

Université de Montréal

Analyse protéomique de la sénescence induite par la chimiothérapie dans le cancer de l'ovaire

Par

Alizée Gouronnec

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Biologie Moléculaire

Option générale

Novembre 2020

© Gouronnec, 2020

Université de Montréal

Unité académique : IRIC, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Analyse protéomique de la sénescence induite par la chimiothérapie dans le cancer de l'ovaire

Présenté par

Alizée Gouronnec

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Étienne Caron

Président-rapporteur

Philippe P. Roux

Directeur de recherche

Frédéric A. Mallette

Membre du jury

Résumé

Les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire à cellules claires (COCC) de stade avancé ont un très faible taux de survie après 5 ans à cause d'une forte résistance aux traitements. Depuis 30 ans, la stratégie thérapeutique du COCC consiste en une combinaison de carboplatine et paclitaxel (CP). Il est donc urgent de proposer de nouveaux traitements pour ce cancer. En étudiant une lignée cellulaire issue d'un COCC, nous avons observé que le traitement CP induisait un état de sénescence. Les cellules sénescents ne prolifèrent plus mais peuvent impacter leur environnement en sécrétant un mélange complexe de molécules. Proposer de nouveaux traitements pour cibler les cellules sénescents induites par la chimiothérapie nécessite de mieux connaître leurs caractéristiques. Dans ce but, nous avons étudié les protéines à la surface des cellules sénescents à l'aide d'une méthode de protéomique de pointe. Nous avons trouvé que la protéine DNAJC5 est fortement augmentée à la surface des cellules sénescents. Cette chaperonne est impliquée dans les mécanismes d'exo- et endocytose, ainsi que dans une voie de sécrétion non-conventionnelle des protéines. Nous avons cherché à savoir si cette voie était activée dans les cellules sénescents, et avons également étudié l'impact de l'inhibition de DNAJC5 sur la protéotoxicité des cellules, ainsi que sur l'établissement de la sénescence. Nos premiers résultats suggèrent que DNAJC5 aurait un rôle dans la sénescence qui n'a encore jamais été observé. À long terme, cette découverte pourrait contribuer au développement de nouveaux traitement dans le COCC.

Mots-clés : Cancer de l'ovaire, sénescence, surfaceome, DNAJC5, voies non-conventionnelles de sécrétion

Abstract

Patients treated for an advanced ovarian clear cell carcinoma (OCCC) have a poor 5-year survival rate due to treatment resistance. Since 30 years, the therapeutic strategy consists of a combination of carboplatin and paclitaxel (CP). It is of the utmost urgency to find new treatments against this cancer. We studied the impact of CP treatment on an OCCC cell line and observed that it induced a senescence state in the cells. Senescent cells do not proliferate anymore but have a huge impact on their microenvironment by secreting a complex mix of molecules. We need to know better the characteristics of chemotherapy-induced senescent cells to be able to target them with new treatments. Consequently, we studied the cell surface proteins of senescent cells with a cutting-edge proteomic method. We found that the protein DNAJC5 was upregulated at the cell surface of senescent cells. This chaperone is implicated in exo- and endocytosis mechanisms, as well as in a non-conventional secretion pathway. We wanted to know if this pathway was activated in senescent cells and we studied the impact of DNAJC5 inhibition on the cell proteotoxicity and on senescence establishment. Our first results suggest that DNAJC5 would have a role in senescence, which has never been observed. In the future, this discovery could contribute to the development of new treatments for the COCC.

Keywords : Ovarian cancer, senescence, surfaceome, DNAJC5, non-conventional secretion pathways

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements	xx
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1. Stratégies thérapeutiques.....	1
1.1. Histoire résumée de la chimiothérapie.....	1
1.2. Létalité synthétique.....	2
1.3. Stratégie « crochet-uppercut »	4
2. Le cancer de l’ovaire : caractéristiques, traitements actuels et futurs.....	5
2.1. Présentation générale	5
2.2. Le cancer de l’ovaire à cellules claires	8
2.2.1. Caractéristiques générales du COCC.....	8
2.2.2. Mutations récurrentes dans le COCC.....	9
2.3. Stratégie thérapeutique actuelle dans le COCC.....	11
2.3.1. Mécanismes de résistance à la chimiothérapie dans le COCC.....	12
2.3.2. Stratégies thérapeutiques actuelles dans le COCC récurrent.....	14
2.3.3. Stratégies envisagées contre les résistances à la chimiothérapie dans le COCC.....	14
2.3.4. Autres stratégies thérapeutiques envisagées dans le COCC.....	15

2.4. Modèle de COCC utilisé dans cette étude	17
3. La sénescence cellulaire	18
3.1. Description	18
3.2. Rôles des cellules sénescents	20
3.2.1. Rôle dans le vieillissement	20
3.2.2. Rôle dans le développement de l'organisme	22
3.2.3. Rôle dans le cancer	22
3.3. Mécanismes de l'arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence	25
3.4. Caractéristiques des cellules sénescents	28
3.4.1. Morphologie	28
3.4.2. β -galactosidase associée à la sénescence	29
3.4.3. DNA-SCARS et foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence	29
3.4.4. Résistance à l'apoptose	30
3.4.5. Métabolisme	31
3.4.6. Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)	33
3.4.6.1. Description	33
3.4.6.2. Régulation du SASP :	36
3.4.6.3. Autres moyens de communication utilisés par les cellules sénescents	38
3.4.6.4. Rôle du SASP dans la sénescence	39
4. Les mécanismes de sécrétion des protéines	42
4.1. Mécanisme de sécrétion conventionnelle	42
4.2. Les mécanismes de sécrétion non-conventionnels	44
4.2.1. Mécanisme de sécrétion non-conventionnelle de type I	45
4.2.2. Mécanisme de sécrétion non-conventionnelle de type II	45

4.2.3. Mécanisme de sécrétion non-conventionnelle de type III	46
4.2.4. Mécanisme de sécrétion non-conventionnelle de type IV	47
4.3. Le MAPS.....	51
4.3.1. Présentation du MAPS	51
4.3.2. DNAJC5	54
5. Contexte	57
6. Objectifs.....	58
Chapitre 2 – Matériel et Méthodes.....	59
1. Culture cellulaire	59
2. Construction shRNA et infection rétrovirale.....	59
3. Cytométrie en flux.....	60
4. Anticorps	61
5. Préparation des échantillons de cellules pour immunobuvardage	61
6. Préparation des milieux conditionnés pour immunobuvardage	62
7. Electrophorèse et Immunobuvardage	62
8. Immunofluorescence	63
9. Marquage X-gal	63
10. RT-qPCR.....	63
11. RNA-seq.....	64
12. Surfaceome	64
12.1. Préparation des échantillons	64
12.2. Spectrométrie de masse et analyse	65
12.3. Quantification sans étiquette et analyse des données.....	66
Chapitre 3 – Résultats	68

1. Les cellules TOV21G entrent en sénescence après exposition à une combinaison chimiothérapeutique.....	68
2. Des analyses transcriptionnelles suggèrent des changements à la membrane plasmique des cellules sénescents	72
2.1. Analyse transcriptionnelle des cellules TOV21G traitées ou non au CP	72
2.2. Analyse des changements transcriptionnels dans différents modèles de sénescence ..	75
3. Analyse des changements à la surface des cellules sénescents	78
4. Étude du rôle de DNAJC5 dans les cellules sénescents.....	85
4.1. Validation des données et présentation des outils nécessaires pour l'étude	85
4.2. Rôle de DNAJC5 dans la sécrétion des protéines mal repliées dans les cellules sénescents.....	88
4.3. Rôle de DNAJC5 dans le maintien de l'homéostasie protéique.....	93
4.4. Rôle de DNAJC5 dans l'établissement et/ou le maintien de l'état de sénescence.....	95
4.5. DNAJC5 est augmenté dans d'autres modèles de sénescence.....	98
Chapitre 4 – Discussion	99
1. Rappel des résultats	99
2. Les cellules TOV21G entrent en sénescence après le traitement CP	100
3. De nombreux changements ont lieu à la surface des cellules sénescents	102
4. La surexpression de DNAJC5 pourrait indiquer une activation du MAPS.....	105
5. La surexpression de DNAJC5 pourrait participer à maintenir l'homéostasie protéique	110
6. Un rôle pour DNAJC5 dans le maintien et/ou l'établissement de la sénescence ?	112
7. D'autres protéines augmentées à la surface des cellules traitées au CP seraient intéressantes à étudier dans le contexte de la sénescence.....	114
Chapitre 5 – Conclusion.....	117
Références bibliographiques.....	118

Liste des tableaux

Tableau 1. – Mutations caractéristiques du COCC présentes dans la lignée TOV21G	18
Tableau 2. – Molécules du SASP	34
Tableau 3. – Références des shRNAs utilisés	60
Tableau 4. – Références des anticorps utilisés.....	61

Liste des figures

Figure 1. – La létalité synthétique	3
Figure 2. – La stratégie « crochet-uppercut »	5
Figure 3. – Distribution des stades de prise en charge du cancer de l’ovaire et survie à 5 ans associée.....	7
Figure 4. – Photo représentative de cancer de l’ovaire à cellules claires.....	8
Figure 5. – Molécules impliquées dans les différents rôles du SASP.....	40
Figure 6. – Schéma récapitulatif des caractéristiques des cellules sénescents	41
Figure 7. – Les voies de sécrétion conventionnelles et non-conventionnelles des protéines ...	50
Figure 8. – La voie de sécrétion non conventionnelle du MAPS	54
Figure 9. – Schéma de la structure de DNAJC5	56
Figure 10. – Présentation du modèle d’étude.....	68
Figure 11. – Les cellules traitées au CP changent de morphologie.....	69
Figure 12. – Les cellules TOV21G traitées au CP arrêtent de proliférer et leur voie de réponse aux dommages à l’ADN est activée.....	71
Figure 13. – La β -galactosidase associée à la sénescence est active chez cellules traitées au CP.	72
Figure 14. – Analyse transcriptionnelle des cellules TOV21G traitées ou non au CP.....	73
Figure 15. – L’analyse des termes GO des changements transcriptionnels significatifs révèle un impact sur différents processus biologiques et au niveau de différents composants cellulaires.	75
Figure 16. – L’analyse des termes GO des changements transcriptionnels en terme de processus biologiques et au niveau des composants cellulaires révèle des impacts identiques entre différents modèles de sénescence.....	77
Figure 17. – La méthode du surfaceome permet l’identification de nombreux changements protéiques à la surface des cellules TOV21G traitées au CP.....	79
Figure 18. – Identification d’une signature de protéines connues pour leur implication dans la sénescence.....	82

Figure 19. – L’analyse des termes GO liés aux protéines dont l’enrichissement est modifié à la surface après traitement CP révèle un impact sur différents processus biologiques.	84
Figure 20. – Les protéines enrichies à la surface des cellules TOV21G traitées au CP sont impliquées dans des processus de sécrétion, d’exocytose régulée et de transport par les vésicules.....	85
Figure 21. – DNAJC5 est enrichi à la surface des cellules sénescences.	86
Figure 22. – Protocole et validation d’inhibition de l’expression de <i>DNAJC5</i> par shRNA.....	87
Figure 23. – Outils d’étude du MAPS et validation de la sécrétion de protéines mal repliées dans les cellules TOV21G après traitement CP.....	90
Figure 24. – Impact de l’inhibition de l’expression de <i>DNAJC5</i> sur la sécrétion des protéines mal repliées lors de la sénescence induite par le traitement CP des cellules TOV21G.	92
Figure 25. – Impact de l’inhibition de l’expression de <i>DNAJC5</i> sur une voie de réponse au stress protéotoxique.....	94
Figure 26. – L’expression de <i>DNAJC5</i> est augmentée avec la sénescence et son inhibition impacte l’expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire mais n’impacte pas la survie.....	97
Figure 27. – Le niveau protéique total de <i>DNAJC5</i> est augmenté dans les cellules TOV21G et HCA-2 hT après induction de la sénescence par irradiation.	98

Liste des sigles et abréviations

53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADAM10 / 17	<i>A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 /17</i>
ADP	Adenosine di-phosphate
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AMP	Adenosine mono-phosphate
ANREG	<i>Amphiregulin</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ARID1A	<i>AT-rich interacting domain-containing protein 1A</i>
ATF4 / 6 α	<i>Activating transcription factor 4 / 6α</i>
ATG	<i>Autophagy-related protein</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosine tri-phosphate
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
B2MG	<i>Beta-2 microglobulin</i>
BAD	<i>BCL-2 associated death protein</i>
BAG6	<i>BCL-2 associated athanogene cochaperone 6</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-XL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BET	<i>Bromodomain and extra-terminal domain</i>
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
BRCA1/2	<i>Breast cancer 1/2</i>
BRD4	<i>Bromodomain containing protein 4</i>
C/EBP β	<i>CCAAT Enhancer Binding Protein Beta</i>
CAML	<i>Calcium modulating ligand</i>

CAV1	<i>Caveolin-1</i>
CCL7	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 7</i>
CCLE	<i>Encyclopédie des lignées cellulaires cancéreuses ; Cancer cell line encyclopedia</i>
CCN1	<i>Cellular communication network factor 1</i>
CCNA/B/E	<i>Cycline A / B / E</i>
CDC6 / 25	<i>Cell division cycle 6 / 25</i>
CDC7	<i>Cell division cycle 7-related protein kinase</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
CEO	Cancer épithélial de l'ovaire
CFTR	Régulateur transmembranaire de la conductance de la fibrose kystique ; <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cGAS-STING	<i>Cyclic GMP-AMP synthase – stimulator of interferon genes</i>
CHK1 / 2	<i>Checkpoint kinase 1 and 2</i>
COCC	Cancer de l'ovaire à cellules claires
COPII	Vésicules complexes à manteau de type II ; <i>Coat complex type II</i>
CP	Carboplatine et paclitaxel
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSB	<i>Cell surface biotinylation</i>
CSP α	Protéine de chaîne de cystéine ; <i>Cystein string protein α</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
CTNNB1	<i>Catenin beta 1</i>
CTSB	<i>Cathepsin B</i>
CUPS	Compartiment pour la sécrétion non conventionnelle des protéines ; <i>Compartment for unconventional secretion of proteins</i>
CXCL	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand</i>
CXCR2	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 2</i>

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DDR	Réponse aux dommages à l'ADN ; <i>DNA damage response</i>
DNAJC5	<i>DnaJ homologue subfamily C member 5</i>
DNA-SCARS	Segments d'ADN avec des altérations de chromatine renforçant la sénescence ; <i>DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence</i>
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
DSB	Cassure double-brin ; double strand break
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EdU	<i>5-ethynyl-2'-deoxyuridine</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epithelial growth factor receptor</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1</i>
EIS	Sénescence induite épigénétiquement
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i> ; Transition épithéliale-mesenchymateuse
EMC	<i>Endoplasmic reticulum membrane protein complex</i>
ENTPD1	<i>Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1</i>
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementation group 1</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
ET	Endosome tardif
EV	Vésicule extracellulaire ; extracellular vesicle
EZH2	<i>Enhancer of zeste homologue 2</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
FIG4	<i>Factor-induced gene 4</i>
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

FOXO4	<i>Forkhead box protein O4</i>
FTH1	<i>Ferritin heavy chain 1</i>
GATA4	<i>GATA Binding Protein 4</i>
GCLC	<i>Glutamate–cysteine ligase catalytic subunit</i>
GCN2	<i>General control nonderepressible 2</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	<i>Protéine verte fluorescente ; Green fluorescent protein</i>
GLB1	<i>Galactosidase beta 1</i>
GLRX	<i>Glutaredoxin</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GPx3 / 4	<i>Glutathione peroxidase 3 / 4</i>
GRASP	<i>Golgi reassembly-stacking protein</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
GSH	<i>Glutathion</i>
HDAC6	<i>Histone deacetylase 6</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HLA-E	<i>Antigène d'histocompatibilité HLA classe I, chaîne alpha E</i>
HMGB2	<i>High mobility group box 2</i>
HNF-1 β	<i>Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox Beta</i>
HRI	<i>Heme-regulated inhibitor</i>
HSP	<i>Protéine de choc thermique</i>
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycan</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
Id1	<i>Inhibitor of DNA binding 1</i>
IFN	<i>Interféron</i>
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor-binding protein</i>
IL-6 / 8	<i>Interleukine 6 / 8</i>
IRAK1	<i>IL-1 receptor activated kinase 1</i>

IRE1 α	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
ISR	Voie de réponse intégrée de stress ; <i>Integrated stress response</i>
JAG1	<i>Jagged Canonical Notch Ligand 1</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KPC1	<i>Kip1 ubiquitination-promoting complex subunit 1</i>
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LAMP1 /2	<i>Lysosomal Associated Membrane Protein 1 /2</i>
LANCL1	<i>LanC like 1</i>
LE	<i>Late endosome</i>
Mad2	<i>Mitotic arrest deficiency 2</i>
MAK2	<i>MAPK activated protein kinase 2</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPS	Sécrétion associée au mauvais repliement des protéines ; <i>Misfolding-associated protein secretion</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA-damage checkpoint 1</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2 homologue</i>
MiDAS	Sénescence induite par le dysfonctionnement mitochondrial
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MRN	<i>MRE11-RAD50-NBS1</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
MVB	<i>Corps multi-vésiculaire ; Multi vesicular bodies</i>
MVP	Protéine de voute majeure ; <i>Major vault protein</i>
NAD ⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>

NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKG2A	<i>NK group 2 member A</i>
NSAF	Facteur d'abondance spectrale normalisé
OIS	Sénescence induite par les oncogènes
OPN	<i>Osteopontin</i>
OSIS	<i>Sénescence induite par le stress oxydatif</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
PANTHER	<i>Protein analysis through evolutionary relationships</i>
PARP	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PCDHGC3	Protocadhérine gamma C3
PD-1	<i>Programmed death 1</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>
PDL3	<i>Phospholipase D3</i>
PERK	<i>Protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PGE2	<i>Prostaglandine E2</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3 kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α</i>
PIK3R1	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>
PKC	Protéine kinase C
PKR	Protéine kinase R
PLC	Phospholipase C
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPP2R1A	<i>Protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha</i>

pRb	<i>Retinoblastoma protein</i>
PRC1 / 2	<i>Polycomb repressive complex 1 /2</i>
PRODH	Proline deshydrogénase
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
PTRF	<i>Polymerase I and transcript release factor; Cavin-1</i>
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RARRES2	<i>Retinoic acid receptor responder protein 2</i>
RE	Reticulum endoplasmique
RFC	<i>Replication factor C</i>
RKIP	<i>Raf kinase inhibitory protein</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPA	<i>Replication protein A</i>
RPKM	Reads par kilobase par million
RTK	Récepteur aux tyrosines kinases
RT-qPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SABG	<i>B-galactosidase associée à la sénescence</i>
SAHF	Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence ; <i>Senescence associated heterochromatin foci</i>
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SERPINE2	<i>Serine proteinase inhibitor, clade E member 2</i>
sFRP	<i>Soluble frizzled-related protein</i>
SGP130	<i>Soluble gp130</i>
SGTA	<i>Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein alpha</i>
shNT	Sh non target
shRNA	ARN en petite épingle à cheveux ; <i>Short-hairpin RNA</i>
SIC	Sénescence induite par la chimiothérapie
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SLB	<i>Surfaceome lysis buffer</i>

SLC	<i>Solute carrier</i>
SM	<i>Sec1/Munc18</i>
SMARCA4	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin 4</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>
SNC	<i>Sécrétion non-conventionnelle</i>
SNIP	<i>SNAP-25 interacting protein</i>
SOD2	<i>Superoxide dismutase mitochondriale 2</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
SRP	Particule de reconnaissance du signal ; <i>Signal recognition particle</i>
SSB	Cassure simple-brin ; <i>single strand break</i>
STAG2	<i>Cohesin subunit SA-2</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
sTNFR	<i>Soluble tumor necrosis factor receptor</i>
Suv39h1	<i>Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1</i>
SWI/SNF	<i>SWItch/ sucrose non fermentable</i>
TA	<i>Ancré par la queue ; Tail-anchored</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TIS	Sénescence induite par la thérapie
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAF3IP2	<i>TRAF3 interacting protein 2</i>
TRAIL	<i>Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i>
TRC	<i>Transmembrane domain recognition complex</i>
TRC40	<i>Transmembrane domain recognition complex protein of 40kDa</i>
TREX1	<i>Three Prime Repair Exonuclease 1</i>

TRiC	<i>TCP1 ring complex</i>
TSP1	<i>Thrombospondin 1</i>
UBL4A	<i>Ubiquitin like 4A</i>
uPA	<i>Urokinase</i>
uPAR	<i>Urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
UPS	Système ubiquitine-protéasome
USP19	Protéase spécifique de l'ubiquitine 19 ; <i>Ubiquitin specific peptidase 19</i>
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
V-ATPase	H ⁺ -ATPase vacuolaire
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIM	Vimentine
XBP-1	<i>X-box binding protein 1</i>
XBP-1s	<i>Spliced XBP-1</i>
X-gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>
ZNF217	<i>Zinc finger protein 217</i>
ZRF1	<i>Zuotin-related factor 1</i>

À Ninon, Janick et Michel

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr Philippe P. Roux de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir laissé la chance de travailler sur ce sujet passionnant. Ces années m'ont énormément appris, autant scientifiquement que personnellement, et j'en ressors grandie. Je te remercie également de m'avoir soutenue dans mes investissements parallèles au laboratoire, en particulier lors de l'organisation de la Journée de la Sénescence.

Je souhaite remercier les membres de mes comités pour leurs conseils avisés : Dr Sylvain Meloche, Dr Sidong Huang, Dr Frédérick A. Mallette et Dr Etienne Caron.

J'aimerais également remercier la faculté de médecine et les programmes de biologie moléculaire de l'université de Montréal, l'IRIC et les Fonds de Recherche du Québec en Santé pour leur soutien financier.

Un énorme merci à l'équipe ROUX pour les conseils scientifiques, les réponses à mes tonnes de questions, les conversations déjantées, votre soutien, les fous rires partagés, les verres au McCaroll ou à la maisonnée... Merci Léo de m'avoir formée à mon arrivée au laboratoire. Je te suis très reconnaissante du temps que tu as pris, pour tes conseils et ton partage de connaissances. Je souhaite également remercier du fond du cœur Antoine, Neethi, Thibault, Louis, Jonathan, Sami, ainsi que Geneviève. J'ai également une pensée pour Célia, Maya et Winnie pour tous les bons moments passés au laboratoire.

Je souhaite également remercier le Dr Francis Rodier et toute son équipe pour m'avoir en partie adoptée et intronisée au monde de la sénescence. Merci en particulier à Yu, Marc-Alexandre, Jessica, Nicolas, Véronique, Daméhan et Arthur pour vos conseils, toutes les conversations scientifiques ou non et les bons moments passés ensemble.

Merci à Christian Charbonneau, Jean Duchaine, Karine Odette, Raphaëlle Lambert, Pierre Melançon et Geneviève Boucher pour vos conseils envers mes expériences et votre disponibilité.

Je souhaite remercier les affaires académiques pour être toujours prêts à répondre à nos questions et en particulier Julie Mantovani, merci pour ton soutien et tous tes conseils. Merci à Joëlle Varin et Angélique Desgroseilliers pour votre aide et votre soutien.

