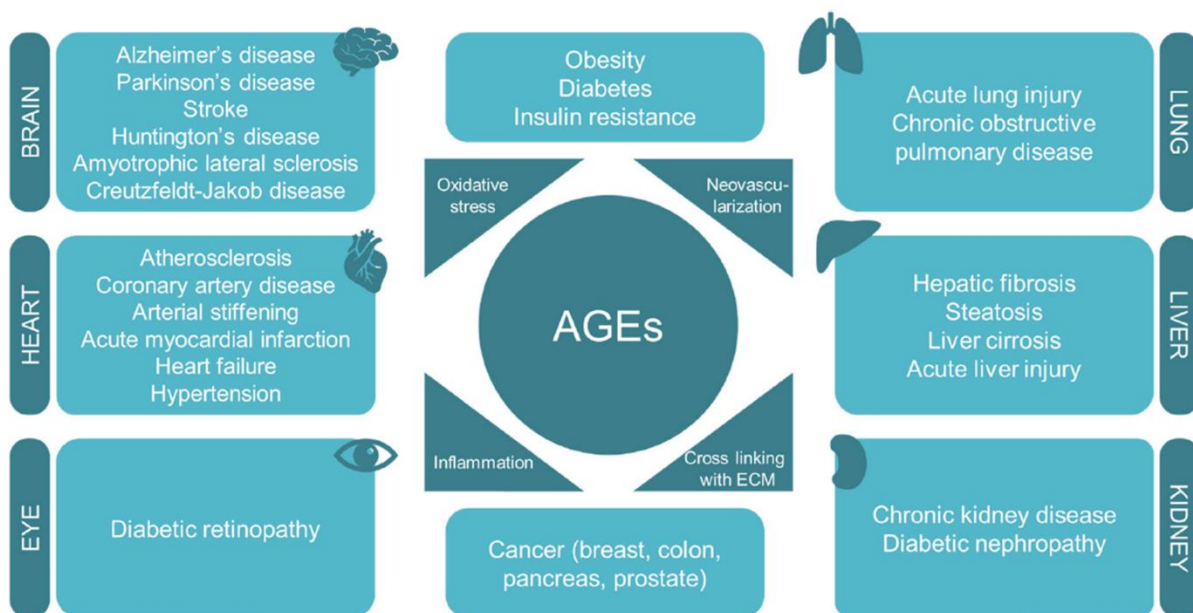


Figure 31. Implication des AGEs dans de nombreuses pathologies dont certaines liées à l'âge.
D'après (Cepas et al., 2020).

1. Implications des AGEs dans le vieillissement cutané

Le lien entre le vieillissement des tissus et l'accumulation des AGEs a été montré dès les années 90 grâce à une étude menée sur l'humain ainsi que sept autres espèces de mammifères. Une corrélation inverse entre l'accumulation au niveau cutané de pentosidine, un marqueur de la glycoxydation, avec l'âge et l'espérance de vie a été mise en évidence (Sell et al., 1996). Peu après, Petropoulos et al. ont montré que des kératinocytes extraits d'épidermes de donneurs âgés ainsi que des kératinocytes humains en sénescence répliquative subissent une accumulation de protéines oxydées, glyquées et modifiées par peroxydation lipidique associée à une altération de l'activité du protéasome (Petropoulos et al., 2000).

Dans la matrice extracellulaire du derme mais également de l'épiderme, les AGEs s'accumulent dans les fibres de collagène et d'élastine conduisant à une perte de l'élasticité et une augmentation de la rigidité de la peau (**Figure 32**) (Gkogkolou and Böhm, 2012; Paeon et al., 2014). Les AGEs formés suite à l'exposition aux UV peuvent également entraîner une accumulation d'ERO associée à une diminution de l'activité d'enzymes détoxifiantes comme la catalase et la dismutase superoxyde et ils seraient potentiellement impliqués dans l'élastose solaire (Fournet et al., 2018).

De plus, les AGEs semblent impliqués dans le photo-vieillessement car ils peuvent promouvoir la mélanogénèse de la peau sans pour autant augmenter le nombre de mélanocytes, mais plutôt en agissant sur l'activation de RAGE (Lee et al., 2016).

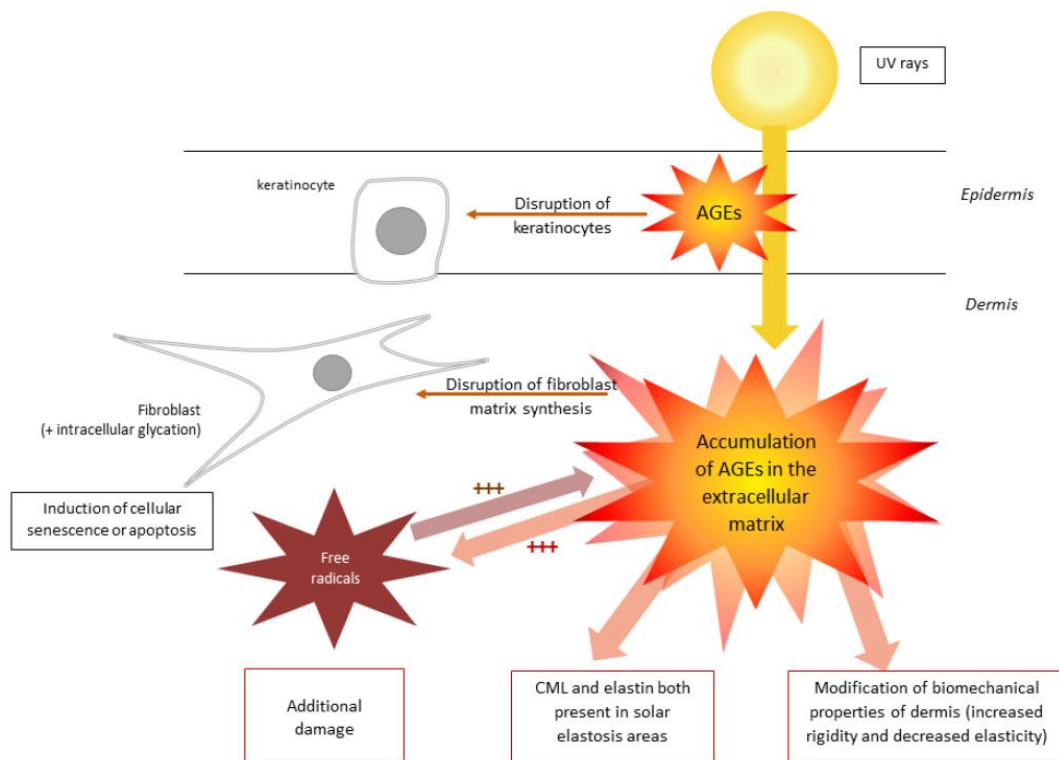


Figure 32. Effets des AGEs sur la peau. D'après (Fournet et al., 2018).

2. Implications des AGEs dans les maladies neurodégénératives

2.1 La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative dont les symptômes les plus fréquents sont des tremblements, une rigidité musculaire ainsi qu'une lenteur des mouvements. Elle est en partie due à une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques situés au niveau de la substance noire du cerveau. Les AGEs sont impliqués dans le développement de la maladie en participant à la formation de corps de Lewy contenant les neurofilaments de α -synucléine. Ils sont d'ailleurs colocalisés avec l' α -synucléine au niveau de la substance noire du cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson (Münch et al., 2000).

Il a été montré que la glycation peut altérer la conformation de l' α -synucléine ainsi que sa capacité à se lier à l'ADN (Guerrero et al., 2013). Cette dernière étude a proposé que l' α -synucléine glyquée, de conformation plus stable, pouvait causer des dommages à l'ADN plus importants que l' α -synucléine non glyquée. En effet, la translocation nucléaire de l' α -synucléine glyquée induit une formation importante de ROS et donc un stress oxydant dans le noyau. Cela entraînerait une expression génique altérée pouvant induire des dysfonctionnements menant à une mort neuronale.

2.2 La maladie d'Alzheimer

L'une des maladies neurodégénératives qui apparaît le plus souvent chez les personnes âgées est la maladie d'Alzheimer. Elle résulte de l'agrégation anormale du peptide amyloïde β (A β) ainsi que de la dégénérescence des neurones du cerveau antérieur et de l'hippocampe qui jouent un rôle dans le processus de mémorisation. Cette dégénérescence neurofibrillaire est en partie imputée à une augmentation de l'état de phosphorylation de la protéine tau. L'implication des AGEs dans la maladie d'Alzheimer a été étudiée. Il a été montré que certains AGEs, pyrraline et pentosidine, sont colocalisés avec les plaques amyloïdes et les lieux de dégénération neurofibrillaire chez des patients atteints d'Alzheimer (Smith et al., 1994). De plus, l'incubation *in vitro* de peptides A β glyqués a montré une toxicité sur des neurones d'hippocampe beaucoup plus importante comparés aux formes natives du peptide A β (Li et al., 2013b). Cette étude a également montré une structure secondaire des A β -AGEs altérée et présentant une meilleure affinité pour le récepteur RAGE. Cela provoque une activation de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) impliquée dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau, entraînant une neurodégénérescence (Li et al., 2012). Les AGEs peuvent également augmenter les niveaux de la protéine précurseur de l'amyloïde, l'APP (« amyloid precursor protein ») et donc le niveau de A β en induisant la production d'ERO. Cet effet des AGEs a pu être bloqué avec de la N-acetyl-cysteine, un antioxydant (Ko et al., 2010). En utilisant des tissus de cerveaux provenant de patients atteints de différents stades de la maladie d'Alzheimer, Kuhla *et al* ont étudié l'état de l'enzyme détoxifiante GLO1. Durant le stade précoce du développement de la maladie, l'expression génique de GLO1 et son activité enzymatique sont augmentées avant d'être fortement diminuées durant les stades intermédiaires et tardifs de la maladie (Kuhla et al., 2007).

On pense également que l'apparition et le développement de la maladie d'Alzheimer seraient favorisés par le diabète, et ce à travers l'implication des AGEs. En effet, la résistance à l'insuline de patients diabétiques serait en partie provoquée par une accumulation d'AGEs suite à l'hyperglycémie dont ils sont souvent sujets. Or, il a été montré que la résistance à l'insuline favorisait l'apparition de processus neurodégénératifs, notamment ceux relatifs à la maladie d'Alzheimer (Carvalho and Cardoso, 2020; Shieh et al., 2020).

3. Implications des AGEs dans le diabète

Le diabète est l'une des maladies les plus répandues avec 466 millions d'individus entre 20 et 79 ans atteints dans le monde en 2019 selon la FID (« Federation Internationale du Diabète») (Fédération Internationale du Diabète). Il peut être de deux types. Le diabète de type 1, dit aussi insulino-dépendant, est caractérisé par une production insuffisante d'insuline causée par une destruction des cellules β du pancréas résultant d'une défaillance du système immunitaire. Le diabète de type 2 est dû à une résistance des cellules à l'insuline. L'insuline devient déficiente et ne parvient plus à réguler le glucose circulant dans le sang afin de le faire pénétrer à l'intérieur des cellules, provoquant ainsi une hyperglycémie chronique. Les complications du diabète apparaissent souvent avec le vieillissement et les patients peuvent développer une néphropathie diabétique, une rétinopathie, une neuropathie, une cardiomyopathie ainsi qu'une angiopathie.

Du fait de l'implication évidente de l'alimentation dans le diabète et l'hyperglycémie associée, le rôle de la glycation et de l'accumulation d'AGEs dans cette maladie a depuis longtemps été étudié. En 1997, Soulis *et al.* ont observé une colocalisation d'AGEs et de RAGE au sein de plusieurs organes de rats diabétiques (Soulis et al., 1997). Lors d'une hyperglycémie, la glycation de l'insuline entraîne une baisse de sa capacité à diminuer la concentration plasmatique en glucose de 20% comparé à l'insuline non modifiée (Boyd et al., 2000). Une étude consistant à nourrir des souris avec de l'albumine modifiée par le méthylglyoxal et contenant des AGEs a montré une augmentation de la résistance à l'insuline, du stress oxydant ainsi que de l'inflammation. Cette résistance à l'insuline pourrait être expliquée par la suppression du récepteur AGER1 et de la sirtuine 1 entraînant ainsi une perte des mécanismes de défense contre les AGEs (Cai et al., 2012). L'albumine glyquée pourrait favoriser l'apparition de la

vasculopathie diabétique en augmentant l'activité de la NOX ainsi que la production d'ERO dans des cellules endothéliales humaines (Rodiño-Janeiro et al., 2010). Les produits de glycation influencent également les complications qui découlent du diabète, comme par exemple la néphropathie (Yamagishi et al., 2002) ou la rétinopathie diabétique, une atteinte des vaisseaux de la rétine suite à un excès de sucre dans le sang. En effet, le traitement de cellules endothéliales rétinienne avec de l'albumine-AGEs provoque une augmentation de l'expression de ICAM-1 et de la E-sélectine, ainsi que de l'activité de Nf-κB (Moore et al., 2003).

Etant donné l'implication des produits de glycation dans la survenue du diabète, plusieurs biomarqueurs ont été développés afin de contrôler la glycémie ainsi que l'apparition de complications relatives à la maladie. En plus du dosage de l'albumine glyquée comme marqueur de l'hyperglycémie, on peut également citer la détection de la forme glyquée de l'hémoglobine A, l'hémoglobine A1C (HbA1c) dont la glycation est proportionnelle à la quantité de glucose dans le sang (Krhač and Lovrenčić, 2019). Le dosage d'HbA1c, couramment utilisé dans les laboratoires d'analyse, permet d'évaluer la glycémie du patient diabétique sur les 2 à 3 mois précédents le dosage et d'évaluer les risques de complications (Lyons and Basu, 2012).

4. Implications des AGEs dans les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde et représentent à elles seules un tiers des décès (World Health Organization). L'axe AGEs/RAGE a souvent été étudié dans le cadre des complications cardiovasculaires.

En 2007, Uribarri *et al* ont montré qu'une seule prise d'une boisson (préparée à partir de glucose et de Coca-Cola light sans caféine) contenant des AGEs suffisait à induire une augmentation de marqueurs de l'inflammation ainsi qu'une altération de la fonction microvasculaire chez des individus atteints de diabète ainsi que chez des individus sains (Uribarri et al., 2007). De plus, il a été montré qu'une concentration plasmatique élevée en AGEs, et plus particulièrement en CML, chez des patients souffrant d'une insuffisance cardiaque chronique augmente la sévérité de la maladie (Hartog et al., 2007).

Des souris soumises à une alimentation riche en CML présentent un développement accéléré du vieillissement artériel dépendant du récepteur RAGE. En effet, ces souris ont

présenté une augmentation de l'expression génique de RAGE et VCAM-1 au niveau de la paroi aortique (Grossin et al., 2015).

5. Implications des AGEs dans les cancers

Au cours du vieillissement, les risques de développer un cancer sont très fortement augmentés et constituent la première cause de mortalité chez les personnes âgées entre 65 et 84 ans (Insee). Cela est en partie favorisé par l'apparition du phénotype de sénescence avec l'âge qui contribue à la progression du cancer via l'installation d'un SASP pro-tumoral ([Voir chapitre II - partie II.3.2.1](#)).

Compte tenu de la nature multifactorielle des cancers, l'implication des AGEs et de leurs récepteurs a beaucoup été étudiée. Par exemple, les interactions entre AGEs et RAGE peuvent promouvoir le développement et l'invasion de cellules cancéreuses mammaires (Sharaf et al., 2015) et de prostate (Ishiguro et al., 2005).

Une forte expression de RAGE a également été décrite dans plusieurs types de cancers comme celui du sein, le cancer cérébral, colorectal, le mélanome, le lymphome, le cancer du côlon, de la prostate ou encore ovarien (Logsdon et al., 2007). D'ailleurs, le traitement de souris déficientes en RAGE avec du TPA (« 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate »), un inducteur de l'inflammation provoquant des tumeurs dans la peau, a permis de montrer leur résistance face au développement cancéreux. En effet, le peu de tumeurs développées par ces souris étaient de plus petite taille et de stade moins évolué en comparaison aux tumeurs des souris contrôles exprimant RAGE (Gebhardt et al., 2008).

VI. Impact des composés dicarbonylés et des AGEs sur l'induction de la sénescence cellulaire

Malgré l'implication avérée des composés dicarbonylés dans le vieillissement et la progression de plusieurs maladies, encore très peu d'études se sont intéressées au rôle du méthylglyoxal, et surtout du glyoxal, dans l'induction d'une sénescence cellulaire prématurée. Cependant, une étude sur des cellules primaires vasculaires endothéliales humaines (HVECs) a montré qu'un traitement avec des doses répétées et subcytotoxiques (150 µM-300 µM) de

glyoxal et/ou de méthylglyoxal induisait leur sénescence. La caractérisation de cette dernière s'est traduite par un changement de morphologie, une induction du marquage SA- β gal, un arrêt du cycle cellulaire, une augmentation de l'expression de p21^{CIP1}, une diminution du niveau protéique de la GLO1 ainsi que l'induction d'un stress oxydant, avec le glyoxal uniquement (Navarrete Santos et al., 2017).

Dans le cerveau, une étude très récente a permis de voir l'effet du méthylglyoxal sur un modèle de souris ayant subi une injection quotidienne de D-galactose pendant 10 semaines. Ce traitement a induit une augmentation des niveaux de méthylglyoxal au niveau du cortex cérébral, pouvant s'expliquer par une défaillance du système de détoxification se manifestant par une baisse du niveau protéique et de l'activité enzymatique de la GLO1. Des déficiences cognitives liées à l'apprentissage et à la mémoire, l'induction d'un stress oxydant ainsi que d'une réponse inflammatoire ont également été observées, appuyant ainsi l'hypothèse d'une induction de la sénescence dans le cerveau par le méthylglyoxal (Li et al., 2019).

De plus, le traitement de cellules souches mésenchymateuses immortalisées de moelle osseuse avec du glyoxal a induit plusieurs marqueurs classiques de sénescence, ainsi que des dommages à l'ADN (Larsen et al., 2012).

L'implication des stress dicarbonylés dans l'induction d'une sénescence prématurée des cellules cutanées a été très peu étudiée et aucun mécanisme moléculaire n'a encore été mis en évidence. Cependant, nous savons que l'exposition aigüe de fibroblastes et kératinocytes HaCaT humains au glyoxal et au méthylglyoxal induit des dommages à l'ADN et la glycation de protéines nucléaires (Roberts et al., 2003). Il a également été reporté que les stress dicarbonylés peuvent induire la sénescence prématurée de fibroblastes et de kératinocytes humains normaux (Berge et al., 2007; Sejersen and Rattan, 2009).

CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Contexte du projet

A l'état physiologique, de nombreux processus comme la glycation, l'autooxydation du glucose, la peroxydation lipidique ou encore la fragmentation des trioses phosphates entraînent la production de composés dicarboxylés comme le GO et le MGO. Ces derniers peuvent également avoir une origine exogène étant donné qu'ils sont retrouvés à une forte concentration dans certains aliments, boissons ou encore dans l'atmosphère. Aussi, les composés dicarboxylés entraînent la production d'AGEs, délétères pour l'organisme. Au cours de la vie, une exposition répétée aux sources externes de composés dicarboxylés ainsi qu'une altération du métabolisme, notamment glucidique, souvent associées à une diminution de l'activité du système de détoxification des glyoxalases, entraînent un déséquilibre entre leur production et leur élimination. L'accumulation de GO, MGO et des AGEs associés provoque un état de stress oxydant favorisant le vieillissement et l'apparition de diverses pathologies (voir chapitre IV - Partie V).

Au niveau cellulaire, le vieillissement normal ou pathologique est caractérisé par la mise en place de la sénescence cellulaire. Elle peut être due à un raccourcissement des télomères ou, dans le cadre d'une sénescence induite de façon prématurée, à l'exposition à différents stress (rayonnements UV ou ionisants, stress oxydant, oncogènes...).

Malgré l'implication des AGEs dans le vieillissement et certaines pathologies, peu d'études se sont intéressées aux effets des composés dicarboxylés dans l'induction de la sénescence cellulaire (voir chapitre IV - partie VI). Dans la peau, des études anciennes avaient montré que le GO et le MGO pouvaient être impliqués dans la sénescence de fibroblastes et kératinocytes humains mais les mécanismes sous-jacents et la détermination des voies de signalisation impliquées restent inconnus à ce jour (Berge et al., 2007; Sejersen and Rattan, 2009).

La sénescence est un processus bien étudié et caractérisé par un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire, un changement morphologique ou encore la sécrétion de plusieurs facteurs comme les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance, regroupés sous le terme de SASP pour « Senescence-Associated Secretory Phenotype ». En fonction du contexte biologique, le SASP peut avoir des effets bénéfiques sur le développement embryonnaire, la cicatrisation et en agissant en tant que suppresseur tumoral, ou il peut avoir des effets

délétères en favorisant la progression tumorale ou l'inflammaging. Il est important de noter que la composition du SASP est très hétérogène et dépend de plusieurs facteurs comme le type cellulaire, la nature et la durée du stress inducteur de sénescence. Aussi, le SASP peut avoir un effet autocrine afin de renforcer l'état de sénescence de la cellule l'ayant sécrété, ou un effet paracrine afin de provoquer la sénescence des cellules avoisinantes prolifératives. L'effet paracrine du SASP possède donc un rôle majeur dans la propagation du phénotype sénéscent dans les tissus et sera au cœur de notre projet visant, à terme, à développer une stratégie anti-âge innovante.

But du projet et stratégie anti-âge

Mon projet de thèse s'articule autour de la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le vieillissement accéléré cutané. En tant que barrière avec l'environnement externe, la peau est constamment soumise à des stress endogènes et exogènes qui favorisent l'apparition de signes visibles de l'âge mais également de certaines pathologies. A ce jour et malgré le développement de nombreuses stratégies anti-âge, la recherche de moyens ralentissant l'impact des stress environnementaux sur la peau constitue encore un défi scientifique majeur pour les entreprises cosmétiques.

De plus, les fibroblastes constituant le modèle cellulaire classique dans l'étude de la sénescence induite *in vitro*, peu d'études se sont consacrées à la compréhension des mécanismes propres aux kératinocytes (Debacq-Chainiaux et al., 2012). Pourtant, ces derniers composent la couche la plus superficielle de la peau, l'épiderme, et constituent donc la première ligne de défense contre les stress environnementaux. De ce fait, nous avons choisi les kératinocytes humains normaux primaires (NHEK pour « Normal Human Epidermal Keratinocytes ») comme modèle d'étude.

Le but de ce projet consiste à étudier les mécanismes impliqués dans la sénescence des NHEK induite par le GO et de caractériser son phénotype sécrétoire que nous avons appelé GASP pour « Glyoxal-Associated Secretory Phenotype ». En particulier, nous nous sommes intéressés au GASP « précoce » associé aux premières étapes de la sénescence, avant la mise en place complète du phénotype sénéscent. L'objectif à long terme serait d'identifier des

ingrédients sénomorphiques pouvant cibler des protéines spécifiques du GASP « précoce » afin d'atténuer son effet paracrine et éviter la propagation du phénotype sénescence aux cellules prolifératives avoisinantes (**Figure 33**).

Objectifs

En premier lieu, l'objectif de mon projet de thèse a consisté à mettre au point un modèle d'induction de sénescence médiée par des traitements au GO sur des NHEK prolifératifs. La sénescence induite a été caractérisée par l'évaluation de plusieurs biomarqueurs classiques comme l'arrêt de la prolifération cellulaire, l'augmentation de l'activité SA- β -galactosidase et la diminution de l'expression génique de *LMNB1*. Nous avons également cherché à déterminer si les traitements au GO induisaient un état de stress oxydant au sein des cellules.

Nous avons ensuite déterminé les voies de signalisation impliquées dans l'induction de la sénescence cellulaire en étudiant l'expression des différents acteurs des voies régulant la sénescence cellulaire directement après le stress GO pendant la phase précoce de la sénescence, mais également une fois le phénotype sénescence installé et maintenu en phase tardive.

De plus, nous nous sommes intéressés à la caractérisation du phénotype sécrétoire associé à la sénescence induite par le GO et que nous avons appelé GASP, en faisant l'hypothèse que ce GASP serait différent d'un SASP dit classique décrit dans la partie introduction. Comme mentionné précédemment, le but du projet à plus long terme serait d'agir en amont de l'installation du phénotype sénescence en modulant l'effet paracrine du GASP grâce à des composés sénomorphiques. Il nous paraissait donc important de définir le GASP précoce mis en place lors des premières étapes du processus de sénescence. Une caractérisation non ciblée du GASP précoce par spectrométrie de masse a été réalisée et le profil sécrétoire a été comparé avec un SASP collecté à partir de NHEK soumis à une sénescence répllicative.

En parallèle, nous avons cherché à voir l'effet du glyoxal sur un modèle d'épiderme humain reconstruit (RHE) en évaluant l'expression génique de certains marqueurs de sénescence ainsi que l'altération morphologique du tissu.