Merci à la team yICSA pour votre soutien, les centaines de messages sur whatsapp à mon réveil le matin et votre enthousiasme pour notre association.

J'ai une pensée toute particulière pour tous les professeurs de biologie qui ont nourri ma passion et en particulier Mme Philibert, Mme Touron et Mr Allano ; ainsi que pour tous les professeurs et encadrants de stage, qui m'ont fait confiance, m'ont appris la recherche et ont répondu à mes innombrables questions. Je souhaite ainsi remercier le Dr Éric Solary, Dr Franck Debeurme et Séverine Badel pour m'avoir donné la première chance de travailler dans un laboratoire. Merci au Dr Douglas Fearon et en particulier merci au Dr Arnaud Pommier. Arnaud, merci de m'avoir permis de réaliser mon rêve de vivre à New York, de ton soutien, tes conseils et de m'avoir permis de participer à une publication. Enfin, j'ai une pensée très particulière pour le Dr Clotilde Théry et Dr Mercedes Tkach. Clotilde et Mercedes, je vous remercie du fond du cœur de m'avoir fait confiance, de m'avoir formée et pour votre soutien envers mes choix de carrière. Merci également au Dr Annaïg Lan.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont aidé, ont partagé leur savoir-faire et souvent un bon moment au laboratoire. Merci au Dr Joanna Kowal, Dr Jean-Marie Carpier, Dr Marine Gros, Dr Lorena Martin-Jaular, Dr Mathilde Mathieu, Adeline Cros et toute l'équipe U932 de l'Institut Curie. Merci à Mélanie, Thomas, Jack, Aline et aux étudiants de l'IRIC.

Je souhaite remercier mes amis qui me rendent la vie plus belle jour après jour. Merci Chloé, Maria-Virginia, Léa, Eloïse et Amandine. Que de chemin parcouru depuis notre rencontre au concours de recrutement... Merci pour votre soutien et vos conseils, tous les très bons moments partagés ensemble, les soirées, les chalets et karaokés endiablés. Mon parcours à l'IRIC n'aurait pas été le même sans vous. Amandine, merci pour ton soutien au quotidien et pour être une coloc du tonnerre. Merci à Lauralie et Benoît, vous rencontrer a été un rayon de soleil et j'ai hâte de pouvoir de nouveau partir en vadrouille dans le Québec avec vous ! Merci Verena, Virginie, Lucyle, Sara, Madline, Marine, Fatéma pour tous les bons moments et conseils

partagés. Merci Cyril pour toutes nos conversations et de m'avoir suivie dans l'organisation de la Journée de la Sénescence. Merci Amina pour ton soutien et innombrables messages vocaux ! Merci à tous mes amis montréalais Élodie, Nithaya, Jeff, Camille, Pierre, Eunji, Thomas et Loïc. C'est un bonheur de partager tous ces moments ensemble.

Merci à mes amies en France qui êtes toujours là pour me soutenir. Vous êtes mes piliers mes ladies et ma vie ne serait pas la même sans vous. Merci Anaëlle, Blandine, Charlotte, Constance, Juliette, Maëlis, Margot et Mégane. Merci Alice pour ton amitié et ton soutien, travailler dans un labo sans mon bureau à côté du tien n'a pas la même saveur. Merci Cassandra pour ton soutien et de m'avoir laissé entrevoir que j'étais capable de partir au Canada, je ne serais pas là sans une conversation qui restera gravée dans ma mémoire. Merci Clémence (ou plutôt Dr Vigouroux-Nguyen !!) pour ton amitié depuis...24 ans ! Merci Audrey pour tout ce qu'on a partagé ensemble. J'ai hâte de partager les aventures à venir de nos reconversions ! Merci Pauline pour ton soutien et nos conversations sans fin. Merci Sébastien.

Enfin, je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui sans ma famille qui m'entoure jour après jour et me pousse à donner le meilleur de moi-même. J'ai une pensée particulière pour Suzanne et Guy Gouronnec. Votre amour me porte et je suis tellement fière d'être votre petite fille. J'ai une pensée émue pour Yvette et Robert Guédo.

Mes derniers remerciements vont à mes parents, Janick et Michel et à ma sœur Ninon. Je n'aurais jamais pu faire tout ce chemin sans votre amour et votre soutien tous les jours. Vous m'avez appris à voir les petits bonheurs de la vie et à être une battante. Je vous aime.

Chapitre 1 : Introduction

1. Stratégies thérapeutiques

1.1. Histoire résumée de la chimiothérapie

Le terme chimiothérapie a été désigné dans les années 1900 par Paul Ehrlich comme l'utilisation de produits chimiques pour traiter les maladies¹. La recherche commença par l'observation de l'effet de gaz létaux, comme le gaz moutarde, sur des soldats. Suite à l'exposition au gaz, les leucocytes étaient supprimés et la moelle osseuse n'était plus capable de produire de nouvelles cellules², laissant présager une efficacité pour traiter les lymphomes. Un des premiers succès fut l'introduction de l'hormonothérapie en 1939 pour le cancer de la prostate³. C'est en 1951 que furent découvertes par Hitchings et Elion la 6-thioquanine et 6-mercaptopurine, utilisées dans le traitement de la leucémie et d'autres maladies. Ils recevront le prix Nobel en 1988 pour cette découverte¹. À cette époque, le sentiment général était que la chimiothérapie, avec ses effets souvent très toxiques, causait plus de mal que de bien aux patients. C'est en combinant les idées qu'une seule cellule cancéreuse pouvait faire resurgir la maladie⁴, et que l'efficacité de la chimiothérapie était corrélée au nombre de cellules contenues dans la tumeur⁵ que les protocoles de traitement ont évolués. Un des exemples les plus frappant fut l'utilisation de la combinaison de chloréthazine (gaz moutarde), vincristine, prednisone et procarbazine pour le traitement de la maladie de Hodgkin^{6,7}. D'une maladie sans aucun traitement possible, on passa à des patients en rémission dans 80% des cas, et pour 60% d'entre eux sans aucune rechute dans les 40 années suivantes^{1,6,7}. Afin de trouver la combinaison la plus optimale pour leurs patients, les praticiens peuvent faire varier l'intensité des doses, les intervalles d'administration, les compléments pour essayer de réduire les effets secondaires et la toxicité. La chimiothérapie fut ensuite proposée en traitement adjuvant à la chirurgie dans le cancer du sein avec des résultats très positifs^{8,9}.

Les découvertes des caractéristiques principales des cellules cancéreuses^{10,11}, ainsi que les avancées technologiques comme le séquençage du génome humain en 2001^{12,13} ont permis le

développement des thérapies ciblées. Ces thérapies sont dirigées contre des cibles propres à chaque cancer, en inhibant par exemple des voies de signalisation qui sont augmentées dans certains cancers.

En parallèle, depuis le milieu des années 1980, se développent les immunothérapies. Les immunothérapies utilisent et imitent le fonctionnement du système immunitaire pour reconnaître et attaquer les cellules cancéreuses^{1,14}.

Cependant, aujourd'hui, les succès des chimiothérapies ont atteint un plateau et les résistances sont toujours d'actualité pour de nombreux cancers¹⁵.

1.2. Létalité synthétique

La stratégie de l'utilisation du concept de la létalité synthétique contre la résistance à la chimiothérapie a été proposée il y a déjà 23 ans¹⁶. La létalité synthétique a été initialement découverte chez la drosophile¹⁷. Elle se définit par le fait que l'inhibition individuelle de deux gènes n'a aucun effet sur la cellule alors que l'inhibition simultanée de ces gènes provoque la mort cellulaire (Figure 1.A). Dans les cellules cancéreuses, la létalité synthétique a lieu lorsque l'inhibition d'un gène dans une cellule normale n'a pas d'effet alors que l'inhibition de celui-ci dans une cellule cancéreuse (mutée pour un autre gène) induit la mort de cette dernière¹⁸ (Figure 1.B.).

Il existe également la létalité synthétique de dosage, où un gène est surexprimé et c'est l'inhibition d'un second gène qui induit la mort de la cellule cancéreuse¹⁹ (Figure 1.C). On peut citer l'inhibition de PP2A (*Protein phosphatase 2*) dans des cellules surexprimant Mad2 (*Mitotic arrest deficiency 2*) qui induit la mort de cellules cancéreuses du foie et du colon²⁰.

La létalité synthétique conditionnelle est une létalité synthétique qui ne peut se réaliser que sous certaines conditions, liées au microenvironnement (hypoxie...), à des changements intrinsèques (niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive oxygen species*) élevé, changements métaboliques...) ou à des changements extrinsèques (traitement ciblant l'ADN...) ¹⁹ (Figure 1.D.).

Par exemple, dans des lignées de glioblastome, des cellules mutées pour STAG2 (*Cohesin*

subunit SA-2) sont plus sensibles aux inhibiteurs de PARP (*Poly(ADP-ribose) polymerase*) lorsque ceux-ci sont combinés à des agents endommageant l'ADN²¹.

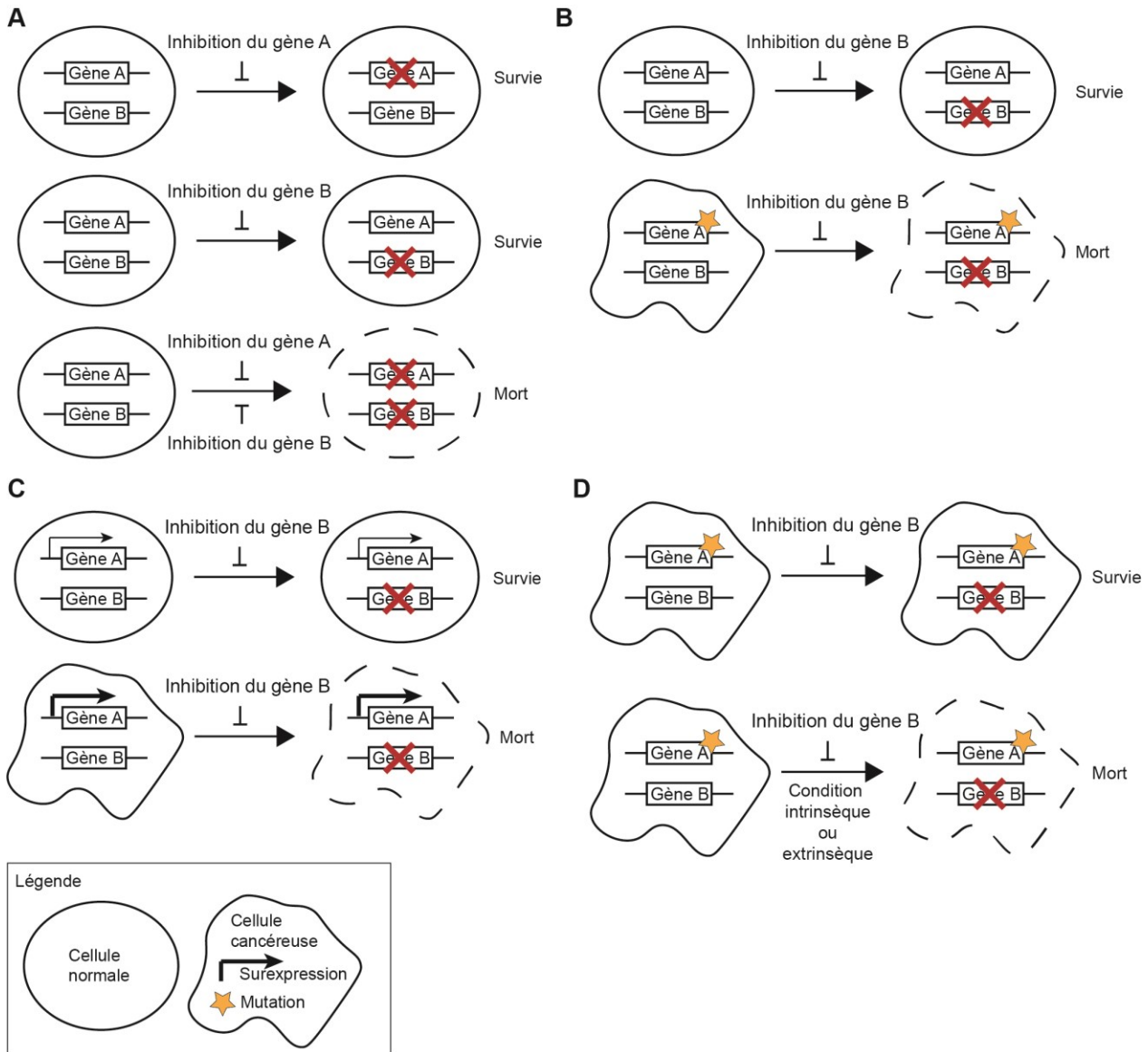


Figure 1. – La létalité synthétique

(A) Définition de la létalité synthétique. (B) La létalité synthétique dans le contexte tumoral. (C) La létalité synthétique de dosage. (D) La létalité synthétique conditionnelle. Adapté de O'Neil et al.¹⁹.

1.3. Stratégie « crochet-uppercut »

Le stratégie « crochet- uppercut » dérive de la létalité synthétique conditionnelle. Elle consiste en une combinaison de drogues qui sont administrées de façon séquentielle. La première drogue tue quelques cellules de la population, mais induit une résistance dans d'autres cellules. Résister implique un certain coût pour la cellule, ce qui lui confère une certaine vulnérabilité et permet donc de la cibler avec une deuxième drogue (Figure 2). On parle de méthode « crochet-uppercut » car le premier traitement est le crochet qui assomme l'adversaire suivi du deuxième traitement, l'uppercut, qui l'achève²²⁻²⁴.

Un haut niveau de ROS est une vulnérabilité acquise des cellules résistantes à la chimiothérapie. Les cellules peuvent alors être dépendantes à la protéine GPx4 (*Glutathione peroxidase 4*), qui les protège des dommages oxydatifs. L'inhibition de GPx4 peut ensuite induire la mort des cellules par ferroptose²⁵.

Un autre type de vulnérabilité acquise est l'état de sénescence.

Suite à la chimiothérapie ou aux irradiations, les cellules cancéreuses peuvent mourir par apoptose, entrer en sénescence, en catastrophe mitotique, arrêter temporairement de proliférer ou totalement résister et continuer de proliférer²⁶. Les cellules sénescents arrêtent de proliférer mais sécrètent de nombreuses molécules : le phénotype sécrétoire associé à la sénescence ou SASP (*Senescence-associated secretory phenotype*). Le SASP a un impact sur le microenvironnement tumoral et malgré l'arrêt de prolifération, les cellules sénescents peuvent, à long terme, être délétères pour le patient^{27,28}. Quelques composés sont déjà connus pour induire la sénescence (sénescence induite par la chimiothérapie, SIC) comme, entre autres, les inhibiteurs de CDK4/6²⁹ (*Cyclin-dependent kinase*), la cisplatine^{30,31}, la doxorubicine^{24,32}, l'adriamycine³³, l'étoposide²⁴. Des cribles ont également été réalisés afin d'identifier de nouveaux composés induisant la sénescence³⁴. Les cellules sénescents peuvent être ensuite préférentiellement ciblées en utilisant des sénolytiques. La recherche de sénolytiques est en pleine expansion. L'un des sénolytiques les plus connus est l'ABT-263, un inhibiteur spécifique des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*). Son effet sénolytique a été observé dans différents modèles de sénescence (répllicative, induite par la thérapie, par

l'expression d'oncogènes) et avec différents types de cellules (fibroblastes, cellules cancéreuses...)24. D'autres molécules ont été reportées comme ayant un effet sénolytique : la combinaison dasatinib et quercetin, le piperlongumine, la fisetine, la metformine, le panobinostat (inhibiteur des HDAC (histone deacetylase)), geldanamycin (inhibiteur des HSP90 (protéine de choc thermique, *heat shock protein*)) et d'autres 35-40.

La stratégie « crochet-uppercut » a par exemple été étudiée dans le cancer du foie dans des modèles cellulaires et murin. Wang et al. ont montré que l'inhibition de la kinase CDC7 (*Cell division cycle 7-related protein kinase*) induisait la sénescence dans les cellules de cancer de foie mutées pour *TP53* et ont identifié que l'inhibition de mTOR (*Mechanistic target of rapamycin*) conduisait à l'apoptose des cellules cancéreuses sénescents41.

Afin de pouvoir exploiter cette stratégie au maximum, il est important de bien comprendre toutes les caractéristiques des cellules sénescents.

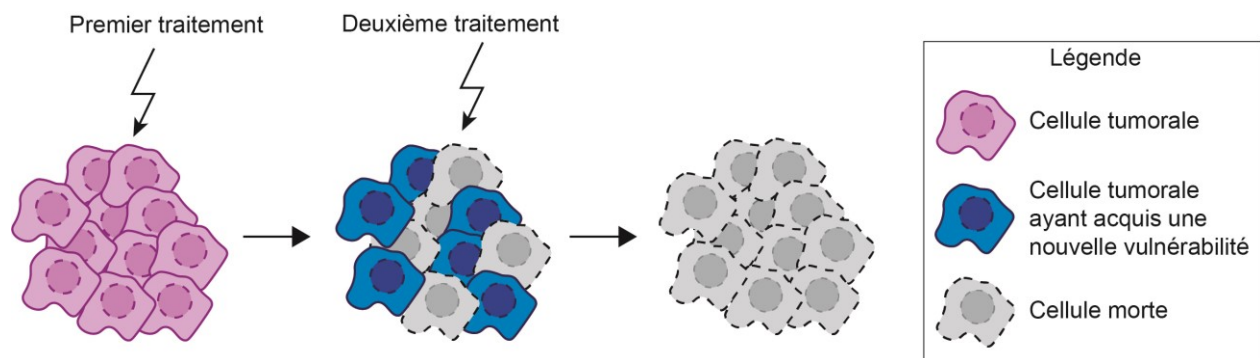


Figure 2. – La stratégie « crochet-uppercut »

Le principe de la stratégie thérapeutique « crochet-uppercut » est de cibler une vulnérabilité acquise des cellules tumorales résistantes à un premier traitement.

2. Le cancer de l'ovaire : caractéristiques, traitements actuels et futurs

2.1. Présentation générale

Le cancer de l'ovaire, malgré une faible incidence (3,4%) est le deuxième cancer gynécologique le plus meurtrier au monde derrière le cancer du col de l'utérus42. Cette mortalité élevée est

majoritairement due à une détection tardive chez les patientes à cause de symptômes non spécifiques, ainsi qu'un fort taux de résistance aux traitements (20-40%)⁴³.

Il existe différents types de cancer de l'ovaire, désignés selon leur tissu d'origine supposé. Les cancers épithéliaux de l'ovaire (CEO) comptent pour 90% des cas, suivis des cancers provenant du stroma et des cordons sexuels (2%) et des cellules germinales (3%)⁴⁴. Le cancer épithélial de l'ovaire (CEO) se divise lui-même en plusieurs sous catégories : le cancer séreux (52%), le cancer endométriode (10%), mucineux (6%) et à cellules claires (6%)⁴⁴. Au Japon, le cancer de l'ovaire à cellules claires (COCC) atteint 23% de tous les cancers de l'ovaire sans qu'une raison précise ait été identifiée^{43,45}.

Les cancers du stroma et des cordons sexuels et des cellules germinales sont pris en charge assez rapidement et ont un bon taux de survie après 5 ans en comparaison des CEO⁴⁴ (Figure 3). Les CEO ne sont pas égaux en terme de stade au diagnostic. Les cancers endométriodes, mucineux et à cellules claires sont diagnostiqués en majorité aux stades I et II d'après la classification de la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) alors que le cancer séreux est diagnostiqué aux stades III et IV⁴⁴. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les cancers séreux sont asymptomatiques dans les premiers stades et que le COCC et le cancer endométriodes sont associés à l'endométriose, une maladie gynécologique nécessitant un suivi régulier des patientes⁴⁶. Aux stades avancés cependant, le COCC et le cancer mucineux ont un taux de survie plus faible (13-16 %) que le cancer séreux (26%) à cause d'une forte résistance aux traitements actuellement utilisés en clinique^{47,48}.

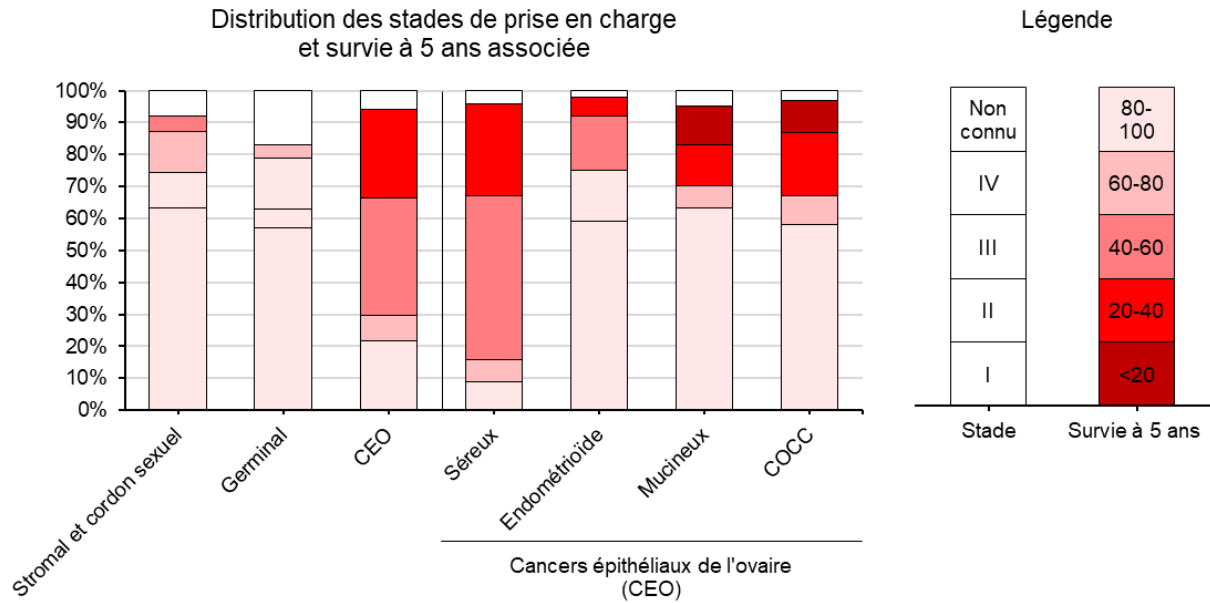


Figure 3. – Distribution des stades de prise en charge du cancer de l’ovaire et survie à 5 ans associée

Graphique réalisé d’après l’étude de Torre et al.⁴⁴.

Les tumeurs du stroma et des cordons sexuels proviennent de différents types cellulaires comme les cellules de la granulosa, de Sertoli et/ou de Leydig^{44,49}. En effet, le programme de différenciation testiculaire normalement réprimé peut être réactivé dans les cellules de la granulosa ou de la thèque suite à la mutation du gène *DICER1* ou d’autres gènes non identifiés⁴⁹.

Les CEO sont également divisés en deux catégories selon leur histologie, leurs mutations principales et leur agressivité⁵⁰. Les cancers de type I comprennent le cancer séreux de bas grade, endométrioïde, mucineux et le COCC. Les cancers non différenciés et séreux de haut grade sont des cancers de type II. Au niveau histologique, les cancers de type I proviennent de kystes d’inclusion ou implantés sur l’épithélium ovarien alors que les cancers de type II proviennent plutôt de la trompe de Fallope ou de l’épithélium ovarien. Les gènes *KRAS* (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *BRAF*, *PTEN* (*Phosphatase and tensin homologue*), *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α*) sont souvent mutés dans les cancers de type I et plus rarement dans les cancers de type II. *TP53* est

très fréquemment muté dans les cancers de type II. Les cancers de type I ont un développement plutôt lent en comparaison des cancers de type II, souvent détectés à un stade avancé⁴⁹⁻⁵¹.

Les femmes ayant déjà eu un cancer du sein et portant les mutations des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* (*Breast cancer 1 or 2*) ont un risque plus élevé de développer un cancer de l'ovaire (44 et 17% respectivement)⁵², le plus souvent de type séreux de haut grade⁴⁴.

Lors de cette étude nous nous sommes particulièrement intéressés au cancer de l'ovaire à cellules claires.

2.2. Le cancer de l'ovaire à cellules claires

2.2.1. Caractéristiques générales du COCC

Les tumeurs de COCC présentent des cellules claires remplies de glycogène ainsi que des cellules clouées (*hobnail cells*) avec un noyau protubérant à la surface de la cellule^{45,53} (Figure 4).

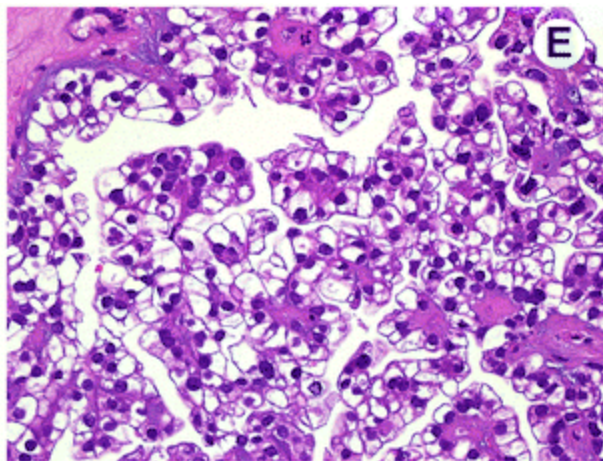


Figure 4. – Photo représentative de cancer de l'ovaire à cellules claires.

Photo de Prat et al.⁵³.

L'origine tissulaire du COCC est encore discutée aujourd'hui. Ses caractéristiques morphologiques ne reflètent pas celles de l'épithélium de surface de l'ovaire, comme cela était pensé au départ, mais semble plutôt provenir de l'endomètre. Le COCC peut en effet provenir

des kystes endométriosiques, qui accompagnent l'endométriose^{49,54-56}. Dans cette pathologie, les cellules de l'endomètre ne recouvrent non plus seulement l'intérieur de l'utérus mais également l'extérieur de celui-ci, pouvant toucher les ovaires, les trompes de Fallope, la vessie, le côlon et les reins⁵⁷. Ceci engendre un état inflammatoire, une surcharge de fer et une forte concentration d'hormones sexuelles dans l'environnement ovarien^{58,59}. Ces circonstances sont favorables au développement d'une endométriose atypique, ce qui est reconnu comme étant associé au COCC dans 22 à 70% des cas⁶⁰. De plus, les mutations caractéristiques du COCC (*PTEN* et *ARID1A* (*AT-rich interactive domain-containing protein 1A*)) ont été retrouvée dans des études comparant les cancers et l'endométriose adjacente⁴⁹.

L'endométriose est donc un facteur de risque pour le COCC^{46,61}. Le syndrome de Lynch, la ménopause tardive et l'utilisation d'hormones de remplacement après la ménopause sont également des facteurs de risques associés au COCC. C'est l'augmentation de la prolifération des cellules ovariennes induite par les estrogènes qui peut participer au développement du cancer. Au contraire, l'utilisation de contraceptifs oraux (pilule) est un facteur protecteur contre le cancer de l'ovaire⁶¹.

2.2.2. Mutations récurrentes dans le COCC

Le COCC est caractérisé par certaines mutations et surexpression de gènes, qui participent au développement du cancer.

La mutation la plus représentée est celle du gène *ARID1A* (40-67%)⁶²⁻⁶⁵. Cette mutation induit la perte de fonction de ce gène suppresseur de tumeur. La protéine ARID1A (nommée aussi BAF250) participe au complexe SWI/SNF (*SWItch/ Sucrose non-fermentable*). Ce complexe, composé de 13 à 15 protéines, remodèle la chromatine pour contrôler l'expression de gènes et joue un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN⁶⁶. ARID1A participe à la liaison du complexe avec ses sites cibles sur l'ADN. Par exemple, ARID1A peut participer au recrutement de la protéine p53 au niveau de ses gènes cibles comme *CDKN1A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*)⁶⁷. De façon intéressante, il a été montré que les tumeurs mutées pour *ARID1A* ne l'étaient pas pour *TP53* et inversement⁶⁷. Dans le COCC, *TP53* est seulement muté dans 5 à 15% des cas^{68,69}. Lorsque le gène *ARID1A* est muté, la protéine n'est plus exprimée et le complexe

SWI/SNF dépend alors de l'expression de *ARID1B*^{66,70}. Le complexe avec ARID1B va faciliter l'expression de gènes de prolifération impliqués dans la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (*Phosphoinositide 3 kinase / Akt / mTOR*) et ErbB, comme MET⁷¹. *ARID1B* est lui-même muté dans 10% à 18% des COCC^{64,65}. SMARCA4 (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin*) est une autre sous-unité du complexe SWI/SNF et a également été retrouvée mutée dans 5% des cas de COCC⁶⁴.

La mutation d'*ARID1A* est un des évènements menant au COCC, ayant été observée dans des lésions précurseurs au COCC⁴⁹. Cependant, sa seule mutation ne permet pas la transformation des cellules en cellules cancéreuses, celle-ci doit être combinée à d'autres évènements comme la perte de PTEN ou la mutation de *PIK3CA*^{70,72}.

Des altérations des gènes de la voie de signalisation PI3K/AKT sont souvent corrélées à celles d'*ARID1A* dans le cancer de l'ovaire^{62,73}. *PIK3CA* est muté dans 20 à 51% des cas de COCC^{62-65,68} et *AKT2* est amplifié dans 24% des cas⁶⁴. *PTEN* est muté dans 5% des cas^{65,68,74} mais la perte de son expression a été observée dans 40 à 51% des cas de COCC⁷⁵. *PIK3CA* code pour la sous-unité catalytique p110 α du complexe PI3K. Celui-ci est composé d'une sous-unités régulatrice, p85, et d'une sous-unité catalytique, p110. La sous-unité p85 va être activée lors de sa fixation aux tyrosines phosphorylées d'un récepteur tyrosine kinase, de la protéine adaptatrice d'un récepteur ou directement à RAS⁷⁶. Cette étape va activer la sous-unité p110 et permettre au complexe PI3K de se rapprocher de la membrane plasmique. PI3K catalyse la phosphorylation du lipide phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) en PI(3,4,5)P₃, aussi appelé PIP₃. PIP₃ va pouvoir être dégradé en PI(3,4)P₂. L'accumulation de PIP₃ et PI(3,4)P₂ va permettre le recrutement à la membrane de protéines effectrices avec des domaines de liaison pour ces molécules, comme Akt ou PDK1⁷⁷ (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*). L'activation de ces protéines permet par la suite l'activation de différentes voies de signalisation ayant un impact sur la prolifération, la survie et le métabolisme des cellules⁷⁷. PTEN est le régulateur négatif convertissant le PIP₃ en PI(4,5)P₂⁷⁸. La mutation de *PIK3CA*, activant le complexe PI3K, et la perte d'expression de *PTEN* vont donc permettre l'hyperactivation de voies de signalisation importantes dans la tumorigenèse⁷⁶. *PIK3R1* (*Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1*),

codant pour la sous-unité régulatrice p85 α /p55 α /p50 α a également été retrouvée mutée dans 7 à 8% des cas de COCC^{64,65}.

D'autres mutations ont été identifiées dans le COCC, comme *PPP2R1A* (10-20 %) ^{62,63,65} (*Protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha*), *KRAS* (9-17%) ^{62-65,68}, *CTNNB1* (5-10%) ^{68,79} (*Catenin beta 1*) et *BRCA1* (6.3%) ⁸⁰.

Certaines protéines sont également surexprimées dans ce cancer, comme le récepteur au facteur de croissance épithélial EGFR (*Epithelial growth factor receptor*) (60%) ⁸¹, MET (20-37%) ^{74,82}, HER2 (14-42,9%) ^{62,64,65,83} (*Human epidermal growth factor receptor 2*), AKT2 (24%) ⁶⁴. La surexpression de EGFR, MET, HER2 et AKT2 contribue à l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et de la voie des MAP kinases (*Mitogen-activated protein kinase*), qui régissent de nombreuses fonctions cellulaires comme la différenciation, la survie, le métabolisme, la prolifération et la migration.

Le facteur de transcription ZNF217 est amplifié de l'ordre de 20 à 36% dans le COCC ^{65,84,85} (*Zinc finger protein 217*). ZNF217 est souvent amplifié dans les cancers et a un rôle dans, entre autres, la régulation de la prolifération, la survie et l'invasion des cellules cancéreuses ⁸⁶.

Enfin, HNF-1 β ^{87,88} (*Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B*) et l'annexine A4 ⁸⁸ sont amplifiées dans quasiment tous les cas de COCC. HNF-1 β ⁸⁹ et l'annexine A4 ⁹⁰ participent à des mécanismes de résistance au traitement, comme nous le verrons plus loin.

2.3. Stratégie thérapeutique actuelle dans le COCC

Le protocole thérapeutique du cancer de l'ovaire à cellules claires commence généralement par une ablation de la tumeur, suivie par une combinaison chimiothérapeutique de sels de platine (cisplatine ou carboplatine) et paclitaxel ^{43,91,92}. Le carboplatine est un agent intercalant de l'ADN, créant des cassures double brin. Les sels de platine induisent aussi la formation de ROS dans les cellules ⁹³. Le carboplatine est moins toxique que le cisplatine, dont il dérive, et est donc favorisé dans le protocole thérapeutique. La combinaison carboplatine-paclitaxel a montré de meilleurs taux de survie que la combinaison cisplatine-paclitaxel ⁹⁴. Le carboplatine a été approuvé par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug*

Administration, FDA) en 1989 pour les patients atteints de cancer. Le taxol (nommé ensuite paclitaxel par l'entreprise Bristol-Myers Squibb) a été découvert en 1967 suite à un programme de criblage de plantes pour trouver des molécules anti-cancéreuses. A l'origine, le taxol provient de l'écorce de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*). Le paclitaxel a été autorisé par la FDA en 1992 pour le traitement du cancer de l'ovaire⁹⁵. Le paclitaxel stabilise les microtubules, bloque les cellules en phase G2/M et induit l'apoptose des cellules^{95,96}.

Cependant, il a été montré que ce traitement était associé aux rechutes des patientes à cause de mécanismes de résistance à la chimiothérapie^{47,97}.

2.3.1. Mécanismes de résistance à la chimiothérapie dans le COCC

La résistance à la chimiothérapie peut être une résistance innée ou acquise. La résistance innée est l'utilisation par la cellule cancéreuse de caractéristiques intrinsèques pour résister à la thérapie. La résistance acquise est l'utilisation par la cellule de caractéristiques nouvellement acquises suite au traitement pour y résister.

Un des mécanismes pouvant expliquer la résistance élevée au traitement du COCC est la prolifération lente des cellules de COCC, en comparaison des cellules de cancer séreux⁹⁸.

Un autre mécanisme de résistance est la diminution de la concentration intracellulaire de la chimiothérapie. Il a été proposé un rôle de la famille des transporteurs ABC (transporteurs avec cassette de liaison à l'ATP, *ATP-binding cassette*). Ces transporteurs sont connus pour exporter les drogues à l'extérieur de la cellule, diminuant leur concentration intracellulaire. L'expression de certains gènes (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC3*, *ABCF2*) de cette famille a été associée à la résistance à différentes drogues comme le cisplatine dans le COCC⁹⁹⁻¹⁰¹. Cependant, une étude immunohistochimique de *ABCB1* et *ABCC1* sur des biopsies de COCC après chimiothérapie n'a pas montré de différence entre des patients répondeurs ou non-répondeurs⁶⁰. D'autres études sont nécessaires pour déterminer l'importance de ces transporteurs dans la résistance à la chimiothérapie du COCC.

L'annexine A4 est une molécule surexprimée dans le COCC et est associée à la résistance à la chimiothérapie dans ce cancer^{90,102-104}. Elle peut par exemple diminuer la concentration

cellulaire de carboplatine en augmentant son rejet à l'extérieur de la cellule en coopération avec le transporteur ATP7A¹⁰⁵.

La détoxification de la cellule est un autre mécanisme permettant aux cellules de résister aux traitements. Les sels de platine induisent du stress oxydatif dans la cellule en augmentant la production de ROS⁹³. L'expression de gènes codant pour des protéines antioxydantes ou impliquées dans les voies de réponse au stress oxydatif comme GPx3 (*Glutathione peroxidase 3*), GLRX (*Glutaredoxin*), SOD2 (*Superoxide dismutase mitochondriale 2*)¹⁰⁶, HNF-1 β est élevée dans le COCC^{60,102,107,108}. SOD2, par exemple, participe à maintenir une bonne fonction mitochondriale en métabolisant les superoxydes et diminuant le stress oxydatif¹⁰⁹. HNF-1 β régule l'expression de GCLC (*Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*), maintenant un niveau élevé du glutathion (GSH) dans les cellules de COCC. Le glutathion maintient un faible niveau de stress oxydatif dans la cellule en participant à l'élimination des ROS⁸⁹.

Les cellules cancéreuses peuvent également résister aux drogues en surexprimant des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN¹¹⁰. L'expression de certains gènes impliqués dans les voies de réparation des excisions de nucléotides de l'ADN, comme ERCC1 (*Excision repair cross-complementation group 1*), ont effectivement été observés dans le COCC^{111,112}.

Enfin, les cellules de COCC peuvent entretenir les signaux de survie. L'expression des récepteurs de EGFR et de HER2 peut être augmentée dans le COCC^{43,81,83,84,102}, activant la voie de signalisation PI3K/Akt, qui protège contre l'activation de l'apoptose. Cette voie est également activée suite aux mutations de *PIK3CA* et *PTEN*. Suite à son activation, Akt va phosphoryler différentes protéines comme BAD¹¹³ (*BCL-2 associated death protein*) ou FOXO3¹¹⁴ (*Forkhead box O 3*), créant un site de liaison pour la protéine 14-3-3. BAD ne pourra alors plus inhiber l'action des protéines anti-apoptotiques comme BCL-XL¹¹³ (*B-cell lymphoma-extra large*). Le facteur de transcription FOXO3, quant à lui, s'accumulera dans le cytoplasme et ne pourra plus se lier à l'ADN pour induire l'expression de gènes codants pour des protéines pro-apoptotiques comme BIM¹¹⁵ ou le ligand Fas¹¹⁴. Il a également été montré que Akt pouvait phosphoryler MDM2¹¹⁶ (*Murine double minute 2 homologue*) et ainsi favoriser la dégradation de p53¹¹⁷,

empêchant la transcription des gènes pro-apoptotiques *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) et *Noxa*¹¹⁸.

2.3.2. Stratégies thérapeutiques actuelles dans le COCC récurrent

La résistance à la chimiothérapie est définie comme une progression de la croissance tumorale pendant le traitement, ou une rechute rapide après le traitement¹¹⁹.

Une fois la résistance déclarée, différents traitements sont actuellement proposés aux patientes selon la sensibilité de leur tumeur aux sels de platine. Les patientes ayant une tumeur sensible aux sels de platine se voient prescrire une combinaison de carboplatine et doxorubicine liposomale pégylée, cette combinaison étant moins toxique que la combinaison de carboplatine et paclitaxel¹¹⁹⁻¹²¹. En cas de résistance aux sels de platine, les patientes se voient prescrire de la doxorubicine liposomale, du paclitaxel ou de la gemcitabine, un antagoniste de la pyrimidine¹¹⁹. Des anti-angiogéniques comme l'anticorps monoclonal contre le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (bevacizumab) sont également prescrits aux patientes en cas de récurrence¹²². Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) étant fortement exprimé par les cellules de COCC et associé à un faible pronostic de survie^{123,124}.

2.3.3. Stratégies envisagées contre les résistances à la chimiothérapie dans le COCC

Une stratégie thérapeutique envisagée contre un mécanisme de résistance à la chimiothérapie est l'utilisation d'inhibiteurs contre SOD2 ou HNF-1 β ⁴⁵. L'inhibition de SOD2 dans des lignées de COCC diminue la prolifération des cellules et induit une dysfonction mitochondriale¹⁰⁹. Induire la dysfonction mitochondriale par l'utilisation de biguanides a été proposée, ces molécules étant déjà approuvées par l'agence américaine FDA pour le traitement du diabète⁴⁵.

Comme vu précédemment, la voie PI3K/Akt/mTOR est fortement activée dans le COCC, rendant les cellules dépendantes de cette voie de signalisation pour leur survie. Rahman et al. ont montré que le statut de *PIK3CA* (muté ou non) ne prédisait pas une sensibilité plus importante aux inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR¹²⁵. Cependant, quelques résultats sont encourageant envers cette stratégie thérapeutique. Une étude a montré que l'inhibition de mTOR (inhibiteur : everolimus) pouvait inhiber la croissance de lignées cellulaires de COCC, sensibles ou résistantes au cisplatine¹²⁶. Un essai clinique de phase deux a montré que la combinaison carboplatine et

paclitaxel avec l'inhibiteur de mTOR temsirolimus était bien tolérée mais ne montrait pas d'augmentation significative de la survie sans progression à plus de 12 mois¹²⁷. Un autre essai clinique a montré que 2 patients sur 6 répondaient favorablement au temsirolimus¹²⁸. D'autres essais cliniques sont actuellement en cours (NCT03456700 ; NCT02142803 ; NCT01065662). Des essais sont donc nécessaires afin d'avoir une idée précise de l'efficacité de l'inhibition de cette voie dans le traitement du COCC.

2.3.4. Autres stratégies thérapeutiques envisagées dans le COCC

Ces résultats indiquent une forte demande de nouveaux traitements, dont plusieurs ont été proposés^{43,45,60}. Ces traitements ciblent l'hyperactivation des voies de signalisation des récepteurs aux tyrosines kinases (RTK), la mutation de ARID1A et ses conséquences ainsi que la réactivité au système immunitaire du COCC⁴⁵.

Les RTK, situés à la surface de la cellule, sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la survie, le métabolisme et la migration⁴⁵. Différents récepteurs ou voies de signalisation découlant de l'activation de ces récepteurs pourraient être ciblés dans le COCC.

Comme vu précédemment, le RTK *MET* est amplifié dans 37% des cas de COCC^{74,82}. Dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de COCC, son inhibition a été bénéfique pour tuer les cellules cancéreuses et inhiber la croissance tumorale¹²⁹. Cependant, un premier essai clinique avec un inhibiteur de MET n'a montré aucune efficacité¹³⁰.

HER2 peut être surexprimé dans le COCC^{62,64,65,83}. Cette surexpression suggère que l'utilisation de l'anticorps monoclonal trastuzumab pourrait être bénéfique pour les patients atteints de COCC. Malgré des données prometteuses de l'utilisation de cet anticorps dans un modèle de souris⁸¹, un essai clinique a malheureusement montré aucun effet de cette stratégie thérapeutique¹³¹. Dans cette étude, le niveau d'expression de HER2 était défini par immunohistochimie¹³¹, or il a été démontré qu'il pouvait y avoir une discordance entre les résultats d'immunohistochimie et d'hybridation in-situ pour ce gène dans le COCC¹³².

ARID1A est muté dans une grande partie des COCC⁶²⁻⁶⁵, induisant une perte de fonction de ce gène. Il a récemment été montré que les cellules mutées pour *ARID1A* étaient dépendantes de l'activité d'EZH2¹³³ (*Enhancer of zeste homologue 2*) et d'ATR¹³⁴ (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*). Par exemple, Kim et al. ont montré que la prolifération et la capacité de formation de colonies était diminuée lors de l'inhibition d'EZH2, par des shRNA et un inhibiteur, dans plusieurs lignées cellulaires (dont une de COCC) où *ARID1A* était muté¹³³. Les inhibiteurs d'EZH2 et d'ATR sont donc une piste intéressante à poursuivre pour une stratégie thérapeutique de létalité synthétique. Il a également été montré que les cellules mutées pour *ARID1A* sont sensibles à l'inhibition d'autres protéines comme PARP⁷⁰, YES1¹³⁵, HDAC6¹³⁶ (*Histone deacetylase 6*), GCLC^{124,137} et la famille des protéines BET¹³⁸ (*Bromodomain and extra-terminal domain*). Depuis 2014, les inhibiteurs de PARP sont acceptés par l'agence américaine FDA pour le traitement des patientes ayant un cancer de l'ovaire récurrent¹³⁹. Pour les patientes atteintes de COCC, cela ne concerne que le petit groupe de patientes porteur de la mutation BRCA1 (6.7%)⁴³.

Enfin, l'immunothérapie pourrait être une stratégie intéressante dans le traitement du COCC⁷⁹. Certains gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN peuvent être mutés dans un faible nombre de COCC, créant une instabilité des microsatellites, facteur favorable à une réponse aux immunothérapies⁶⁰. Un essai clinique a montré que 2 patientes sur 20 ayant un cancer de l'ovaire résistant aux sels de platine étaient en complète rémission après un traitement utilisant un anticorps anti-PD-1 (*Programmed death 1*)¹⁴⁰. Ces deux patientes étaient atteintes de COCC et n'étaient pas mutées pour *ARID1A*, ni ne montraient d'instabilité des microsatellites, laissant présager d'autres facteurs déterminants pour la réponse aux immunothérapies⁷⁹. De plus, il a été montré que les cellules de COCC sécrétaient beaucoup d'interleukine 6 et 8 (IL-6 et IL-8), molécules immunosuppressives, à cause d'une activation de la voie de STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) et NF-κB (*Nuclear factor kappa B*)^{72,141,142}. Ce dernier peut participer à l'immunosuppression, en induisant l'expression de PD-L1¹⁴³ (*Programmed death ligand 1*). Ces caractéristiques laissent présager un possible succès des immunothérapies chez certaines patientes atteintes de COCC.

2.4. Modèle de COCC utilisé dans cette étude

Dans cette étude, nous avons utilisé la lignée de COCC TOV21G. Cette lignée cellulaire a été établie à partir d'une tumeur d'une patiente de 62 ans, sans historique familial de cancer de l'ovaire et avant tout traitement chimio-thérapeutique, au centre hospitalier universitaire de l'Université de Montréal (Canada)¹⁴⁴. Les caractéristiques histopathologiques montrent qu'il s'agit d'un carcinome de l'ovaire à cellules claires, de stade III (invasion aux tissus afférents et/ou ganglions lymphatiques) et grade 3 (cellules anormales pouvant se multiplier de façon agressive) selon la classification FIGO¹⁴⁴.