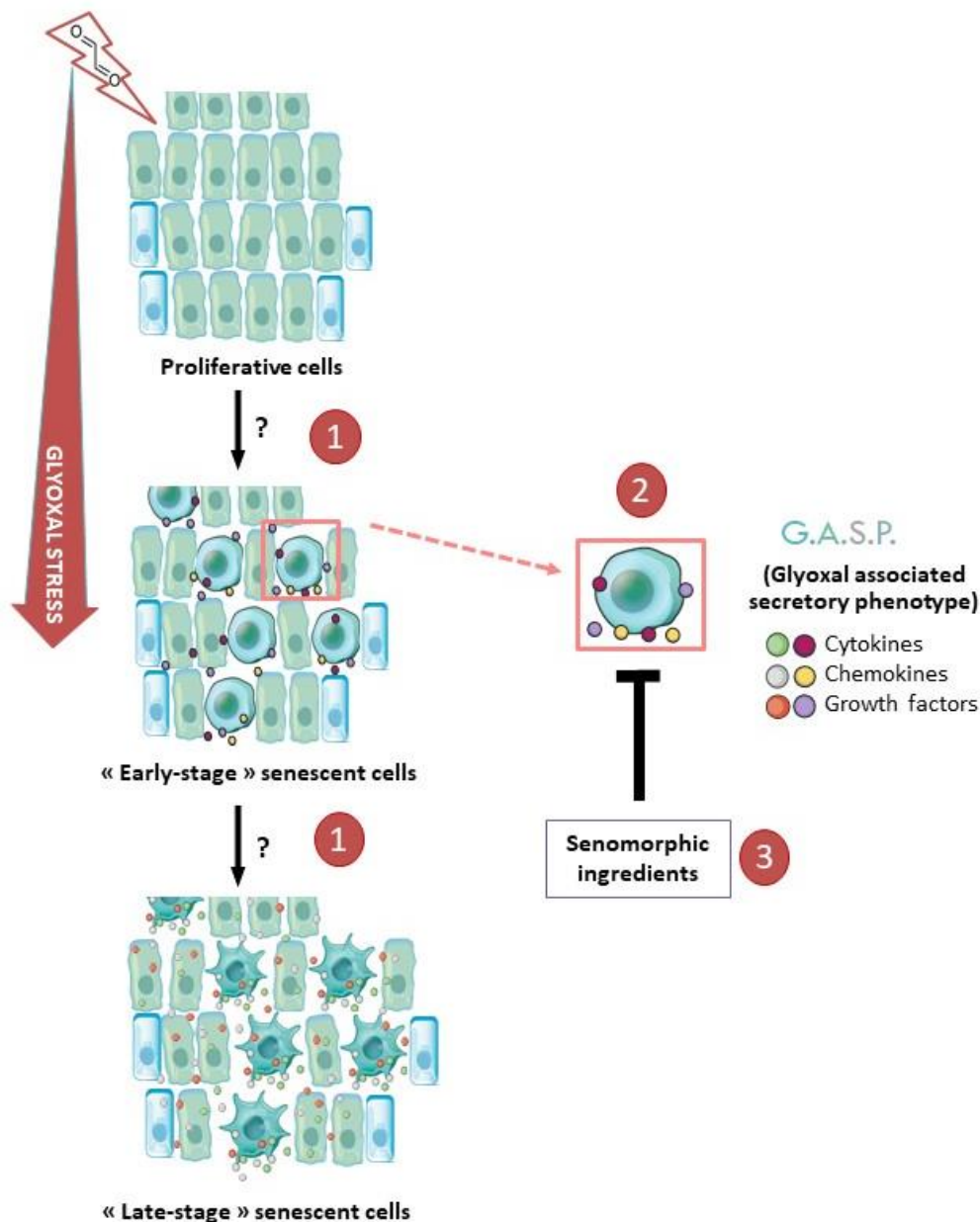


Figure 33. Objectifs du projet de thèse et stratégie anti-âge. (1) La première étape du projet a consisté à déterminer si le glyoxal est capable d'induire la sénescence des kératinocytes humains normaux prolifératifs. Il s'agissait ensuite de distinguer les voies de signalisation impliquées dans les différentes phases de la mise en place du phénotype sénescence avec une phase « précoce » (« early-stage » senescence) et une phase tardive (« late-stage » senescence). (2) La deuxième étape concerne la caractérisation du GASP propre à la phase précoce de la sénescence afin d'identifier des cibles potentielles pouvant être modulées à l'aide de composés sénormorphiques (3), afin d'atténuer l'effet paracrine du GASP.

RESULTATS

Présentation de l'article

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet de thèse est synthétisé et présenté sous la forme d'un article portant le titre suivant : « Glyoxal induces senescence of human keratinocytes through oxidative stress and the AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} pathway ».

Cet article est actuellement soumis.

Dans le cadre du projet et de cette publication, nous avons collaboré avec Virginie Salnot, ingénieure sur la plateforme de protéomique 3P5 de l'Université de Paris pour l'identification et la quantification du GASP précoce et du SASP, ainsi que pour les analyses statistiques associées.

Une seconde collaboration a été initiée avec la compagnie Ashland à Sophia Antipolis, et en particulier avec Christophe Capallere et Christelle Plaza, afin de produire des épidermes humains reconstruits (RHE) et de mettre au point un modèle de traitements des RHE au GO.

Glyoxal induces senescence in human keratinocytes through oxidative stress and activation of the AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} pathway

Rym Halkoum^{1,2}, Virginie Salnot³, Christophe Capallere⁴, Christelle Plaza⁴, Aurore L'Honoré¹, Karl Pays², Bertrand Friguet¹, Carine Nizard² and Isabelle Petropoulos^{1*}

¹Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Institut de Biologie Paris-Seine, Biological Adaptation and Ageing, B2A-IBPS, 75005 Paris, France.

²LVMH Recherche. Life Science Department, 185 Avenue de Verdun, 45800, Saint Jean de Braye, France.

³3P5 proteomics facility, Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 Paris, France.

⁴Ashland, Global Skin Research Center, Advanced Skin Research & Bioengineering Dept., Sophia Antipolis, France.

*Corresponding author: ¹Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Institut de Biologie Paris-Seine, Biological Adaptation and Ageing, B2A-IBPS, 75005, Paris, France.
isabelle.petropoulos@sorbonne-universite.fr

Short title: Glyoxal-induced senescence of human keratinocytes

Abbreviations: AGE: Advanced Glycation End Products; ANOVA: Analysis of Variance; CEL: N ϵ -carboxyethyl-lysine; CML: N ϵ -carboxymethyl-lysine; DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole; EDU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; GASP: Glyoxal-Associated Secretory Phenotype; GO: Glyoxal; LMNB1: Lamin B1; MGO: Methylglyoxal; NHEK: Normal Human Epidermal Keratinocytes; PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen; PBS: phosphate buffered saline; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; RHE: Reconstructed Human Epidermis; RHOA, Transforming protein RhoA; ROS: Reactive Oxygen Species; RPS7, 40S ribosomal protein S7; RS: Replicative senescence; SA- β Gal: Senescence-Associated beta-galactosidase; SASP: Senescence-Associated Secretory Phenotype; SEM: standard error of the mean; THBS2, Thrombospondin-2; YBX1, Y-box-binding protein 1

ABSTRACT

Senescence is a well-characterized cellular state associated with specific markers such as permanent cell proliferation arrest, and the secretion of messenger molecules by cells expressing the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). The SASP composition depends on many factors such as the cell type or the nature of the stress that induces senescence. Since the skin constitutes a barrier with the external environment, it is particularly subjected to different types of stresses, and consequently prone to premature cellular aging. The dicarbonyl compounds glyoxal and methylglyoxal are precursors of Advanced Glycation End-products (AGEs), whose presence marks normal and pathological aging. In this study, we demonstrate that glyoxal treatment provokes oxidative stress by increasing reactive oxygen species and AGEs levels and induce senescence in human keratinocytes. Furthermore, glyoxal-induced senescence bears a unique molecular progression profile: an “early-stage” when AKT-FOXO3a-p27^{KIP1} pathway mediates cell-cycle arrest, and a “late-stage” senescence maintained by the p16^{INK4}/pRb pathway. Moreover, we characterized the resulting secretory phenotype during early senescence by mass spectrometry. Our study provides evidence that glyoxal can affect keratinocyte functions and act as a driver of human skin aging. Hence, senotherapeutics aimed at modulating glyoxal-associated senescence phenotype holds promising potential.

INTRODUCTION

Skin aging is a multi-faceted biological process sculpted by both intrinsic and extrinsic factors (Wang and Dreesen, 2018). Aging not only modifies skin appearance, but also alters its physiological functions, including the thinning of the epidermis, impaired barrier function and increased susceptibility to physical insults and infections (Chambers and Vukmanovic- Stejic, 2020). At the cellular level, aging results in decrease of cellular replicative capacity and accumulation of senescent cells in both the epidermis and dermis (Velarde and Demaria, 2016).

Cellular senescence in skin is mostly attributed to replicative stress induced by telomere shortening (Hayflick and Moorhead, 1961). Other contributing factors include oxidative stress, UV radiation or exposure to xenobiotics (Debacq-Chainiaux et al., 2016). Senescent cells exhibit several hallmarks including permanent cell-cycle arrest, enlarged and flattened shape, high Senescence Associated- β -Galactosidase (SA- β gal) activity, reduced *Lamin B1* expression and the production of a complex secretome called the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) (Hernandez-Segura et al., 2018). The SASP, whose composition depends on the cell type and the stress origin, comprises a large variety of factors such as inflammatory cytokines, chemokines, growth factors and matrix metalloproteinases. The SASP asserts detrimental effects on senescent cells by acting in an autocrine fashion to reinforce the senescent state of the cell, or in a paracrine fashion to induce senescence in the surrounding cells (Coppé et al., 2010).

Cell cycle arrest is the first detectable event in senescence. It is mediated by the action of cyclin-dependent kinase inhibitors, such as p21^{CIP1} and p16^{INK4}. Activation of the p53/p21^{CIP1} or p16^{INK4}/pRb signaling pathway result in the hypophosphorylation of the tumor suppressor pRb, which blocks the cell cycle progression. However, alternative pathways can also provoke irreversible cell cycle arrest, such as the PI3K/AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} pathway (Liu et al., 2015,

McClelland Descalzo et al., 2016). Specifically, inhibition of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) results in senescence in mouse primary embryonic fibroblast through p27^{KIP1}, independently of p53, p16^{INK4} and p21^{CIP1} (Collado et al., 2000).

Among the oxidizing agents that can affect skin physiology throughout life, the presence of Advanced Glycation End products (AGEs) unequivocally signifies age-associated dysfunctions via reactive oxygen species (ROS) production and proteostasis impairment (Chaudhuri et al., 2018). Important AGEs include Nε-carboxymethyl-lysine (CML) and Nε-carboxyethyl-lysine (CEL). They are end products derived from the reactions between protein lysine residue with glyoxal (GO) and methylglyoxal (MGO), two metabolites predominantly produced during glucose metabolism and lipid peroxidation (Chaudhuri et al., 2018). These dicarbonyl compounds also come from environmental exposure or food consumption (Hellwig et al., 2018). Both are exposome factors that can potentiate skin aging (Krutmann et al., 2017). Glyoxalases can detoxify and prevent dicarbonyl stress (Xue et al., 2011), but certain pathologies, such as diabetes and normal aging can compromise glyoxalases activity, leading to the dysfunction of the clearance system, hence toxic accumulation of AGEs (Radjei et al., 2014).

Despite the established involvement of dicarbonyl compounds in aging and several pathologies development, few studies have investigated their roles in senescence. Recent papers have reported that both GO and MGO can trigger senescence in telomerase-immortalized human mesenchymal or in human vascular endothelial cells (Larsen et al., 2012, Navarrete Santos et al., 2017). In the skin, while some studies show a potential role of dicarbonyl stress in fibroblast and keratinocyte senescence (Berge et al., 2007; Sejersen and Rattan, 2009), the signaling pathways involved in this process remain largely unknown.

In this study, we have investigated the consequences of exposure to low-range doses of GO on epidermis. In normal human epidermal keratinocytes (NHEK), GO exposure led to excessive

ROS production and CML accumulation followed by senescence. Establishment of the senescent phenotype occurred in two steps, involving the AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} signaling pathway at the onset followed by the activation of the p16^{INK4}/pRb pathway. We have shown that this senescence phenotype, which can be reproduced *ex vivo* on reconstructed human epidermis, is accompanied by the production of a specific secretome to which we assign the term “Glyoxal-Associated Secretory Phenotype” (GASP). Our results bring new insights regarding the molecular mechanisms implicated in keratinocytes senescence and skin aging.

RESULTS

Glyoxal treatment induces senescence in normal human keratinocytes

To study the consequences of GO treatment on proliferative keratinocytes, we first seeded NHEK cells at day 0 and treated them with 200 μ M or 300 μ M GO for the next two days (Supplementary Figure S1a). We determined the GO treatment concentrations based on a TUNEL assay performed on the treated NHEK cells. While the 200 μ M treatment did not induce apoptosis, 25% of cells were TUNEL-positive when treated with 300 μ M GO (Figure 1a). Despite the relative toxicity of the 300 μ M treatment, we kept both concentrations in order to investigate the dose-dependent effects.

We tracked the expression profile of different senescence markers at days 3 and 8 to characterize the time course of senescence (Figure 1b-d). Since cell cycle arrest is one of the main features of the senescence, we investigated the effect of the 48h treatment of GO on NHEK proliferation using EdU incorporation. A significant dose-dependent decrease in the number of EdU-positive cells was observed in treated cells compared to control cells (Figure 1b), correlated with the reduced expression of a proliferation marker Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) (Supplementary Figure S1b). As expected, this decrease of cell proliferation

observed at day 3 is followed by the establishment of a complete senescent phenotype at day 8, marked by the positive staining for SA- β Gal in 80% of treated cells compared to 20% in control cells (Figure 1c). Senescence was further demonstrated by a progressive and dose-dependent decrease in Lamin B1 (*LMNB1*) (Figure 1d) and *PCNA* expression (Supplementary Figure S1b), and by the appearance of senescence-associated vacuoles at day 8 (black arrows - Figure 1c).

These results are further confirmed using NHEK cells from a second donor (donor 2, Supplementary Figure S1c and S1d), thus demonstrating that GO treatment of human keratinocytes leads to establishment of a progressive senescence phenotype characterized by an early cell proliferation arrest at day 3, followed by the acquisition of late senescence markers at day 8.

The “early-stage” GO-induced cellular senescence is mediated by the AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} signaling pathway

To determine which signaling pathway can trigger the GO-induced “early-stage” senescence, we analyzed the expression of the classical cell cycle inhibitors, p21^{CIP1} and p16^{INK4} at day 3, using NHEK cells submitted to replicative senescence (RS) as a positive control. No significant changes in either p16^{INK4} or p21^{CIP1} protein levels were observed following GO treatment, in contrast to RS cells (Figure 2a, Supplementary Figure 2a). Consistent with these results, we failed to observe p53 protein activation or modification in GO treated cells compared to the controls (Supplementary Figure S2b), suggesting that the initiation of GO-induced NHEK senescence is unlikely to be mediated by the canonical pathways.

Interestingly, we found significant increase in both p27^{KIP1} protein expression (Figure 2b, supplementary Figure 2c) and mRNA transcripts (Figure 2c) in GO treated cells but not in control cells undergoing RS (Figure 2b).

pRb phosphorylation is a prominent marker of cell cycle progression. At Day 3, we found a significant decrease of pRb phosphorylation following 300 μ M of GO exposure (Figure 2d). These results, which were confirmed using donor 2 NHEK cells (Supplementary figure S2d), indicate that GO-treatment is responsible for the cell proliferation arrest (Figure 1b).

In view of the well-described role of the AKT/FOXO3a pathway in activation of $p27^{KIP1}$ gene expression (Liu et al., 2015), we therefore investigated its involvement in GO-treated NHEK cells. As expected, we found a significant accumulation of FOXO3a protein in GO-treated cell nuclei, revealing its activation (Figure 2e, supplementary Figure 2e). In the absence of physiological stress, the kinase AKT actively phosphorylates FOXO3a and prevents its nuclear translocation. Consistent with this result, we detected predominantly the inactive, non-phosphorylated form of AKT kinase in GO-treated cells. (Figure 2f). Taken together, these results reveal that in human keratinocytes, the AKT/FOXO3a/ $p27^{KIP1}$ pathway drives the GO induced “early-stage” senescence, whereas classical $p21^{CIP1}$ and $p16^{INK4}$ pathways are the key players in replicative senescence.

The $p16^{INK4}$ /pRb pathway is activated during the “late-stage” senescence

Next, we investigated if the activation of AKT/FOXO3a/ $p27^{KIP1}$ was maintained at day 8 in GO treated cells, when the senescent phenotype is fully established (Figure 1c, Supplementary figure S1d). Surprisingly, we failed to observe any modification of $p27^{KIP1}$ expression either at the mRNA (Figure 3a) or at the protein level (data not shown). Moreover, AKT activation in GO-treated and control cells are comparable (Figure 3a), suggesting that the AKT/FOXO3a/ $p27^{KIP1}$ pathway is no longer required for late stage senescence despite a significant decrease of pRb phosphorylation (Figure 3b).

To further document the mechanism by which the GO-induced late-stage senescence was established, we assayed the expression and activation of classical senescence markers at day 8.

While the activation of p53 and the protein levels of p21^{CIP1} (Figure 3c) were similar between control and GO-treated cells, p16^{INK4} expression was markedly increased in GO-treated cells (Figure 3c). These results, along with the loss of pRb phosphorylation (Figure 3b), suggest that while the AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} pathway is required for early cell-cycle arrest, the activation of the p16^{INK4}/pRb pathway is critical for the establishment of the late-stage senescence phase of GO-treated NHEK cells.

Glyoxal treatment leads to oxidative stress in NHEK

As GO treatment results in early activation of the AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} pathway, we reasoned that increased ROS levels together with accumulation of CML-modified proteins could trigger AKT inactivation and subsequent FOXO3a nuclear translocation. To test this hypothesis, we quantified ROS and CML levels in control and GO-treated NHEK cells at one hour and 3 days after exposure respectively. We observed that GO treatment leads to early and dose-dependent increase in ROS levels (Figure 4a), followed by the accumulation of intracellular CML-modified proteins (Figure 4b) at day 3.

Characterization of the GASP (Glyoxal-Associated Secretory Phenotype) from the “early-stage” senescent keratinocytes

Through its paracrine effect, the SASP can induce tissue dysfunction, perturb tissue homeostasis and/or promote senescence of normal neighboring cells. Rational drug design entails the systematic identification and targeting of the SASP components responsible for early activation of cellular senescence. To identify components specifically expressed during the onset of GO-induced senescence, we harvested the culture supernatant from GO-treated, non-treated and replication-senescent cells, analyzed their composition and constructed the GO-

mediated “early-stage” senescence secretome, or “GASP” for Glyoxal-Associated Secretory Phenotype.

We first quantified the gene expression of classical SASP factors. At day 3, interleukins IL-1 α /b, IL-6, IL-8, MMP3 and AREG expressions were upregulated in a dose-dependent manner in GO-treated cells compared to controls (Figure 5a). Similarly, using Multiplex assay, we found that a large panel of cytokines including IL-1 α , IL-1ra, IL-4, IL-7 and IL-8 were secreted by GO-treated cells compared to the control proliferative cells (Figure 5b).

To obtain a more complete GASP composition and to identify early specific markers, LC-MS/MS analyses were performed on secretome samples from control, 3 days GO-treated and NHEK cells submitted to RS. Among the 2096 proteins exhibiting significant variations (Figure 5c), 1015 were found to be more abundant in GO-treated and RS cells (Figure 5d), 37% (152) of them are specific to GO treatments. We cross-compared these proteins with four different databases of known SASP factors (supplementary material, supplementary table S3), and found 12 proteins among the 152 identified as secreted factors (Figure 5e). Notably, four proteins, YBX1, THBS2, RPS7 and RHOA have been previously identified in the “SASP Atlas” (Figure S3), could thus represent new markers of early GASP.

Consequences of glyoxal treatment on reconstructed human epidermis

Encouraged by the senescent phenotypes of GO-treated NHEK cells, we next evaluated the consequences of GO exposure on reconstructed human epidermis (RHE). Nine days after GO treatment, RHE morphology was altered, exhibiting a 20% reduction of thickness in contrast to untreated control (Figure 6a). To investigate whether this alteration correlates to other senescence features, we quantified gene expression for $p27^{KIP1}$, $p53/p21^{CIP1}$ and $p16^{INK4}$ from the whole epidermis and found that $p53$, $p21^{CIP1}$ and $p16^{INK4}$ were significantly upregulated in GO-treated RHE, but not $p27^{KIP1}$. These results further support the conclusion that GO

treatment of RHE promotes senescence in human keratinocytes, leading to a “late-stage” phenotype 9 days after exposure.

DISCUSSION

In the present study, we investigated the consequences of GO exposure on epidermis aging. In NHEK cells isolated from human clinical samples, we show that exposure to low-range doses of GO induces oxidative stress and protein glycation leading to premature senescence. Such senescence occurs in two phases: the early phase is marked by cell cycle arrest and decreased *LMNB1* gene expression and the late phase manifests the positive SA-βGal phenotype.

Analysis of the signaling pathways underlying NHEK cell cycle arrest during the “early-stage” led to the identification of the AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} pathway. Although p27^{KIP1} role in senescence is still poorly described, a few studies have reported its role in replicative and oxidative senescence (Collado and Serrano, 2010; Collado et al., 2000; Tsai et al., 2020), including in dermal stem cells, where p27^{KIP1} is critical for RS after the activation of the PI3K/AKT/FOXO3a pathway (Liu et al., 2015). Surprisingly, in the epidermis, the activation of this pathway is restricted to GO-induced senescence, since no activation of p27^{KIP1} was observed in NHEK cells submitted to RS.

Such activation of AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} pathway is transient since p27^{KIP1} expression and AKT hypophosphorylation were no longer observed during the “late-stage” senescence. In contrast, we demonstrated that maintenance of the cell cycle arrest required for the establishment of the “late-stage” senescence phenotype is accompanied by activation of the p16^{INK4}/pRb pathway. Notably, GO-induced senescence of NHEK does not activate p53,

consistent with reported observations in replicative and oncogene-induced senescence in keratinocytes (Kim et al., 2015).

Abnormal GO production has been reported in several pathological conditions, such as hyperglycemia and diabetes. High glucose concentrations can inhibit embryonic stem cells proliferation through increased ROS levels, leading to activation of FOXO3a/CTNNB1 and upregulation of $p27^{KIP1}$ and $p21^{CIP1}$ expression (McClelland Descalzo et al., 2016). Here, we show that GO treatments of NHEK also increases ROS levels and leads to accumulation of CML-modified proteins, which could explain the activation of FOXO3a and the consequent increased $p27^{KIP1}$ expression.

Ex vivo experiments conducted on RHE showed that GO treatments result in the epidermal thinning that correlates to increased expression of several senescence markers including $p16^{INK4}$, $p21^{CIP1}$ and p53. Our results in both RHEs and NHEK cells clearly suggest that GO, induces keratinocytes senescence that could potentiate and accelerate skin aging.

Given the well-known detrimental effect on senescent cells through SASP production during aging, and the high variability of SASP composition (Basisty et al., 2019), we dissected the early stage secretome composition of GO-treated NHEK (GASP) to uncover specific biomarkers. In addition to the upregulation of a large number of well-known SASP factors like cytokines, growth factors and proteases (Coppé et al., 2010), characterization of the GASP has led to the identification of 152 proteins whose expression was specific to GO exposure. Among these four proteins YBX1, THBS2, RPS7 and RHOA potentially represent new biomarkers of early GASP. Further experiments, including functional analysis of these four molecules in GO-induced senescence of keratinocytes will be relevant for the development of senotherapeutics based strategies to counteract the effects of age on skin.

MATERIALS AND METHODS

Ethical compliance

For cell culture studies, skin samples were collected from anonymous adult patients who have undergone plastic surgeries performed by independent surgeons. Informed consent was obtained for research purposes from each donor.

Cell culture and treatments

NHEK derived from donor 1 (a 48-year-old female) and 2 (a 28-year-old female) were seeded in media 1 (supplementary material), with a density of 10^4 cells/cm² on day 0. Cells were then treated with 200 μ M or 300 μ M of GO (Sigma Aldrich, St Louis, MO) mixed in media 2 (supplementary material) at days 1 and 2. “early-stage” senescent cells were harvested at day 3. To establish “late-stage” senescence, culture medium was switched to media 1 at day 3 and cells were cultured until day 8 (Supplementary Figure S1a).

3D organotypic skin epidermis culture

For the epidermis reconstruction, keratinocytes derived from newborn foreskin were seeded on a 0.5 cm² inert polycarbonate membrane (insert Nunc, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) bathed in a chemically defined media (Ashland proprietary) containing 100 μ M GO. After 48h of culture at the air-liquid interface, the media was changed, and the reconstructed epidermis were placed at the air-liquid interface for the next 9 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Immunofluorescence

TUNEL assay was performed at day 3 in control and treated cells using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) following manufacturer’s instructions. As a positive control, 5U/ μ L of DNase (Macherey-Nagel, Düren,

Germany) was added to the cells for 20 min at room temperature and nuclei were counterstained with DAPI (1:2000) before analyses.

For EdU staining, the Click-iT EdU Cell Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used following the manufacturer's instructions: one day after plating, cells were incubated with 10 μ M EDU for 48 hrs. Detection was performed using Alexa488 as a reactive fluorophore, followed by DAPI staining. Images were acquired on Leica Microsystems, DMi8 microscope and analyzed using Leica Application Suite X Software.

SA- β galactosidase Assay

Senescence associated β -galactosidase assays were performed as previously described (Dimri et al., 1995). Positive cells were counted using an OLYMPUS CKX-41 microscope and an OLYMPUS E-620 camera.

Protein extraction and cell fractionation

Treated and control cells were harvested on ice in freshly prepared lysis buffer (supplementary material). After sonication and centrifugation at 14.000 g at 4°C for 20 min, supernatants containing proteins were collected.