Ces cellules montrent un seul changement caryotypique, avec une trisomie du chromosome 10. Les cellules TOV21G ne sont pas mutées pour les gènes *TP53* et *CDKN2A*. Les mutations classiques du COCC se retrouvent dans cette lignée : *ARID1A*, *PIK3CA*, *KRAS*, *PTEN* et *CTNNB1*¹⁴⁵. La base de données de l'encyclopédie des lignées cancéreuses (CCLE, *Cancer cell line encyclopedia*) du Broad Institute répertorie les mutations présentes dans de nombreuses lignées cellulaires, dont la lignée TOV21G¹⁴⁶ (Tableau 1). Les cellules TOV21G ont les mutations suivantes : une délétion et une insertion pour *ARID1A*, aboutissant à des changements du cadre de lecture (pN756fs et pP549fs) et ainsi à une protéine inactive¹⁴⁷; une mutation faux-sens pour *KRAS* (pG13C) induisant l'activation constitutive de la protéine et donc l'activation de la voie des MAP kinases; deux délétions pour *PTEN*, induisant des changements du cadre de lecture (pL265fs et pR142fs); une mutation faux sens pour *PIK3CA* (pH1047Y) et pour *CTNNB1* (pK292N). La mutation faux sens de *PIK3CA* a lieu dans le domaine kinase et a pour résultat une protéine constitutivement active¹⁴⁸. Les mutations de *PTEN* dans le domaine phosphatase (pR142fs) ou C2 (pL265fs) induisent une perte d'activité de la protéine⁷⁸. Les mutations de *PIK3CA* et *PTEN* induisent une hyperactivation de la voie PI3K/Akt/mTOR.

Tableau 1. – Mutations caractéristiques du COCC présentes dans la lignée TOV21G

Gène muté	Type de mutation	Modification protéique	Effet
<i>ARID1A</i>	Insertion	pP549fs	Inactivation de la protéine
	Délétion	pN756fs	Inactivation de la protéine
<i>PIK3CA</i>	Faux sens	pH1047Y	Protéine constitutivement active Activation de la voie PI3K/Akt/mTOR
<i>PTEN</i>	Délétion	pR142fs	Perte de fonction
	Délétion	pL265fs	Activation de la voie PI3K/Akt/mTOR
<i>KRAS</i>	Faux sens	pG13C	Protéine constitutivement active Activation de la voie des MAP kinases
<i>CTNNB1</i>	Faux sens	pK292N	Mutation dans le domaine de liaison à la E-cadhérine

3. La sénescence cellulaire

3.1. Description

La sénescence cellulaire a été décrite dès 1961 par Hayflick et Moorhead lorsqu'ils ont observé des fibroblastes humains diploïdes augmenter de taille et arrêter de proliférer, après un certain nombre de passages en culture cellulaire *in vitro*^{149,150}. Ils ont alors défini la sénescence comme un état irréversible d'arrêt du cycle cellulaire. Au fil du temps, la sénescence a été observée dans de nombreux autres contextes mais il s'agit toujours d'une réponse au stress.

Le modèle décrit par Hayflick et Moorhead est en fait un type de sénescence appelé sénescence répllicative^{149,150}. La sénescence répllicative s'explique par le raccourcissement critique des télomères après un certain nombre de division cellulaires¹⁵¹. L'absence d'expression de la télomérase dans les cellules somatiques humaines empêche la restauration des télomères à chaque phase S du cycle cellulaire. Les télomères deviennent de plus en plus petits, ce qui finit par déclencher une réponse aux dommages à l'ADN¹⁵² (DDR, *DNA damage response*).

Le déclenchement de la DDR se réalise également dans d'autres contextes, par exemple après irradiation des cellules¹⁵³ ou bien après exposition de celles-ci à des drogues génotoxiques, comme la doxorubicine³² ou des inhibiteurs de topoisomérases¹⁵⁴. Ce type de sénescence s'appelle la sénescence induite par la thérapie (TIS) et dans le cas des drogues, la sénescence induite par la chimiothérapie (SIC). Dans le cas de la TIS ou SIC, il y a apparition de cassures double-brin après le traitement, entraînant la DDR¹⁵³. La DDR peut également se déclencher lors de signaux mitotiques forts dû à certains oncogènes (HRAS¹⁵⁵, MOS, CDC6, CCNE¹⁵⁶ (cycline E), STAT5¹⁵⁷ (*Signal transducer and activator of transcription 5*)). L'hyper réplication de l'ADN provoque l'effondrement de fourches de réplifications et des dommages à l'ADN, activant une DDR persistante^{155,158} et l'induction de la sénescence induite par les oncogènes (OIS). Enfin, le stress oxydatif provenant d'agents oxydatifs (H₂O₂) ou de produits du métabolisme cellulaire (ROS) peut causer une DDR et induire un état de sénescence (sénescence induite par le stress oxydatif, OSIS)^{159,160}. La sénescence peut être induite par les inhibiteurs d'histone déacétylase¹⁶¹, qui, sans casser l'ADN, activent les protéines de la DDR¹⁶². On parle alors de sénescence induite épigénétiquement (EIS).

La sénescence peut également survenir sans DDR, par exemple en cas de stress de culture (substrat inapproprié, sérum), inactivation d'un gène suppresseur de tumeur (*PTEN*¹⁶³) ou encore l'expression ectopique des inhibiteurs de kinases dépendant des cyclines (p21^{WAF1/CIP1} (p21) et p16^{INK4a} (p16))¹⁶⁴. Dans le cas de la sénescence induite par le dysfonctionnement mitochondrial (MiDAS), celle-ci se déclenche à cause d'une diminution des ratios NAD⁺/NADH (*Nicotinamide adenine dinucleotide/nicotinamide adenine dinucleotide with hydrogen*), activant AMPK (*AMP-activated protein kinase*) et p53¹⁶⁵.

Les cellules sénescents sont identifiables par la combinaison de différentes caractéristiques, qui, prises individuellement sont également détectées dans d'autres états cellulaires, mais c'est leur combinaison qui permet d'identifier cet état particulier qu'est la sénescence cellulaire.

La caractéristique commune de l'état de sénescence est l'arrêt permanent du cycle cellulaire. Les cellules sénescents se distinguent des cellules quiescentes car aucun stimuli physiologique (facteurs mitogènes ou de croissance) permettant la reprise de la prolifération n'a encore été

découvert. Les cellules sénescents se distinguent également des cellules différenciées au stade terminal car ces dernières ont atteint le dernier stade d'un programme de développement spécifique. Les cellules sénescents sont, elles, entrées dans cet état suite à un stress cellulaire. De plus, la sénescence peut également être activée dans ces cellules différenciées au stade terminal, comme les hépatocytes¹⁶⁶ ou adipocytes¹⁶⁷. Le passage à l'état de sénescence ne nécessite donc pas forcément un cycle cellulaire actif. L'arrêt du cycle cellulaire repose sur la voie de p53/p21 et la voie de pRb/p16 (*Retinoblastoma protein / p16*) dont nous décrivons les mécanismes plus loin¹⁶⁸.

3.2. Rôles des cellules sénescents

3.2.1. Rôle dans le vieillissement

La racine latine du mot sénescence, *senescere*, signifie vieillir. Il a été démontré que les cellules sénescents s'accumulent avec l'âge dans les organes¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Un modèle de souris permettant la délétion spécifique des cellules exprimant p16 a montré que les animaux âgés, une fois dépourvus de leurs cellules sénescents, avaient une survie médiane environ 25% plus longue^{172,173}. De plus, la suppression des cellules sénescents a retardé l'apparition de pathologies liées à l'âge, de tumeurs et de signes de vieillesse chez les souris^{172,173}. Il a été montré chez des souris âgées ou irradiées, que le sénolytique ABT-263, inhibiteur des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL, permet de supprimer les cellules souches hématopoïétiques sénescents et permet aux cellules souches hématopoïétiques normales de retrouver certaines caractéristiques d'un système hématopoïétique plus jeune¹⁷⁴. Suite à l'injection d'un peptide empêchant la liaison entre FOXO4 et p53, induisant alors l'apoptose des cellules sénescents, des souris âgées ont retrouvé une belle densité de fourrure, une meilleure réactivité et une meilleure fonction rénale¹⁷⁵. Les auteurs montrent que FOXO4 se retrouve associé avec p53 au niveau de la chromatine dans les cellules sénescents¹⁷⁵. FOXO4 était déjà connu pour participer à la régulation de l'expression de p21, une cible de p53¹⁷⁶. Les auteurs ont montré que le peptide permettait la diminution de l'expression des niveaux de p21 et l'exclusion du noyau de p53 phosphorylée¹⁷⁵. Baar et al ont proposé dans cet article que la séquestration de p53 en dehors du noyau par l'interaction avec le peptide permettra alors à p53 de se déplacer

jusqu'à la mitochondrie afin d'induire l'apoptose¹⁷⁷ au lieu d'induire la sénescence via l'induction de la transcription de *p21*. Les auteurs ont utilisé deux modèles de souris âgées (soit de façon rapide, soit naturellement) associés à un système permettant le suivi des cellules sénescents et leur suppression spécifique suite à l'injection d'une drogue^{175,178}. Les auteurs ont montré que le peptide avait la même efficacité que lorsque les cellules sénescents étaient supprimées après l'injection de la drogue, démontrant que l'action du peptide était effective dans les cellules sénescents et que la suppression de celles-ci était positive pour les souris¹⁷⁵. De plus ce peptide n'induisait pas une diminution des plaquettes associée à la toxicité de l'ABT-263. Enfin, les auteurs ont également démontré que le peptide permettait l'apoptose des cellules sénescents suite à la chimiothérapie. Le potentiel de ce peptide est donc à explorer¹⁷⁵.

Les cellules sénescents ont un rôle important dans de nombreuses pathologies liées à l'âge¹⁷⁹. Elles peuvent avoir un rôle délétère dans certains cas, comme pour la fibrose pulmonaire idiopathique¹⁸⁰, l'obésité^{167,181}, le diabète de type 2¹⁸¹, la sarcopénie¹⁸² et la cataracte^{173,179}. Dans le cas de la sarcopénie, qui correspond une diminution des capacités musculaires avec l'âge, l'état de sénescence des cellules satellites inhibe leur capacité de régénération et donc de maintenance de la masse musculaire¹⁸². Dans d'autres maladies, l'accumulation de cellules sénescents est protecteur¹⁷⁹. Elles peuvent participer à limiter l'étendue des dommages, comme c'est le cas pour les cicatrices fibrotiques du foie¹⁸³ ou de plaies¹⁸⁴, la fibrose du rein¹⁸⁵, la fibrose suite à un infarctus du myocarde¹⁸⁶, l'hypertension pulmonaire¹⁸⁷ et l'athérosclérose¹⁸⁸. La fibrose est un processus auquel participent les cellules sénescents en sécrétant des composants de la matrice extracellulaire comme CCN1¹⁸⁴ (*Cellular communication network factor 1*) ou stimulent leur production par les fibroblastes adjacents¹⁸⁹. Ce sont également les molécules sécrétées par le SASP qui diminuent la fibrose. Les métallo-protéinases sécrétées dégradent la matrice extracellulaire et la sécrétion de différentes cytokines permet le recrutement des cellules immunitaires afin de supprimer les cellules sénescents¹⁸³. Ce sont des expériences de suppression des cellules sénescents dans des modèles animaux qui ont pu montrer que leur présence était nécessaire à la limitation des différentes maladies (limitation de la fibrose du foie¹⁸³; du rein¹⁸⁵; du cœur¹⁸⁶; de l'hypertension¹⁸⁷; aide à la cicatrisation¹⁸⁴) ou bien à leur aggravation (obésité¹⁸¹; sarcopénie¹⁸²). Les anévrismes, le glaucome, les maladies

d'Alzheimer et Parkinson, entre autres, ont été également identifiés comme étant associés à la sénescence, sans avoir encore déterminé si cela était bénéfique ou délétère pour le patient¹⁷⁹.

De par son importance dans le vieillissement, la sénescence est très étudiée par les équipes de recherche et les industries pharmaceutiques, dans l'espoir de mieux comprendre les processus de vieillissement et trouver des moyens d'allonger au maximum notre durée de vie en bonne santé.

3.2.2. Rôle dans le développement de l'organisme

Le programme de sénescence est également activé lors du développement, en parallèle du programme d'apoptose. Cela a été montré lors de marquages au X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) d'embryons entiers de souris et de poules puis vérifié dans chaque tissu en regardant par exemple l'expression de p21^{190,191}. Lors du développement, les cellules sénescents se situent dans le sac endo-lymphatique de l'oreille interne, les tubules mésonéphrotiques durant l'involution du mésonéphros, la crête ectodermale apicale des membres, la fermeture du tube neural et dans l'espace interdigital régressant^{190,191}. Les cellules sénescents dans l'embryon n'ont pas de dommages à l'ADN, et n'expriment pas p16¹⁹⁰. Le programme repose sur l'expression de p21, régulée par les voies de signalisation TGF β /SMAD (*Transforming growth factor beta / SMAD*) et PI3K/FOXO. Les cellules sénescents dans l'embryon finissent par mourir par apoptose et être supprimées par phagocytose par des macrophages^{179,190,191}.

3.2.3. Rôle dans le cancer

Enfin, la sénescence a un rôle double vis-à-vis du cancer. La sénescence peut être activée dans les cellules cancéreuses mais les cellules sénescents ailleurs dans l'organisme et le microenvironnement ont également un rôle majeur dans le développement de la tumorigenèse.

Lors de la tumorigenèse les signaux oncogéniques augmentent progressivement jusqu'à déclencher le programme de sénescence via p16 et/ou p53, empêchant le développement d'une tumeur¹⁹²⁻¹⁹⁴. Kang et al. ont démontré que l'induction d'une mutation oncogénique dans des hépatocytes de souris, *in vivo*, induisait un programme de sénescence dans ces hépatocytes. Les auteurs ont alors observé que les cellules sénescents sont reconnues et détruites par des

lymphocytes T ou macrophages¹⁶⁶. En utilisant des modèles de souris dont le système immunitaire est incomplet, Kang et al. ont démontré que c'était bien les cellules du système immunitaire qui éliminaient les cellules sénescents précancéreuses¹⁶⁶. C'est lorsque p16, p53 ou d'autres médiateurs de la sénescence comme p27 sont inactivés que les cellules peuvent échapper à l'état de sénescence et alors permettre à la tumeur de se développer¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

Un des exemples de sénescence les plus connus est celui des nævus (communément appelé grains de beauté). Ces tumeurs bénignes sont composées de mélanocytes souvent majoritairement mutés pour la kinase BRAF¹⁹⁸ et ne progressent que rarement en mélanome¹⁹⁹. Michaloglou et al. ont été les premiers à montrer que les nævus étaient composés de mélanocytes sénescents, *in vitro* et dans des échantillons de peau humaine²⁰⁰. Cependant, cet exemple est particulier car les mélanocytes sénescents sont rarement supprimés par des cellules du système immunitaire²⁰⁰.

L'induction de sénescence dans des cellules tumorales par la thérapie peut être bénéfique. Les cellules vont alors arrêter de proliférer, permettant de maintenir la tumeur à une taille constante, et même de la diminuer. En effet, par la sécrétion du SASP, les cellules sénescents peuvent attirer des cellules du système immunitaire (neutrophiles, macrophages, cellules NK (*Natural killer*)), qui vont alors les détruire²⁰¹. Le SASP va également propager la sénescence aux cellules environnantes²⁰².

D'un autre côté, l'induction de sénescence dans des cellules tumorales peut être délétère pour le patient. L'injection de cellules cancéreuses avec des fibroblastes sénescents dans des souris a décuplé le potentiel tumoral des cellules²⁰³. Les cellules sénescents peuvent émettre des signaux dissuadant les cellules du système immunitaire. Par exemple, il a été montré que la molécule HLA-E (antigène d'histocompatibilité HLA classe I, chaîne alpha E) pouvait être enrichie à leur surface, envoyant un signal inhibiteur aux cellules NK lorsqu'elle se lie au récepteur NKG2A²⁰⁴ (*NK group 2 member A*). De plus, même si elles attirent les cellules immunitaires, les capacités de ces dernières sont altérées avec la vieillesse, pouvant éviter la suppression des cellules sénescents²⁰⁵. Les cellules sénescents peuvent aussi sécréter des molécules favorisant

l'angiogenèse, la prolifération et l'invasion des cellules tumorales²⁰⁶⁻²⁰⁸. Elles peuvent donc participer à la résistance à la thérapie et à la rechute du patient²⁸.

Enfin, certaines publications suggèrent que des sous-populations de cellules sénescents pourraient re-proliférer²⁰⁹⁻²¹², apportant un argument de plus pour cibler les cellules sénescents. Roberson et al. ont estimé qu'une cellule sur un million pouvait proliférer de nouveau après être entrée en sénescence, en utilisant un modèle de cellules de cancer du poumon défectueuses pour p53 traitées par de la camptothécine²⁷. Cependant, la plupart des études étaient réalisées en étudiant une population de cellules induites en sénescence et n'étaient donc pas assez précises pour affirmer qu'une cellule qui re-proliférait était véritablement entrée en sénescence dès le départ. Les avancées technologiques nous permettent désormais de suivre les cellules depuis leur entrée dans l'état de sénescence jusqu'à leur éventuelle sortie, laissant présager de nombreuses découvertes sur les programmes régissant ces sorties de l'état de sénescence. Par exemple, Saleh et al. ont utilisé une méthode de triage afin de séparer les cellules sénescents ou non après induction par la chimiothérapie, suivie par de la vidéo-microscopie afin de suivre chaque cellule individuellement²¹¹. En utilisant entre autres la vidéo-microscopie, deux études ont proposé que les fluctuations des niveaux d'expressions de p53 et p21 pouvaient expliquer la sortie de l'état de sénescence^{213,214}. Milanovic et al. ont quant à eux montré dans différents modèles de souris et de lignées cellulaires, en utilisant le modèle de sénescence induite par la thérapie, que les cellules sénescents peuvent acquérir des caractéristiques de cellules souches et re-proliférer lorsque l'environnement est plus favorable²¹². Les auteurs ont utilisé un modèle murin de leucémie permettant l'inactivation conditionnelle de *p53*. Les cellules leucémiques entraient en sénescence suite à un traitement à l'adriamycine et en sortaient lors de l'inactivation de *p53*. Milanovic et al. ont observé que les cellules sénescents cancéreuses avaient acquis des traits caractéristiques de cellules leucémiques souches comme l'expression de CD44, Kit et Sca1, ainsi que l'expression de gènes cibles de la voie Wnt. De plus, les cellules qui sortaient de la sénescence suite à l'inactivation de *p53* étaient plus agressives (formation de plus de colonies et induction de leucémie dans des souris réceptrices) que les cellules n'étant pas entrées en sénescence (inactivation de *p53* avant traitement)²¹².

3.3. Mécanismes de l'arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence

Dans le cas de la sénescence induite par les dommages à l'ADN, la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) se met en place. Il existe différents types de dommages à l'ADN, dont les cassures simple-brin (SSB, *single strand break*) ou double-brin (DSB, *double strand break*), majoritairement représentées dans la sénescence. La cassure de l'ADN est reconnue par le complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) dans le cas d'une cassure double-brin²¹⁵ ou par la protéine de réplication A (RPA, *replication protein A*) dans le cas d'une cassure simple-brin²¹⁶. Cette première étape permet le recrutement de kinases au niveau de la cassure : Ataxia telangiectasia mutée (ATM) pour une DSB²¹⁷ et ATR, avec sa sous-unité ATRIP (*ATR-interacting protein*), pour une SSB^{218,219}. ATM s'auto-phosphoryle pour pouvoir être active^{162,220} et phosphoryler le variant H2AX (γ H2AX) des histones H2A les plus proches^{221,222}. Le signal est alors amplifié, pour les DSB via le recrutement de kinases ATM additionnelles, ce qui propage le signal γ H2AX le long de la chromatine²²³. Cette étape nécessite l'aide des protéines MDC1^{223,224} (*Mediator of DNA-damage checkpoint 1*) et 53BP1^{225,226} (*p53-binding protein 1*). Concernant les SSB, ATR est directement active après son recrutement, et son activité est amplifiée par le complexe RAD9-RAD1-HUS1²²⁷, appelé complexe 9-1-1, le complexe RAD17-RFC²²⁸ (*RAD17-Replication factor C*), la protéine TOPBP1²²⁹ et claspin²³⁰. Cette dernière est nécessaire pour la phosphorylation de la kinase de point de contrôle CHK1 (*Checkpoint kinase 1*). Une fois que le signal est amplifié et dépasse un certain seuil²³¹, les kinases de point de contrôle CHK1 et CHK2 sont phosphorylées par ATR²³² et ATM^{233,234}. CHK1 et CHK2 diffusent alors dans le noyau et phosphorylent leurs substrats, entre autres les phosphatases CDC25 (*Cell-division cycle 25*) et p53²³⁵. La phosphorylation de CDC25 inactive cette dernière mais n'induit qu'un arrêt rapide du cycle cellulaire²³⁶. Les phosphorylations de p53 par ATM sur la serine 15²³⁷ et par CHK1/2 sur la serine 20²³⁸ induisent sa stabilisation en réduisant l'interaction avec MDM2 et permettent la transcription de gènes cibles comme *CDKN1A*²³⁹ (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*). *CDKN1A* code pour p21, un inhibiteur de kinase dépendante des cyclines (CDK2 et CDK4/6 (*cyclin dependent kinase*)). p21 inhibe CDK2, entraînant l'hypophosphorylation de la protéine Rb (*Retinoblastoma protein, pRb*) et d'autres membres de la famille Rb, leur permettant de réprimer l'activité de la famille des facteurs de transcription E2F, et empêchant alors toute

progression du cycle cellulaire²⁴⁰. L'activation de p53 et la transcription de ses gènes cibles qui s'en suit déclenche un arrêt prolongé du cycle cellulaire²⁴¹.

L'autre voie importante d'arrêt du cycle cellulaire est celle de $p16^{INK4a}$, nommé ensuite $p16$. Ce gène se trouve au niveau du locus $INK4a/ARF/INK4b$, aussi connu sous les noms de $CDKN2A$ et $CDKN2B$. Ce locus est inactivé dans de nombreux cancers suite à des mutations ou à sa délétion²⁴².

$CDKN2A$ comprend les gènes de $p16$, $p16-\gamma$, ARF (aussi appelé $p14$) et $p12$. L'amplification $CDKN2A$ par RT-qPCR ne doit donc pas être interprétée comme étant représentative des niveaux de p16 et de son activation. p12 est seulement exprimé dans le pancréas où il joue le rôle de suppresseur de tumeur²⁴³. p14 séquestre MDM2 dans le nucléole, empêchant l'interaction entre MDM2 et p53, participant alors à la stabilisation de cette dernière²⁴⁴. p16- γ aurait la même fonction que p16²⁴⁵. p16 et p15 (encodée par $CDKN2B$) sont des protéines suppresseurs de tumeurs, codant pour des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines CDK4 et CDK6²⁴⁶. p16 ou p15, en se fixant à CDK4/6, induisent un changement allostérique de ces dernières²⁴⁷. Ce changement de conformation empêche la liaison de CDK4 et CDK6 aux cyclines D²⁴⁷. La phosphorylation des membres de la famille Rb par CDK4/6 sera donc inhibée, induisant l'accumulation de la forme hypophosphorylée de pRb, amenant à un arrêt du cycle cellulaire^{248,249}. Le rôle de $p15^{INK4b}$ n'a pas encore été très étudié dans la sénescence. En revanche, p16 est largement utilisé comme marqueur de la sénescence. Il a été démontré que l'expression de p16 augmente avec l'âge *in vitro* et *in vivo*, chez l'homme et la souris^{250,251}. Son expression est induite comme réponse tardive aux dommages télomériques ou intrachromosomaux de l'ADN et par le stress de culture^{154,252,253}.

Différents mécanismes de régulation du locus $INK4a/ARF$ ont été rapportés. Le promoteur de $p16$ est normalement méthylé par les méthyl-transférases DNMT1 (*DNA methyltransferase 1*) (maintien des méthylation existantes) et DNMT3b (méthylation *de novo*), empêchant la transcription du gène²⁵⁴. La déméthylation du promoteur peut avoir lieu suite à un traitement par des inhibiteurs de DNMT comme le 5-aza-2'-deoxycytidine²⁵⁵. L'expression de $DNMT1$ peut également être réprimée lors de l'induction de la sénescence par l'augmentation de la stabilité

du facteur de transcription HBP1 (*high-mobility group box protein 1*) suite à l'activation de la voie p38 MAPK²⁵⁶ (p38 *mitogen-activated protein kinase*). La répression de DNMT1 par HBP1 induira alors une déméthylation générale, affectant entre autres le promoteur de p16²⁵⁷. De plus, HBP1 a un site de liaison au niveau du promoteur de p16, induisant la transcription de ce dernier²⁵⁷. *INK4a/ARF/INK4b* comprend également un ARN non codant anti-sens nommé ANRIL qui participe à la régulation de l'expression de p16²⁵⁸. En absence de stress, ANRIL recrute au promoteur de p16 les complexes répressifs Polycomb 1 et 2 (PRC1 et PRC2, *Polycomb repressive complex 1 /2*)^{245,259}. PRC2 contient la protéine EZH2, qui catalyse la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3) du domaine régulateur du locus, menant à sa répression. Dans les cellules sénescences, l'expression d'EZH2 est diminuée, ainsi donc que les marques épigénétiques répressives sur le locus, ce qui entraîne la dissociation des complexes polycomb. Les gènes p16 et ARF pourront alors être transcrits²⁵⁹. Il a de plus été montré que l'expression de la protéine Bmi-1, membre du complexe PRC1, était diminuée dans des fibroblastes sénescents²⁶⁰. À l'inverse, lorsque Bmi-1 était surexprimé l'expression de p16 était inhibée et les fibroblastes avaient une durée de vie prolongée. Dans cet article, Itahana et al. ont également montré que l'extension de la durée de vie des fibroblastes était due à la régulation de la voie p16/pRb et non celle de p53/p21²⁶⁰. Il a récemment été montré dans un modèle de sénescence induite par l'activation constitutive de la voie mTOR, qu'un substrat de la kinase S6 nommé ZRF1 (*Zuotin-related factor 1*), participait à l'activation du programme de p16²⁶¹. Une hypothèse serait que ZRF1 se fixe sur les histones H2A portant un seul résidu ubiquitine, induisant le déplacement du complexe PRC1 et ainsi la transcription des gènes réprimés²⁶². ZRF1 est également connu pour interagir avec Id1 (*Inhibitor of DNA-binding 1*)²⁶³. Id1 forme des dimères avec le facteur de transcription Ets2 et empêche ainsi la transcription de ses gènes cibles dont p16²⁶⁴. En se liant à Id1, ZRF1 permettrait donc à Ets2 de se fixer sur le site de liaison au niveau du promoteur de p16 pour induire sa transcription. Dans un modèle de sénescence répliquative, il a été montré qu'un autre membre de la famille Ets, Ets1, induisait la transcription de p16 une fois fixé au promoteur²⁶⁴. Id1 régule aussi l'expression de p16 en formant un hétérodimère avec la protéine E47²⁶⁵. E47 forme normalement un hétérodimère avec d'autres protéines de type hélice-boucle-hélice pour ensuite se fixer sur la chromatine au niveau de séquences appelées

boîte E (Murre 1989). *p16* possède deux boîtes E au niveau de son promoteur²⁶⁶. De plus, il a été montré que le niveau d'expression d'*Id1* était diminué dans des fibroblastes sénescents (Hara 1994). La transcription de *p16* s'effectue également lorsque les facteurs de transcriptions Sp1²⁶⁷ (*Specificity protein 1*), Ets²⁶⁴, AP1²⁶⁸ (*Activator protein 1*) et PPAR γ ²⁶⁹ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) peuvent se lier au promoteur.

Dans le cas de la sénescence induite par les oncogènes, l'activation constante de certaines voies de signalisation (RAS²⁷⁰, BRAF²⁷¹) peut déclencher des boucles de régulation négatives, renforçant l'arrêt de prolifération. Par exemple, Wajapeyee et al. ont montré que l'activation constitutive de la voie BRAF/MEK/ERK (*BRAF/Mitogen-activated protein kinase kinase/Extracellular signal-regulated kinase*) suite à la mutation BRAF^{V600E} et l'activation du facteur de transcription JUN qui en découle, induisait l'expression de IGFBP7 (*Insulin growth factor binding protein 7*)²⁷¹. IGFBP7 va induire l'expression de RKIP (*Raf kinase inhibitory protein*) qui va empêcher la phosphorylation de MEK par BRAF et ainsi inhiber la voie de signalisation et participer à l'arrêt de prolifération²⁷¹.

De plus, l'arrêt de prolifération est soutenu par certains composants du SASP. La liaison de cytokines au récepteur CXCR2 (*C-X-C Motif Chemokine Receptor 2*) participe au maintien de l'arrêt du cycle cellulaire d'une manière dépendante de p53²⁷². PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*) est une cible de p53 qui contribue à l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt et à l'exclusion du noyau de la cycline D1²⁷³. Des dérégulations épigénétiques peuvent également soutenir l'arrêt du cycle cellulaire. Il a par exemple été démontré que la méthyltransférase de l'histone H3 lysine 9 Suv39h1 (*Suppressor of variegation 3-9 homolog 1*) était essentielle dans certains modèles de sénescence chez la souris^{192,274}.

3.4. Caractéristiques des cellules sénescents

Les cellules sénescents possèdent des caractéristiques particulières, résumées dans la figure 6.

3.4.1. Morphologie

Les cellules sénescents changent de morphologie. Elles sont plus larges, plus étalées et de forme irrégulière¹⁴⁹.

Ce changement de morphologie est dû à une réorganisation du cytosquelette de tubuline²⁷⁵ et d'actine²⁷⁶. Yang et al. ont montré dans un modèle de sénescence lié à pRb que la réorganisation du cytosquelette d'actine était due à l'augmentation d'activité dans les cellules sénescents de la protéine CDK5, qui phosphoryle l'eitrine au niveau de la thréonine 235 dans le domaine N-terminal²⁷⁷. L'eitrine fait le lien entre les filaments d'actine au niveau N-terminal et la membrane plasmique au niveau C-terminal²⁷⁸. C'est une protéine de la famille des ERM (eitrine, radixine et moésine), dont les domaines N et C terminaux interagissent et bloquent l'accès aux sites de liaison des domaines terminaux lorsqu'elles sont inactives²⁷⁹. La phosphorylation de la thréonine 567 au niveau du domaine C-terminal de l'eitrine est également augmenté dans les cellules sénescents²⁷⁶. Ces phosphorylations vont permettre l'ouverture de la protéine et les sites de liaison à chaque domaine terminal seront alors accessibles²⁷⁶. L'eitrine pourra alors faire le lien entre la membrane plasmique et l'actine, induisant une réorganisation du cytosquelette.

Concernant la réorganisation du cytosquelette de tubuline, Moujaber et al. ont montré dans un modèle de sénescence induite par la thérapie, que la diminution de l'expression de HDAC6, induisait une augmentation de l'acétylation de la lysine 40 de l' α -tubuline, ce qui participait à la stabilisation des microtubules²⁸⁰.

3.4.2. β -galactosidase associée à la sénescence

Dans les cellules sénescents l'expression de la β -galactosidase lysosomale GLB1 (*Galactosidase beta 1*) est augmentée, en association à l'augmentation de la masse lysosomale²⁸¹. Cette augmentation permet la détection de l'activité β -galactosidase à un pH suboptimal (pH 6,0 au lieu de pH 4,5) dans les cellules sénescents, donnant lieu au nom de β -galactosidase associée à la sénescence (SABG)^{169,281,282}. Un test a alors été développé, permettant la détection de cette enzyme et de son activité à pH6. Il s'agit d'un marquage au 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal), où le substrat, une fois métabolisé par la SABG, devient bleu et colore donc la cellule sénescence en bleu²⁸³.

3.4.3. DNA-SCARS et foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence

Lors de la DDR, les protéines responsables de la signalisation et de la réparation de la cassure se rassemblent autour de celle-ci. Cette agrégation est appelée foyer de dommage à l'ADN. Des

foyers persistants ont en plus été observés dans les cellules sénescences au niveau de dommages non réparables. Ces foyers sont nommés « segments d'ADN avec des altérations de chromatine renforçant la sénescence » ou DNA-SCARS²⁸⁴. Les foyers de dommage à l'ADN, qu'ils soient persistants ou transitoires, peuvent être détectés dans le noyau par immunofluorescence en marquant la forme phosphorylée du variant de l'histone H2A.x (γ H2AX) et la protéine 53BP1²⁸⁴⁻²⁸⁶. Cependant, les DNA-SCARS diffèrent des foyers transitoires de dommage à l'ADN en étant associés aux corps nucléaires PML (*Promyelocytic leukemia protein*). On n'y retrouve pas les protéines de réparation de l'ADN RAD51 et RPA, mais ils sont enrichis des formes actives phosphorylées des protéines CHK2 et p53²⁸⁴. Rodier et al. ont montré que les DNA-SCARS étaient associés à l'arrêt de prolifération et à la sécrétion de l'IL-6, probablement à cause de leur enrichissement en protéines impliquées dans les voies de signalisation de la DDR comme CHK2 et p53^{284,287}.

Dans certains modèles de sénescence et en particulier dans l'OIS, on peut observer des foyers nucléaires enrichis en marques épigénétiques répressives (H3K9me3 et H3K27me3). Ces foyers sont en fait une organisation tridimensionnelle spécifique des chromosomes, qui sont alors enroulés sur eux-mêmes en formant un cercle²⁸⁸. L'hétérochromatine enrichie en marques H3K9me3 se retrouve au centre et est entourée de l'hétérochromatine enrichie en marques H3K27me3²⁸⁸. L'euchromatine se retrouve sur les bords extérieurs du cercle. Ce cercle est détectable avec un marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) par immunofluorescence. Ces foyers sont appelés foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF, *Senescence associated heterochromatin foci*)²⁸⁸. Narita et al. ont montré que les marques répressives H3K9me3 étaient situées au niveau des promoteurs des gènes cibles du facteur de transcription E2F²⁸⁹. Ces foyers participent ainsi à la répression de l'expression de gènes pro-prolifératifs comme la cycline A et donc à l'arrêt de prolifération des cellules sénescences.

3.4.4. Résistance à l'apoptose

Une importante caractéristique des cellules sénescence est leur résistance à l'apoptose. La régulation des protéines pro et anti-apoptotiques joue évidemment un rôle important. Les protéines anti-apoptotiques de la famille de BCL-2, BCL-W et BCL-XL sont augmentées dans les

cellules sénescences^{290,291}. Le niveau d'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 est augmenté, étant lié à un enrichissement de la marque activatrice d'acétylation H4K16Ac. À l'inverse, la marque inhibitrice H4K20me3 est enrichie au niveau de Bax, le gène codant pour la protéine pro-apoptotique²⁹². De plus, l'inhibition de BCL-2 est empêchée par l'activation constante du facteur de transcription CREB²⁹¹ (*cAMP response element-binding protein*). D'autres protéines anti-apoptotiques ont leur expression augmentée dans les cellules sénescences, comme la protéine de voute majeure (MVP, *Major vault protein*)²⁹³, c-myb²⁹⁴ et la survivine²⁹⁵. Outre les protéines pro/anti-apoptotiques, d'autres mécanismes ont été découvert qui participent à la résistance à l'apoptose dans les cellules sénescences. Il a été montré que FOXO4 pouvait protéger les cellules sénescences de l'entrée en apoptose en séquestrant p53 dans le noyau, dans un modèle de sénescence induite par la chimiothérapie mais également *in vivo*, chez des souris naturellement âgées¹⁷⁵. HSP90 en complexe avec la survivine²⁹⁵ ou bien en stabilisant la forme phosphorylée d'Akt, participe également à la résistance à l'apoptose des cellules sénescences³⁵.

3.4.5. Métabolisme

Les cellules sénescences, bien que ne proliférant plus, sont toujours très actives métaboliquement²⁹⁶⁻²⁹⁸. Il a été montré que la glycolyse était augmentée dans des modèles de cellules sénescences suite à la chimiothérapie²⁷⁴, l'expression de l'oncogène BRAF^{V600E}²⁹⁹, l'irradiation, ainsi que dans un modèle de sénescence répliquative³⁰⁰. Cependant, il a également été montré qu'elle pouvait être inhibée dans un modèle de sénescence induite par la surexpression de l'oncogène *Ras*³⁰¹. La glycolyse est donc impactée lors de la sénescence mais semble être dépendante du modèle considéré. Le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique), est une source importante d'énergie pour la cellule. En étant combiné à la chaîne de transport d'électrons, il permet la production de 34 molécules d'ATP (Adenosine tri-phosphate). Il a été montré qu'il était modulé dans les cellules sénescences^{299,300}. Dans une étude de métabolisme, James et al. ont montré dans un modèle de sénescence répliquative et dans un modèle de sénescence induite par l'irradiation que la glycolyse était augmentée et la progression du cycle de Krebs bloquée³⁰⁰. Au contraire, Kaplon et al. ont montré que le cycle de

Krebs était plus actif dans des cellules sénescents suite à l'expression de l'oncogène BRAF^{V600E299}. Ces différences pourraient être dues au modèle de sénescence utilisé.

Le processus de dégradation sélective des mitochondries, ou mitophagie, est diminué dans les cellules sénescents, les laissant accumuler de nombreuses mitochondries dysfonctionnelles, qui relâchent alors des composés oxydatifs (ROS) dans le cytoplasme^{299,302,303}. Il n'est pas clair si la dysfonction mitochondriale est une conséquence de la sénescence ou bien une cause³⁰⁴, comme cela a pu être montré dans le cas de la MiDAS¹⁶⁵ ou de la sénescence réplivative³⁰⁵. De plus, la dysfonction mitochondriale peut maintenir l'état de sénescence en maintenant un stress oxydatif élevé au sein de la cellule, renforçant la réponse aux dommages à l'ADN^{306,307}.

L'autophagie est un processus permettant de recycler et dégrader les éléments endommagés et / ou dangereux de la cellule comme les organites défectueux, les agrégats de protéines, ou encore des pathogènes intracellulaires³⁰⁸. Aujourd'hui il n'y a pas encore de consensus sur l'activation de l'autophagie dans les cellules sénescents^{309,310}. De par son rôle détoxifiant, l'autophagie peut éviter l'entrée en sénescence des cellules qui possèdent des mitochondries défectueuses, subissent un stress oxydatif ou en réponse à une accumulation de protéines mal repliées³¹¹. Ce même rôle participe à la survie des cellules sénescents au long terme, en régulant les niveaux de stress. Cependant, il a également été montré que l'autophagie pouvait être essentielle lors de l'induction de l'état de sénescence^{312,313}. Récemment, il a été prouvé que l'activation de la voie de signalisation p38 α , induisant l'autophagie, permettait à des cellules traitées par de la chimiothérapie d'entrer en sénescence plutôt qu'en apoptose³¹⁴. L'autophagie participerait aussi à l'approvisionnement des acides aminés nécessaires pour la production des molécules du SASP³¹⁵.

La protéotoxicité est un des marqueurs du vieillissement³¹⁶. Avec leur forte production de ROS, les cellules sénescents sont sujettes à un dérèglement de l'homéostasie protéique. En effet les ROS peuvent oxyder les méthionines et cystéines, et en présence de métaux, peuvent carbonyler les prolines, thréonine, lysine et arginines³¹⁷. Ces modifications altèrent le bon repliement des protéines et leurs fonctions. De plus, ces protéines carbonylées peuvent réagir

avec des groupes aminés, des sucres et des lipides participant à la formation d'agrégats (nommés lipofuscine) dans les lysosomes³¹⁸.

3.4.6. Phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)

3.4.6.1. Description

Une autre caractéristique principale des cellules sénescents est leur capacité à sécréter de nombreuses molécules, leur conférant un impact majeur sur le microenvironnement. Ce complexe de molécules est appelé phénotype sécrétoire associé à la sénescence, ou SASP. Avant même d'avoir des preuves de son existence, des études ont montré que le niveau transcriptionnel de nombreux gènes codants pour des protéines sécrétées était augmenté dans les cellules sénescents^{319,320}. Il a ensuite été progressivement démontré, et ce encore aujourd'hui, qu'une large variété de protéines étaient sécrétées et que la composition du SASP variait selon le type cellulaire et le contexte^{168,321}. Par exemple, en utilisant une méthode de protéomique non biaisée, Basisty et al. ont récemment montré que les sécrétomes de fibroblastes sénescents, suite à de l'irradiation ou la surexpression de l'oncogène RAS, étaient uniques³²¹. Chaque sécrétome avait une combinaison unique de 10 protéines sécrétées qui n'était pas retrouvée dans le sécrétome des autres modèles³²¹. Un autre exemple est celui de l'étude menée par Wiley et al., où les auteurs comparent les sécrétomes de cellules sénescents suite à un stress génotoxique ou à la dysfonction mitochondriale¹⁶⁵. Ce dernier ne comprend pas les interleukines IL-1 α et IL-1 β , ainsi que les molécules associées alors qu'elles le sont dans celui des cellules sénescents suite à un stress génotoxique¹⁶⁵. IL-1 α et IL-1 β sont deux interleukines souvent identifiées dans le SASP et il a été montré qu'elles régulaient l'expression des interleukines 6 et 8, deux composants majeurs du SASP³²².

Les molécules composant le SASP entrent dans différentes classes. Elles peuvent être des facteurs solubles comme des cytokines, chimiokines et facteurs de croissance ; des facteurs insolubles ; des protéases ; des récepteurs et leurs ligands ainsi que des molécules non-protéiques (Tableau 2).

Tableau 2. – Molécules du SASP.

Classe	Molécule
Interleukines	IL-6 ; IL-7 ; IL-1 α ; IL-1 β ; IL-13 ; IL-15 ; IL-11
Chimiokines	IL-8; CXCL1, CXCL2, CXCL3; CCL2 ; CCL7 ;CCL8; CCL13; CCL3 ; CCL20; CCL16; eotaxine; eotaxin-3; CCL25; CXCL5; CCL1; CXCL11 ; CCL5 ; CXCL6 ; CCL28 ; CCL27 ; oncostatine M
Autres molécules inflammatoires	TGF β ; GM-CSF; G-CSF; IFN- γ ; CXCL13; MIF; RARRES2
Facteurs de croissance, régulateurs	Amphiréguline; épiréguline; héréguline; EGF; FGF2; HGF; FGF7; VEGF; angiogénine; SCF; CXCL12 ; PIGF; NGF; IGFBP-2, -3, -4, -6, -7, -8 ;
Protéases et régulateurs	MMP-1, -3, -10, -12, -13, -14; TIMP-2; PAI-1, -2; tPA; uPA; cathepsine B
Ligands et récepteurs	ICAM-1, -3; OPG; sTNFR1; sTNFR2; TRAIL-R3; Fas; uPAR; SGP130; EGFR; sFRP-2 ; WNT16
Molécules non-protéiques	PGE2; oxyde nitrique; ROS
Facteurs insolubles	Fibronectine; collagènes; laminine

Liste non exhaustive (Adapté de Coppe et al.^{208 323}, Tremain et al.³²⁴, Kortlever et al.²⁷³, Gorgoulis et al.³²⁵ et Faget et al.³²⁶).

IL : Interleukine ; CXCL : C-X-C Motif Chemokine Ligand ; CCL : Chemokine (C-C motif) ligand ; MIP : Macrophage inflammatory protein ; GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor ; G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor ; IFN : Interféron ; MIF : Macrophage migration inhibitory factor ; RARRES2: Retinoic acid receptor responder protein 2 ; EGF: Epidermal growth factor ; FGF : Fibroblast growth factor ; HGF : Hepatocyte growth factor ; VEGF : Vascular endothelial growth factor ; SCF : Stem cell factor ; PIGF : Placental growth factor ; NGF : Nerve growth factor ; IGFBP: Insulin-like growth factor-binding protein ; MMP : Matrix metalloproteinase ; TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase ; PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1 ; tPA: Tissue plasminogen activator; uPA: Urokinase ; ICAM : InterCellular Adhesion Molecule ; OPG: Osteoprotegerin ; sTNFR : Soluble tumor necrosis factor receptor ; TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand ; uPAR : Urokinase-type plasminogen

activator receptor ; *SGP130* : *Soluble gp130* ; *sFRP* : *Soluble frizzled-related protein* ; *PGE2* : Prostaglandine E2

Ces molécules sont également sécrétées par des cellules non-sénescentes, ce qui a aidé à découvrir les fonctions du SASP et donc en partie l'impact que peuvent avoir les cellules sénescentes sur leur environnement.

IL-6 et IL-8 sont les molécules les plus connues du SASP³²³. IL-6 peut avoir un rôle anti ou pro-inflammatoire selon la forme du récepteur sur lequel elle se fixe. Dans le cas classique, IL-6 se fixe à son récepteur membranaire IL-6R α (ou gp80) et a un rôle anti-inflammatoire. Il existe également une forme soluble du récepteur, appelée sIL-6R α , suite à l'épissage de son ARNm ou bien suite au clivage de la partie extracellulaire du récepteur membranaire par ADAM10 (*A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*) et ADAM17. C'est la fixation d'IL-6 à cette forme soluble qui donne lieu à la signalisation pro-inflammatoire^{327,328}. Dans les deux cas, une fois la fixation d'IL-6 à son récepteur, cela va déclencher la formation d'un hétérotrimère avec deux sous-unités gp130 à la membrane plasmique de la cellule cible. Cette dernière étape permet l'activation des voies de signalisation JAK/STAT (*Janus kinase/STAT*), MAPK/ERK et PI3K/Akt, expliquant les nombreux rôles que joue IL-6^{327,329}. IL-6 est en effet impliquée dans l'inhibition de l'apoptose, la survie, la prolifération, l'angiogenèse, les mécanismes d'invasion et de dissémination métastatique, ainsi que la régulation du métabolisme³²⁹. IL-6R est uniquement exprimé dans les hépatocytes et leucocytes alors que gp130 est exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules. C'est donc la forme soluble du récepteur d'IL-6 qui lui permettra d'avoir un impact majeur. Cependant, l'expression de la forme membranaire, de la forme soluble et de gp130 sont également régulées, impliquant une situation plus complexe. Gp130 a d'ailleurs également une forme soluble, inhibitrice de sIL-6R α ^{327,328}. IL-6 est régulé au niveau transcriptionnel par AP-1 (*Activator protein 1*), l'AMP cyclique, C/EBP β (*CCAAT Enhancer Binding Protein Beta*), Sp1, CREB, STAT3 et NF-K β ³³⁰. Au niveau post-transcriptionnel, il est régulé positivement par ARID5A, TNF α (*Tumor necrosis factor alpha*) et IL-1 β et négativement par regnase-I, BRD4 (*Bromodomain containing protein 4*) et certains micro-ARNs comme miR142 ou miR146a³³⁰.