To fractionate whole cells into cytoplasmic and nuclear protein extracts, cultivated NHEK cells were gently scratched on ice in cold PBS, centrifugated for 5 min at 300 g at 4°C and resuspended in a hypotonic buffer (supplementary material). After 10 min of centrifugation at 3000 g at 4°C, the supernatants (cytoplasmic fractions) were collected and pellets were resuspended in Cell Extraction Buffer (Invitrogen) supplemented with 1X proteases and phosphatases inhibitors cocktails (ThermoFisher Scientific). After 30 min of centrifugation at 14.000 g at 4°C, the supernatants containing the nuclear extracts were collected.

Western Blot

Proteins were separated on Any-kD gels (Bio-Rad, Hercules, CA) and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C and with secondary antibodies for 1 hour (antibodies listed in supplementary table). Bands were revealed by fluorescence and ECL (CML) using ChemiDoc™ (Bio-Rad).

RNA isolation and RT-qPCR

At each designated time point, total RNA was extracted and purified using Nucleospin RNA extraction kit (Macherey-Nagel). Reverse transcription was performed on 500 ng of RNA using SuperScriptIII First-Strand kit (Invitrogen). qPCR was performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Bio-systems, Carlsbad, CA) in a LightCycler 480 (Roche Applied Science, Canada). Primer's sequences are listed in supplementary material.

ROS levels quantification

Cells were first incubated with 200 µM or 300 µM GO in media 2 for one hour before the addition of 5 µM of CellROX Deep Red Reagent (Life Technologies). After 45 minutes of incubation, cells were harvested with 0.5% trypsin (Life Technologies) and fixed for 5 minutes by 10% formalin (Sigma Aldrich). ROS levels were measured via flow cytometry using MACSQuant Analyzer (Myltenyi Biotec).

Quantification of SASP factors by multiplex

Conditioned media were collected at day 3 of culture, processed following Malaquin et al. protocol (Malaquin et al., 2019) and concentrated using a 10 kD cut-off filter. SASP factors were quantified using Multiplex Bead Immunoassay (HCYTMAG-60K-PX29, Merck Millipore, Billerica, MA) according to manufacturer's instructions. Data acquisition and

analysis were performed on a Luminex MAGPIX System (Merck Millipore) with xPONENT software and data were normalized to the total intracellular protein amounts.

Proteomics sample preparation and analyses

Sample analyses and data processing were conducted at the 3P5 Proteomic Facility. Briefly, samples were trypsin-digested by Strap Micro Spin Column (Protifi, Huntington, NY). Resulting peptides were separated on in-house fabricated strong cation exchange (SCX) Stage-Tips in five fractions according to (Wiśniewski et al., 2009) and were analyzed on an Orbitrap Fusion Mass Spectrometer MS (ThermoFisher Scientific). Label-free global proteome quantification and statistics were performed using Maxquant and Perseus software (Cox et al., 2014; Tyanova et al., 2016).

Statistical analyses

GraphPad Prism 8.0 software (La Jolla, CA, USA) was used for statistical analyses. P-values were obtained using one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's Multiple Comparison Test (NHEK cell culture), or one-tailed Student's t-test (RHE analysis). All data were presented as mean $\pm$ S.E.M. *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001 and ****p <0.0001.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Datasets related to this article have been uploaded at <https://www.ebi.ac.uk/pride/> and the generation of the PXD is in process.

ORCiDs

Rym Halkoum : 0000-0002-5063-6141

Virginie Salnot : 0000-0002-7530-4493

Christophe Capallere : 0000-0003-4495-3981

Christelle Plaza : 0000-0002-1313-7407

Aurore L'honoré : 0000-0001-6371-4455

Karl Pays : 0000-0002-6955-6571

Bertrand Friguet : 0000-0001-8085-1961

Carine Nizard : 0000-0002-6569-8820

Isabelle Petropoulos : 0000-0001-9205-7458

CONFLICT OF INTERESTS STATEMENT

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Morgane Le Gall for her kind help for the Venn Diagram generation. We thank Rachel Gergondey, Marie-Paule Hamon and Coline Rogue for helping us with proteomic sample preparation, flow cytometry and Western Blot, respectively. We also thank Sophie Gournet (IBPS, CNRS UMR 7622) for help with the graphical abstract. We are grateful to Isabelle Imbert and Jean-Marie Botto (Ashland company) for their contribution in the collaboration between LVMH Research and Ashland. The Orbitrap Fusion mass spectrometer was acquired with funds from the FEDER through the “Operational Programme for Competitiveness Factors and employment 2007-2013”, and from the “Cancéropôle Ile-de-France”.

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

Conceptualization: IP, CN; Formal Analysis: RH, VS, CC, CP; Funding acquisition: CN, IP , KP, BF; Investigation: RH, VS, CC, CP, Methodology: RH, VS, CC, CP, AL; Project administration: IP, CN, BF; Supervision: IP, CN; Validation: IP; Visualization: RH, VS; Writing - original draft: IP, RH, AL; Writing - review & editing: IP, AL.

FUNDING

This study was supported by ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) and The LVMH Group.

REFERENCES

- Berge, U., Behrens, J., and Rattan, S.I.S. (2007). Sugar-Induced Premature Aging and Altered Differentiation in Human Epidermal Keratinocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, 524–529.
- Chambers, E.S., and Vukmanovic- Stejic, M. (2020). Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* 160, 116–125.
- Chaudhuri, J., Bains, Y., Guha, S., Kahn, A., Hall, D., Bose, N., et al. (2018). The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality. *Cell Metab* 28, 337–352.
- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10, 51–57.
- Collado, M., Medema, R.H., García-Cao, I., Dubuisson, M.L.N., Barradas, M., Glassford, J., et al. (2000). Inhibition of the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway Induces a Senescence-like Arrest Mediated by p27^{Kip1}. *J. Biol. Chem.* 275, 21960–21968.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol* 5, 99–118.
- Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 13, 2513–2526.
- Debacq-Chainiaux, F., Ben Ameer, R., Bauwens, E., Dumortier, E., Toutfaire, M., and Toussaint, O. (2016). Stress-Induced (Premature) Senescence. In *Cellular Ageing and Replicative Senescence*, S.I.S. Rattan, and L. Hayflick, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 243–262.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585–621.
- Hellwig, M., Gensberger-Reigl, S., Henle, T., and Pischetsrieder, M. (2018). Food-derived 1,2-dicarbonyl compounds and their role in diseases. *Seminars in Cancer Biology* 49, 1–8.
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., and Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology* 28, 436–453.
- Kim, R.H., Kang, M.K., Kim, T., Yang, P., Bae, S., Williams, et al. (2015). Regulation of p53 during senescence in normal human keratinocytes. *Aging Cell* 14, 838–846.
- Krutmann, J., Bouloc, A., Sore, G., Bernard, B.A., and Passeron, T. (2017). The skin aging exposome. *Journal of Dermatological Science* 85, 152–161.
- Liu, S., Wang, X., Zhao, Q., Liu, S., Zhang, H., Shi, J., Li, N., Lei, X., Zhao, H., Deng, Z., et al (2015). Senescence of human skin-derived precursors regulated by Akt-FOXO3-p27KIP1/p15INK4b signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72, 2949–2960.

- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Malaquin, N., Tu, V., and Rodier, F. (2019). Assessing Functional Roles of the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). In *Cellular Senescence*, M. Demaria, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 45–55.
- McClelland Descalzo, D.L., Satoorian, T.S., Walker, L.M., Sparks, N.R.L., Pulyanina, P.Y., and zur Nieden, N.I. (2016). Glucose-Induced Oxidative Stress Reduces Proliferation in Embryonic Stem Cells via FOXO3A/ β -Catenin-Dependent Transcription of p21cip1. *Stem Cell Reports* 7, 55–68.
- Navarrete Santos, A., Jacobs, K., Simm, A., Glaubitz, N., Horstkorte, R., and Hofmann, B. (2017). Dicarboxyls induce senescence of human vascular endothelial cells. *Mechanisms of Ageing and Development* 166, 24–32.
- Pathan, M., Keerthikumar, S., Chisanga, D., Alessandro, R., Ang, C.-S., Askenase, P., et al. (2017). A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *J Extracell Vesicles* 6.
- Radjei, S., Friguet, B., Nizard, C., and Petropoulos, I. (2014). Prevention of dicarboxyl-mediated advanced glycation by glyoxalases: implication in skin ageing. *Biochemical Society Transactions* 42, 518–522.
- Sejersen, H., and Rattan, S.I.S. (2009). Dicarboxyl-induced accelerated ageing in vitro in human skin fibroblasts. *Biogerontology* 10, 203–211.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., et al (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13, 731–740.
- Velarde, M.C., and Demaria, M. (2016). Targeting Senescent Cells: Possible Implications for Delaying Skin Ageing: A Mini-Review. *Gerontology* 62, 513–518.
- Wang, A.S., and Dreesen, O. (2018). Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Ageing. *Front Genet* 9.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6, 359–362.
- Xue, M., Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2011). Glyoxalase in ageing. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22, 293–301.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplemental methods

Ethical compliance of RHE

Ex vivo skin samples were obtained from anonymous healthy donors after circumcisions. Surgical residues were harvested according to French regulations (agreement DC 2011-1323) and after obtaining informed written consent from the patients.

Histological analysis

The reconstructed human epidermis was fixed in 10% formalin solution (Sigma Aldrich) for 1 h at room temperature. After successive dehydration, tissues were embedded in paraffin. Paraffin sections (4µm) were stained by Hematoxylin & Eosin staining (H&E) and analyzed with a QImaging Retina 2000R Fast1394 camera. Images were processed using the Q-Capture Pro 7 (QImaging) acquisition software.

Analysis of mRNA levels of RHE by RT-qPCR

After treatment, RHEs were disrupted in lysis buffer and RNA was isolated using the mirVana miRNA Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA).

cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit containing RNase Inhibitor (Applied Bio-systems, Carlsbad, CA). The reverse transcription was performed on 2 µg of total RNA using a thermocycler (Applied Bio-systems). Real-time PCR was performed on a StepOnePlus thermocycler (Applied Bio-systems) with TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Bio-systems) and TaqMan Gene Expression Assays (Applied Bio-systems).

mRNA expression was quantified using TaqMan miRNA assays for human *CDKN1A* (*p21*, Hs00355782_m1), *CDKN1B* (*p27Kip1*, Hs00153277_m1), *TP53* (*p53*, Hs01034249_m1),

CDKN2A (*p16*, Hs00923894_m1), and human *GAPDH* (Hs02786624_g1) as the housekeeping gene (Applied Bio-systems). mRNA expression was normalized against the expression of human *GAPDH* (Qiagen, Hilden, Germany) expression levels. Each sample was analyzed in triplicate.

The comparative Ct method was used for relative quantification of target expressions (Livak and Schmittgen, 2001) and the StepOne* software (Applied Bio-systems) was used for data treatment.

Sample preparation for Proteomics

Four biological replicates of conditioned culture media (secretomes) from 4 distinct cell culture conditions (untreated, 200 μ m GO, 300 μ m GO and RS) were digested by “Strap” Micro Spin Column (Protifi, Huntington, NY) using trypsin (sequencing-grade from Promega, Madison, WI) according to manufacturer’s instruction. 25 μ g of each sample were denatured v/v with a solution contained 4% SDS (GE Healthcare, Chicago, IL), 400 mM TEAB (Sigma Aldrich), 20 mM TCEP (Sigma Aldrich) and 100 mM ClAA (from Fluka) for 5 min at 95°C. The denatured secretomes were acidified with 12% phosphoric acid at 1:10 (acid: protein volume ratio). 6 volumes of Strap Binding Buffer (90% Methanol, 100 mM TEAB) were added. The resulting protein suspension was transferred to the Strap filter. After centrifugation and wash, the filter was incubated with trypsin (1:50, enzyme: protein) in 100 μ L of 50 mM TEAB at 37°C overnight. Resulting peptides were fractionated on strong cation exchange chromatography (SCX) StageTips in five different fractions (Wiśniewski et al., 2009).

LC-MS/MS analysis

Peptides from each of these 5 fractions were separated by Reverse phase C₁₈ using an u3000 RSLC chromatographer from Dionex on a 2 μ m particle size, 100 Angström pore size, 75 μ m internal diameter, and 25 cm in length C₁₈ reverse phase analytical column with a 3 h binary

gradient from 99% solution A (0.1% formic acid in H₂O) to 55% solution B (80% ACN, 0.085% formic acid) before injection into an Orbitrap Fusion Mass Spectrometer MS (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). MS data acquisition was performed throughout the elution process in a data-dependent scheme (top speed mode in 3 seconds) with full MS scans acquired with the orbitrap detector, followed by HCD peptide fragmentation and Ion trap fragment detection of the most abundant ions detected in the MS scan. Mass spectrometer settings for full scan MS were: 1.0E6 AGC, 60,000 target resolution, 350-1500 m/z range, maximum ion injection time (MIIT) of 60 ms. HCD MS/MS fragmentation was permitted for 2-7+ precursor ions reaching more than 5.0E3 minimum intensity. Quadrupole-filtered precursors within 1.6 m/z isolation window were fragmented with a Normalised Collision Energy setting at 30. 1.0E5 AGC Target and 60 ms MIIT were the limiting ions accumulation values. The Ion-trap detector was used for its fast and sensitive detection capabilities. A 30 seconds dynamic exclusion time was set.

Proteomics data processing

Maxquant software version 1.6.6.0 (Cox et al., 2014) was used for the data extraction from the raw MS files from mass spectrometer. The databases included the human sequences from the Uniprot database (June 2018, 42394 entries) and a list of in-house frequent contaminant sequences. Peptide cleavage was based on trypsin specificity with maximum 2 missed cleavages. Carbamidomethylation of cysteines was set as constant modification, whereas acetylation of the protein N terminus and oxidation of methionines were set as variable modifications. The false discovery rate was kept below 1% on both peptides and proteins. The normalization was permitted and “match between runs” (MBR) option was allowed with a match time window of 0,7 min and an alignment time window of 20 min. For statistical analysis, data were imported into the Perseus software version 1.6.2.3 (Tyanova et al., 2016). Reverse and contaminant proteins were excluded from analysis. LFQ intensity data were transformed into log₂. Only the proteins with at least 3 out of 4 replicates valid LFQ intensity value per

condition were selected. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA). An adjusted *p*-value was calculated using the Benjamini-Hochberg False Discovery Rate and a *q*-value ≤ 0.05 was considered significant. The data analysis was following by a Perseus Tukey's post hoc and the mean of LFQ per condition was calculated. Hierarchical clustering was performed with the default value of Perseus (distance Pearson correlation) subsequent to the normalization of the mean by Z-scoring. Moreover, to create a Venn diagram, ratios 200 μ m GO/untreated, 300 μ m GO/untreated and RS/untreated were calculated on proteins with at least 2 valid values per condition. Proteins with a ratio >1 and determined significant following to Tukey's post hoc were annotated Proteins of Interest (POI) in Supplementary table S3.

In order to identify proteins known to be secreted among our three comparisons, we performed annotation on the three POI lists using different databases related to secretion:

1. UniProt knowledge base (www.uniprot.org release 2019_09) was used to identify proteins labeled with the Keyword "Secreted" [KW-0964].
2. The Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org version 19) enumerates 1683 secreted proteins to which the predicted ones are added by a majority decision-based method (MDSEC) constructed using the results from three different Signal Peptide prediction methods.

The Vertebrate Secretome Database VerSeDa (<http://genomics.cicbiogune.es/VerSeDa>) stores information about proteins that are predicted to be secreted from cells.

The corresponding annotations are shown in Supplementary table S3.

Based on these annotations a Venn diagram was created using the FunRich software (Pathan et al., 2017) (Figure 5d). It represents the intersection between our three sets of proteins of interest and a merge of the different annotation databases.

Media and buffer compositions

Media 1: EpiLife™ Medium, containing 60 µM calcium (Life Technologies, Carlsbad, CA) and supplemented with human keratinocyte growth supplement 1X (HKGS) (Life Technologies), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma Aldrich, St-Louis, MO)

Media 2: EpiLife™ Medium containing 60 µM calcium (Life Technologies).

Lysis buffer for total protein extraction: 5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.25 M saccharose, 0.2 mM MgSO₄, 20 mM tetrasodium EDTA, 20% Triton X-100, 1 mM DTT supplemented with protease inhibitor cocktail (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

Hypotonic buffer for cell fractionation: 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, protease inhibitor cocktail 1X (ThermoFisher Scientific) and phosphatase inhibitor Cocktail 1X (ThermoFisher Scientific) containing 10% of NP40.

Supplementary Table S1. Primer sequences used for qPCR on 2D culture of NHEK

Primer name	Sequence (5'-3')
Human Actin	F: CCAACCGCGAGAAGATGA R: TCCATCACGATGCCAGTG
Human AREG	F: TGATCCTCACAGCTGTTGCT R: TCCATTCTCTTGTCGAAGTTTCT
Human IL-1 α	F: GGTTGAGTTTAAGCCAATCCA R: TGCTGACCTAGGCTTGATGA
Human IL-1 β	F: CTGTCCTGCGTGTTGAAAGA R: TTGGGTAATTTTTGGGATCTACA
Human IL-6	F: GCCCAGCTATGAACTCCTTCT R: GAAGGCAGCAGGCAACAC
Human IL-8	F: AGACAGCAGAGCACACAAGC R: ATGGTTCCTTCCGGTGGT
Human LMNB1	F: AAGGCGAAGAAGAGAGGTTGAAG R: GCGGAATGAGAGATGCTAACACT
Human MMP3	F: CAAAACATATTTCTTTGTAGAGGACAA R: TTCAGCTATTTGCTTGGGAAA
Human p27Kip1 (CDKN1B)	F: CCCTAGAGGGCAAGTACGAGT R: AGTAGAACTCGGGCAAGCTG
Human PCNA	F: TCCTCCTTCCCGCCTGCCTGTAGC R: CGCGTTATCTTCGGCCCTTAGTGTA

Supplementary Table S2. Primary antibodies references for Western Blot

Primary antibody	Manufacturer	Reference	Dilution
p16INK4a	Abcam	Ab108349	1:1000
p21	BD biosciences	556431	1:1000
Beta-actin (C4)	Santa Cruz	sc-47778	1:1000
p27	Santa Cruz	sc-528	1:500
Rb (M-153)	Santa Cruz	sc-7905	1:1000
p53	Santa Cruz	sc-6243	1:1000
CML	R&D Systems	MAB3247	1:1000
Phospho-Rb (S807/811)	Cell Signaling Technology	#9308	1:1000
Phospho-p53 (S15)	Cell Signaling Technology	#9284	1:1000
Phospho-AKT (S473)	Cell Signaling Technology	#9271	1:1000
AKT	Cell Signaling Technology	#9272	1:1000
FOXO3a (75D8)	Cell Signaling Technology	#2497	1:5000
Secondary antibody			
Goat anti-mouse AlexaFluor 700	Invitrogen (Thermofisher Scientific)	A21036	1:10000
Goat anti-rabbit Dylight 800	Invitrogen (Thermofisher Scientific)	SA5-10036	1:10000

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Glyoxal treatment induces senescence in NHEK cells.

(a) Left panel: day 3, TUNEL assay marking apoptosis in GO-treated cells and DNASE-treated cells. Right panel: TUNEL-positive cells are represented as the percentage of total cells. (b) Left panel: Day 3 EdU incorporation assay in GO-treated and non-treated cells. Left panel: EdU-positive cells are represented as the percentage of total cells. (c) Left panel: SA- β gal staining of control and GO-treated cells on day 3 and day 8. Black arrows mark senescence-associated vacuoles. Right panel: The number of SA- β gal positive cells are represented as the percentage of total cells. (d) *LMNB1* transcripts levels based on qPCR at days 3 and 8 from control and GO-treated. (a-d) Error bars represent the mean $\pm$ SEM, with n=3 independent experiments. Scale bars = 100 μ m (a-b) and 50 μ m (c).

Figure 1

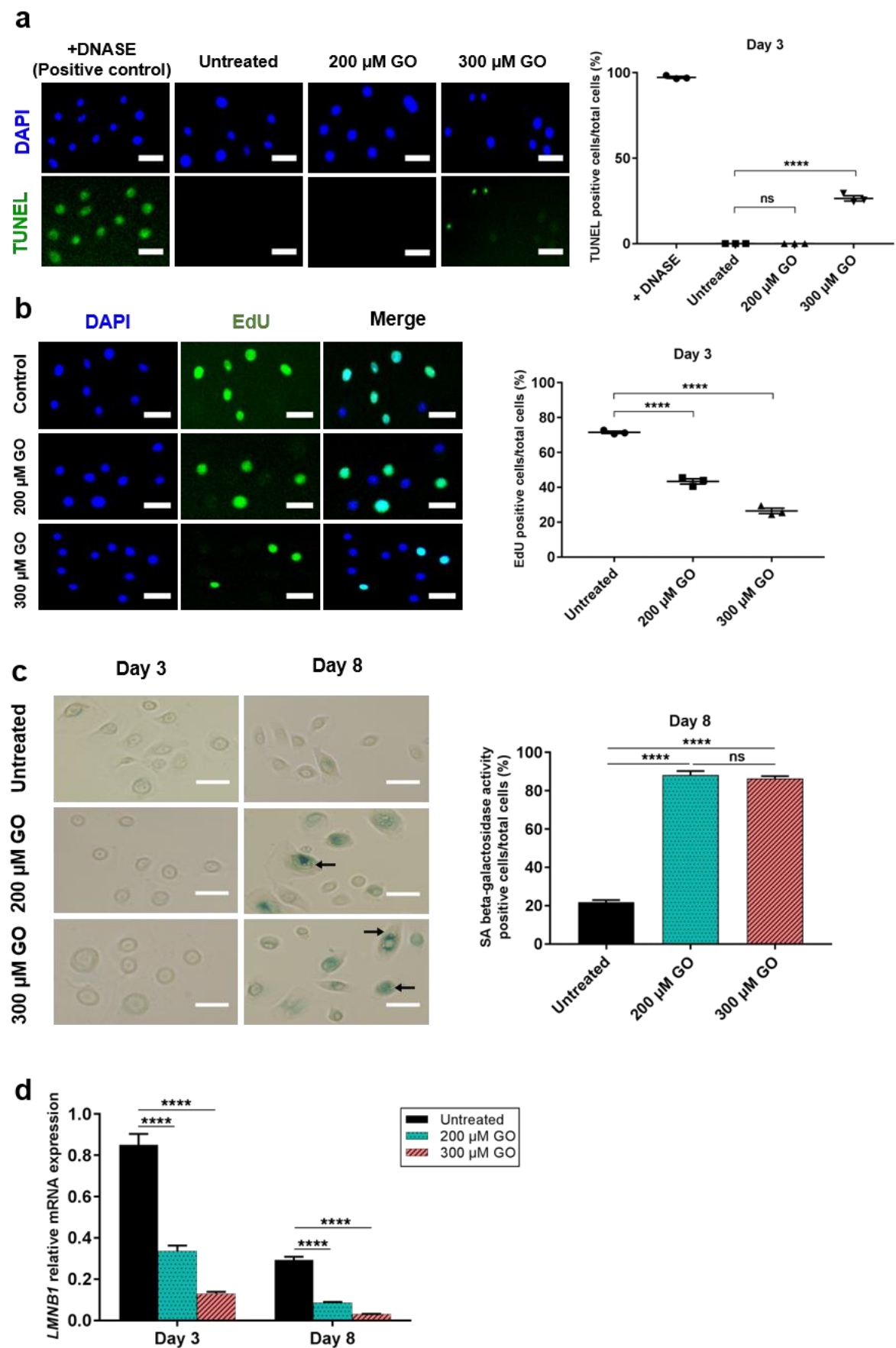


Figure 2. The “early-stage” senescence is mediated by the AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} signaling pathway.

(a-b) Western blot analyses on total protein extracts from GO-treated and RS cells using anti-p16, anti-p21 (a, Left panel) and anti-p27 antibodies (b, Left panel). Quantification of western-blot analyses indicates the levels of p16, p21 (a, Right panel) and p27 (b, Right panel) relative to actin. (c) qPCR analysis for *P27* transcripts. (d) Western-blot analyses using anti-Phospho-pRb and anti-total-pRb antibodies. Quantification indicates the ratio Phospho-pRb/total pRb. (e) Western blot using anti-FOXO3a directed against the cytoplasmic and nuclear proteins. Quantification indicates the FOXO3a nuclear/cytoplasmic ratio. (f) Western-blot using antibodies anti-phospho-AKT and anti-total AKT. Quantification indicates the phospho-AKT/total AKT ratio. Error bars represent the mean $\pm$ SEM, with n=3 independent experiments (a-b, d-f) or n=6 (c) independent experiments.