IL-8 est une chimiokine pro-inflammatoire, d'abord découverte pour sa capacité à recruter des neutrophiles³³¹. Elle se lie aux récepteurs membranaires CXCR1 et CXCR2, ce qui va induire l'activation de nombreuses voies de signalisation comme PI3K/Akt, PLC/PKC (*Phospholipase C/Protein kinase C*), MAPK, JAK/STAT. Il est maintenant établi qu'IL-8 a également un rôle dans le recrutement des cellules myéloïdes suppressives en plus des neutrophiles. IL-8 participe également à la promotion de l'angiogenèse et à la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT, *Epithelial mesenchymal transition*)³³².

3.4.6.2. Régulation du SASP :

Différentes voies de signalisation ont été rapportées comme régulatrices de l'expression des composants du SASP. L'initiation du SASP n'est pas encore totalement claire mais plusieurs mécanismes ont été mis en avant. Un des acteurs principaux contrôlant le SASP est NF- κ B^{272,333}. Différents mécanismes d'induction de ce facteur de transcription ont été montrés. Lors de la voie de réponse des dommages à l'ADN, l'activation de ATM et ATR sont nécessaires pour activer la voie de signalisation de GATA4 (*GATA Binding Protein 4*). GATA4 est un facteur de transcription qui est normalement lié à p62 pour être dégradé par autophagie sélective. Dans les cellules sénescentes, l'autophagie sélective pour GATA4 est inhibée, stabilisant la protéine. GATA4 peut alors induire la transcription de ses gènes cibles, comme TRAF3IP2 (*TRAF3 interacting protein 2*). TRAF3IP2 et IL-1 α activent alors NF- κ B, qui induit à son tour la transcription de nombreux gènes du SASP comme CCL2, GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) ou CXCL1³³⁴. Dans cette étude, Kang et al. démontrent également que certains gènes comme IL-6 ou CXCL3 sont induits par GATA4 mais ne nécessitent pas l'expression de TRAF3IP2, impliquant l'existence d'autres voies parallèles³³⁴. Un autre moyen d'initiation du SASP par NF- κ B est *via* la voie de signalisation de la kinase p38 MAPK. Son activation induit l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et donc l'expression de certains composants du SASP comme CXCL1, CCL7 (*Chemokine (C-C motif) ligand 7*), CCL8 et IL-10³³⁵.

Un autre acteur principal du SASP est le facteur de transcription C/EBP β ²⁷². Le SASP est dynamique et évolue dans le temps, grâce à une régulation fine de l'expression de ses composants. Par exemple, Hoare et al. ont découvert que l'intensité d'expression de NOTCH

variait entre des cellules qui entraient en sénescence et une fois que celle-ci était bien établie, modifiant la composition du SASP et donc l'impact des cellules sur le microenvironnement³³⁶. Dans un modèle de sénescence induite par RAS, les auteurs ont montré qu'à l'entrée en sénescence l'expression de NOTCH était haute, inhibant C/EBP β , et induisait l'expression d'un SASP plutôt immunosuppresseur avec la sécrétion de TGF- β , de facteurs de croissance et composants de la matrice extracellulaire. En revanche, une fois la sénescence établie, les niveaux de NOTCH étaient bas, permettant l'activation de C/EBP β et donc l'expression d'un SASP plutôt pro-inflammatoire avec la sécrétion d'IL-1, IL-6 et des métalloprotéases matricielles³³⁶.

Une autre voie importante d'initiation du SASP découverte récemment est la voie cGAS-STING (*cyclic GMP-AMP synthase – stimulator of interferon genes*). Cette voie est connue en immunologie pour être une voie de défense antivirale en détectant l'ADN antiviral dans le cytoplasme de la cellule³³⁷. Suite aux dommages à l'ADN, de l'ADN cytoplasmique se retrouve dans les cellules sénescents^{338,339}. La diminution d'expression des DNases DNases2 et TREX1 (*Three Prime Repair Exonuclease 1*) dans les cellules sénescents empêche les fragments d'être dégradés, déclenchant alors la voie cGAS-STING³⁴⁰.

Il a également été montré dans un modèle murin de sénescence induite par la perte de PTEN que la voie de signalisation JAK-STAT était nécessaire à la sécrétion d'un SASP immunosuppresseur³⁴¹.

Suite à l'entrée en sénescence, l'expression d'IL-1, codant pour les interleukines IL-1 α et IL-1 β , est augmentée³⁴². L'interaction entre IL-1 α et son récepteur IL-1R1 permet l'activation de la kinase IRAK1 (*IL-1 receptor activated kinase 1*), qui induit l'activation de NF- κ B et en conséquence l'expression des molécules du SASP comme IL-6 et IL-8³²². IL-6 peut à son tour participer à activer le SASP en travaillant de concert avec C/EBP β ³⁴³.

Le SASP est également contrôlé par la voie p38 MAPK. Cette dernière est activée lors de l'induction de la sénescence et induit une augmentation de l'activité de NF- κ B³³⁵. La voie p38 MAPK régule également le SASP de façon post-transcriptionnelle en augmentant l'activité de

MK2 (*MAPK-activated protein kinase 2*) qui va participer à la stabilisation de certains ARN messagers de molécules du SASP³⁴⁴.

Une autre voie de régulation post-transcriptionnelle du SASP est celle de la voie mTOR. Laberge et al. ont montré que la traduction de l'IL-1 α était supprimée lors de l'inhibition du complexe mTORC1 par la rapamycine, impactant l'activité de Nf- κ B et donc l'expression de nombreuses molécules du SASP²⁰³.

L'expression du SASP est également régulée par des changements épigénétiques³²⁶. Par exemple, Tasdemir et al. ont montré que le co-activateur transcriptionnel BRD4, qui participe au contrôle de l'élongation transcriptionnelle par l'ARN polymérase II³⁴⁵, s'associait aux régions « super amplificatrices » (*super enhancer*) situées au niveau des gènes de molécules du SASP³⁴⁶. L'inhibition de BRD4 supprime l'expression du SASP et donc les impacts sur le microenvironnement associé comme la surveillance par les cellules du système immunitaire³⁴⁶. Il a également été montré que la protéine HMGB2 participait à exclure les locus des gènes des molécules du SASP des SAHF en empêchant la propagation des marques répressives H3K9me2/3 au niveau des locus des gènes du SASP³⁴⁷.

Cependant, dans certains modèles de sénescence où cet état est induit par l'expression ectopique de p21 ou p16, il a été montré que le SASP n'était pas forcément exprimé par les cellules sénescents³⁴⁸. Une hypothèse serait le manque de dommages à l'ADN persistants mais cette question demande plus d'investigations²⁸⁷.

3.4.6.3. Autres moyens de communication utilisés par les cellules sénescents

D'autres moyens de communication sont utilisés par les cellules sénescents, comme les ponts cytoplasmiques, la sécrétion de ROS et la transmission des signaux par la voie JAG1/NOTCH (*Jagged Canonical Notch Ligand 1/NOTCH*) aux cellules voisines³²⁵. Les vésicules extracellulaires (EVs, *Extracellular vesicles*) sont également très importantes pour la communication des cellules sénescents³⁴⁹. Les cellules sénescents sécrètent plus de vésicules extracellulaires que les cellules non sénescents³⁵⁰. Les EVs proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique ou, lorsqu'elles ont une taille inférieure à 150nm, de l'invagination des corps multi-vésiculaires (MVB, *Multivesicular bodies*) et sont alors appelées exosomes³⁵¹. Les EVs

renferment de nombreuses protéine, ARN et ARN interférants, permettant à la cellule de communiquer avec son environnement³⁵¹.

3.4.6.4. Rôle du SASP dans la sénescence

De par l'intensité de leur sécrétion et leur diversité, les molécules du SASP ont de nombreuses fonctions sur la cellule sénescence et sur les cellules environnantes (Figure 5).

Il a été montré que le SASP permettait de renforcer la sénescence ou de l'induire^{202,272}, d'attirer des cellules du système immunitaire^{166,201} et induire leur activation et/ou différenciation³⁵² afin de créer un environnement immunosuppresseur³⁵³, ou à l'inverse, un environnement propice à la suppression des cellules sénescence par les cellules du système immunitaire^{166,201}. De plus, le SASP peut contribuer à la prolifération de cellules du microenvironnement^{206,208}, ainsi qu'aux processus de plasticité cellulaire³⁵⁴, d'angiogenèse²⁰⁷, d'invasion²⁰⁸, migration³⁵⁵ et préparation de la niche pré-métastatique³⁵⁶. Enfin, le SASP peut aider les cellules à résister aux traitements³⁵⁴.

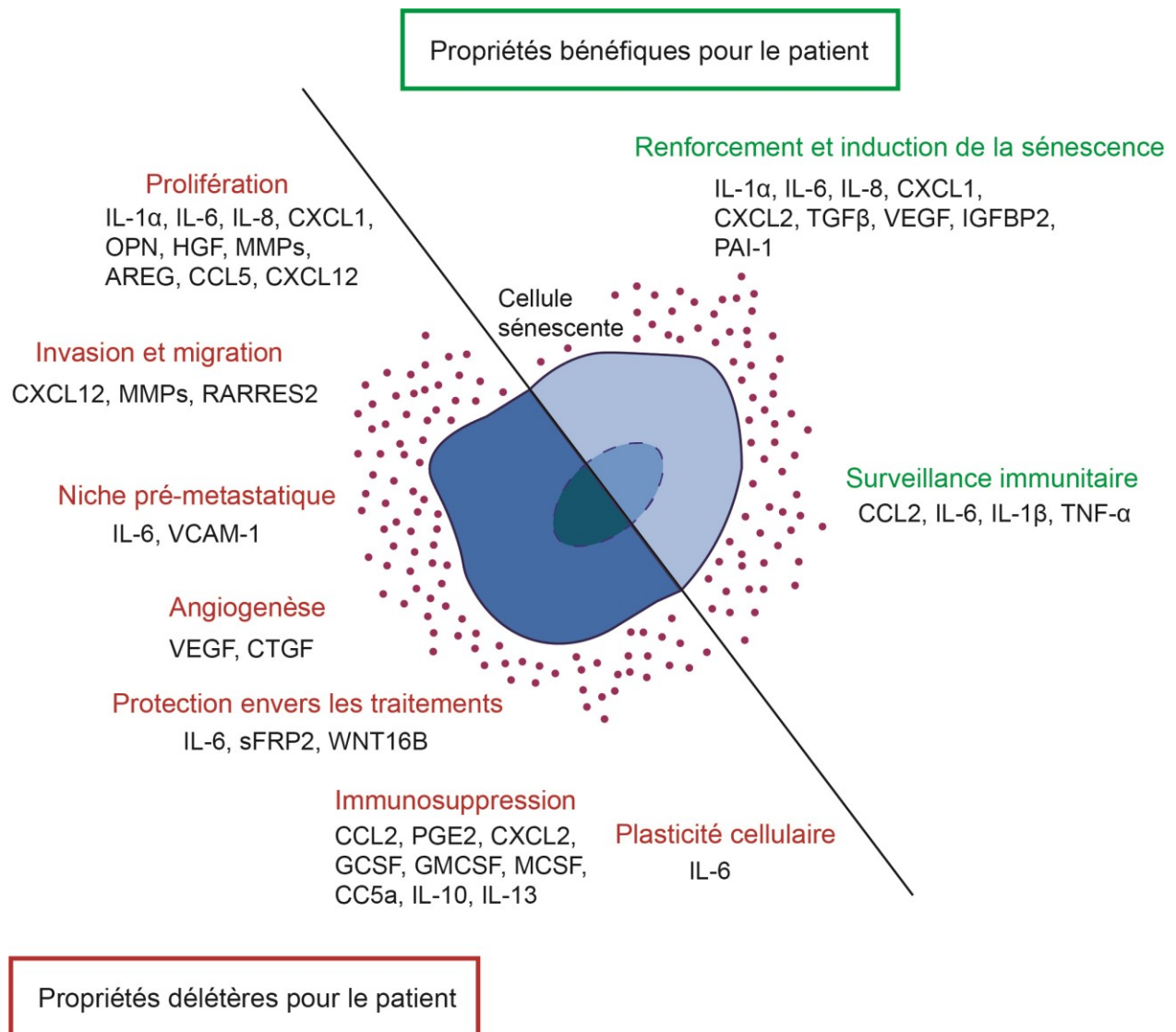


Figure 5. – Molécules impliquées dans les différents rôles du SASP.

Les molécules sécrétées par le SASP lui confèrent différents rôles qui peuvent être bénéfiques ou délétères pour le patient. Adapté de Herranz et al.³⁵⁷ et Faget et al.³²⁶. OPN : Osteopontin ; AREG : Amphiregulin ; CTGF : Connective tissue growth factor.

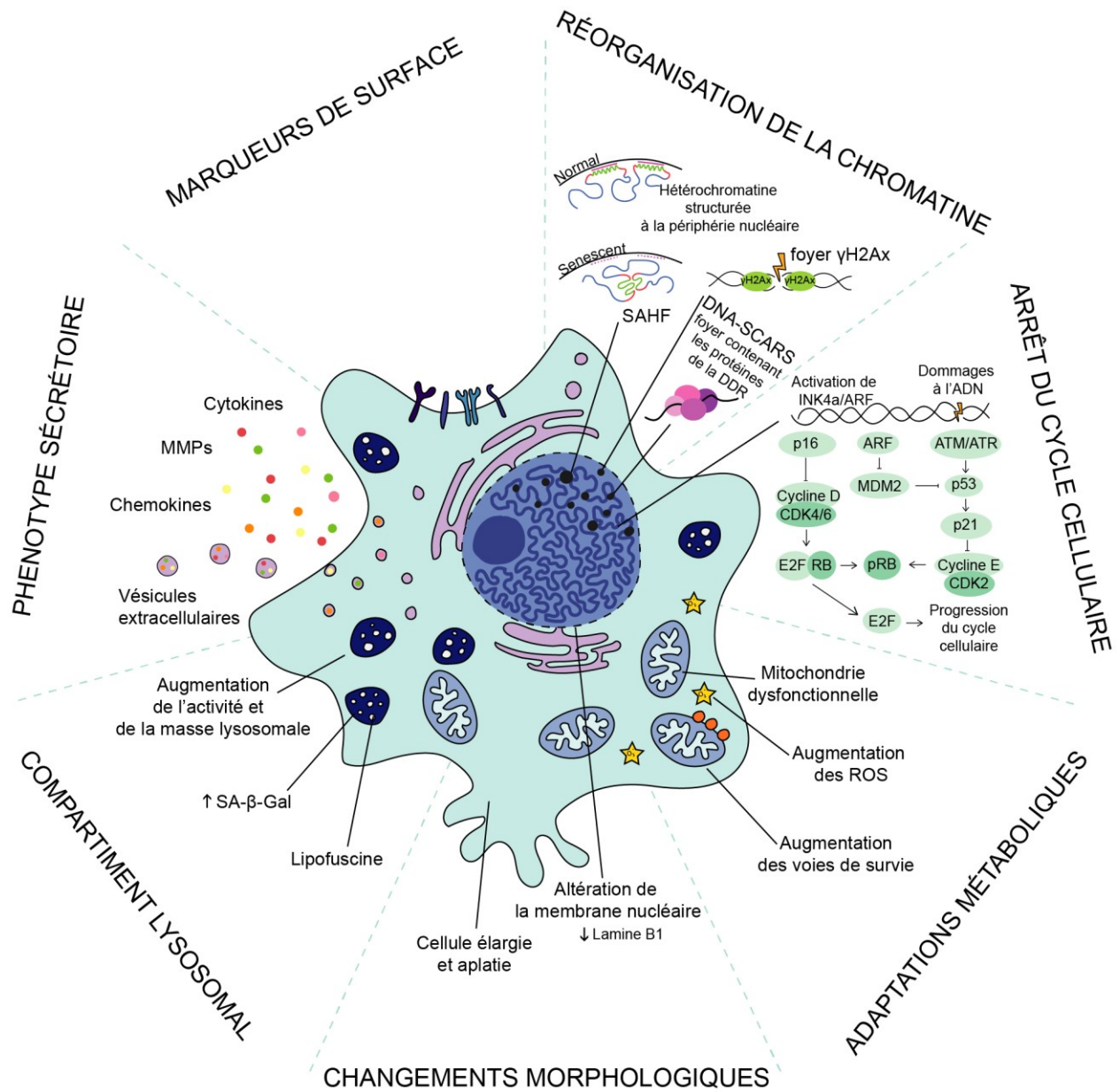


Figure 6. – Schéma récapitulatif des caractéristiques des cellules sénescentes

Les cellules sénescentes sont caractérisées par des changements morphologiques, des modifications du compartiment lysosomal, un phénotype sécrétoire, des modifications à la surface, une réorganisation de la chromatine, un arrêt du cycle cellulaire et des adaptations métaboliques. Schéma adapté de Gonzalez-Gualda et al. ³⁵⁸.

4. Les mécanismes de sécrétion des protéines

4.1. Mécanisme de sécrétion conventionnelle

Environ un tiers des cadres de lectures ouverts du génome humain produisent des protéines sécrétées (11%) ou transmembranaires (20%)³⁵⁹. Ces protéines transitent par le réticulum endoplasmique (RE) avant de rejoindre l'appareil de Golgi pour être ensuite délivrées à la membrane plasmique ou dans le milieu extracellulaire³⁶⁰ (Figure 7.A). Cela peut se faire de façon co-traductionnelle ou post-traductionnelle. Toutes les protéines commencent leur traduction avec des ribosomes libres dans le cytosol. Les protéines amenées à rejoindre le RE contiennent un peptide particulier (appelé séquence signal) en N-terminal. Ce peptide est reconnu par la particule de reconnaissance du signal (*Signal recognition particle* ou SRP), bloquant l'élongation de la chaîne polypeptidique. Le complexe ribosome-chaîne polypeptidique-SRP se fixe ensuite sur le RE au niveau d'un translocon constitué de protéines nommées Sec61³⁶¹. Une fois le complexe fixé et la séquence engagée dans le translocon, la traduction peut reprendre, alors dirigée vers la lumière du RE, grâce aux ribosomes cette fois-ci liés à la membrane du RE. Le peptide signal est généralement clivé une fois que la protéine a passé la membrane. La traduction de certaines protéines transmembranaires (comme les protéines ancrées par la queue ou *tail-anchored* (TA) dont le domaine transmembranaire est proche de la terminaison carboxyle) s'effectue parfois entièrement dans le cytoplasme avec des ribosomes libres et elles rejoignent ensuite le RE de façon post-traductionnelle³⁶². Kutay et al. ont montré que l'insertion de ces protéines dans le RE nécessitait de l'ATP et une voie d'insertion dans le RE différente³⁶². Rabu et al. suggèrent que les protéines dont la queue est peu hydrophobe ont besoin d'une faible quantité d'ATP pour s'insérer dans la membrane du RE et sont alors aidées par les chaperonnes des familles de protéines de choc thermique 70 et 40 (Hsp70 et Hsp40)³⁶³. Récemment Guna et al. ont découvert que certaines protéines à queue peu hydrophobe interagissaient avec la calmoduline dans le cytosol pour éviter leur agrégation après leur traduction et que leur insertion dans la membrane du RE était réalisée par le complexe protéique de membrane du RE (EMC, *Endoplasmic reticulum membrane protein complex*)³⁶⁴. Les protéines ayant une queue très hydrophobe ont besoin d'une plus grande

quantité d'ATP pour s'insérer dans la membrane du RE et seront alors aidées l'ATPase TRC40 (*Transmembrane domain- recognition complex protein of 40kDa*, anciennement appelée Asna-1)^{363,365}. TRC40 appartient au complexe de reconnaissance des domaines transmembranaires TRC (*transmembrane domain recognition complex*)³⁶⁶. La voie du TRC consiste par une prise en charge de la protéine suite à sa traduction par le complexe protéique TRC35, UBL4A (*Ubiquitin-like 4A*) et BAG6³⁶⁷ (*BCL-2 associated athanogene co-chaperonne 6*). Ce complexe va recruter la co-chaperonne SGTA (*Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein alpha*), qui va elle-même recruter d'autres protéines selon la destination de la protéine TA³⁶⁸. Le recrutement de TRC40 dirigera la protéine TA vers le RE³⁶⁵ alors que la liaison de la protéine TA à BAG6 induira sa destruction par la voie du protéasome³⁶⁹. Une fois TRC40 recrutée, le complexe TRC40-protéine TA se détache du reste du complexe TRC et va s'associer avec le complexe WRB et CAML (*Calcium modulating ligand*) à la membrane du RE, où ce dernier permettra l'insertion de la protéine TA dans la membrane du RE et le relargage de TRC40 dans le cytoplasme³⁷⁰. Des petites protéines sécrétées rejoignent également le RE de façon post-traductionnelle. Suite à leur traduction dans le cytosol, les petites protéines sont protégées par TRC40³⁷¹ ou par la calmoduline³⁷². Le passage dans le RE sera réalisé par la protéine Sec61, alors aidée des protéines Sec62 et Sec63^{373,374}. La protéine BiP (*Binding immunoglobulin protein*), localisée dans le lumen du RE, aidera au passage de la chaîne polypeptidique à travers Sec61 pour être délivrée dans le lumen du RE³⁷⁵. Dans le RE, les protéines se replieront, seront glycosylées et les ponts disulfures se formeront, ou les protéines seront intégrées à la membrane dans le cas des protéines transmembranaires^{359,376}. Les protéines cytosoliques ou destinées à la mitochondrie, au noyau ou aux peroxysomes sont, elles, traduites dans le cytosol avec des ribosomes libres et repliées dans le cytosol. À la sortie du ribosome, elles sont stabilisées par les chaperonnes Hsc70 (membre de la famille Hsp70) et son cofacteur Hsp40. Elles peuvent alors se replier spontanément ou nécessiter l'aide de la chaperonne Hsp90 ou d'un complexe chaperonine, nommé TRiC (*TCP1 ring complex*)³⁷⁷. Les protéines destinées à être sécrétées ou à rejoindre la membrane plasmique vont ensuite être incorporées à de petites vésicules (50-80nm) de transport, nommées vésicules complexes à manteau de type II (*Coat complex type II* ou COPII), qui fusionnent avec l'appareil de Golgi. Les protéines y subissent des

modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, phosphorylation ou encore le clivage de précurseurs permettant la maturation des protéines. Ce réseau membranaire se décompose en la partie *cis*, par où arrivent les vésicules contenant les protéines à sécréter (la plus proche du RE donc), la partie *medial*, du milieu, et la partie *trans*, la plus éloignée du RE, par où sortent les vésicules pour rejoindre la membrane plasmique. Les vésicules fusionnent alors avec elle, soit de manière constitutive dans le cas des protéines sécrétées en tout temps (composants de la matrice extracellulaires...) ou de manière régulée suite à un stimulus spécifique (neurotransmetteurs, hormones...). Il existe aussi un système de transport rétrograde, *via* des vésicules COPI, du *trans* vers le *cis*-Golgi pour maintenir une répartition égale des protéines et enzymes du Golgi, ou même rapporter certaines protéines au RE³⁷⁸.