Figure 2

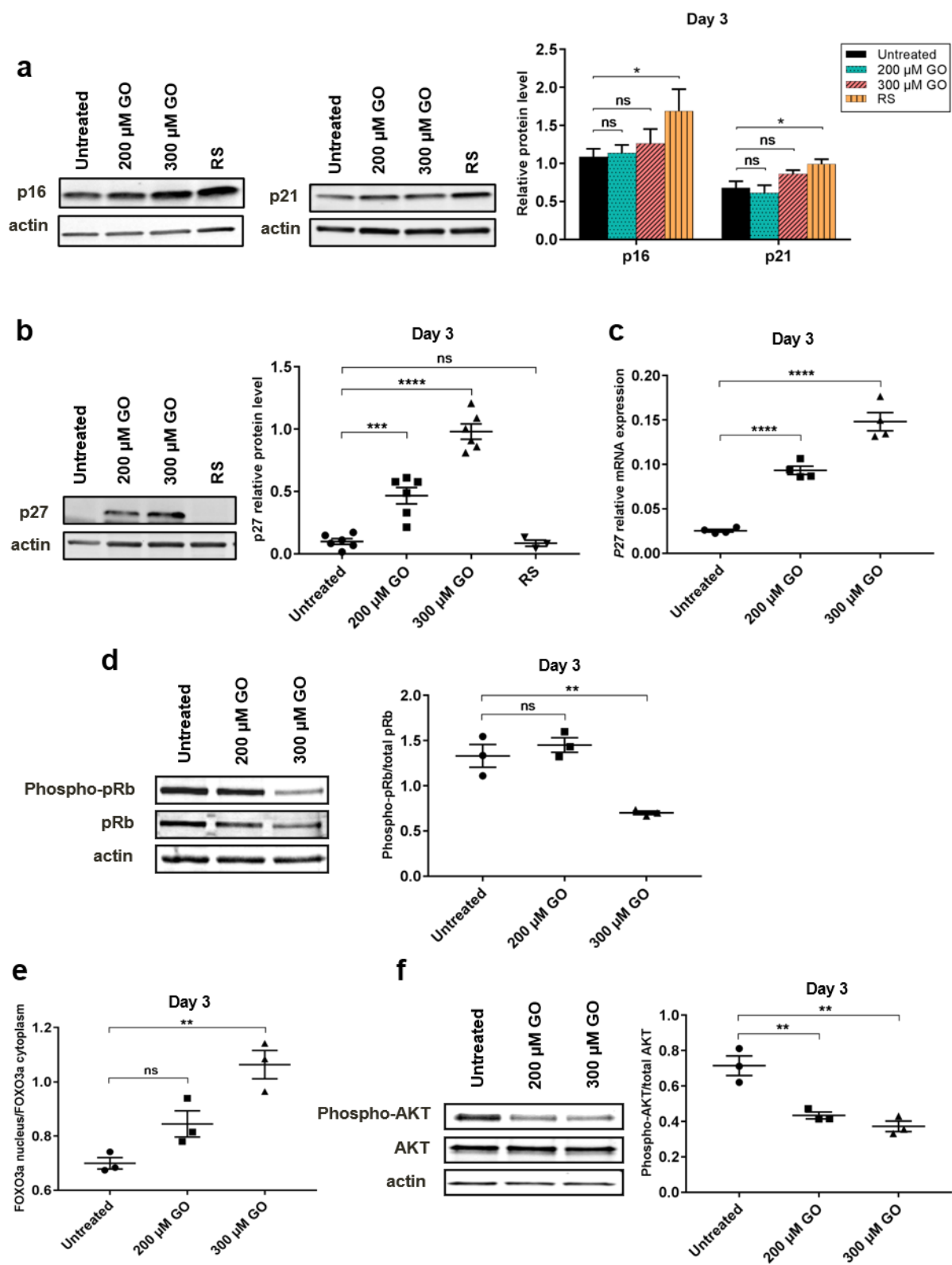


Figure 3. The p16^{INK4}/pRb pathway is activated during the “late-stage” senescence (Day 8).

(a) Left panel: RNA samples from control and GO-treated were analyzed by qPCR for *P27* transcripts. Right panel: Proteins were extracted from GO-treated and control cells and processed for western-blot analyses, using antibodies to phospho-AKT and total AKT. Quantification of western-blot analyses indicates the phospho-AKT/total AKT ratio (b-c) Proteins were extracted from GO-treated and control cells and processed for western-blot analyses, using antibodies to phospho-pRb and total pRb (b) p16, p21 and phospho-p53 (c). Quantification of western-blot analyses indicates the phospho-pRb/total -pRb ratio (b) and the levels of p16, p21 and phospho-P53 relative to actin. (a-c) Error bars represent the mean $\pm$ SEM, with n=3 independent experiments.

Figure 3

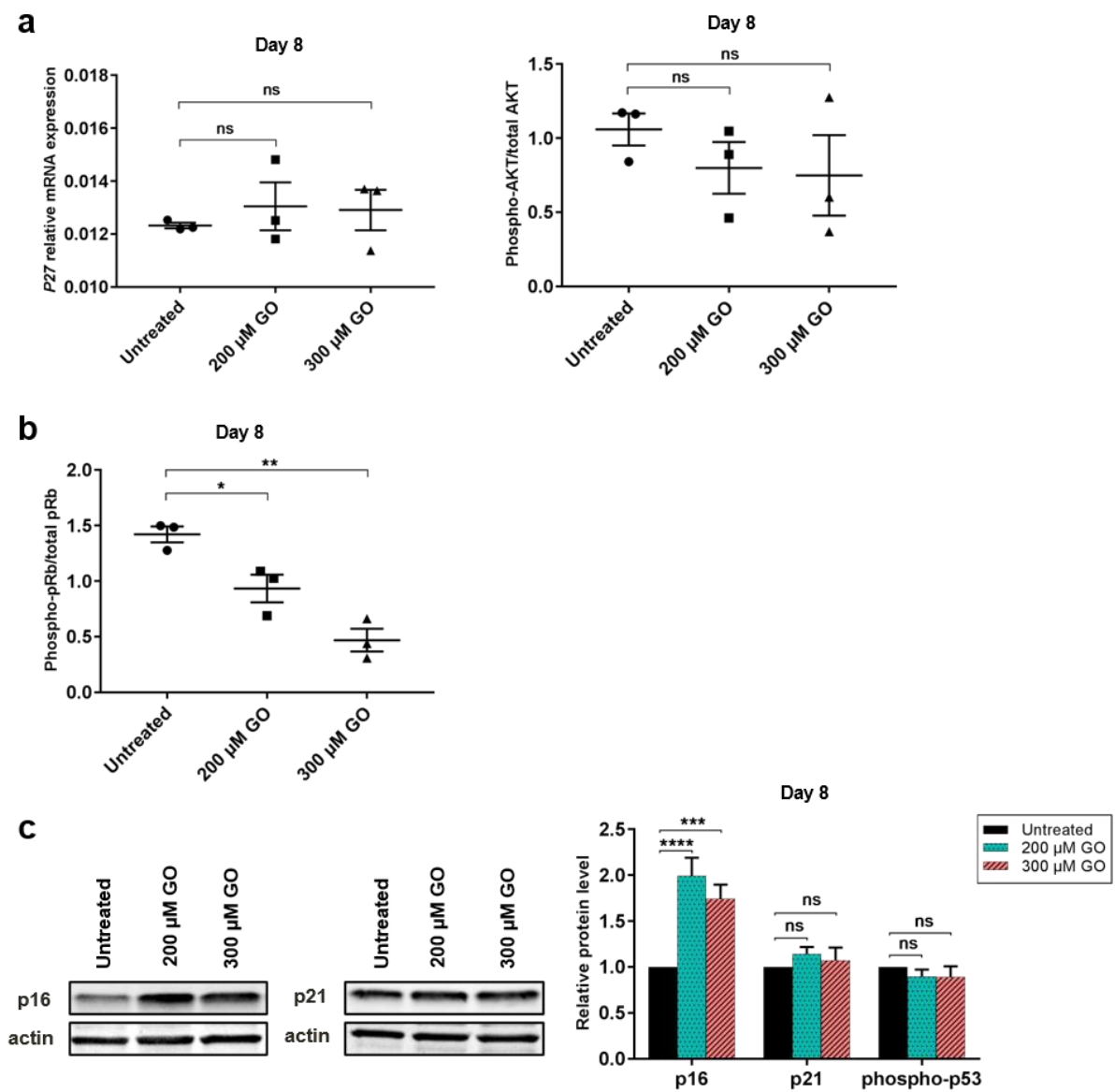


Figure 4. Glyoxal treatment leads to oxidative stress state in NHEK cells.

(a-b) NHEK cells were cultured in the presence or absence of 200 and 300 μ M GO for one hour. (a) Quantification of reactive oxygen species (ROS) with CellROX probe in treated vs. non treated cells. Values are expressed as median fluorescent intensity (f.i). (b) Day 3 Western-blot analyses using antibodies against CML on total protein extract from GO-treated and control cells showing profile of CML-modified proteins. Quantification of western-blot analyses indicates the relative CML level. (a-b) Error bars represent the mean $\pm$ SEM, with n=3 independent experiments.

Figure 4

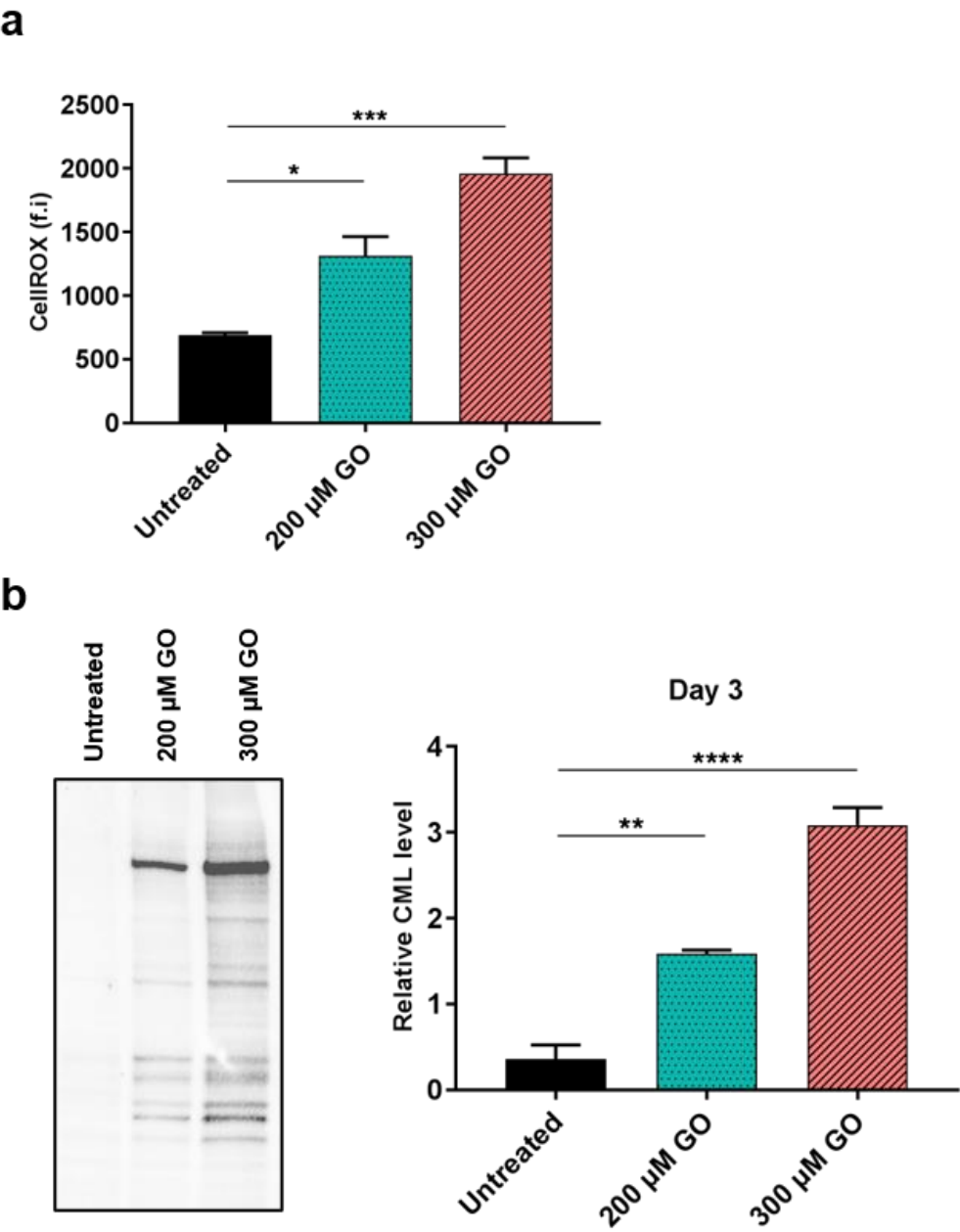


Figure 5. Characterization of the GASP (Glyoxal-Associated Secretory Phenotype) from “early-stage” senescent cells.

(a) qPCR analysis of transcript abundance of known SASP factors from control and GO-treated cells, illustrated as fold changes in reference to control cells. (b) Luminex assay results based on protein concentration comparison of known SASP factors detected in culture media from control and GO-treated cells. All data points were normalized to total intracellular protein concentration (fold change to control cells). (c) Culture media from control, GO-treated cells or cells submitted to RS were analyzed by MS. Results were analyzed by hierarchical clustering. (d) Venn diagram representing the overlap between the proteins significantly increased in the SASP (RS) and the “early-stage” GASP (200 and 300 μ M GO) compared to control condition, and to secretome databases. (e) List of proteins referenced in secretome databases and showing significant increase in the “early-stage” GASP. Error bars represent the mean $\pm$ SEM, with n=4 (a, c) and n=3 (b) independent experiments.

Figure 5

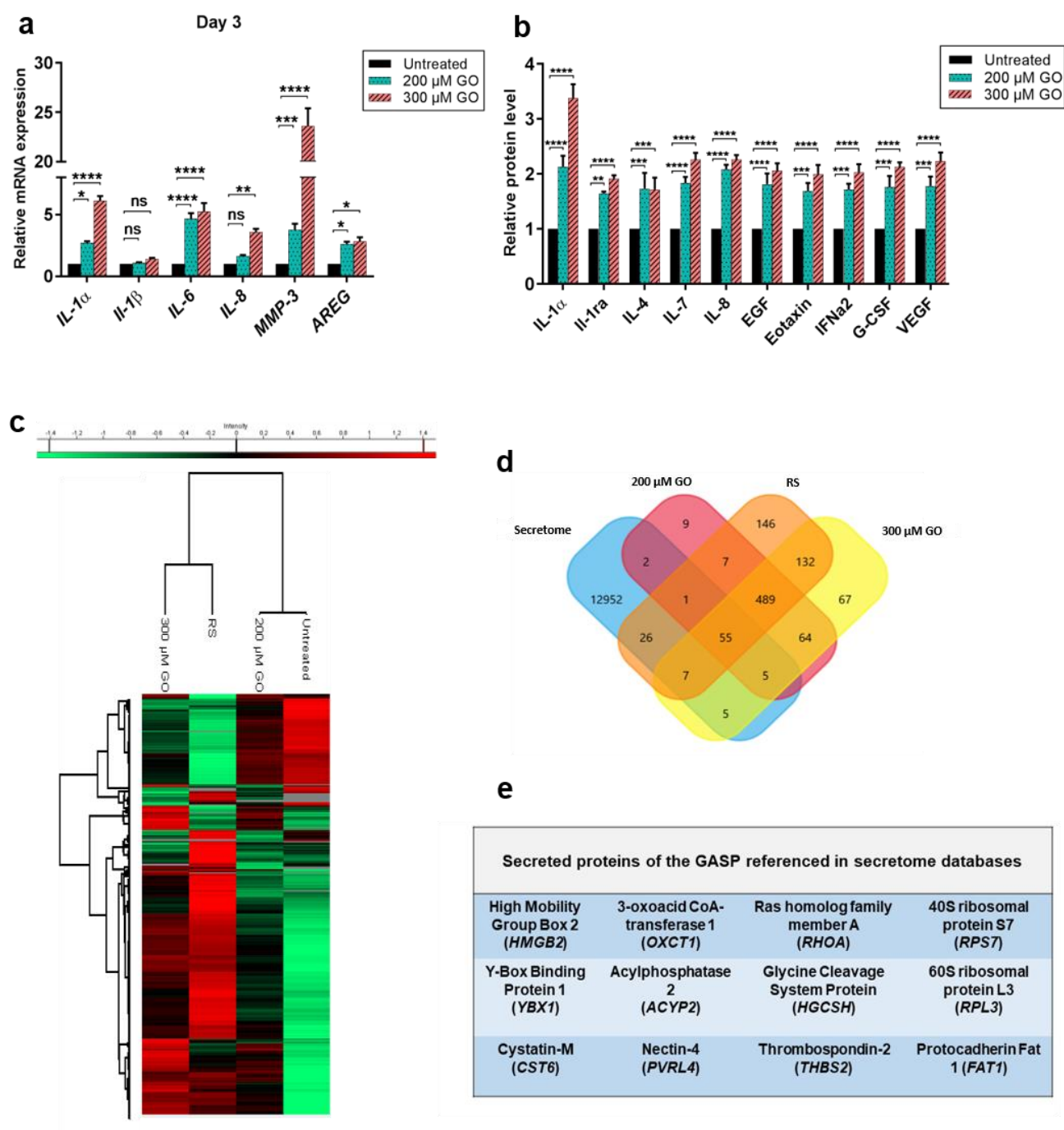
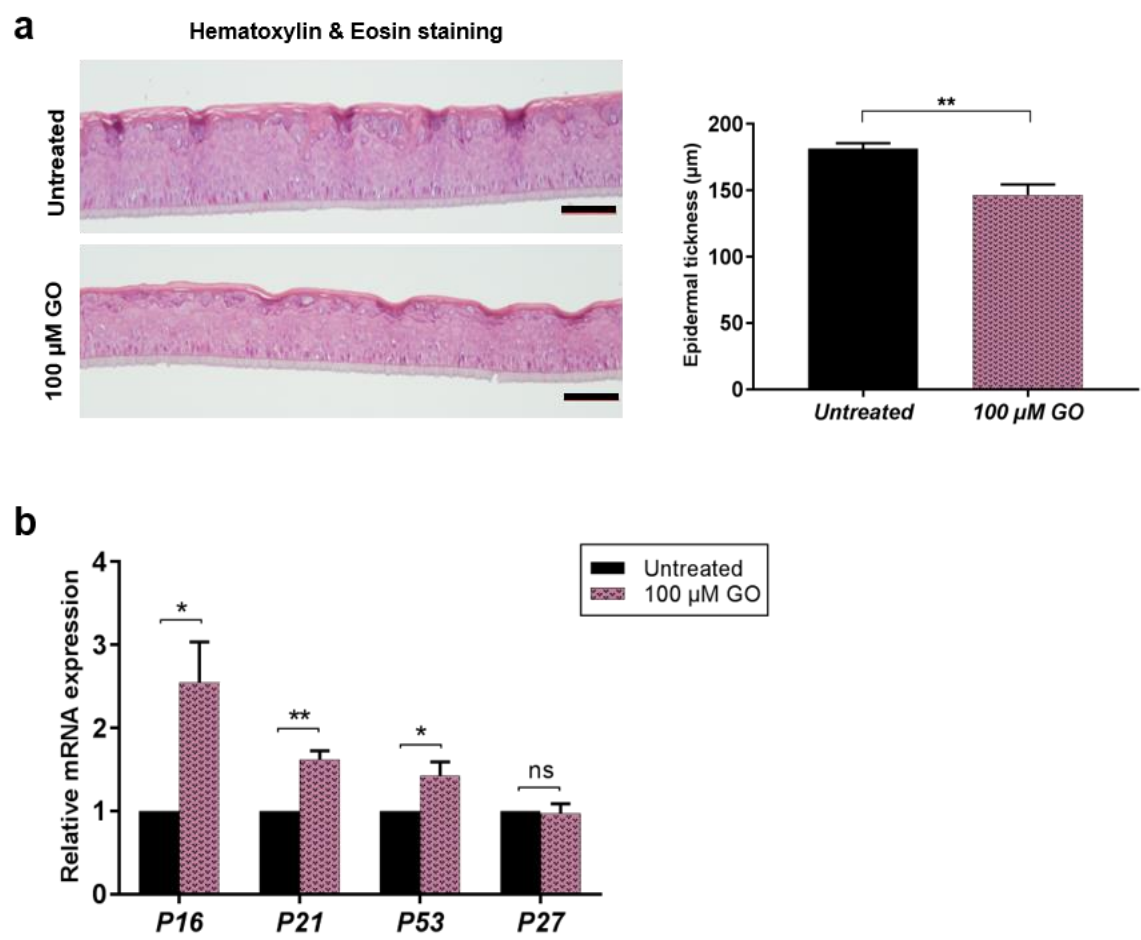


Figure 6. Effects of the glyoxal treatment on reconstructed human epidermis (RHE) at day 11 after reconstruction.

(a) Histological staining of RHE cultured in presence or absence of 100 μ M GO Bars = 100 μ m (Left panel). Quantification of epidermal thickness in GO treated RHE compared to control (Right panel). (b) qPCR analysis for transcripts of different senescence markers. Data presented as fold change to control condition. Error bars represent the mean $\pm$ SEM, with n=3 independent experiments.

Figure 6

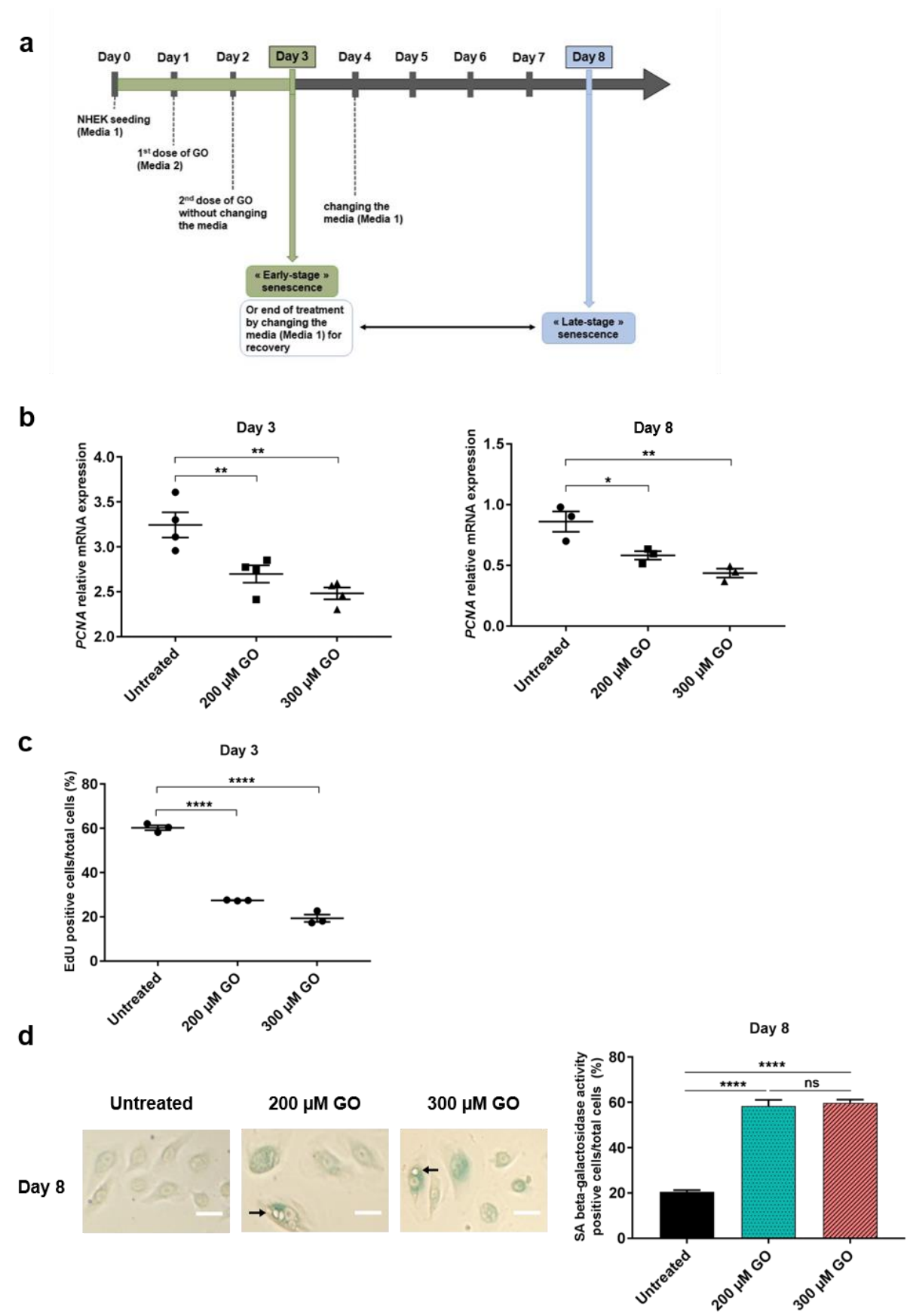


SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure S1. Glyoxal treatment induces senescence of NHEK cells.

(a) Timeline of experimental procedure for senescence induction in NHEK following GO treatments. **(b)** At days 3 and 8, control and GO-treated cells were harvested for RNA purification for qPCR to quantify *PCNA* transcripts. **(c-d)** GO-induced senescence using NHEK cells from a second donor. **(c)** At day 1, control and GO-treated cells were incubated with EdU for 48h. At day 3, cells were processed for fluorescence detection of EdU incorporation. EdU-positive cells were counted and quantified as the percentage of total cells. **(d)** Left panel: SA- β gal staining of control and GO-treated cells at Day 8. Black arrows point to senescence-associated vacuoles. Scale bars = 50 μ m. Right panel: The number of SA- β gal positive cells per condition is represented as the percentage of total cells.

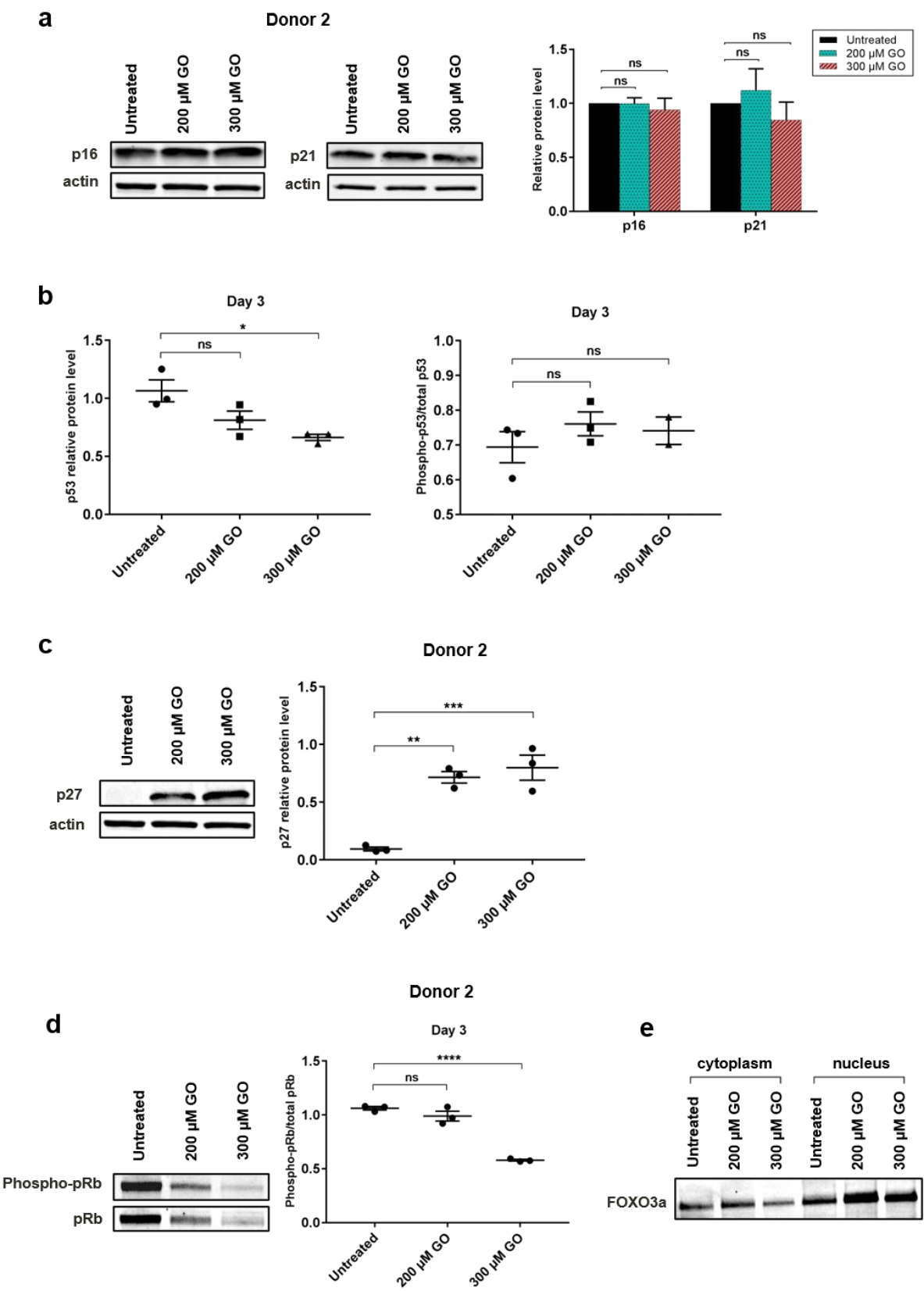
Figure S1



Supplementary Figure S2. Signaling pathways involved in GO-induced senescence.

(**a,c,d**) Western blot of senescence markers in NHEK cells from a second donor in the presence or absence of 200 and 300 μ M GO for 3 days: p16, p21 (**a**, Left panel), p27 (**c**, Left panel), Phospho-pRb and total pRb (**d**, Left panel). Quantification of western-blot shows the levels of p16, p21 (**a**, Right panel) and p27 (**c**, Right panel) relative to actin and the ratio Phospho-pRb/total pRb (**d**, Right panel). (**b**) Western blot of Phospho-p53 and total p53 in NHEK cells from the first donor were cultured in the presence or absence of 200 and 300 μ M GO for 3 days. p53 (**b**, Left panel) and phospho-P53/total P53 ratio (**b**, Right panel). (**e**) Western blot of cytoplasmic and nuclear portions of FOXO3a. (**a-d**) Error bars represent the mean $\pm$ SEM, with n=3 independent experiments.

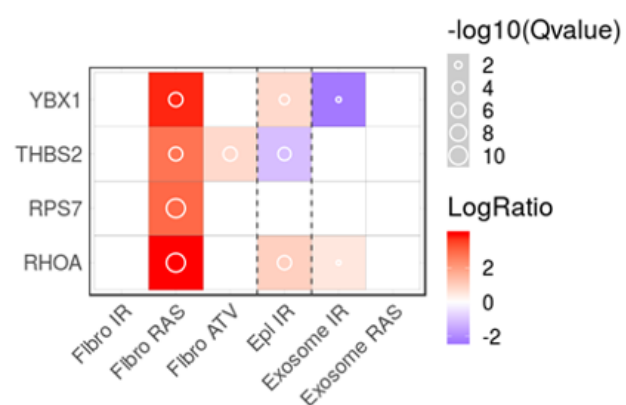
Figure S2



Supplementary Figure S3. Some of the “early-stage” GASP secreted proteins are part of the SASP.

Heatmap obtained by entering the 12 “early-stage” GASP proteins defined as “secreted” in the database of the SASP Atlas Query tool (<http://www.saspatlas.com>). Four proteins (YBX1, THBS2, RPS7, RHOA) were found in the soluble SASP of senescent fibroblasts induced by RAS or ATV, senescent epithelial cells induced by IR or exosomes released by IR epithelial cells. (YBX1, Y-box-binding protein 1; THBS2, Thrombospondin-2; RPS7, 40S ribosomal protein S7; RHOA, Transforming protein RhoA; ATV, atazanavir treatment; RAS, inducible RAS overexpression; IR, X-irradiation)

Figure S3



Résumé des résultats

I. Mise au point d'un protocole expérimental de traitement au glyoxal

L'induction de la sénescence cellulaire *in vitro* nécessite une exposition chronique ou aigue à de faibles doses d'un stress (Debacq-Chainiaux et al., 2016). Pour notre étude, nous avons choisi de traiter des NHEK avec des doses subcytotoxiques et répétées de GO (2 traitements espacés de 24h) capables d'induire la sénescence sans provoquer de mort cellulaire. Afin de choisir les concentrations à appliquer, nous avons réalisé un test TUNEL suite à des traitements à 200 μ M et 300 μ M de GO. Malgré l'entrée en apoptose d'environ 20% des cellules traitées avec 300 μ M GO, cette proportion reste relativement faible et nous avons décidé de retenir les deux conditions de traitements afin d'observer d'éventuels effets dose-dépendants.

Suite au traitement, nous avons distingué deux phases différentes dans l'établissement de la sénescence (**Figure 34**) :

- Une phase précoce ou « early-stage senescence » qui correspond à l'étape d'initiation du processus de sénescence et qui se situe juste après l'arrêt des traitements au GO au jour 3 (Day 3).
- Une phase tardive ou « late-stage senescence » qui a lieu 6 jours après la dernière dose de traitement, soit au jour 8 (Day 8). Elle représente l'établissement complet du phénotype sénescant.

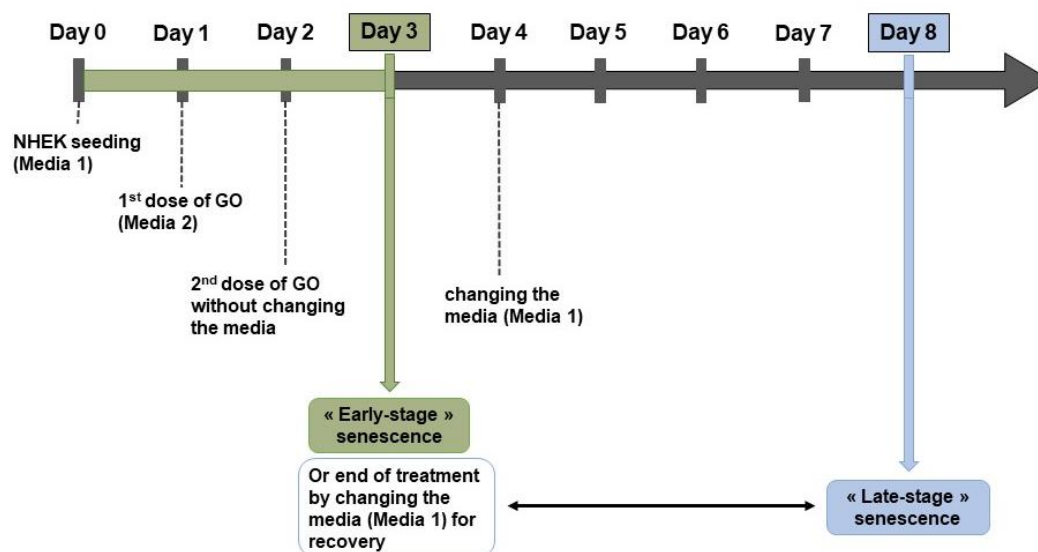


Figure 34. Protocole d'induction in vitro de la sénescence de NHEK par stress GO. Les NHEK sontensemencées à 10^4 cellules/cm² dans du milieu Epilife auquel on ajoute du HKGS (Human Keratinocytes Growth Supplement) et les antibiotiques Pénicilline et Streptomycine (media 1). Le lendemain, les cellules sont traitées avec 200 μ M ou 300 μ M de GO dans du milieu Epilife sans HKGS ni antibiotiques (media 2) pendant 48 h, avec ajout d'une deuxième dose de GO sans changement de milieu le deuxième jour. Tandis que les cellules en sénescence précoce sont récupérées au jour 3, celles qui correspondent à la phase tardive sont maintenue en culture avec des changements de milieu jusqu'au jour 8, afin de permettre l'établissement du phénotype sénescence. Voir « materials & methods » de l'article.

II. Le glyoxal induit la sénescence des NHEK

Afin d'évaluer l'effet du GO sur la prolifération cellulaire, nous avons réalisé un test de prolifération par incorporation d'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) suite aux traitements et avons montré un arrêt du cycle cellulaire des cellules traitées par rapport aux cellules contrôles de façon dose-dépendante. Ce résultat a été confirmé par la diminution statistiquement significative de l'expression génique du marqueur de prolifération cellulaire PCNA (« Proliferating Cell Nuclear Antigen ») dans les cellules traitées au jour 3 mais également au jour 8, c'est-à-dire 5 jours après le stress.

Cependant, malgré un arrêt de la prolifération et une diminution de l'expression génique de la lamine B1, qui constitue un autre marqueur de la sénescence, nous n'avons pas détecté d'activité SA- β gal au jour 3 dans les cellules traitées, ce qui semble indiquer que les cellules sont encore dans une phase d'initiation de la sénescence. En effet, au jour 8, 80% des

cellules traitées étaient positives au marquage SA- β gal. Nous avons également remarqué que les cellules traitées subissaient un changement morphologique en paraissant plus élargies et arrondies. Elles affichaient également une apparition de vacuoles liées à la sénescence.

III. Détermination des voies de signalisation impliquées dans l'initiation (phase précoce) et le maintien (phase tardive) de la sénescence cellulaire

- *Phase précoce de la sénescence*

En premier lieu, nous avons cherché à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire durant la phase précoce de la sénescence. Nous avons commencé par étudier les voies classiques p53/p21^{CIP1} et p16^{INK4A}/pRb. Les niveaux des protéines p21^{CIP1} et p16^{INK4A} ne présentaient aucune différence significative entre les cellules traitées au GO comparées aux contrôles, contrairement au contrôle positif représentant les cellules en sénescence répliquative. De plus, p53 ne semble pas être activée étant donné que le niveau de sa forme phosphorylée n'augmentait pas suite aux traitements au GO.

Cependant, nous avons remarqué que le GO était capable de provoquer l'induction, de l'expression génique et protéique d'un autre inhibiteur du cycle cellulaire appartenant à la même famille que p21^{CIP1} ; p27^{KIP1}. De plus, la protéine p27^{KIP1} ne semble pas exprimée par les cellules en sénescence répliquative.

Bien qu'il existe peu d'études décrivant le rôle de p27^{KIP1} dans la sénescence cellulaire, cet inhibiteur du cycle cellulaire a été impliqué dans la voie de signalisation AKT/FOXO3a/ p27^{KIP1} régulant la sénescence des cellules précurseurs dérivées de la peau et des cellules souches embryonnaires (Liu et al., 2015; McClelland Descalzo et al., 2016) (voir Chapitre II - Partie I.4.3). Nous avons montré que les cellules traitées au GO en phase précoce de sénescence présentent une déphosphorylation de AKT, également connue pour lever la séquestration du facteur de transcription FOXO3a du cytoplasme. De façon cohérente, une expérience de fractionnement cellulaire nous a permis de voir une translocation nucléaire de FOXO3a suite au GO. PRb, dont la déphosphorylation empêchant la progression du cycle cellulaire est un marqueur de sénescence, est connu comme pouvant être inhibé par les complexes Cycline-

CDK suite à leur inactivation par p27^{KIP1}. Nous avons remarqué une déphosphorylation, et donc une inactivation, de pRb statistiquement significative dans les cellules traitées avec 300 μ M de GO.

L'ensemble de ces résultats nous permet de formuler l'hypothèse selon laquelle l'initiation de la sénescence induite au GO dans des NHEK est médiée par la voie AKT/FOXO3a/ p27^{KIP1}.

- Phase tardive de la sénescence

Au jour 8, nous avons constaté que l'expression de la protéine p27 suivie par des expériences de Western Blot était abolie dans nos conditions de traitements. De plus, il n'y avait pas de différence significative de son expression génique entre les NHEK traitées et contrôles. Nous n'avons également pas observé non plus de déphosphorylation de AKT en phase tardive de sénescence.

Pourtant, la progression du cycle cellulaire était toujours inhibée au jour 8 étant donné que nous avons montré que pRb était déphosphorylé et le marqueur *PCNA* sous-exprimé dans les cellules traitées au GO.

Une étude des acteurs des voies de signalisation classiques de sénescence nous a permis de mettre en évidence une activation de la voie p16^{INK4A}/pRb traduite par l'augmentation significative de l'expression de p16^{INK4A} dans les cellules sénescents. En revanche, le GO n'a pas induit d'activation de p21^{CIP1} ni de p53.

Au vu de ces résultats, il semblerait que lors de la phase tardive de la sénescence, la voie p16^{INK4A}/pRb prenne le relais sur la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} afin de maintenir le phénotype sénescents.

IV. Le GO provoque un stress oxydant des NHEK

Le GO est connu pour induire la formation d'AGEs et plus spécifiquement de CML au niveau des protéines, induisant leur altération et participant ainsi à un stress oxydant. Nous avons donc cherché à évaluer l'induction de CML intracellulaires suite au GO par Western Blot.

Au jour 3, une forte accumulation de protéines modifiées par CML a été détectée de façon dose-dépendante dans les cellules traitées comparées aux contrôles. Nous avons alors utilisé une sonde fluorescente pour mesurer le niveau d'ERO intracellulaires par cytométrie en flux. Comme attendu, 1 heure de traitement au GO a suffi pour provoquer une augmentation significative d'ERO dans les cellules.

Ces résultats nous ont permis de confirmer que le GO provoque un état de stress oxydant des cellules traitées à travers l'accumulation de CML et d'ERO intracellulaires.

V. Caractérisation du GASP associé à la phase précoce de l'établissement de la sénescence cellulaire

Afin de détecter et de quantifier toutes les protéines sécrétées lors de la phase précoce de la sénescence, nous avons établi une collaboration avec la plateforme de spectrométrie de masse l'Université de Paris Descartes (3P5). Nous avons donc comparé par LC-MS/MS dans des conditions « label-free » des milieux de culture récoltés au jour 3 à partir de cellules non traitées, traitées à 200 μ M ou à 300 μ M ainsi que de NHEK en sénescence répliquative. Ces analyses nous ont permis de visualiser les profils de sécrétion des différentes conditions sous forme de Heatmap. Nous avons ainsi identifié 152 protéines dont la sécrétion augmente spécifiquement dans le GASP, ce qui constitue notre groupe d'intérêt pour ce projet. En plus d'avoir comparé nos 4 conditions les unes avec les autres, nous avons fusionné et interrogé 4 banques de données différentes regroupant des protéines déjà connues pour être sécrétées. Cette comparaison nous a permis de filtrer le groupe de protéines d'intérêt pour ne retenir plus que 12 protéines dont la sécrétion a déjà été décrite, cependant pas dans le cadre de la sénescence.

Afin d'étudier l'expression et la sécrétion de facteurs plus classiques du SASP, nous avons réalisé des expériences de qRT-PCR et de dosages ELISA en Multiplex à partir d'échantillons de cellules contrôles, traitées avec 200 μ M de GO et traitées avec 300 μ M de GO en phase précoce de sénescence. Au jour 3, nous avons observé une augmentation de l'expression génique de plusieurs marqueurs du SASP comme IL-1 α , IL-6, IL-8 mais également MMP3 et AREG. Aussi, nous avons montré une augmentation de la sécrétion de plusieurs

interleukines comme IL-1 α , IL-1ra, IL-4, IL-7 et IL-8. L'IL-6 n'a pas été retrouvée dans le milieu de culture.

VI. Effets du GO sur un modèle d'épiderme humain reconstruit

En collaboration avec la compagnie Ashland (Sophia-Antipolis, France), nous avons étudié les effets du GO sur RHE. Suite aux traitements et après plusieurs jours de récupération, nous avons remarqué une altération morphologique du tissu qui se manifeste par une réduction significative de son épaisseur. Nous avons également testé certains marqueurs de sénescence par qRT-PCR. L'expression génique de p16^{INK4A}, p21^{CIP1} et p53 augmentent significativement dans les tissus traités mais pas celle de p27^{KIP1}. Ces expériences ayant été réalisées 9 jours après le traitement au GO afin de permettre la récupération du tissu, nous pouvons émettre l'hypothèse que les RHE se trouvent déjà dans une phase avancée du processus de sénescence. Des expériences complémentaires seront nécessaires afin de pouvoir conclure quant à une potentielle induction de la sénescence des RHE suite au GO.

VII. Validation de notre modèle d'induction de la sénescence par le GO sur un deuxième donneur de NHEK

Afin de consolider nos résultats, il nous a paru nécessaire de tester notre modèle de sénescence au GO sur des kératinocytes issus d'un deuxième donneur. Notre donneur principal correspond à une femme de 48 ans, tandis que ce deuxième est une femme de 28 ans. Ainsi, nous avons montré que le GO induisait également un arrêt de la prolifération cellulaire ainsi qu'une activation de la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} en phase précoce de sénescence (jour 3), ainsi que l'apparition du marquage SA- β gal en phase tardive (jour 8).

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Discussion générale

La sénescence correspond à un processus cellulaire qui peut être dû à un raccourcissement des télomères dans le cas de la sénescence répllicative, ou à l'exposition à un stress provoquant des dommages à l'ADN ou un stress oxydant. Parmi les inducteurs de stress oxydant, on distingue les composés dicarbonylés comme le GO et le MGO, responsables de la production d'AGEs. Une étude récente réalisée sur des cellules vasculaires endothéliales humaines a montré que le GO, le MGO ou une combinaison des deux, pouvaient induire la sénescence cellulaire en augmentant la formation d'ERO et d'AGEs (Navarrete Santos et al., 2017). Le D-galactose, converti en glucose et participant à la glycolyse, provoque la sénescence de cerveaux murins en induisant l'accumulation de MGO (Li et al., 2019). Cependant, il existe encore très peu d'études portant sur les composés dicarbonylés et l'induction de la sénescence et dans la peau, mis à part deux publications suggérant un rôle du GO dans la sénescence des cellules de peau (Berge et al., 2007; Sejersen and Rattan, 2009), aucun mécanisme moléculaire n'a encore été décrit. Dans le cadre du vieillissement de la peau, nous avons voulu voir l'impact du GO sur un modèle de NHEK qui représente un type cellulaire cutané peu étudié comparé aux fibroblastes.

Le but ultime de ce projet serait de prévenir la propagation de la sénescence dans la peau due à l'effet paracrine du sécrétome. De ce fait, il nous a semblé intéressant de caractériser la composition du sécrétome suite au stress GO et associé aux premières étapes d'induction de la sénescence. Afin de récolter les milieux conditionnés précisément lors de cette fenêtre temporelle, il était donc nécessaire d'étudier les biomarqueurs de sénescence et les voies de signalisation impliquées dans les processus d'initiation et de maintien de la sénescence des NHEK induite par le GO.

I. Etude de l'effet du glyoxal dans l'induction de la sénescence des NHEK

Nous avons commencé par mettre au point un modèle d'induction de sénescence *in vitro* en exposant des NHEK à des doses répétées de GO pendant 48 h. Nous avons choisi d'utiliser des concentrations subcytotoxiques de 200 μ M et 300 μ M de GO afin d'observer d'éventuelles réponses dose-dépendantes. Nos résultats nous ont permis de distinguer deux phases distinctes de l'installation de la sénescence : Une phase précoce d'initiation de la sénescence se déroulant après 48h de traitements (jour 3) suivie d'une phase tardive après plusieurs jours de culture supplémentaires et durant laquelle le phénotype sénéscent est complètement installé (jour 8). Ces deux phases sont caractérisées par des biomarqueurs de sénescence communs comme un arrêt de la prolifération cellulaire et une diminution de l'expression du gène *LMNB1*. Cependant, en plus du fait que le marquage SA- β gal n'apparaît que lors de la phase tardive (jour 8), c'est au niveau de l'activation des voies de signalisation que nous avons remarqué les différences les plus importantes entre les deux phases. En effet, le GO initie la sénescence des NHEK en activant la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} lors de la phase précoce et non pas les voies classiques passant par p21^{CIP1} et p16^{INK4A}. Lors de la phase tardive, nous avons observé un changement de signalisation en faveur de l'activation de p16^{INK4A}/pRB pour maintenir le phénotype sénéscent et une inhibition de la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1}.

L'activation de la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} a déjà été décrite lors de la sénescence répllicative de précurseurs dérivés de la peau (Liu et al., 2015). Contrairement aux résultats obtenus lors de l'étude de Liu et al., nous n'avons pas détecté d'augmentation de la protéine p27^{KIP1} dans les NHEK en sénescence répllicative, ce qui laisse penser que l'activation *in vitro* de cette voie est dépendante du type cellulaire. Aussi, FOXO3a et p27^{KIP1} ont été impliqués dans l'arrêt de la prolifération de cellules souches embryonnaires soumises à une hyperglycémie (McClelland Descalzo et al., 2016). Cette étude est d'autant plus intéressante pour nos travaux que, le GO étant majoritairement produit à partir du glucose par glycation ou auto-oxydation du glucose, on peut se demander s'il existe un lien spécifique entre le métabolisme du glucose ou des sucres en général et l'activation de la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} dans les kératinocytes humains primaires. Afin de tester cette

hypothèse, il serait intéressant de déterminer si cette voie est activée lors de la phase précoce de sénescence induite suite à l'exposition de stress de différents types (UV, OIS, H₂O₂...).

L'aspect dynamique de l'établissement de la sénescence est un phénomène connu depuis plusieurs années. En fonction du contexte biologique, il est aujourd'hui admis que le processus de sénescence est composé de plusieurs étapes dont trois remarquables selon le modèle proposé par Van Deursen et al. (van Deursen, 2014; Herranz and Gil, 2018). Ce modèle décrit une première étape d'initiation de la sénescence à la suite de signaux inducteurs et qui entraîne la mise en place de la phase précoce (« early-senescence ») accompagnée d'un arrêt du cycle cellulaire souvent médié par les voies p53/p21^{CIP1} et p16^{INK4A}/pRb. A ce stade, les cellules subiraient une diminution de l'expression du gène *LMNB1* et par conséquent un remodelage de la chromatine à l'origine de la production du SASP, ce qui place les cellules dans un état de sénescence dite complète (« Full senescence »). Les auteurs qualifient ensuite de sénescence tardive (« Late senescence »), voire profonde (« Deep late senescence »), l'état dans lequel se trouve la cellule après diverses modifications génétiques et épigénétiques (augmentation de la rétrotransposition, protéolyse des histones...).

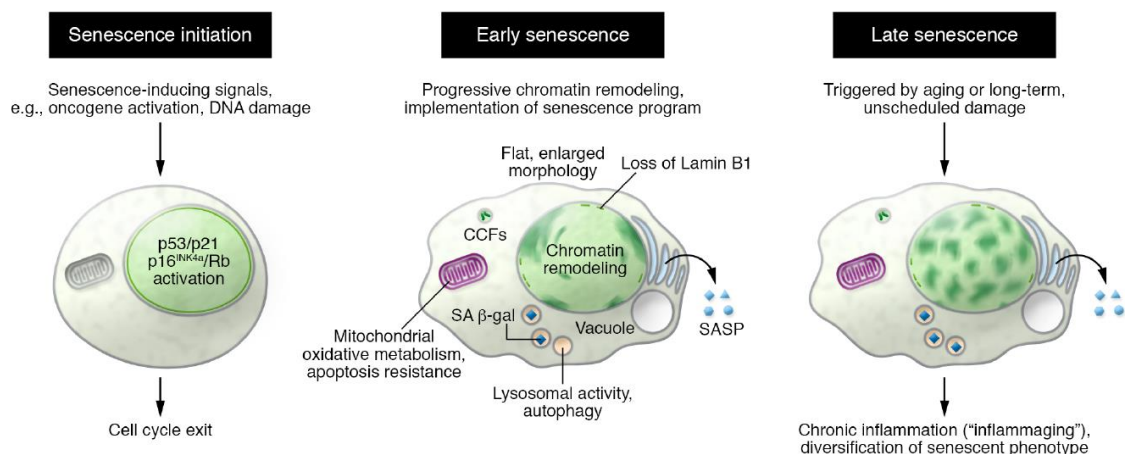


Figure 35. Modèle présentant les différentes étapes de l'installation du phénotype sénescence. D'après (Herranz and Gil, 2018).