La participation de la famille des protéines SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) est nécessaire pour la fusion de la membrane vésiculaire et de la membrane plasmique. Les SNAREs sont situées sur la vésicule et la membrane. Ces protéines contiennent toutes une ou plusieurs répétitions *heptad*, appelée motif SNARE. La liaison de leurs motifs crée un complexe quaternaire extrêmement stable qui permet d'attirer les deux membranes l'une contre l'autre et d'induire la fusion de celles-ci. Un autre modèle nécessite la présence de l'H⁺-ATPase vacuolaire (V-ATPase) en plus suite à la liaison de SNAREs. La liaison d'une unité VO d'une V-ATPase sur la vacuole et d'une autre unité VO d'une V-ATPase présente sur la membrane cible permet la formation d'un pore³⁷⁹⁻³⁸¹.

D'autres protéines comme les SM (Sec1/Munc18), Munc13, RIM, synaptotagmine, SNIP (*SNAP-25 interacting protein*) interagissent avec les SNAREs et participent à la régulation de la fusion membranaire^{380,382}.

4.2. Les mécanismes de sécrétion non-conventionnels

En plus de ce mode de sécrétion conventionnel, il a également été découvert différents modes de sécrétion non-conventionnels, pour des protéines ne passant pas par la route traditionnelle du RE suivi du Golgi.

Il existe quatre modes de sécrétion non-conventionnels³⁸³ (Figure 7.B-E). Les types I, II et III sont destinés aux protéines cytoplasmiques ne comportant pas de séquence signal. Le type IV est

pour des protéines ayant une séquence signal ou un domaine transmembranaire. Cependant, ces dernières ne transitent pas par le Golgi à la suite du RE pour rejoindre la surface cellulaire. Il reste encore beaucoup à découvrir concernant les protéines sécrétées de cette manière et les mécanismes moléculaires impliqués, qui semblent être dépendants du substrat, du type cellulaire et du moyen d'induction³⁸³.

La majorité du temps, ces mécanismes sont induits par le stress. Inflammation, privation de nutriment et stress mécaniques sont des déclencheurs de ces voies de sécrétion non-conventionnelles³⁸⁴. Cependant, certaines protéines comme FGF2³⁸⁵ (*Fibroblast growth factor 2*) et HIV-Tat³⁸⁶ sont sécrétées de manière constitutive par la voie non-conventionnelle. Une même protéine peut utiliser deux voies de sécrétion différentes, selon le stimulus. Par exemple, la protéine sans séquence signal IL-1 β semble emprunter la voie de type I lorsque les cellules sont dans un contexte inflammatoire, ou emprunter la voie de type III lorsque les cellules sont privées de nutriments³⁸⁷.

4.2.1. Mécanisme de sécrétion non-conventionnelle de type I

Le type I de sécrétion non conventionnelle utilise la formation de pore dans la membrane plasmique pour relâcher les protéines dans le milieu extracellulaire³⁸³ (Figure 7.B). Les protéines utilisant cette voie se rapprochent de la membrane plasmique et interagissent avec le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) présent sur le feuillet cytoplasmique. Cette étape permet l'oligomérisation de la protéine, qui forme alors un pore à travers la membrane plasmique, permettant le passage dans le milieu extracellulaire. La protéine peut elle-même former un pore, comme c'est le cas pour FGF2³⁸⁵ et HIV-Tat³⁸⁶ ou bien passer à travers un pore formé par une autre protéine. Par exemple, la thiorédoxine passe à travers le pore formé par le récepteur purinergique P2X7R³⁸⁸. FGF2 est ensuite recruté par les chaînes héparane sulfate de protéoglycanes de surface³⁸⁵.

4.2.2. Mécanisme de sécrétion non-conventionnelle de type II

Le type II est très peu étudié. Il semble permettre le passage de protéines ayant subi une acylation et les phéromones d'accouplement des levures. Il utilise les transporteurs ABC^{383,389} (Figure 7.C). C'est le changement de conformation des deux domaines transmembranaires suite

à la liaison de l'ATP sur les domaines de liaison aux nucléotides du transporteur ABC qui permet l'export des molécules vers le milieu extracellulaire³⁹⁰.

4.2.3. Mécanisme de sécrétion non-conventionnelle de type III

Le type III utilise des organites membranaires comme les endosomes et autophagosomes pour transporter les protéines jusqu'au milieu extracellulaire³⁸³ (Figure 7.D).

Les autophagosomes proviennent des phagophores qui sont constitués d'une double membrane et sont formés lors du processus d'autophagie. Ils englobent du matériel cytoplasmique de façon non-sélective. La fermeture du phagophore donne naissance à l'autophagosome. Dans le processus autophagique, l'autophagosome va fusionner avec un lysosome pour former un autolyosome et induire la destruction du matériel cytosolique englobé grâce aux protéases lysosomales³⁹¹. Le mécanisme par lequel les autophagosomes transportent les protéines n'est pas encore clair. Il a été montré que les protéines ATG (*Autophagy-related protein*) nécessaires à l'autophagie sont impliquées dans la sécrétion non conventionnelle. Par exemple, la sécrétion de la protéine sans séquence signal Acb1 chez la levure nécessite l'expression des gènes Atg5, Atg7, Atg8, Atg12³⁹². De même, la sécrétion d'IL-1 β a pu être inhibée par des inhibiteurs de l'autophagie ou bien lors de l'inhibition du gène Atg5³⁹³. Cependant, il a également été montré que les protéines GRASP (*Golgi reassembly-stacking protein*) de la famille des protéines périphériques du Golgi étaient nécessaires à la sécrétion d'Acb1³⁹² et d'IL-1 β ³⁹³. Suite à une privation en nutriments, les protéines GRASP se relocalisent sur des vésicules regroupées avec des microtubules et forment un compartiment cytoplasmique. Ce compartiment est nommé compartiment pour la sécrétion non conventionnelle des protéines (*Compartment for unconventional secretion of proteins, CUPS*)³⁹⁴. D'abord pensés autophagosomes car colocalisant avec certaines protéines impliquées dans l'autophagie, la nature de ces compartiments n'est pas encore très claire car les protéines ATG ne sont pas forcément requises pour leur formation. Les complexes ESCRT I, II et III (*Endosomal sorting complexes required for transport*) ainsi que la sous-unité Snf7 sont ensuite nécessaires pour englober ce compartiment dans un sac membranaire, qui fusionnera avec la membrane plasmique³⁹⁴.

A cause de la double membrane, les protéines encerclées par l'autophagosome ne sont pas solubles. Dans le cas de l'autophagie réalisée par les chaperonnes, la protéine Hsp70 reconnaît des protéines ayant un motif peptidique KFERC et se lie avec LAMP2 (*Lysosomal Associated Membrane Protein 2*). Après avoir été dépliées, les protéines seront transportées à travers la membrane lysosomale pour atteindre le lumen, où elles seront dégradées³⁹¹. Ce mécanisme a été proposé pour le passage des protéines à travers l'autophagosome afin de pouvoir être sécrétées sans être entourées d'une membrane³⁹³.

Les exosomes sont des petites vésicules (50-150nm), créés par l'invagination de la membrane interne d'endosomes tardifs appelés corps multi-vésiculaires (MVB). Cette étape est réalisée par différents acteurs comme le complexe ESCRT, des lipides et/ou des tétraspanines³⁹⁵. La fusion du MVB avec la membrane plasmique relâche dans le milieu extracellulaire les exosomes, qui auront alors un impact sur les cellules environnantes ou éloignées^{351,396,397}. Les exosomes peuvent se fixer sur la cellule cible, fusionner avec la membrane plasmique ou bien être importés à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de différents mécanismes de phagocytose ou d'endocytose³⁵¹. IL-1 β ³⁹⁸, la protéine Tau³⁹⁹, le peptide A β ⁴⁰⁰ ou l' α -synucléine⁴⁰¹, entre autres, utilisent par exemple cette voie de sécrétion non-conventionnelle pour rejoindre le milieu extracellulaire.

Une voie de sécrétion utilisant les endosomes vient également d'être découverte. Appelée MAPS pour sécrétion associée au mauvais repliement des protéines (*Misfolding-associated protein secretion*), ce mécanisme permet la sécrétion de protéines mal repliées dans le milieu extracellulaire et repose sur le transport vésiculaire. Nous allons la développer dans une section plus bas⁴⁰².

4.2.4. Mécanisme de sécrétion non-conventionnelle de type IV

Les protéines passant par cette voie de sécrétion ont une séquence signal ou un domaine transmembranaire et transitent donc par le RE (Figure 7.E). Néanmoins, elles n'empruntent pas l'appareil de Golgi pour rejoindre la surface cellulaire. Cette voie de sécrétion a été observée dans le cas de stress mécaniques ou de stress du RE³⁸³.

Deux mécanismes ont été découverts lors du stress du RE, permettant la sécrétion de protéines sans passer par le Golgi. Ces mécanismes ont été observés pour des protéines qui rejoignent normalement la surface cellulaire par la voie de sécrétion conventionnelle. Dans le cas où elles sont mutées, elles sont alors dégradées par la voie de dégradation du RE et ne peuvent pas atteindre la membrane plasmique. Cependant, il a été observé que lors d'un stress du RE, ces protéines mutées pouvaient rejoindre la surface cellulaire par des voies de sécrétion non conventionnelles.

Le premier mécanisme a été observé pour le régulateur transmembranaire de la conductance de la fibrose kystique délété pour la phénylalanine 505, $\Delta F505$ -CFTR⁴⁰³ (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Il repose sur la phosphorylation de l'homodimère GRASP55, situé sur le Golgi, lors de stress du RE. GRASP55 se localise alors sur le RE sous forme de monomères⁴⁰⁴. La reconnaissance du domaine PDZ des substrats par le domaine PDZ1 de GRASP55 permet leur encapsulation dans des vésicules, puis leur transport jusqu'à la membrane plasmique, pouvant passer par les endosomes^{403,405}.

Le deuxième mécanisme repose sur Hsc70 et sa co-chaperonne DNAJC14. Hsc70 est une chaperonne exprimée de façon constitutive dans les cellules et participe à de nombreux processus⁴⁰⁶. Elle a tout d'abord été découverte pour son rôle dans la dissociation des triskels de clathrines lors du processus d'endocytose réalisé par les clathrines⁴⁰⁷. Elle est particulièrement importante pour tous les processus participants au maintien de l'homéostasie protéique comme le repliement, la translocation, les processus d'assemblage ou désassemblage, la maturation ou encore la dégradation des protéines⁴⁰⁶. Hsc70 a une activité ATPase hydrolysant l'ATP en ADP (Adénosine di-phosphate). La forme liée à l'ATP est instable et a une faible affinité pour les substrats. La forme liée à l'ADP possède à l'inverse une forte affinité pour les substrats^{408,409}. Des co-chaperonnes comme la famille des Hsp40 (nommées DnaJ ou protéines J) sont nécessaires pour le passage de la forme liée à l'ATP à celle liée à l'ADP⁴¹⁰. Les protéines de la famille des Hsp40 se lient via leur domaine J aux protéines de la famille des Hsp70, dont Hsc70^{406,411}. C'est la diversité des protéines Hsp40 qui permet aux protéines Hsp70 d'être impliquées dans autant de fonctions différentes⁴¹².

Il existe 41 protéines J, qui contiennent toutes un domaine particulier d'environ 70 acides aminés, très conservé, nommé le domaine J. Ce domaine détient un motif composé de 3 acides aminés, une histidine, une proline et un acide aspartique, formant une boucle entre deux hélices alpha. C'est ce motif, appelé motif HPD, qui permet l'interaction avec les protéines de la famille Hsp70⁴¹³. En dehors du domaine J, les protéines J ont des structures très diverses, pouvant expliquer la diversité de fonctions qu'elles induisent en se liant aux protéines de la famille Hsp70⁴¹². Leur localisation joue aussi un rôle sur leur fonction. Elles ont été observées dans le cytoplasme, le noyau, les endosomes, les mitochondries, le RE et les ribosomes. Par exemple, DNAJA3 est située au niveau de la mitochondrie, où elle a un rôle dans la fragmentation mitochondriale⁴¹⁴. DNAJB2 est retrouvée dans le cytosol, le noyau ou sur le côté cytoplasmique de la membrane du RE. Elle participe à la dégradation des protéines *via* le système ubiquitine-protéasome⁴¹⁵. DNAJC14 est localisée au RE. Elle participe au trafic de protéines vers la surface cellulaire^{416,417}, au trafic lysosomal réalisé par le complexe SNARE⁴¹⁸ ainsi que dans la sécrétion non conventionnelle des protéines⁴¹⁹.

Le mutant H723R du transporteur anionique pendrine est un substrat de Hsc70⁴¹⁹. Cette mutation est une des causes majeures de surdité dans le monde. En temps normal, la pendrine-H723R est détectée dans le RE et détruite *via* la voie de dégradation associée au RE. Suite au blocage du trafic RE-Golgi, Jung et al. ont observé que la pendrine-H723R pouvait rejoindre la surface cellulaire⁴¹⁹. Les auteurs ont montré que Hsc70 interagissait directement avec la protéine mutée et que DNAJC14 allait empêcher celle-ci d'être dégradée par la voie de dégradation associée au RE⁴¹⁹. Il est intéressant de souligner que malgré le même signal d'induction (le stress du RE) et l'implication de Hsc70, les protéines CFTR et la pendrine nécessitent des interacteurs particuliers (GRASP55 et DNAJC14 respectivement) pour rejoindre la membrane plasmique, laissant présager l'existence d'autres voies de sécrétion non conventionnelles dépendamment du substrat consid r ^{419,420}.

La voie de sécrétion non conventionnelle de type IV associée au stress mécanique a été observée chez l'organisme modèle *Drosophila* et concerne des int grines⁴²¹. Cependant le mécanisme exact n'a pas encore été découvert.

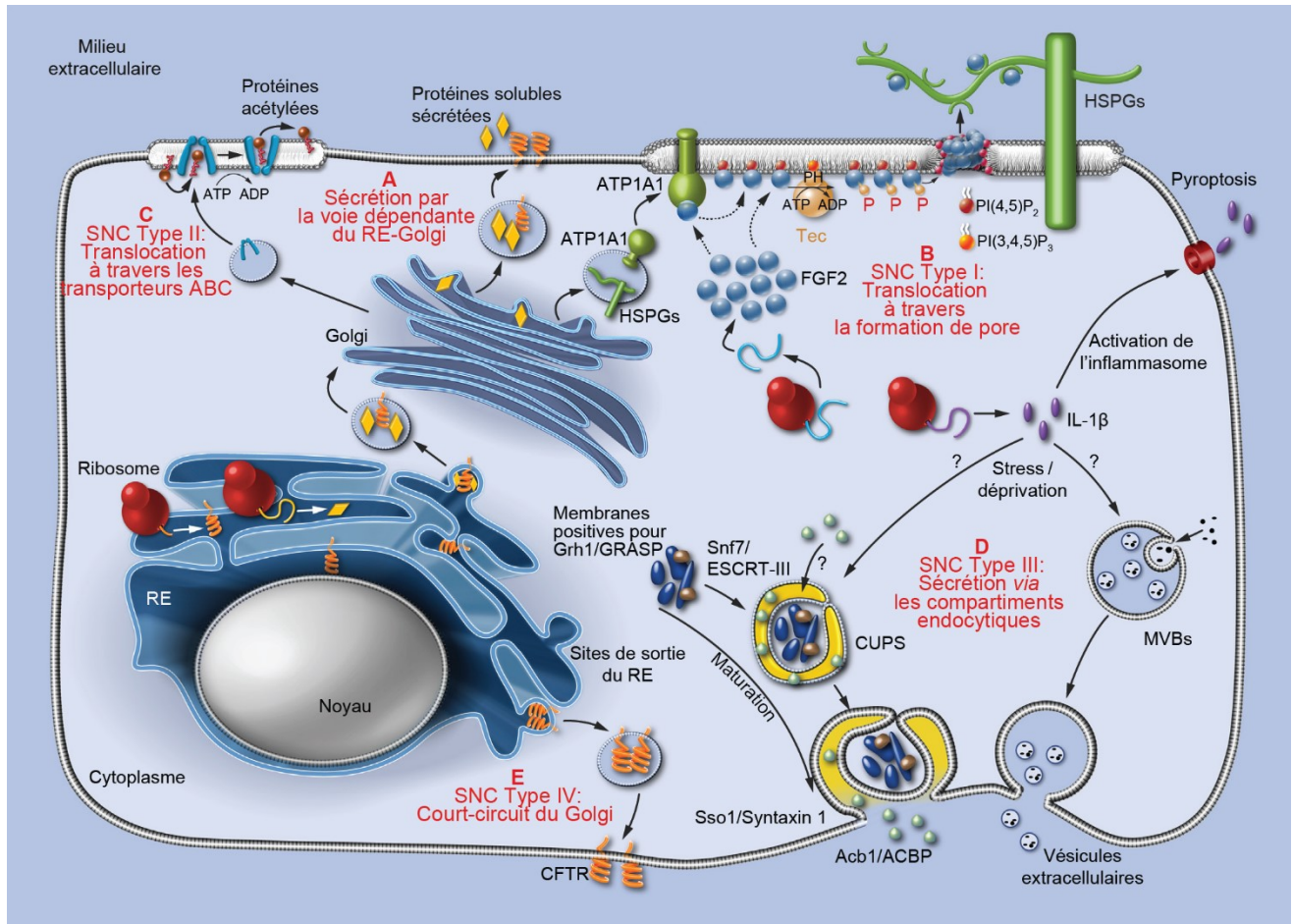


Figure 7. – Les voies de sécrétion conventionnelles et non-conventionnelles des protéines

Ce schéma représente les différentes voies de sécrétions des protéines. La voie de sécrétion conventionnelle (A) consiste à transiter par le réticulum endoplasmique (RE) puis l'appareil de Golgi. Il existe quatre types de sécrétion non-conventionnelle (SNC). Les protéines empruntant la voie de sécrétion de type I (B) forment un pore à travers la membrane alors que celles empruntant la voie de type II (C) traversent la membrane par des transporteurs ABC. La sécrétion de type III (D) utilise les compartiments endocytiques et autophagiques pour transporter les protéines jusqu'au milieu extracellulaire. Enfin, les protéines sécrétées peuvent utiliser la voie de type IV (E), transitant par le RE mais court-circuitant le Golgi. Schéma adapté de Dimou et al.⁴²². HSPG : Heparan sulfate proteoglycan.

4.3. Le MAPS

4.3.1. Présentation du MAPS

Le MAPS a été découvert en 2016 par l'équipe du Dr Yihong Ye par l'étude du rôle de la protéase spécifique de l'ubiquitine 19 (USP19, *Ubiquitin specific peptidase 19*) dans la sécrétion des protéines mal repliées⁴⁰² (Figure 8). USP19 est la seule protéase de l'ubiquitine à posséder un domaine transmembranaire situé à l'extrémité carboxy-terminale. Cette propriété lui permet d'être localisée à la membrane du RE⁴²³. USP19 interagit avec la chaperonne Hsp90. Il a été proposé que Hsp90 pouvait favoriser la liaison entre USP19 et l'ubiquitine, lorsque les niveaux du substrat ubiquitinilé sont faibles⁴²⁴. Cependant, Hsp90 n'est pas nécessaire dans le MAPS, pouvant impliquer que les niveaux de substrats ubiquitinilés sont assez importants pour se passer de l'aide de Hsp90⁴²⁵. De par son rôle de protéase de l'ubiquitine, USP19 régule la stabilité de nombreuses protéines comme le facteur du cycle cellulaire KPC1⁴²⁶ (*Kip1 ubiquitination-promoting complex subunit 1*). Lee et al. ont observé que la surexpression de USP19 dans des cellules HEK293T exprimant la GFP (protéine verte fluorescente, *green fluorescent protein*) augmentait la sécrétion de celle-ci⁴⁰². Les auteurs ont alors remarqué que les molécules de GFP dans le milieu extracellulaire n'émettaient pas de fluorescence, ce qui peut être le cas lorsque la protéine est mal repliée. Pour tester cette hypothèse, ils ont créé une GFP qui ne possédait pas le dernier feuillet beta, nommée GFP1-10⁴⁰². La GFP1-10 est une protéine qui se replie moins bien en comparaison de la GFP normale. Ils ont montré que la GFP1-10 était plus sécrétée que la GFP normale et que cette différence était réduite lorsque le dernier feuillet beta était co-exprimé avec la GFP1-10, ce qui augmentait la fluorescence. Cette sécrétion nécessite USP19 et particulièrement son domaine catalytique, ainsi que son domaine transmembranaire. La sécrétion dépendante de USP19 était également visible dans des cellules exprimant d'autres protéines cytoplasmiques mal/non repliées comme l' α -synucléine ou non assemblées comme UBL4A. Lee et al. ont également montré que USP19 est une chaperonne, détectant l'état de repliement de ses substrats et se liant aux protéines mal repliées⁴⁰².

Un autre interacteur majeur de USP19 a été identifié, il s'agit de Hsc70⁴²⁵. Hsc70 semble être requis pour la liaison du substrat par USP19⁴²⁵. Hsc70 forme un complexe avec la co-chaperonne

DNAJC5 (*DnaJ* homologue subfamily C member 5) de la famille des Hsp40^{427,428}. Ce complexe a été observé au niveau des vésicules synaptiques⁴²⁹ et plus spécifiquement, comme ayant un rôle dans la sécrétion de protéines sujettes au mauvais repliement comme Tau et l' α -synucléine⁴³⁰. Cependant, au contraire de Hsc70, DNAJC5 ne forme pas une interaction stable avec USP19⁴²⁵.

L'équipe du Dr Ye a montré que la surexpression de DNAJC5, comme celle de USP19, induit la sécrétion de la protéine GFP1-10⁴²⁵. Xu et al. ont montré que USP19 était situé en amont de DNAJC5 dans le déroulement de la voie de sécrétion⁴²⁵. De façon intrigante, la sécrétion n'est pas totalement abolie en absence d'USP19^{402,425}. Ceci pourrait indiquer un autre mécanisme de sécrétion ne nécessitant pas USP19. USP19 étant une protéase de l'ubiquitine, les substrats peu ou non ubiquitinilés pourraient être directement recrutés par Hsc70 et transféré à DNAJC5 pour la suite du MAPS.

Lee et al ont découvert que les protéines mal repliées étaient associées à la membrane interne ou étaient à l'intérieur de vésicules qui appartiennent aux endosomes associés au RE⁴⁰². Le mécanisme par lequel les protéines traversent la membrane de la vésicule n'a pas encore été résolu mais semble impliquer la protéine DNAJC5⁴³¹.