Malgré de nombreuses similitudes entre ce modèle et celui que nous avons étudié, nous noterons une différence dans les termes choisis afin de définir les différentes phases de la sénescence. En effet, l'état de sénescence « tardive » de notre modèle de NHEK au jour 8

correspondrait à ce qu'ils appellent « full senescence ». Notre étude a donc permis d'apporter de nouveaux éléments dans la caractérisation de la dynamique de la sénescence.

La totalité de notre étude a été réalisée sur des NHEK provenant d'un donneur de sexe féminin âgé de 48 ans. Etant donné l'importance des variabilités entre individus humains et afin de consolider nos résultats, nous avons testé notre modèle d'induction de sénescence sur un deuxième donneur de NHEK de sexe féminin et âgé de 28 ans. Ainsi, les expériences d'arrêt de prolifération cellulaire et la détermination de l'activation de la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} lors de la phase précoce ainsi que le marquage SA-βgal au jour 8 ont été également observés dans ce second donneur.

Perspectives :

Ces travaux ont permis pour la première fois de mettre en évidence l'activation de la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} dans un modèle de sénescence jusqu'alors très peu étudié. Suite au stress GO, une déphosphorylation de AKT provoque la translocation nucléaire de FOXO3a qui, en tant que facteur de transcription, va activer l'expression de p27^{KIP1} réprimant ainsi l'activité de pRb par déphosphorylation. Cependant, il serait important de confirmer cette cascade de signalisation et le lien entre les différents acteurs de la voie en réalisant des expériences visant à inhiber cette voie en amont. La transfection de kératinocytes primaires étant connue pour être particulièrement difficile à réaliser, il serait plus envisageable d'utiliser des molécules permettant la phosphorylation d'AKT ou de FOXO3a ou celles empêchant la translocation nucléaire de FOXO3a. A terme, l'invalidation de p27^{KIP1} devrait empêcher l'induction de la sénescence suite au stress GO.

II. Le GO provoque un état de stress oxydant des NHEK

Comme évoqué précédemment, le glucose et ses dérivés (GO, MGO, D-Galactose) provoquent une augmentation d'ERO intracellulaires et un état de stress oxydant lié à l'arrêt de prolifération cellulaire (Li et al., 2019; McClelland Descalzo et al., 2016; Navarrete Santos et al., 2017). Nous avons commencé par montrer que le GO induisait une augmentation dose-dépendante du niveau de CML intracellulaires lors de la phase précoce de sénescence, laissant supposer que le GO pénètre dans la cellule et entraîne la formation d'AGEs délétères. Une exposition d'une heure des NHEK au GO a suffi pour provoquer une induction de ROS intracellulaires et un état de stress oxydant.

Ces résultats indiquent que le GO activerait la sénescence des NHEK et probablement la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} par l'intermédiaire des ERO.

Dans l'introduction de ce manuscrit, nous avons rapporté que les ERO entre autres induits par la stimulation du RAGE peuvent induire l'activation de la PI3K et d'AKT par phosphorylation et par conséquent l'inhibition de FOXO3a par séquestration dans le noyau (voir [Chapitre IV - Partie III.1.2](#)). Or, notre étude ainsi que celles de plusieurs autres équipes dont McClelland et al. (McClelland Descalzo et al., 2016) ont montré une activation par translocation nucléaire de FOXO3a engendrée par une déphosphorylation de AKT suite à une augmentation d'ERO. On sait que les ERO peuvent induire la voie des MAPK, notamment la voie JNK, connue pour activer la transcription de FOXO3a et son import nucléaire (Brown and Webb, 2018; Fasano et al., 2019) (**Figure 36**). Les ERO étant responsables de l'activation ou de l'inhibition de FOXO3a en fonction du contexte biologique, nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle les ERO induites suite au GO provoquent l'activation de FOXO3a par l'intermédiaire d'acteurs comme JNK et non via l'activation de la voie des PI3K, ce qui serait cohérent avec la déphosphorylation de AKT que nous avons observée. Cependant, le lien entre l'augmentation intracellulaire de CML suite au GO et celle des ERO reste encore à définir et l'hypothèse d'une boucle de rétrocontrôle médiée par la sécrétion de CML dans le milieu extracellulaire et la liaison CML-RAGE permettant d'induire des ERO intracellulaires pourrait constituer une première piste de recherche.

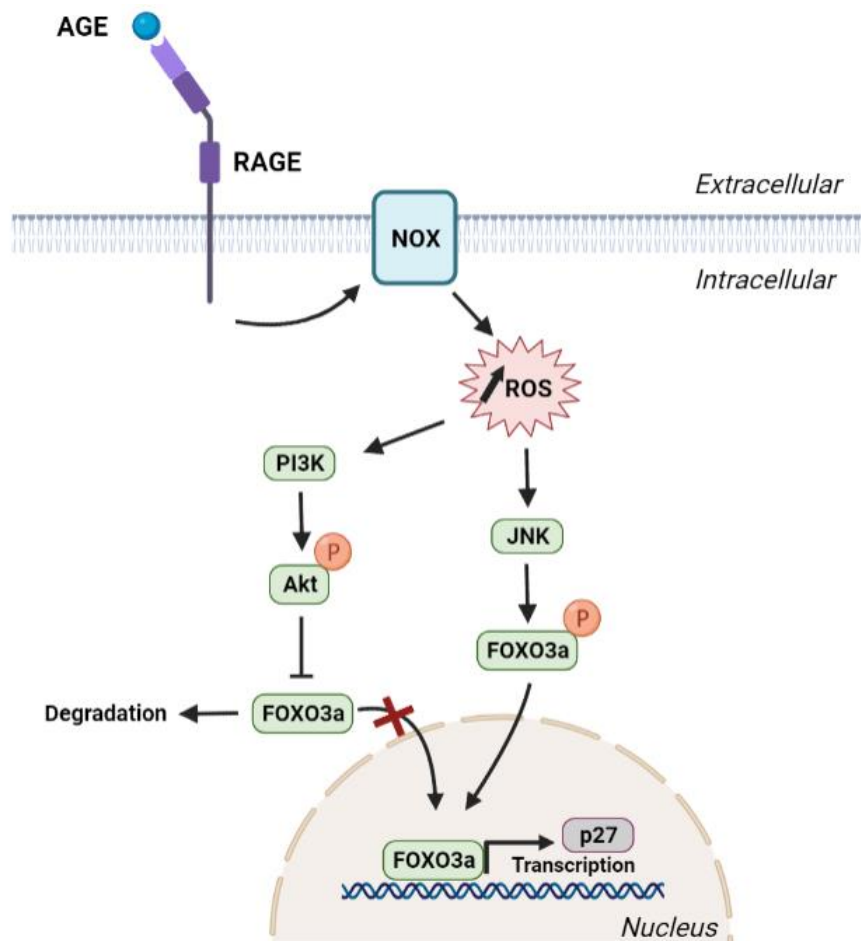


Figure 36. La régulation de FOXO3a par les ERO. Lors d'un stress oxydant, notamment suite à une liaison AGEs-RAGE, les ERO peuvent soit inhiber soit activer la translocation nucléaire et l'activité de FOXO3a en activant la voie PI3K/AKT/FOXO3a ou celle de JNK respectivement.

Perspectives :

On sait que la sénescence cellulaire induite par un stress active des voies de stress oxydant et/ou de dommages à l'ADN (Debacq-Chainiaux et al., 2016). Bien que nous ayons démontré l'implication des ROS dans la sénescence induite par le GO, des expériences supplémentaires visant à détecter une éventuelle induction de dommages à l'ADN seraient nécessaires. Des résultats préliminaires obtenus par notre laboratoire ont montré qu'il n'y avait pas de différences entre le nombre de foci γ H2AX des NHEK traités au GO et contrôles. Cependant, ces expériences devront être répétées afin de pouvoir tirer une conclusion définitive.

III. Caractérisation du GASP précoce et sélection de cibles anti-âge potentielles

Dans le cadre de l'étude du sécrétome, notre intérêt a porté sur la caractérisation du GASP précoce, c'est-à-dire sur le phénotype sécrétoire induit suite au stress GO par des cellules dont le processus de sénescence a été juste initié, dans lesquelles, nous ne détectons pas d'activité SA- β gal. En effet, la stratégie anti-âge que nous souhaitons développer consiste à agir sur le GASP en amont de la propagation de la sénescence.

Nous avons commencé par vérifier si certains facteurs que l'on retrouve classiquement dans le SASP sont présents dans le GASP précoce. De façon intéressante, nous avons montré une induction au niveau transcriptionnel et/ou sécrétoire de plusieurs cytokines (IL-1 α , IL-1ra, IL-6, IL-8) mais également MMP3, AREG, Eotaxin, IFN α 2, G-CSF, EGF et VEGF dans le GASP précoce. En 2010, Coppé et al. ont décrit que la sécrétion de la majorité de ces molécules était augmentée dans les cellules sénescents comparées à leur modèle de cellules quiescentes en pré-sénescence (Coppé et al., 2010). Il semblerait donc que dans le GASP précoce on retrouve des facteurs généralement associés au SASP de cellules en sénescence présentant, entre autres, une activité SA- β gal augmentée. Cependant, il n'est pas à exclure que l'induction précoce des facteurs identifiés dans le SASP et retrouvés dans le GASP soit une caractéristique spécifique du type cellulaire étudié.

Afin d'identifier des facteurs du sécrétome précoce spécifiquement induits par le GO, nous avons réalisé une analyse non biaisée par spectrométrie de masse LC-MS/MS des milieux conditionnés provenant des NHEK non traités, traités avec 200 μ M et 300 μ M de GO et correspondant à la phase précoce d'induction de la sénescence (jour 3). Nous avons fait le choix de comparer ces profils sécrétoires avec celui d'un SASP provenant de NHEK en sénescence répliquative afin d'identifier les protéines sécrétées communément entre le SASP et le GASP précoce, mais surtout celles spécifiques au GASP.

Parmi les 4 conditions testées et comparées aux cellules contrôles prolifératives, 1015 protéines sont significativement sur-sécrétées. Parmi ces 1015 protéines, 691 sont communes

au GASP précoce et au SASP. La majorité des protéines sécrétées par le GASP durant l'initiation de la sénescence sont donc des facteurs retrouvés dans un SASP de NHEK. Cependant, notre groupe d'intérêt concerne les protéines sur-sécrétées de façon précoce et spécifique du GASP. Il s'agit de 152 protéines dont 12 ont été déjà répertoriées dans des bases de données spécifiques au sécrétome. Ces 12 protéines sont indiquées dans le tableau ci-dessous (**Figure 37**) :

Secreted proteins of the GASP referenced in secretome databases			
High Mobility Group Box 2 (HMGB2)	3-oxoacid CoA-transferase 1 (OXCT1)	Ras homolog family member A (RHOA)	40S ribosomal protein S7 (RPS7)
Y-Box Binding Protein 1 (YBX1)	Acylphosphatase 2 (ACYP2)	Glycine Cleavage System Protein (HGCSH)	60S ribosomal protein L3 (RPL3)
Cystatin-M (CST6)	Nectin-4 (PVRL4)	Thrombospondin-2 (THBS2)	Protocadherin Fat 1 (FAT1)

Figure 37. Protéines spécifiques du GASP présentes dans les bases de données « Secretome ». Liste des gènes codant pour les 12 protéines spécifiquement sur-sécrétées dans le GASP connues comme étant sécrétées dans les bases de données « Secretome » interrogées (Voir le matériel et méthodes supplémentaires de l'article).

Parmi ces 12 protéines que l'on a comparé à la base de donnée du « SASP ATLAS », 4 d'entre elles (codées par les gènes *RHOA*, *THBS2*, *YBX1* et *RPS7*) représentent des facteurs du SASP mature issu de fibroblastes IMR90 dont la sénescence a été induite par le facteur oncogénique RAS ou par traitement à l'ATV, ou du SASP de cellules épithéliales rénales corticales irradiés (www.saspatlas.com). Il est à noter que dans cette étude les protéines solubles et les protéines contenues dans les exosomes ont été analysées séparément pour chaque condition (Basisty et al., 2019). A ce jour, les rôles de ces 4 protéines en tant que facteurs du SASP et leur lien avec la sénescence restent encore à être explorés. Toutefois, une étude réalisée sur des cellules cancéreuses prostatiques humaines dont la sénescence a été induite par traitements à la doxorubicine induit un arrêt de la prolifération cellulaire. L'expression constitutive de RhoA a cependant permis d'inhiber cet arrêt du cycle cellulaire en provoquant, entre autres, une hypophosphorylation de pRb ainsi qu'une induction de p21^{CIP1} et p27^{KIP1} (Park et al., 2007). Bien qu'il ne s'agisse pas de résultats obtenus au niveau

sur la forme sécrétée de RhoA, l'étude des interactions entre ce dernier et p27 pourrait être intéressante dans le cadre de notre modèle d'induction de la sénescence des NHEK au GO.

Bien qu'elle n'ait pas été décrite dans le « SASP Atlas », HMGB2 pourrait également constituer un composant intéressant du GASP précoce. Tout d'abord, elle fait partie de la même famille que HMGB1, un facteur dont la perte au niveau nucléaire et la sécrétion est considérée comme un marqueur de sénescence. Dans une lignée de fibroblastes humains IMR90 sénescents par stress réplicatif ou oncogénique, Aird et al. ont montré une diminution de HMGB2 à la fois au niveau transcriptionnel et protéique (Aird et al., 2016). Cependant, une quantité significative de HMGB2 restait liée à la chromatine des cellules sénescents et serait responsable de l'expression de plusieurs facteurs du SASP comme IL-6 et IL-8 et ce, de façon Nf-κB-indépendante. De même, l'inhibition du gène de HMGB2 leur a permis de réduire sa quantité protéique liée à la chromatine et donc de diminuer l'expression génique de facteurs du SASP. Du fait du rôle de HMGB2 intracellulaire dans la sénescence et la régulation du SASP, il serait intéressant de voir si sa sécrétion lors des premières étapes de la sénescence joue un rôle dans l'évolution et la propagation du processus.

Perspectives :

Bien que nous ayons réalisé une cartographie complète des protéines sur-sécrétées dans le GASP précoce et que nous les ayons comparées avec des facteurs d'un SASP mature, un travail de validation demeure nécessaire. En effet, il faudrait envisager de réaliser des expériences de culture de NHEK prolifératifs en présence de milieux conditionnés issus de NHEK en sénescence précoce afin d'étudier l'implication des facteurs du GASP dans l'induction de la sénescence de NHEK par effet paracrine.

Au-delà de l'intérêt que représente la phase précoce du GASP dans le cadre de notre stratégie anti-âge, il serait intéressant de caractériser le GASP mature associé à la phase tardive de la sénescence au jour 8. En effet, une comparaison de la modulation des facteurs du GASP au cours des différentes étapes de l'installation de la sénescence des NHEK suite au GO pourrait potentiellement aider à comprendre l'implication de certaines molécules dans la sénescence. Le GASP mature caractérisé pourrait également être comparé voire intégré au « SASP Atlas » (voir Chapitre II - Partie II.4.1.2).

Enfin, nous pouvons nous demander si le GASP est régulé par les voies de signalisation classiques du SASP comme les voies dépendantes de $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ ou p38MAPK . Il serait également intéressant d'analyser comment les voies impliquées dans la régulation du GASP sont modulées entre les phases précoces et tardives dans notre modèle de sénescence induite par le GO.

IV. Effets du glyoxal sur un modèle d'épiderme humain reconstruit

Dans le but de se rapprocher de la complexité d'un épiderme humain, nous avons collaboré avec la compagnie Ashland (Sophia-Antipolis) afin de travailler sur un modèle reconstruit. Nous avons mis au point un modèle de traitement de RHE permettant d'étudier les effets du GO sans provoquer de toxicité. Ainsi, des traitements sur 48 h avec des doses répétées de GO à 100 μM ont été effectués puis les tests ont été réalisés sur les épidermes 9 jours après la fin du traitement. Le GO a induit une altération morphologique caractérisée par un amincissement des RHE ainsi que l'expression génique des marqueurs de sénescence p53 , p21^{CIP1} et $\text{p16}^{\text{INK4A}}$. Cependant, aucun changement n'a été remarqué concernant l'expression de p27^{KIP1} . Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'extraction des ARNm ayant été réalisée au jour 11, les RHE se trouvaient dans une phase tardive de sénescence.

Perspectives :

Dans le but de caractériser la dynamique de la sénescence, nous pourrions étudier les différents marqueurs de sénescence de façon précoce, c'est-à-dire après l'arrêt des traitements au GO avant la phase de récupération. La mise en évidence des voies de signalisation impliquées dans la sénescence des RHE suite au GO serait également pertinente à étudier.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse nous ont permis de mettre en évidence pour la première fois une induction de la sénescence cellulaire de kératinocytes humains normaux primaires en culture par le glyoxal. *In vitro*, il est bien admis que l'établissement du phénotype sénescence peut avoir lieu après un stress. Cependant, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes moléculaires associés à l'initiation du processus de sénescence. Dans notre étude, nous avons distingué deux phases différentes de la sénescence induite par le stress GO : Une phase précoce, se situant au bout de 48 h de traitement, associée à un arrêt de la prolifération cellulaire et une diminution de l'expression du gène *LMNB1*. A ce stade, les voies classiques d'induction du cycle cellulaire p53/p21^{CIP1} et p16^{INK4A}/pRb ne sont pas activées et l'initiation de la sénescence est médiée par la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1}. Nous avons ensuite caractérisé une phase tardive durant laquelle le phénotype sénescence des NHEK traités au GO est bien établi avec l'apparition du marquage SA-βgal. De façon intéressante, nous avons montré que la voie p16^{INK4A}/pRb prenait le relais afin de maintenir la sénescence au dépend d'une inactivation de la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1}. La voie p21^{CIP1}/p53 ne semble pas être impliquée dans la sénescence des NHEK suite au GO. Aussi, le GO provoque la production de CML et d'ERO intracellulaires et par conséquent, un état de stress oxydant qui serait probablement à l'origine de l'induction de la sénescence et de l'activation de la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1}.

Toujours dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'initiation du processus de sénescence, une partie importante de notre projet a consisté à caractériser le profil sécrétoire des NHEK en sénescence précoce, le « GASP précoce ». Des études par qRT-PCR et du dosage ELISA en Multiplex nous ont permis de voir que plusieurs facteurs classiques et connus du SASP mature sont présents de façon précoce dans le GASP (au jour 3). Cependant, nous avons voulu mettre en évidence de nouvelles protéines potentiellement impliquées dans la sénescence induite par le GO en réalisant une cartographie complète des molécules sécrétées dans le GASP précoce par spectrométrie de masse en label-free. En comparant l'ensemble des protéines identifiées avec le SASP de NHEK en sénescence répliquative, nous avons remarqué que la majorité des protéines sécrétées dans le GASP précoce sont communes à celles d'un SASP mature. 152 protéines spécifiquement sur-

sécrétées dans le GASP, non retrouvées dans le SASP, ont été identifiées et dont le rôle dans l'effet paracrine du GASP mériterait d'être exploré dans le cadre de la poursuite du projet.

Ce projet de thèse a donc permis d'apporter de nouvelles connaissances quant aux mécanismes d'induction de la sénescence *in vitro* et la caractérisation du phénotype sécrétoire des NHEK (**Figure 38**), un modèle encore très peu étudié. La sénescence induite par le GO et médiée par la voie AKT/FOXO3a/p27^{KIP1} a également été confirmée sur les NHEK d'un deuxième donneur, consolidant ainsi nos résultats. Bien qu'il s'agisse d'expériences encore préliminaires, l'augmentation des marqueurs de sénescence sur RHE suite au GO est une piste prometteuse quant à la transposition de notre modèle d'induction sur NHEK à des tissus plus complexes comme les RHE ou, à terme, des peaux reconstruites.

Enfin, dans le cadre confidentiel de cette thèse CIFRE avec LVMH Recherche et en collaboration avec la compagnie Ashland, nous avons commencé à aborder l'aspect de valorisation du modèle par la sélection d'ingrédients sénomorphiques pouvant potentiellement cibler le GASP précoce. La poursuite de ce projet devrait permettre la modulation du GASP précoce par le biais des sénomorphiques et donc, prévenir l'installation de la sénescence des NHEK.

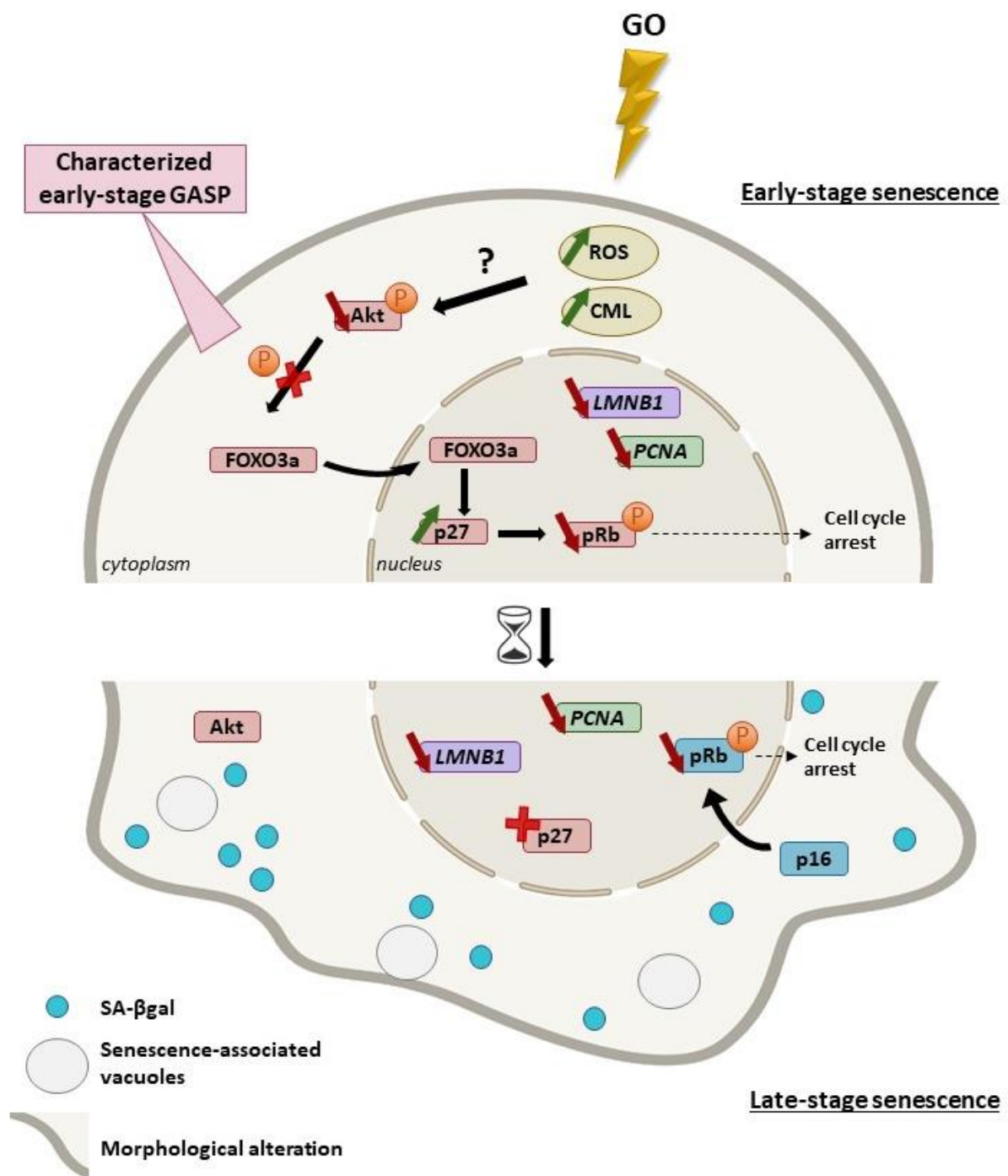


Figure 38. Modèle proposé du rôle du glyoxal dans l'induction de la sénescence des NHEK. *In vitro*, le GO induirait une phase précoce de la sénescence des NHEK caractérisée par une augmentation de ROS et de CML. Cet état de stress oxydant serait potentiellement l'activateur direct ou indirect de la voie AKT/FOXO3a/p27, responsable de l'arrêt de prolifération cellulaire. Cette phase précoce est également caractérisée par la sécrétion d'un GASP précoce. Plusieurs jours de récupération permettent aux NHEK d'atteindre un état de sénescence tardive médiée par la voie p16/pRb et caractérisée par une augmentation de l'activité SA-βGal et l'apparition de vacuoles associées à la sénescence. Une diminution de l'expression de PCNA et de la LMNB1 ainsi que des altérations morphologiques se déroulent lors de ces deux phases.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbadie, C., Pluquet, O., and Pourtier, A. (2017). Epithelial cell senescence: an adaptive response to pre-carcinogenic stresses? *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 4471–4509.
- Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* **9**, 400–414.
- Acosta, J.C., O’Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., et al. (2008). Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell* **133**, 1006–1018.
- Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrusis, M., et al. (2013a). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* **15**, 978–990.
- Acosta, J.C., Snijders, A.P., and Gil, J. (2013b). Unbiased Characterization of the Senescence-Associated Secretome Using SILAC-Based Quantitative Proteomics. In *Cell Senescence*, L. Galluzzi, I. Vitale, O. Kepp, and G. Kroemer, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 175–184.
- Advedissian, T., Deshayes, F., Poirier, F., Viguier, M., and Richarme, G. (2016). The Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 prevents glycation damage in human keratinocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **473**, 87–91.
- Aird, K.M., Iwasaki, O., Kossenkov, A.V., Tanizawa, H., Fatkhutdinov, N., Bitler, B.G., Le, L., Alicea, G., Yang, T.-L., Johnson, F.B., et al. (2016). HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci. *The Journal of Cell Biology* **215**, 325–334.
- Aldini, G., Vistoli, G., Stefek, M., Chondrogianni, N., Grune, T., Sereikaite, J., Sadowska-Bartos, I., and Bartosz, G. (2013). Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. *Free Radical Research* **47**, 93–137.
- Alers, S., Löffler, A.S., Wesselborg, S., and Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks. *Mol Cell Biol* **32**, 2–11.
- Alexander, K., and Hinds, P.W. (2001). Requirement for p27KIP1 in Retinoblastoma Protein-Mediated Senescence. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 3616–3631.
- Alimbetov, D., Davis, T., Brook, A.J.C., Cox, L.S., Faragher, R.G.A., Nurgozhin, T., Zhumadilov, Z., and Kipling, D. (2016). Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology* **17**, 305–315.
- Anerillas, C., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2020). Regulation of senescence traits by MAPKs. *GeroScience*.

Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Semenchenko, A.V., Tyndyk, M.L., Yurova, M.N., Kovalenko, I.G., et al. (2011). If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging* 3, 148–157.

Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P.S., and Curtis, R. (2004). The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev.* 18, 3004–3009.

Ariga, H., Takahashi-Niki, K., Kato, I., Maita, H., Niki, T., and Iguchi-Ariga, S.M.M. (2013). Neuroprotective Function of DJ-1 in Parkinson's Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013.

Asadipooya, K., and Uy, E.M. (2019). Advanced Glycation End Products (AGEs), Receptor for AGEs, Diabetes, and Bone: Review of the Literature. *J Endocr Soc* 3, 1799–1818.

Avery, S.V. (2011). Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal* 434, 201–210.

Baar, M.P., Brandt, R.M.C., Putavet, D.A., Klein, J.D.D., Derks, K.W.J., Bourgeois, B.R.M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D.A., et al. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* 169, 132–147.e16.

Baba, S.P., Barski, O.A., Ahmed, Y., O'Toole, T.E., Conklin, D.J., Bhatnagar, A., and Srivastava, S. (2009). Reductive Metabolism of AGE Precursors: A Metabolic Route for Preventing AGE Accumulation in Cardiovascular Tissue. *Diabetes* 58, 2486–2497.

Bair, W.B., Cabello, C.M., Uchida, K., Bause, A.S., and Wondrak, G.T. (2010). GLO1 Overexpression in Human Malignant Melanoma. *Melanoma Res* 20, 85–96.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236.

Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., Saltness, R., Jeganathan, K.B., Versoza, G.C., Pezeshki, A.-M., et al. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184–189.

Barlovic, D., Thomas, M., and Jandeleit-Dahm, K. (2010). Cardiovascular Disease: What's All the AGE/RAGE About? *CHDDT* 10, 7–15.

Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633–637.

Basisty, N., Kale, A., Jeon, O.H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., et al. (2019). A Proteomic Atlas of Senescence-Associated Secretomes for Aging Biomarker Development (Cell Biology).

Bekaert, S., Meyer, T.D., and Oostveldt, P.V. (2005). Telomere Attrition as Ageing Biomarker. *ANTICANCER RESEARCH* 11.

Berge, U., Behrens, J., and Rattan, S.I.S. (2007). Sugar-Induced Premature Aging and Altered Differentiation in Human Epidermal Keratinocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, 524–529.

Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905.

Bertrand-Vallery, V., Boilan, E., Ninane, N., Demazy, C., Friguet, B., Toussaint, O., Poumay, Y., and Debacq-Chainiaux, F. (2010). Repeated exposures to UVB induce differentiation rather than senescence of human keratinocytes lacking p16(INK-4A). *Biogerontology* 11, 167–181.

Betts, J.G., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J.E., Korol, O., Kruse, D., Poe, B., Wise, J.A., Womble, M., and Young, K.A. *Anatomy & Physiology*. 1420.

Black, A.P.B., Ardern-Jones, M.R., Kasproicz, V., Bowness, P., Jones, L., Bailey, A.S., and Ogg, G.S. (2007). Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *European Journal of Immunology* 37, 1485–1493.

Bodnar, A.G. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* 279, 349–352.

Borodkina, A.V., Deryabin, P.I., Giukova, A.A., and Nikolsky, N.N. (2018). “Social Life” of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It? *Acta Naturae* 10, 4–14.

Boyd, A.C., Abdel-Wahab, Y.H.A., McKillop, A.M., McNulty, H., Barnett, C.R., O’Harte, F.P.M., and Flatt, P.R. (2000). Impaired ability of glycated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1523, 128–134.

Brown, A.K., and Webb, A.E. (2018). Regulation of FOXO Factors in Mammalian Cells. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 165–192.

Bussian, T.J., Aziz, A., Meyer, C.F., Swenson, B.L., van Deursen, J.M., and Baker, D.J. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 562, 578–582.

Cai, W., Ramdas, M., Zhu, L., Chen, X., Striker, G.E., and Vlassara, H. (2012). Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15888–15893.

Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer* 33, 703–709.

Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology* 75, 685–705.

Cappello, C., Zwergal, A., Kancierski, S., Haas, S.C., Kandemir, J.D., Huber, R., Page, S., and Brand, K. (2009). C/EBP β enhances NF- κ B-associated signalling by reducing the level of I κ B- α . *Cellular Signalling* 21, 1918–1924.

Carvalho, C., and Cardoso, S. (2020). Diabetes-Alzheimer's disease link: Targeting mitochondrial dysfunction and redox imbalance. *Antioxidants & Redox Signaling* ars.2020.8056.

CB Insights Research. The Future Of Aging? The New Drugs & Tech Working To Extend Life & Wellness. <https://www.cbinsights.com/research/report/future-aging-technology-startups/>.

Cepas, V., Collino, M., Mayo, J.C., and Sainz, R.M. (2020). Redox Signaling and Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in Diet-Related Diseases. *Antioxidants* 9, 142.

Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3 σ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *401*, 5.

Chandra, T. (2016). Senescence Associated Heterochromatic Foci: SAHF. In *The Functional Nucleus*, D.P. Bazett-Jones, and G. Dellaire, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 205–218.

Chandramohan, V., Mineva, N.D., Burke, B., Jeay, S., Wu, M., Shen, J., Yang, W., Hann, S.R., and Sonenshein, G.E. (2008). c-Myc represses FOXO3a-mediated transcription of the gene encoding the p27Kip1 cyclin dependent kinase inhibitor. *J. Cell. Biochem.* 104, 2091–2106.

Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., et al. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22, 78–83.

Chaudhuri, J., Bains, Y., Guha, S., Kahn, A., Hall, D., Bose, N., Gugliucci, A., and Kapahi, P. (2018). The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality. *Cell Metab* 28, 337–352.

Chenau, J., Michelland, S., and Seve, M. (2008). Le sécrétome : définitions et intérêt biomédical. *La Revue de Médecine Interne* 29, 606–608.

Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J.E., Premsrirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C.S., et al. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* 25, 2125–2136.

Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., and van Deursen, J.M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine* 21, 1424–1435.

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

Chung, H.Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A.Y., Carter, C., Yu, B.P., and Leeuwenburgh, C. (2009). Molecular Inflammation: Underpinnings of Aging and Age-related Diseases. *Ageing Res Rev* 8, 18–30.

Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10, 51–57.

- Collado, M., Medema, R.H., García-Cao, I., Dubuisson, M.L.N., Barradas, M., Glassford, J., Rivas, C., Burgering, B.M.T., Serrano, M., and Lam, E.W.-F. (2000). Inhibition of the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway Induces a Senescence-like Arrest Mediated by p27^{Kip1}. *J. Biol. Chem.* 275, 21960–21968.
- Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L., and Rando, T.A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433, 760–764.
- Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol* 6.
- Coppe, J.-P., Boisen, M., Ho Sun, C., Wong, B.J.F., Kang, M.K., Park, N.-H., Desprez, P.-Y., Campisi, J., and Krtolica, A. (2008). A Role for Fibroblasts in Mediating the Effects of Tobacco-Induced Epithelial Cell Growth and Invasion. *Mol Cancer Res* 6, 1085–1098.
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol* 5, 99–118.
- Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C.K., Freund, A., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2011). Tumor Suppressor and Aging Biomarker p16^{INK4a} Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype. *J. Biol. Chem.* 286, 36396–36403.
- Cox, J., Hein, M.Y., Luber, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 13, 2513–2526.
- Davaapil, H., Brockes, J.P., and Yun, M.H. (2017). Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development* 144, 106–114.
- Davalos, A.R., Kawahara, M., Malhotra, G.K., Schaum, N., Huang, J., Ved, U., Beausejour, C.M., Coppe, J.-P., Rodier, F., and Campisi, J. (2013). p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J Cell Biol* 201, 613–629.
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 4, 1798–1806.
- Debacq-Chainiaux, F., Leduc, C., Verbeke, A., and Toussaint, O. (2012). UV, stress and aging. *Dermatoendocrinol* 4, 236–240.
- Debacq-Chainiaux, F., Ben Ameer, R., Bauwens, E., Dumortier, E., Toutfaire, M., and Toussaint, O. (2016). Stress-Induced (Premature) Senescence. In *Cellular Ageing and Replicative Senescence*, S.I.S. Rattan, and L. Hayflick, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 243–262.
- Demaria, M. (2019). Cellular senescence: methods and protocols.

Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M.E.T., et al. (2014). An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31, 722–733.

Demaria, M., Desprez, P.Y., Campisi, J., and Velarde, M.C. (2015). Cell Autonomous and Non-autonomous Effects of Senescent Cells in the Skin. *J Invest Dermatol* 135, 1722–1726.

van Deursen, J.M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509, 439–446.

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

Dobson, M., Ramakrishnan, G., Ma, S., Kaplun, L., Balan, V., Fridman, R., and Tzivion, G. (2011). Bimodal Regulation of FoxO3 by AKT and 14-3-3. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1453–1464.

Doles, J., Storer, M., Cozzuto, L., Roma, G., and Keyes, W.M. (2012). Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function. *Genes Dev* 26, 2144–2153.

Dolgin, E. (2020). Send in the senolytics. *Nat Biotechnol* 38, 1371–1377.

Doonan, R., McElwee, J.J., Matthijssens, F., Walker, G.A., Houthoofd, K., Back, P., Matscheski, A., Vanfleteren, J.R., and Gems, D. (2008). Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 22, 3236–3241.

Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M.G., Zhu, J., Sen, P., Wangenstein, K.J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z., et al. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* 550, 402–406.

Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 3471–3480.

Edgar, D., Shabalina, I., Camara, Y., Wredenberg, A., Calvaruso, M.A., Nijtmans, L., Nedergaard, J., Cannon, B., Larsson, N.-G., and Trifunovic, A. (2009). Random Point Mutations with Major Effects on Protein-Coding Genes Are the Driving Force behind Premature Aging in mtDNA Mutator Mice. *Cell Metabolism* 10, 131–138.

Eggert, T., Wolter, K., Ji, J., Ma, C., Yevsa, T., Klotz, S., Medina-Echeverz, J., Longerich, T., Forgues, M., Reisinger, F., et al. (2016). Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* 30, 533–547.

Evangelou, K., Lougiakis, N., Rizou, S.V., Kotsinas, A., Kletsas, D., Muñoz-Espín, D., Kastrinakis, N.G., Pouli, N., Marakos, P., Townsend, P., et al. (2017). Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Aging Cell* 16, 192–197.

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

Faget, D.V., Ren, Q., and Stewart, S.A. (2019). Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* 19, 439–453.

Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., and Maibach, H.I. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science* 30, 87–95.

Fasano, C., Disciglio, V., Bertora, S., Lepore Signorile, M., and Simone, C. (2019). FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: A Round Trip in Cellular Stress Response. *Cells* 8, 1110.

Fédération Internationale du Diabète Atlas de la fid 9ème édition et autres ressources. <https://diabetesatlas.org/fr/resources/>.

Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14, 2015–2027.

Fernandez-Marcos, P.J., and Serrano, M. (2016). Mitochondrial Damage Induces Senescence with a Twisted Arm. *Cell Metabolism* 23, 229–230.

Fleming, T.H., Humpert, P.M., Nawroth, P.P., and Bierhaus, A. (2010). Reactive Metabolites and AGE/RAGE-Mediated Cellular Dysfunction Affect the Aging Process – A Mini-Review. *Gerontology*.

Fleming, T.H., Theilen, T.-M., Masania, J., Wunderle, M., Karimi, J., Vittas, S., Bernauer, R., Bierhaus, A., Rabbani, N., Thornalley, P.J., et al. (2013). Aging-Dependent Reduction in Glyoxalase 1 Delays Wound Healing. *Gerontology* 59, 427–437.

Flores, J.M., Martín-Caballero, J., and García-Fernández, R.A. (2014). p21 and p27 a shared senescence history. *Cell Cycle* 13, 1655–1656.

Fournet, M., Bonté, F., and Desmoulière, A. (2018). Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. *Aging Dis* 9, 880–900.

Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M.P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., et al. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development* 128, 92–105.

Freund, A., Orjalo, A.V., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2010). Inflammatory Networks during Cellular Senescence: Causes and Consequences. *Trends Mol Med* 16, 238–246.

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

Fu, T.-M., Jacob, D.J., Wittrock, F., Burrows, J.P., Vrekoussis, M., and Henze, D.K. (2008). Global budgets of atmospheric glyoxal and methylglyoxal, and implications for formation of secondary organic aerosols. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 113.

- Fuhrmann-Stroissnigg, H., Ling, Y.Y., Zhao, J., McGowan, S.J., Zhu, Y., Brooks, R.W., Grassi, D., Gregg, S.Q., Stripay, J.L., Dorronsoro, A., et al. (2017). Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun* 8.
- Funakoshi, M., Tsuda, M., Muramatsu, K., Hatsuda, H., Morishita, S., and Aigaki, T. (2011). A gain-of-function screen identifies wdb and lkb1 as lifespan-extending genes in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405, 667–672.
- García-Fernández, R.A., García-Palencia, P., Sánchez, M.Á., Gil-Gómez, G., Sánchez, B., Rollán, E., Martín-Caballero, J., and Flores, J.M. (2011). Combined loss of p21waf1/cip1 and p27kip1 enhances tumorigenesis in mice. *Lab Invest* 91, 1634–1642.
- Gebhardt, C., Riehl, A., Durchdewald, M., Németh, J., Fürstenberger, G., Müller-Decker, K., Enk, A., Arnold, B., Bierhaus, A., Nawroth, P.P., et al. (2008). RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J Exp Med* 205, 275–285.
- Georgakilas, A.G., Martin, O.A., and Bonner, W.M. (2017). p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends in Molecular Medicine* 23, 310–319.
- Ghosh, K., and Capell, B.C. (2016). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging. *J Invest Dermatol* 136, 2133–2139.
- Giannakou, M.E., and Partridge, L. (2004). The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends in Cell Biology* 14, 408–412.
- Gkogkolou, P., and Böhm, M. (2012). Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermato-Endocrinology* 4, 259–270.
- Gladyshev, V.N. (2014). The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory! *Antioxid Redox Signal* 20, 727–731.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., and Piette, J. (2006). NF-κB activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochemical Pharmacology* 72, 1493–1505.
- Goligorsky, M.S., Chen, J., and Patschan, S. (2009). Stress-induced premature senescence of endothelial cells: a perilous state between recovery and point of no return: Current Opinion in Hematology 16, 215–219.
- Greer, E.L., and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410–7425.
- Grossin, N., Auger, F., Niquet-Leridon, C., Durieux, N., Montaigne, D., Schmidt, A.M., Susen, S., Jacolot, P., Beuscart, J.-B., Tessier, F.J., et al. (2015). Dietary CML-enriched protein induces functional arterial aging in a RAGE-dependent manner in mice. *Molecular Nutrition & Food Research* 59, 927–938.
- Gruber, J., Fong, S., Chen, C.-B., Yoong, S., Pastorin, G., Schaffer, S., Cheah, I., and Halliwell, B. (2013). Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. *Biotechnology Advances* 31, 563–592.

Guarente, L. (2008). Mitochondria—A Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins? *Cell* 132, 171–176.

Guerrero, E., Vasudevaraju, P., Hegde, M.L., Britton, G.B., and Rao, K.S. (2013). Recent Advances in α -Synuclein Functions, Advanced Glycation, and Toxicity: Implications for Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* 47, 525–536.

Hänel, K.H., Cornelissen, C., Lüscher, B., and Baron, J.M. (2013). Cytokines and the Skin Barrier. *Int J Mol Sci* 14, 6720–6745.

Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392–395.

Hartog, J.W.L., Voors, A.A., Schalkwijk, C.G., Scheijen, J., Smilde, T.D.J., Damman, K., Bakker, S.J.L., Smit, A.J., and van Veldhuisen, D.J. (2007). Clinical and prognostic value of advanced glycation end-products in chronic heart failure. *European Heart Journal* 28, 2879–2885.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25, 585–621.

Heck, D.E., Gerecke, D.R., Vetrano, A.M., and Laskin, J.D. (2004). Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. *Toxicology and Applied Pharmacology* 195, 288–297.

Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, p53, and p21CIP1, but Not p16INK4a. *Molecular Cell* 14, 501–513.

Hernandez-Segura, A., de Jong, T.V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., and Demaria, M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol* 27, 2652–2660.e4.

Hernandez-Segura, A., Nehme, J., and Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology* 28, 436–453.

Herranz, N., and Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence.

Herzig, S., and Shaw, R.J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 121–135.

Hiona, A., Sanz, A., Kujoth, G.C., Pamplona, R., Seo, A.Y., Hofer, T., Someya, S., Miyakawa, T., Nakayama, C., Samhan-Arias, A.K., et al. (2010). Mitochondrial DNA Mutations Induce Mitochondrial Dysfunction, Apoptosis and Sarcopenia in Skeletal Muscle of Mitochondrial DNA Mutator Mice. *PLoS ONE* 5, e11468.

Hnit, S.S.T., Xie, C., Yao, M., Holst, J., Bensoussan, A., De Souza, P., Li, Z., and Dong, Q. (2015). p27 Kip1 signaling: Transcriptional and post-translational regulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 68, 9–14.

Hoffmann, A., and Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunological Reviews* 210, 171–186.

Höhn, A., Jung, T., Grimm, S., and Grune, T. (2010). Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: Role in senescent cells. *Free Radical Biology and Medicine* 48, 1100–1108.

Höhn, A., Weber, D., Jung, T., Ott, C., Hugo, M., Kochlik, B., Kehm, R., König, J., Grune, T., and Castro, J.P. (2016). Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol* 11, 482–501.

Hongo, A., Okumura, N., Nakahara, M., Kay, E.P., and Koizumi, N. (2017). The Effect of a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor on Cellular Senescence of Cultivated Human Corneal Endothelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 3325.

Hubackova, S., Krejcikova, K., Bartek, J., and Hodny, Z. (2012). IL1- and TGF β -Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine “bystander senescence.” *Aging (Albany NY)* 4, 932–951.

Ido, Y., Durantou, A., Lan, F., Cacicedo, J.M., Chen, T.C., Breton, L., and Ruderman, N.B. (2012). Acute Activation of AMP-Activated Protein Kinase Prevents H₂O₂-Induced Premature Senescence in Primary Human Keratinocytes. *PLoS One* 7.

Ined La population en graphiques. https://www.ined.fr/fr/tout-savoir-population/graphiques-cartes/population_graphiques/.

Insee Population par sexe et groupe d'âges - Données annuelles 2021. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2381474>.

Insee Causes de décès des personnes âgées. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2386247>.

Ishiguro, H., Nakaigawa, N., Miyoshi, Y., Fujinami, K., Kubota, Y., and Uemura, H. (2005). Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development. *The Prostate* 64, 92–100.

Ito, Y., Hoare, M., and Narita, M. (2017). Spatial and Temporal Control of Senescence. *Trends in Cell Biology* 27, 820–832.

Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., et al. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med* 23, 775–781.

Jiang, L., Wang, J., Wang, Z., Huang, W., Yang, Y., Cai, Z., and Li, K. (2018). Role of the Glyoxalase System in Alzheimer's Disease. *JAD* 66, 887–899.

Johansson, Å., Enroth, S., and Gyllenstein, U. (2013). Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan. *PLoS ONE* 8, e67378.

Jones, C.J., Kipling, D., Morris, M., Hepburn, P., Skinner, J., Bounacer, A., Wyllie, F.S., Ivan, M., Bartek, J., Wynford-Thomas, D., et al. (2000). Evidence for a Telomere-Independent “Clock” Limiting RAS Oncogene-Driven Proliferation of Human Thyroid Epithelial Cells. *Mol Cell Biol* 20, 5690–5699.

Jun, J.-I., and Lau, L.F. (2010). The Matricellular Protein CCN1/CYR61 Induces Fibroblast Senescence and Restricts Fibrosis in Cutaneous Wound Healing. *Nat Cell Biol* 12, 676–685.

Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B.A., Campisi, J., and Elledge, S.J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* 349, aaa5612.

Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479, 547–551.

Kawahara, T.L.A., Michishita, E., Adler, A.S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., McCord, R.A., Ongaigui, K.C.L., Boxer, L.D., Chang, H.Y., et al. (2009). SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to control of NF- κ B dependent gene expression and organismal lifespan. *Cell* 136, 62–74.

Kennedy, A.L., McBryan, T., Enders, G.H., Johnson, F.B., Zhang, R., and Adams, P.D. (2010). Senescent mouse cells fail to overtly regulate the HIRA histone chaperone and do not form robust Senescence Associated Heterochromatin Foci. *Cell Div* 5, 16.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461–464.

Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell* 127, 265–275.

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

Kirschner, N., and Brandner, J.M. (2012). Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1257, 158–166.

Ko, J., Kim, I., Yoo, S., Min, B., Kim, K., and Park, C. (2005). Conversion of Methylglyoxal to Acetol by *Escherichia coli* Aldo-Keto Reductases. *J Bacteriol* 187, 5782–5789.

Ko, S.-Y., Lin, Y.-P., Lin, Y.-S., and Chang, S.-S. (2010). Advanced glycation end products enhance amyloid precursor protein expression by inducing reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* 49, 474–480.

Kortlever, R.M., Higgins, P.J., and Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* 8, 877–884.

Köten, B., Simanski, M., Gläser, R., Podschun, R., Schröder, J.-M., and Harder, J. (2009). RNase 7 Contributes to the Cutaneous Defense against *Enterococcus faecium*. *PLoS ONE* 4, e6424.

Krhač, M., and Lovrenčić, M.V. (2019). Update on biomarkers of glycemic control. *World J Diabetes* 10, 1–15.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114, 1299–1307.

Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., and Lowe, S.W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 134, 657–667.

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

Kruglikov, I.L., Zhang, Z., and Scherer, P.E. (2019). Caveolin-1 in skin aging – From innocent bystander to major contributor. *Ageing Research Reviews* 55, 100959.

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

Kuhla, B., Boeck, K., Schmidt, A., Ogunlade, V., Arendt, T., Münch, G., and Lüth, H.-J. (2007). Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of Aging* 28, 29–41.

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

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

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

Kwon, M., Lee, J., Lee, C., and Park, C. (2012). Genomic Rearrangements Leading to Overexpression of Aldo-Keto Reductase YafB of *Escherichia coli* Confer Resistance to Glyoxal. *J Bacteriol* 194, 1979–1988.

Labbadia, J., and Morimoto, R.I. (2015). The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annu Rev Biochem* 84, 435–464.

Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A.V., Patil, C.K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S.C., Davalos, A.R., Wilson-Edell, K.A., Liu, S., et al. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol* 17, 1049–1061.

Larsen, S.A., Kassem, M., and Rattan, S.I. (2012). Glucose metabolite glyoxal induces senescence in telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Chem Cent J* 6, 18.

Lecot, P., Alimirah, F., Desprez, P.-Y., Campisi, J., and Wiley, C. (2016). Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br J Cancer* 114, 1180–1184.

Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195.

Lee, E.J., Kim, J.Y., and Oh, S.H. (2016). Advanced glycation end products (AGEs) promote melanogenesis through receptor for AGEs. *Sci Rep* 6.

Lee, J., Song, J., Kwon, K., Jang, S., Kim, C., Baek, K., Kim, J., and Park, C. (2012). Human DJ-1 and its homologs are novel glyoxalases. *Human Molecular Genetics* 21, 3215–3225.

Lee, S.-H., Lee, J.-H., Lee, H.-Y., and Min, K.-J. (2019). Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Rep* 52, 24–34.

Lewis, D.A., Yi, Q., Travers, J.B., and Spandau, D.F. (2008). UVB-induced Senescence in Human Keratinocytes Requires a Functional Insulin-like Growth Factor-1 Receptor and p53. *Mol Biol Cell* 19, 1346–1353.

Li, J., and Schmidt, A.M. (1997). Characterization and Functional Analysis of the Promoter of RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.* 272, 16498–16506.

Li, H., Zheng, L., Chen, C., Liu, X., and Zhang, W. (2019). Brain Senescence Caused by Elevated Levels of Reactive Metabolite Methylglyoxal on D-Galactose-Induced Aging Mice. *Front Neurosci* 13.

Li, X., Xu, H., Xu, C., Lin, M., Song, X., Yi, F., Feng, Y., Coughlan, K., Cho, W., Kim, S., et al. (2013a). The Yin-Yang of DNA Damage Response: Roles in Tumorigenesis and Cellular Senescence. *IJMS* 14, 2431–2448.

Li, X.-H., Lv, B.-L., Xie, J.-Z., Liu, J., Zhou, X.-W., and Wang, J.-Z. (2012). AGEs induce Alzheimer-like tau pathology and memory deficit via RAGE-mediated GSK-3 activation. *Neurobiology of Aging* 33, 1400–1410.

Li, X.-H., Du, L.-L., Cheng, X.-S., Jiang, X., Zhang, Y., Lv, B.-L., Liu, R., Wang, J.-Z., and Zhou, X.-W. (2013b). Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid. *Cell Death Dis* 4, e673–e673.

Liao, C., Xiao, Y., and Liu, L. (2020). The Dynamic Process and Its Dual Effects on Tumors of Therapy-Induced Senescence. *Cancer Manag Res* 12, 13553–13566.

Liu, S., Wang, X., Zhao, Q., Liu, S., Zhang, H., Shi, J., Li, N., Lei, X., Zhao, H., Deng, Z., et al. (2015). Senescence of human skin-derived precursors regulated by Akt-FOXO3-p27KIP1/p15INK4b signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72, 2949–2960.

Liu, Y., Long, J., and Liu, J. (2014). Mitochondrial free radical theory of aging: Who moved my premise? *Geriatrics & Gerontology International* 14, 740–749.

Liu, Y.-Z., Wang, Y.-X., and Jiang, C.-L. (2017). Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. *Front Hum Neurosci* 11.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.

Logsdon, C., Fuentes, M., Huang, E., and Arumugam, T. (2007). RAGE and RAGE Ligands in Cancer. *CMM* 7, 777–789.

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

López-Lluch, G., and Navas, P. (2016). Calorie restriction as an intervention in ageing. *J Physiol* 594, 2043–2060.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217.

Lu, C., He, J.C., Cai, W., Liu, H., Zhu, L., and Vlassara, H. (2004). Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11767–11772.

Lyons, T.J., and Basu, A. (2012). BIOMARKERS IN DIABETES: HEMOGLOBIN A1c, VASCULAR AND TISSUE MARKERS. *Transl Res* 159, 303–312.

Majumder, P.K., Grisanzio, C., O’Connell, F., Barry, M., Brito, J.M., Xu, Q., Guney, I., Berger, R., Herman, P., Bikoff, R., et al. (2008). A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27kip1 checkpoint induces senescence, inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell* 14, 146–155.

Marechal, A., and Zou, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a012716–a012716.

Martin, N., Salazar-Cardozo, C., Vercamer, C., Ott, L., Marot, G., Slijepcevic, P., Abbadie, C., and Pluquet, O. (2014). Identification of a gene signature of a pre-transformation process by senescence evasion in normal human epidermal keratinocytes. *Mol Cancer* 13, 151.

Matejuk, A. (2018). Skin Immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 66, 45–54.

McClelland Descalzo, D.L., Satoorian, T.S., Walker, L.M., Sparks, N.R.L., Pulyanina, P.Y., and zur Nieden, N.I. (2016). Glucose-Induced Oxidative Stress Reduces Proliferation in Embryonic Stem Cells via FOXO3A/ β -Catenin-Dependent Transcription of p21cip1. *Stem Cell Reports* 7, 55–68.

Mesquita, A., Weinberger, M., Silva, A., Sampaio-Marques, B., Almeida, B., Leao, C., Costa, V., Rodrigues, F., Burhans, W.C., and Ludovico, P. (2010). Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 15123–15128.

Mitchell, R., Mellows, B., Sheard, J., Antonioli, M., Kretz, O., Chambers, D., Zeuner, M.-T., Tomkins, J.E., Denecke, B., Musante, L., et al. (2019). Secretome of adipose-derived

mesenchymal stem cells promotes skeletal muscle regeneration through synergistic action of extracellular vesicle cargo and soluble proteins. *Stem Cell Res Ther* 10.

Mitchell, S.J., Scheibye-Knudsen, M., Longo, D.L., and de Cabo, R. (2015). Animal Models of Aging Research: Implications for Human Aging and Age-Related Diseases. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 3, 283–303.

Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence. *Mol Cell Biol* 29, 4495–4507.

Moiseeva, O., Deschênes-Simard, X., St-Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A.E., Bourdeau, V., Pollak, M.N., and Ferbeyre, G. (2013). Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell* 12, 489–498.

Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2006). Oncogene-Induced Cell Senescence — Halting on the Road to Cancer. *N Engl J Med* 355, 1037–1046.

Moore, T.C.B., Moore, J.E., Kaji, Y., Frizzell, N., Usui, T., Poulaki, V., Campbell, I.L., Stitt, A.W., Gardiner, T.A., Archer, D.B., et al. (2003). The Role of Advanced Glycation End Products in Retinal Microvascular Leukostasis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4457–4464.

Münch, G., Lüth, H.J., Wong, A., Arendt, Th., Hirsch, E., Ravid, R., and Riederer, P. (2000). Crosslinking of α -synuclein by advanced glycation endproducts — an early pathophysiological step in Lewy body formation? *Journal of Chemical Neuroanatomy* 20, 253–257.

Muñoz-Espín, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 482–496.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., et al. (2013). Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* 155, 1104–1118.

Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell* 113, 703–716.

Nassour, J., Martien, S., Martin, N., Deruy, E., Tomellini, E., Malaquin, N., Bouali, F., Sabatier, L., Wernert, N., Pinte, S., et al. (2016). Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat Commun* 7.

Nassrally, M.S., Lau, A., Wise, K., John, N., Kotecha, S., Lee, K.L., and Brooks, R.F. (2019). Cell cycle arrest in replicative senescence is not an immediate consequence of telomere dysfunction. *Mechanisms of Ageing and Development* 179, 11–22.

Navarrete Santos, A., Jacobs, K., Simm, A., Glaubitz, N., Horstkorte, R., and Hofmann, B. (2017). Dicarbonyls induce senescence of human vascular endothelial cells. *Mechanisms of Ageing and Development* 166, 24–32.

Nelson, G., Wordsworth, J., Wang, C., Jurk, D., Lawless, C., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2012). A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell* 11, 345–349.

Nickel, W. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. *European Journal of Biochemistry* 270, 2109–2119.

Niedernhofer, L.J., Gurkar, A.U., Wang, Y., Vijg, J., Hoeijmakers, J.H.J., and Robbins, P.D. (2018). Nuclear Genomic Instability and Aging. *Annual Review of Biochemistry* 87, 295–322.

Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T., and Simm, A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2, 411–429.

Ott, C., Jung, T., Grune, T., and Höhn, A. (2018). SIPS as a model to study age-related changes in proteolysis and aggregate formation. *Mechanisms of Ageing and Development* 170, 72–81.

Özcan, S., Alessio, N., Acar, M.B., Mert, E., Omerli, F., Peluso, G., and Galderisi, U. (2016). Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging (Albany NY)* 8, 1316–1327.

Pageon, H., Zucchi, H., Rousset, F., Monnier, V.M., and Asselineau, D. (2014). Skin aging by glycation: lessons from the reconstructed skin model. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 52.

Pal, S., and Tyler, J.K. (2016). Epigenetics and aging. *Sci Adv* 2.

Park, C., Lee, I., Jang, J.H., and Kang, W.K. (2007). Inhibitory role of RhoA on senescence-like growth arrest by a mechanism involving modulation of phosphatase activity. *FEBS Letters* 581, 3800–3804.

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

Patki, M., McFall, T., Rosati, R., Huang, Y., Malysa, A., Polin, L., Fielder, A., Wilson, M.R., Lonardo, F., Back, J., et al. (2018). Chronic p27Kip1 Induction by Dexamethasone Causes Senescence Phenotype and Permanent Cell Cycle Blockade in Lung Adenocarcinoma Cells Over-expressing Glucocorticoid Receptor. *Sci Rep* 8, 16006.

Payne, B.A.I., and Chinnery, P.F. (2015). Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847, 1347–1353.

Petropoulos, I., Conconi, M., Wang, X., Hoeneil, B., Bregegere, F., Milner, Y., and Friguier, B. (2000). Increase of Oxidatively Modified Protein Is Associated With a Decrease of Proteasome Activity and Content in Aging Epidermal Cells. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 55, B220–B227.

Podhorecka, M., Skladanowski, A., and Bozko, P. (2010). H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy.

Powers, E.T., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W., and Balch, W.E. (2009). Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annual Review of Biochemistry* 78, 959–991.

Prasad, K., and Mishra, M. (2018). AGE–RAGE Stress, Stressors, and Antistressors in Health and Disease. *Int J Angiol* 27, 1–12.

Prasad, C., Davis, K.E., Imrhan, V., Juma, S., and Vijayagopal, P. (2017). Advanced Glycation End Products and Risks for Chronic Diseases: Intervening Through Lifestyle Modification. *Am J Lifestyle Med* 13, 384–404.

Prata, L.G.P.L., Ovsyannikova, I.G., Tchkonja, T., and Kirkland, J.L. (2018). Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Seminars in Immunology* 40, 101275.

Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., and Lemaitre, J.-M. (2011). p53 and p16INK4A independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun* 2, 473.

Prost-Squarcioni, C. (2006). [Histology of skin and hair follicle]. *Med Sci (Paris)* 22, 131–137.

Qian, Y., and Chen, X. (2013). Senescence Regulation by the p53 Protein Family. *Methods Mol Biol* 965, 37–61.

Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2009). Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 14, 20–24.

Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2018). Glycation- and/or Polyol Pathway-Inducing Complications☆. In *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*, I. Huhtaniemi, and L. Martini, eds. (Oxford: Academic Press), pp. 170–179.

Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2019). Glyoxalase 1 Modulation in Obesity and Diabetes. *Antioxidants & Redox Signaling* 30, 354–374.

Rabbani, N., Xue, M., and Thornalley, P.J. (2016). Methylglyoxal-induced dicarbonyl stress in aging and disease: first steps towards glyoxalase 1-based treatments. *Clinical Science* 130, 1677–1696.

Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology* 27, 230–240.

Radjei, S., Friguet, B., Nizard, C., and Petropoulos, I. (2014). Prevention of dicarbonyl-mediated advanced glycation by glyoxalases: implication in skin aging. *Biochemical Society Transactions* 42, 518–522.

Radjei, S., Gareil, M., Moreau, M., Leblanc, E., Schnebert, S., Friguet, B., Nizard, C., and Petropoulos, I. (2016). The glyoxalase enzymes are differentially localized in epidermis and regulated during ageing and photoageing. *Experimental Dermatology* 25, 492–494.

Rando, T.A., and Chang, H.Y. (2012). Aging, Rejuvenation, and Epigenetic Reprogramming: Resetting the Aging Clock. *Cell* 148, 46–57.

Rasul, A., Rashid, A., Waheed, P., and Khan, S.A. (2018). Expression analysis of glyoxalase I gene among patients of diabetic retinopathy. *Pak J Med Sci* 34, 139–143.

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

Reichert, O., Fleming, T., Neufang, G., Schmelz, M., Genth, H., Kaefer, V., Wenck, H., Stäb, F., Terstegen, L., Kolbe, L., et al. (2017). Impaired glyoxalase activity is associated with reduced expression of neurotrophic factors and pro-inflammatory processes in diabetic skin cells. *Experimental Dermatology* 26, 44–50.

Ren, R., Ocampo, A., Liu, G.-H., and Izpisua Belmonte, J.C. (2017). Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. *Cell Metabolism* 26, 460–474.

Requena, J.R., Fu, M.-X., Ahmed, M.U., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., and Thorpe, S.R. (1996). Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrology Dialysis Transplantation* 11, 48–53.

Rhinn, M., Ritschka, B., and Keyes, W.M. (2019). Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development* 146, dev151837.

Richarme, G., Liu, C., Mihoub, M., Abdallah, J., Leger, T., Joly, N., Liebart, J.-C., Jurkunas, U.V., Nadal, M., Boulloc, P., et al. (2017). Guanine glycation repair by DJ-1/Park7 and its bacterial homologs. *Science* 357, 208–211.

Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M.C., Morton, J.P., Sansom, O.J., Zender, L., and Keyes, W.M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev* 31, 172–183.

Rizou, S.V., Evangelou, K., Myrianthopoulos, V., Mourouzis, I., Havaki, S., Athanasiou, A., Vasileiou, P.V.S., Margetis, A., Kotsinas, A., Kastrinakis, N.G., et al. (2019). A Novel Quantitative Method for the Detection of Lipofuscin, the Main By-Product of Cellular Senescence, in Fluids. In *Cellular Senescence*, M. Demaria, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 119–138.

Roberts, M.J., Wondrak, G.T., Laurean, D.C., Jacobson, M.K., and Jacobson, E.L. (2003). DNA damage by carbonyl stress in human skin cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 522, 45–56.

Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11, 973–979.

Rodiño-Janeiro, B.K., González-Peteiro, M., Uceda-Somoza, R., González-Juanatey, J.R., and Álvarez, E. (2010). Glycated albumin, a precursor of advanced glycation end-products, up-regulates NADPH oxidase and enhances oxidative stress in human endothelial cells: molecular correlate of diabetic vasculopathy. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 26, 550–558.

- Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., and Weissman, I.L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447, 725–729.
- Roth, S.M., Metter, E.J., Ling, S., and Ferrucci, L. (2006). Inflammatory factors in age-related muscle wasting: Current Opinion in Rheumatology 18, 625–630.
- Rowan, S., Bejarano, E., and Taylor, A. (2018). Mechanistic targeting of advanced glycation end-products in age-related diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864, 3631–3643.
- Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., and Melino, G. (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* 32, 5129–5143.
- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* 28, 99–114.
- Salminen, A., Kauppinen, A., and Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling* 24, 835–845.
- Salotti, J., and Johnson, P.F. (2019). Regulation of senescence and the SASP by the transcription factor C/EBP β . *Experimental Gerontology* 128, 110752.
- Schröder, J.-M., and Harder, J. (2006). Peptides antimicrobiens naturels cutanés. *Med Sci (Paris)* 22, 153–157.
- Schumacher, B., van der Pluijm, I., Moorhouse, M.J., Kosteus, T., Robinson, A.R., Suh, Y., Breit, T.M., van Steeg, H., Niedernhofer, L.J., van IJcken, W., et al. (2008). Delayed and Accelerated Aging Share Common Longevity Assurance Mechanisms. *PLoS Genet* 4, e1000161.
- Sejersen, H., and Rattan, S.I.S. (2009). Dicarbonyl-induced accelerated aging in vitro in human skin fibroblasts. *Biogerontology* 10, 203–211.
- Sell, D.R., Lane, M.A., Johnson, W.A., Masoro, E.J., Mock, O.B., Reiser, K.M., Fogarty, J.F., Cutler, R.G., Ingram, D.K., Roth, G.S., et al. (1996). Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 485–490.
- Sen, P., Shah, P.P., Nativio, R., and Berger, S.L. (2016). Epigenetic mechanisms regulating longevity and aging. *Cell* 166, 822–839.
- Shammas, M.A. (2011). Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14, 28–34.
- Sharaf, H., Matou-Nasri, S., Wang, Q., Rabhan, Z., Al-Eidi, H., Al Abdulrahman, A., and Ahmed, N. (2015). Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852, 429–441.

- Sharma, N., Rao, S.P., and Kalivendi, S.V. (2019). The deglycase activity of DJ-1 mitigates α -synuclein glycation and aggregation in dopaminergic cells: Role of oxidative stress mediated downregulation of DJ-1 in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 135, 28–37.
- Shen, C.-Y., Lu, C.-H., Wu, C.-H., Li, K.-J., Kuo, Y.-M., Hsieh, S.-C., and Yu, C.-L. (2020). The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. *Molecules* 25, 5591.
- Shieh, J.C.-C., Huang, P.-T., and Lin, Y.-F. (2020). Alzheimer's Disease and Diabetes: Insulin Signaling as the Bridge Linking Two Pathologies. *Mol Neurobiol* 57, 1966–1977.
- da Silva, G. (2010). Hydroxyl radical regeneration in the photochemical oxidation of glyoxal: kinetics and mechanism of the $\text{HC(O)CO} + \text{O}_2$ reaction. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 6698.
- Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 565–580.
- Smith, M.A., Taneda, S., Richey, P.L., Miyata, S., Yan, S.D., Stern, D., Sayre, L.M., Monnier, V.M., and Perry, G. (1994). Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5710–5714.
- Solti, K., Kuan, W.-L., Fórizs, B., Kustos, G., Mihály, J., Varga, Z., Herberth, B., Moravcsik, É., Kiss, R., Kárpáti, M., et al. (2020). DJ-1 can form β -sheet structured aggregates that co-localize with pathological amyloid deposits. *Neurobiology of Disease* 134, 104629.
- Soulis, T., Thallas, V., Youssef, S., Gilbert, R.E., McWilliam, B.G., Cooper, M.E., and Murray-McIntosh, R.P. (1997). Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* 40, 619–628.
- Sreekumar, P.G., Hinton, D.R., and Kannan, R. (2020). The Emerging Role of Senescence in Ocular Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2020.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (1999). Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2109–2117.
- Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., et al. (2013). Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell* 155, 1119–1130.
- Sun, X., Shi, B., Zheng, H., Min, L., Yang, J., Li, X., Liao, X., Huang, W., Zhang, M., Xu, S., et al. (2018). Senescence-associated secretory factors induced by cisplatin in melanoma cells promote non-senescent melanoma cell growth through activation of the ERK1/2-RSK1 pathway. *Cell Death Dis* 9, 1–15.
- Tanaka, N., Yonekura, H., Yamagishi, S., Fujimori, H., Yamamoto, Y., and Yamamoto, H. (2000). The Receptor for Advanced Glycation End Products Is Induced by the Glycation Products

Themselves and Tumor Necrosis Factor- α through Nuclear Factor- κ B, and by 17 β -Estradiol through Sp-1 in Human Vascular Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 275, 25781–25790.

Tao, X., and Tong, L. (2003). Crystal Structure of Human DJ-1, a Protein Associated with Early Onset Parkinson's Disease. *J. Biol. Chem.* 278, 31372–31379.

Thoppil, H., and Riabowol, K. (2020). Senolytics: A Translational Bridge Between Cellular Senescence and Organismal Aging. *Front Cell Dev Biol* 7.

Thornalley, P.J., and Rabbani, N. (2011). Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22, 318–325.

Toussaint, O., Dumont, P., Remacle, J., Dierick, J.-F., Pascal, T., Fripiat, C., Magalhaes, J.P., Zdanov, S., and Chainiaux, F. (2002). Stress-Induced Premature Senescence or Stress-Induced Senescence-Like Phenotype: One In Vivo Reality, Two Possible Definitions? *ScientificWorldJournal* 2, 230–247.

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417–423.

Tsai, C., Chang, C., Lin, B., Wu, Y., Wu, M., Lin, L., Huang, W., Holz, J.D., Sheu, T., Lee, J., et al. (2020). Up-regulation of cofilin-1 in cell senescence associates with morphological change and p27^{kip1}-mediated growth delay. *Aging Cell*.

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., and Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13, 731–740.

Uribarri, J., Cai, W., Sandu, O., Peppia, M., Goldberg, T., and Vlassara, H. (2005). Diet-Derived Advanced Glycation End Products Are Major Contributors to the Body's AGE Pool and Induce Inflammation in Healthy Subjects. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, 461–466.

Uribarri, J., Stirban, A., Sander, D., Cai, W., Negrean, M., Buening, C.E., Koschinsky, T., and Vlassara, H. (2007). Single Oral Challenge by Advanced Glycation End Products Acutely Impairs Endothelial Function in Diabetic and Nondiabetic Subjects. *Diabetes Care* 30, 2579–2582.

Van Raamsdonk, J.M., and Hekimi, S. (2009). Deletion of the Mitochondrial Superoxide Dismutase sod-2 Extends Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5, e1000361.

Velarde, M.C., and Demaria, M. (2016). Targeting Senescent Cells: Possible Implications for Delaying Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology* 62, 513–518.

Victorelli, S., Lagnado, A., Halim, J., Moore, W., Talbot, D., Barrett, K., Chapman, J., Birch, J., Ogrodnik, M., Meves, A., et al. (2019). Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *EMBO J* 38.

Vijg, J., and Suh, Y. (2013). Genome Instability and Aging. *Annual Review of Physiology* 75, 645–668.

Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., and Aldini, G. (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research* 47, 3–27.

Wagner, W. (2019). The Link Between Epigenetic Clocks for Aging and Senescence. *Front. Genet.* 10, 303.

Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M.R. (2008). Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell* 132, 363–374.

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

Walters, H.E., Deneka-Hannemann, S., and Cox, L.S. (2016). Reversal of phenotypes of cellular senescence by pan-mTOR inhibition. *Aging (Albany NY)* 8, 231–243.

Wang, A.S., and Dreesen, O. (2018). Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Front. Genet.* 9.

Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N., and Hara, E. (2017). Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Science* 108, 563–569.

Wautier, M.-P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D.M., Schmidt, A.M., and Wautier, J.-L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 280, E685–E694.

Webley, K., Bond, J.A., Jones, C.J., Blaydes, J.P., Craig, A., Hupp, T., and Wynford-Thomas, D. (2000). Posttranslational Modifications of p53 in Replicative Senescence Overlapping but Distinct from Those Induced by DNA Damage. *Mol Cell Biol* 20, 2803–2808.

Wiley, C.D., Velarde, M.C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E.A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H.W., Davis, S.S., Ramanathan, A., et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab* 23, 303–314.

Wiley, C.D., Liu, S., Limbad, C., Zawadzka, A.M., Beck, J., Demaria, M., Artwood, R., Alimirah, F., Lopez-Dominguez, J.-A., Kuehnemann, C., et al. (2019). SILAC Analysis Reveals Increased Secretion of Hemostasis-Related Factors by Senescent Cells. *Cell Rep* 28, 3329–3337.e5.

Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6, 359–362.

World Health Organization Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).

World Health Organization, glyoxal report (2004). Concise International Chemical Assessment Document 57. <https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad57.pdf?ua=1> (2004).

Wyss-Coray (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12, 1005–1015.

Xie, J., Méndez, J.D., Méndez-Valenzuela, V., and Aguilar-Hernández, M.M. (2013). Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cellular Signalling* 25, 2185–2197.

Xu, M., Tchkonja, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E.R., Pirtskhalava, T., White, T.A., Johnson, K.O., Stout, M.B., Mezera, V., et al. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E6301–E6310.

Xu, Q., Long, Q., Zhu, D., Fu, D., Zhang, B., Han, L., Qian, M., Guo, J., Xu, J., Cao, L., et al. (2019). Targeting amphiregulin (AREG) derived from senescent stromal cells diminishes cancer resistance and averts programmed cell death 1 ligand (PD-L1)-mediated immunosuppression. *Aging Cell* 18.

Xu, Y., Li, N., Xiang, R., and Sun, P. (2014). Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends Biochem Sci* 39, 268–276.

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

Yamagishi, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Amano, S., Koga, K., Takeuchi, M., and Makita, Z. (2002). Advanced Glycation End Product-induced Apoptosis and Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Human-cultured Mesangial Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 20309–20315.

Yang, N., and Hu, M. (2005). The limitations and validities of senescence associated- β -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Experimental Gerontology* 40, 813–819.

Yang, S.-J., Chen, C.-Y., Chang, G.-D., Wen, H.-C., Chen, C.-Y., Chang, S.-C., Liao, J.-F., and Chang, C.-H. (2013). Activation of Akt by Advanced Glycation End Products (AGEs): Involvement of IGF-1 Receptor and Caveolin-1. *PLoS ONE* 8, e58100.

Ye, X., Zerlanko, B., Zhang, R., Somaiah, N., Lipinski, M., Salomoni, P., and Adams, P.D. (2007). Definition of pRB- and p53-Dependent and -Independent Steps in HIRA/ASF1a-Mediated Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci. *Mol Cell Biol* 27, 2452–2465.

Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahr, E., Condiotti, R., et al. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* 7.

Yoshimoto, S., Loo, T.M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., et al. (2013). Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 499, 97–101.

Yousefzadeh, M.J., Zhu, Y., McGowan, S.J., Angelini, L., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Xu, M., Ling, Y.Y., Melos, K.I., Pirtskhalava, T., Inman, C.L., et al. (2018). Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. *EBioMedicine* 36, 18–28.

Zglinicki, T. von, Petrie, J., and Kirkwood, T.B.L. (2003). Telomere-driven replicative senescence is a stress response. *Nat Biotechnol* 21, 229–230.

Zhang, R., Chen, W., and Adams, P.D. (2007). Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci. *Mol Cell Biol* 27, 2343–2358.

Zhang, Y., Ikeno, Y., Qi, W., Chaudhuri, A., Li, Y., Bokov, A., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Epstein, C., Richardson, A., et al. (2009). Mice Deficient in Both Mn Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase-1 Have Increased Oxidative Damage and a Greater Incidence of Pathology but No Reduction in Longevity. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 64A, 1212–1220.

Zhao, G., Wang, H., Xu, C., Wang, P., Chen, J., Wang, P., Sun, Z., Su, Y., Wang, Z., Han, L., et al. (2016). SIRT6 delays cellular senescence by promoting p27Kip1 ubiquitin-proteasome degradation. *Aging (Albany NY)* 8, 2308–2323.

Zhao, J., Zhang, L., Lu, A., Han, Y., Colangelo, D., Bukata, C., Scibetta, A., Yousefzadeh, M.J., Li, X., Gurkar, A.U., et al. (2020). ATM is a key driver of NF- κ B-dependent DNA-damage-induced senescence, stem cell dysfunction and aging. *Aging (Albany NY)* 12, 4688–4710.

Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A.C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A.K., Ikeno, Y., Hubbard, G.B., Lenburg, M., et al. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14, 644–658.

Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H.M., Ling, Y.Y., Stout, M.B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K.O., Giles, C.B., et al. (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* 15, 428–435.

Zonari, A., Brace, L.E., Al-Katib, K.Z., Porto, W.F., Foyt, D., Guiang, M., Cruz, E.A.O., Marshall, B., Salgueiro, W.G., Inan, M.D., et al. (2020). Senotherapeutic peptide reduces skin biological age and improves skin health markers (Bioengineering).