L'équipe du Dr Yihong Ye a vérifié que le MAPS n'était pas le même mécanisme que celui lié aux autophagosomes car il ne requérait pas la présence des protéines GRASP ou du complexe ESCRT I, que les protéines ne présentaient pas de colocalisation avec des protéines des autophagosomes et que la sécrétion n'était pas augmentée par la privation en nutriments, ni diminuée par des inhibiteurs de l'autophagie^{402,431}. Ils ont également démontré que cette voie était différente de celle de l'autophagie réalisée par les chaperonnes⁴³¹. Cependant, l'inhibition de LAMP2 diminue la sécrétion par le MAPS, situation qui peut revenir à la normale suite à la surexpression de DNAJC5⁴³¹. Le rôle de LAMP2 n'a pas encore été éclairci dans le MAPS.

Dans leur étude, Xu et al. ont montré que DNAJC5 était localisé au niveau de vésicules positives pour Rab9 ou LAMP1, marqueurs des endosomes tardifs et des lysosomes, respectivement⁴²⁵. Cependant, c'est seulement au niveau des endosomes tardifs qu'était visible la co-localisation avec les protéines mal repliées comme GFP1-10. La sécrétion des protéines mal repliées n'était

pas inhibée par la bréfeldine A, une drogue bloquant la formation des vésicules COPII, établissant que cette sécrétion se faisait par une voie non-conventionnelle. Les protéines transportées par cette voie de sécrétion non conventionnelle ne sont pas non plus entourées d'une membrane, elles ne passent donc pas par la voie des exosomes⁴²⁵.

Enfin, l'équipe du Dr Yihong Ye a montré que les protéines de la famille SNARE VAMP7 (*Vesicle-associated membrane protein 7*) et VAMP8 participaient à la sécrétion des protéines mal repliées, probablement en permettant la fusion des vésicules avec la membrane plasmique⁴⁰². Les endosomes tardifs pourraient également fusionner avec des lysosomes pour dégrader leur contenu, ce qui est une option envisageable pour le MAPS sachant que les substrats sont des protéines mal repliées. Cependant, Lee et al. ont montré que les vésicules du MAPS ne fusionnaient pas avec des lysosomes, cette hypothèse doit donc être confirmée⁴³¹.

Les auteurs ont montré que DNAJC5 interagissait avec les protéines mal repliées dans la cellule mais également dans le milieu extracellulaire, établissant qu'au moins une fraction des protéines DNAJC5 était sécrétée avec la protéine mal repliée⁴²⁵. Ils ont également montré que les protéines mal repliées sécrétées dans le milieu extracellulaire pouvaient être internalisées *via* le processus d'endocytose par les cellules voisines, qui vont alors les diriger vers les lysosomes pour dégradation⁴²⁵.

Le MAPS est un mécanisme qui sélectionne ses substrats, *via* la protéine USP19, ce qui en fait donc aussi un mécanisme de contrôle de la qualité des protéines. Cette nouvelle voie de sécrétion fonctionne en parallèle du protéasome, certains substrats du MAPS étant aussi connus pour être ubiquitinilés et dégradés par le protéasome⁴⁰². Cependant, en cas de dysfonction de ce dernier, le MAPS peut prendre le relai et sa capacité à sécréter les protéines mal repliées est augmentée. Le groupe du Dr Ye propose que le MAPS soit un moyen permettant aux cellules ayant un stress protéotoxique trop important de relâcher les protéines mal repliées dans le microenvironnement, où elles seront dégradées par des cellules environnantes moins stressées⁴²⁵. Le MAPS pourrait être un moyen de dissémination des protéines mal repliées dans les maladies comme Alzheimer ou Parkinson et concourir à la propagation de celles-ci⁴²⁵.

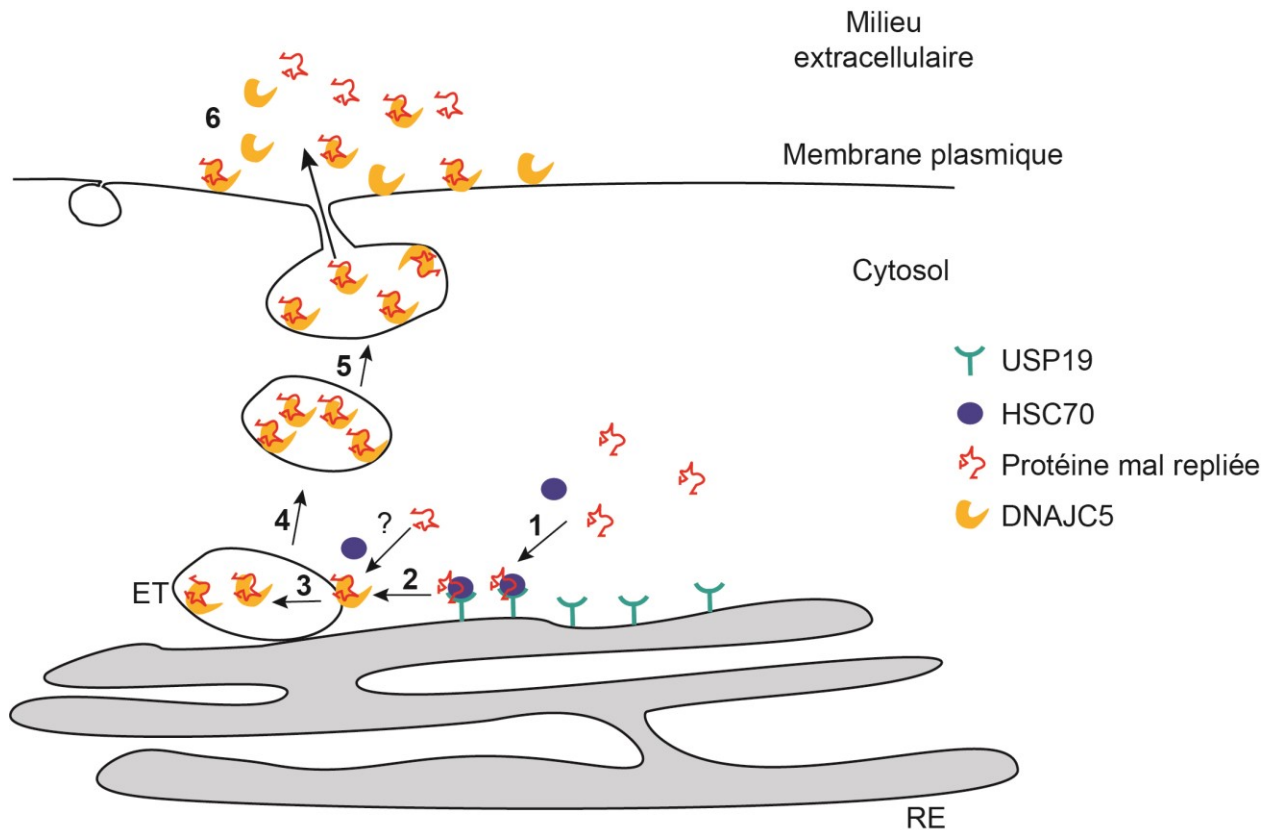


Figure 8. – La voie de sécrétion non conventionnelle du MAPS

Le MAPS se déroule en différentes étapes. (1) Les protéines cytoplasmiques mal repliées sont prises en charge par USP19, située sur le RE, et Hsc70. (2) La protéine est transmise à DNAJC5, sur les endosomes tardifs (ET) à proximité du RE. Il n'est pas exclu que certaines protéines court-circuitent le passage par USP19. (3) Le complexe DNAJC5-protéine mal repliée est internalisé dans l'ET par un mécanisme non encore identifié. (4) L'ET transite jusqu'à la membrane plasmique. (5) L'ET fusionne avec la membrane plasmique et relâche le complexe DNAJC5-protéine mal repliée dans le milieu extracellulaire, où il peut se dissocier. DNAJC5, si associé à la membrane de l'ET pourrait se retrouver à la membrane plasmique suite à la fusion. Schéma inspiré de Lee et al.⁴⁰² et Xu et al.⁴²⁵.

4.3.2. DNAJC5

DNAJC5 code pour la protéine CSP α (protéine de chaîne de cystéine, *cystein string protein*). Tout comme ses homologues CSP β et CSP γ , elle possède un domaine comprenant une chaîne de cystéines (Figure 9). CSP α est exprimée dans la plupart des cellules. L'expression de CSP β est

restreinte aux testicules et aux cellules ciliées auditives, et uniquement aux testicules pour CSPy. La chaîne de cystéine peut être palmitoylée, permettant aux CSPs d'être associée aux membranes⁴³². Il a été montré que DNAJC5 pouvait être localisée à la membrane plasmique^{433,434} et au niveau de vésicules synaptiques ou sécrétoires^{425,435,436}. DNAJC5 est une chaperonne interagissant avec différentes protéines, comme entre autres la syntaxine, VAMP, des sous-unités de protéines G, un mutant de l'huntingtine, des sous-unités du canaux calciques, synaptotagmines et la dynamine 1^{437,438}. DNAJC5 a été identifiée comme ayant un rôle au niveau de l'exocytose, en particulier au niveau des synapses. Elle a également un rôle neuroprotecteur. En effet, l'inhibition de DNAJC5 dans des organismes modèles comme la drosophile ou la souris induit la dégénération des neurones et une mort très précoce^{439,440}. Chez l'homme, il a été observé que l'expression de DNAJC5 chez des patients atteints d'Alzheimer était réduite dans les zones dégradées du cerveau antérieur⁴⁴¹. De plus, il existe deux mutations de DNAJC5 induisant soit une délétion de la leucine 116 ou une substitution de la leucine 115 pour une arginine. Les personnes ayant ce gène muté développent une maladie neurodégénérative appelée céroïde-lipofuscinose neuronale de l'adulte. Cette maladie rare se déclare chez le jeune adulte (20-30 ans) avec des symptômes comme la démence, l'épilepsie et des troubles moteurs^{434,442,443}. Lors de l'analyse pathologique, on observe une neurodégénération ainsi que des agrégats intra-neuronaux de matériel auto-fluorescent. Ces mutations se situent au niveau du domaine riche en cystéine et suggère donc qu'elles ont un impact sur la capacité de DNAJC5 à se situer au niveau des membranes et à participer au processus d'exocytose (Figure 9). De plus, il a été montré que les mutants de DNAJC5 étaient capables de s'agréger⁴⁴⁴ et que ces agrégats ne pouvaient être sécrétés, contrairement à la protéine sauvage⁴³⁴.

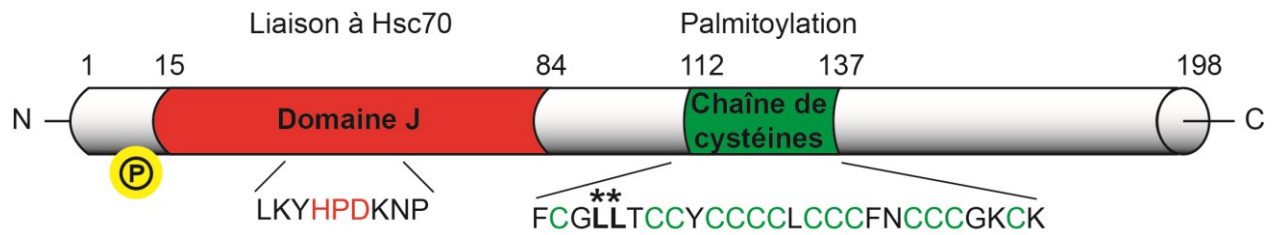


Figure 9. – Schéma de la structure de DNAJC5

DNAJC5 comprend un domaine J, avec un motif HPD, permettant la liaison à Hsc70. Elle possède également une chaîne de cystéines pouvant être palmitoylées, ce qui permet à *DNAJC5* d'être associée aux membranes. Les leucines 115 et 116 peuvent être mutées, induisant une maladie neurodégénérative. La serine 10 de *DNAJC5* peut être phosphorylée. Schéma adapté de Burgoyne et Morgan⁴³⁸.

5. Contexte

Les patientes atteintes du cancer de l'ovaire à cellules claires se voient toujours proposer la même combinaison thérapeutique depuis une trentaine d'année. Ce traitement n'est malheureusement que très peu efficace sur les cancers de stades avancés et de nombreuses patientes rechutent. Il est donc urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ce cancer.

Suite à un traitement par chimiothérapie, différents destins s'offrent aux cellules cancéreuses. Elles peuvent mourir par apoptose, résister et continuer de proliférer, entrer en catastrophe mitotique ou en sénescence. Les cellules sénescents arrêtent de proliférer. Induire la sénescence chez des cellules cancéreuses est donc une stratégie recherchée car elle permet de restreindre le développement tumoral. Cependant, par la sécrétion de diverses molécules, les cellules sénescents peuvent avoir un effet délétère sur le patient et contribuer à sa rechute. Après avoir induit la sénescence dans les cellules cancéreuses, une deuxième étape pourrait être de les supprimer. Il est donc nécessaire de bien connaître les caractéristiques des cellules sénescents pour pouvoir les cibler de façon spécifique avec de nouveaux traitements.

Nous avons donc étudié une lignée de COCC après traitement par la combinaison chimiothérapeutique utilisée en clinique. Ces cellules entrent en sénescence après le traitement et ainsi représentent un modèle d'étude très intéressant.

Nous avons souhaité étudier les changements ayant lieu à la surface des cellules de COCC traitées par la chimiothérapie afin de mieux connaître ces cellules et découvrir de nouvelles caractéristiques de la sénescence induite par la chimiothérapie, qui pourraient aider à la proposition de nouveaux traitements.

6. Objectifs

- 1) Mettre en place le modèle de sénescence des cellules de COCC au laboratoire
- 2) Analyser l'impact du traitement chimiothérapeutique sur le transcriptome et le surfaceome de cellules de COCC
- 3) Identifier un candidat exprimé à la surface des cellules sénescents et étudier les processus auxquels il participe
- 4) Etudier l'impact de l'inhibition de ce candidat sur l'établissement et/ou le maintien de l'état de sénescence

Chapitre 2 – Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire

Les cellules TOV21G ont été établies en 1991 (ATCC, CRL-11730) et proviennent de l'équipe du Dr F. Rodier (CrCHUM, Montréal, Canada). La lignée stable TOV21G exprimant la GFP1-10 a été réalisée par le Dr J. Lee (NIH/NIDDK, Bethesda, EU). La lignée stable exprimant l' α -synucléine a été réalisée par infection virale. Les cellules TOV21G sont cultivées dans du milieu OSE (Wisent) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline/ streptomycine à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu est changé tous les 2 à 3 jours. Toutes les lignées ont été testées pour la présence de mycoplasmes et sont utilisées au maximum 20 passages après décongélation.

Pour l'induction de sénescence, les cellules sont traitées par une combinaison de carboplatine (10 μ M) et paclitaxel (30nM). Après 12h de traitement, le milieu est changé pour du milieu frais, puis le milieu est changé tous les 2 à 3 jours. 5 jours après le traitement, les cellules sont lavées au PBS (solution saline tamponnée au phosphate) 3 fois et le milieu changé pour du milieu appauvri en sérum. Les expériences sont réalisées 48h après le début de changement de milieu. Les cellules contrôles sont mises en plaque 4 jours avant les expériences puis suivent le même protocole de déprivation que les cellules traitées.

2. Construction shRNA et infection rétrovirale

La déplétion des gènes est réalisée en utilisant des petits ARN en épingle à cheveux (*short-hairpin RNA*, shRNA) en utilisant des lentivirus produits par des vecteurs de la librairie Mission TRC shRNA.

Tableau 3. – Références des shRNAs utilisés

shRNA	Référence
shNT	SHC002, Sigma
ShDNAJC5 #9	TRCN0000155209
ShDNAJC5 #13	TRCN0000154613
ShDNAJC5 #30	TRCN0000155930
ShDNAJC5 #38	TRCN0000154238
ShDNAJC5 #91	TRCN0000153691

Les virus sont produits dans des cellules 293T. La transfection est réalisée via des précipités de calcium-phosphate avec le mix (6µg du plasmide PLKO-shRNA, 1.5 µg du plasmide pMDLg/pREE et du plasmide pRSV-Rev, et 3 µg du plasmide pMD2-VSVG). La titration des virus est faite par la plateforme de l'IRIC dans des cellules HeLa. Les cellules TOV21G sont ensuite infectées à une MOI de 0.75 en présence de polybrène (4 µg/mL). 3 jours après l'infection, les cellules sont lavées 2 fois au PBS et mises dans du milieu frais avec l'antibiotique de sélection, la puromycine (1.5 µg/mL). Pour la lignée exprimant l' α -synucléine, l'infection a été réalisée avec 1 mL de virus (sur 5 mL produits) et les cellules sont sélectionnées avec l'hygromycine à 300 µg/mL pendant 10 jours.

3. Cytométrie en flux

Les cellules sont récupérées et comptées puis resuspendues dans une solution de 2% FBS-PBS. Les cellules sont ensuite centrifugées à 1500 rpm pour 5 minutes, rincées au PBS et re-centrifugées à 1500 rpm pour 5 minutes. Le culot cellulaire est re-suspendu dans 300 µL de PBS. En vortexant, 700 µL d'éthanol 95% est ajouté goutte à goutte puis les cellules sont gardées à -20°C pendant minimum 2 heures. Une fois les cellules fixées, les cellules sont centrifugées et lavées au PBS 2 fois. Les cellules sont ensuite resuspendues dans la solution de marquage (40 µg/mL Propidium iodide, 100 µg/mL RNase A, PBS) puis incubées dans le noir pendant 30 minutes et analysées au cytomètre en flux (BD FACS Celesta avec logiciel BD FACS Diva v8.0.2). L'analyse du cycle cellulaire a été faite avec FlowJo v10.

4. Anticorps

Les anticorps utilisés sont les suivants :

Tableau 4. – Références des anticorps utilisés

Protéine	Marque	Référence
Actine	Sigma	A5441
Caveolin-1	Santa Cruz Biotechnology	Sc-894
Clusterin-alpha	Santa Cruz Biotechnology	Sc-5289
DNAJC5	Millipore	AB1576
Ⓣ-eIF2a (S51)	Cell Signaling Technology	3398 clone D9G8
eIF2a	Cell Signaling Technology	9722
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	Sc-47724
GFP	Santa Cruz Biotechnology	Sc-9996
p21	Cell Signaling Technology	2947
Ⓣ-p53 (S15)	Cell Signaling Technology	9284
Ⓣ-53	Cell Signaling Technology	2527
PTRF	Abcam	Ab48824
α-synucléine	Cell Signaling Technology	2642
Mouse-HRP	Chemicon	
Rabbit-HRP	Chemicon	
Streptavidin- HRP	Cytiva	RPN1231VS

5. Préparation des échantillons de cellules pour immunobuvardage

Après lavage au PBS sur glace, les cellules sont lysées dans un tampon de lyse (Blenis Lysis Buffer (10 mM K_3PO_4 , 1mM EDTA, 5 mM EGTA, 10mM $MgCl_2$, 50mM-glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Brij35, 0.1% deoxycholic acid, 1 mM sodium orthovanadate [Na_3VO_4], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), et 1X inhibiteur de protéases (cOmplete, sans EDTA, Roche) ou Surfaceome Lysis Buffer (SLB) 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich), 1X inhibiteur de protéases (cOmplete, sans EDTA, Roche), 1 mM Na_3VO_4 , and 1 mM PMSF) pendant 15mn minimum. Les lysats sont ensuite centrifugés pendant 10mn à 16000g. Le surnageant est récupéré, la concentration totale de protéines

dosée par la technique de Bradford (Biorad) puis les échantillons sont réalisés avec du Laemmli 4X (50% (v/v) 4X Tris/SDS pH 6.8, 40% (v/v) glycerol, 8% (w/v) SDS, 6.2% (w/v) DTT, 2 mg Bleu de Bromophénol) et chauffés à 98°C pendant 7mn.

6. Préparation des milieux conditionnés pour immunobuvardage

Les milieux conditionnés (5.5mL) sont récupérés puis soumis à une centrifugation de 20 minutes à 2000g à 4°C. Ils sont ensuite transférés dans un nouveau tube et 3.5mL est transféré dans un tube de concentration (Ultracel® 3K, AMICON® Ultra-4, Millipore). Une première centrifugation de 40 minutes à 4000g et 4°C est effectuée. La partie non-concentrée est vidée et le reste du milieu conditionné est rajouté dans le tube de concentration. Une deuxième puis une troisième centrifugation de 40 minutes à 4000g et 4°C sont réalisées. Le milieu concentré est récupéré, dosé par la technique de Bradford (Biorad) puis les échantillons sont préparés (ajout de PBS si besoin selon le dosage et Laemmli 4X) pour l'immunobuvardage.

7. Electrophorèse et Immunobuvardage

Les échantillons sont ensuite déposés sur gel de SDS-polyacrylamide à 10 ou 12%. Les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (Millipore) préalablement activée dans un bain de méthanol. Celle-ci est ensuite saturée dans une solution de TBST 0.1% (10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl et 0.1% Tween 20) supplémentée par 5% de lait écrémé en poudre ou 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) puis celle-ci est incubée durant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire concerné. Après lavages au TBST 0.1%, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires de souris ou de lapin, couplés à la HRP. Après lavages, la révélation est faite à l'aide d'une solution de détection améliorée de la chimiluminescence ou ECL (*Enhanced chemoluminescence*) maison (volume 1:1; solution 1 (500 µL de 250mM luminol, 220 µL de 90 mM acide p-coumerique, 50 mL 100 mM Tris pH 8.6), solution 2 (30 µL de 30% H₂O₂, 50 mL de 100 mM Tris pH 8,6)) ou ECL commercial (Fisher) en utilisant des films (Harvard Apparatus Canada) et le révélateur de films (AFP Manufacturing).

8. Immunofluorescence

Les cellules sont lavées au PBS puis fixées avec 3.7% de formaldéhyde dans du PBS pendant 15mn. Après lavages au PBS, les cellules sont perméabilisées avec 0.3% de Triton-PBS pendant 5 minutes. Après lavages au PBS, la solution de blocage à 5% BSA-PBS est appliquée sur les cellules pendant 1h à température pièce. La phalloïdine conjuguée au texas red (1/250, Invitrogen) dans la solution de blocage est ensuite appliquée pendant 30 minutes à température pièce. Les cellules sont lavées 2 fois avec du 0.05% Tween-PBS puis incubées avec le DAPI (1 µg/mL) dans du PBS pendant 10mn à température pièce. Après un dernier lavage avec du 0.05% Tween-PBS les cellules sont observées au microscope Leica LSM700 avec l'objectif 20x et analysées avec le logiciel Zen v2.

Microscopie en contraste de phase

Les cellules sont rincées au PBS puis photographiées en contraste de phase au 20x avec un microscope inversé Retiga Leica.

9. Marquage X-gal

Le marquage est réalisé selon le protocole déjà décrit²⁸³. Les cellules sont lavées au PBS puis fixées avec la solution de fixation (2% formaldéhyde, 0.2% glutaraldehyde) pendant 5 mn. Après 2 lavages, la solution de marquage (40 mM acide citrique/sodium phosphate, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM sodium chloride, 2 mM magnesium chloride et 1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) dans de l'eau distillée) est appliquée et les cellules sont incubées sur la nuit à 37°C dans un incubateur sans CO₂. Après incubation, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS puis une fois au méthanol pour fixer. Après séchage à l'air libre, les cellules sont photographiées à la loupe binoculaire (Leica Stereo et appareil photo Canon) puis les photos sont analysées avec le logiciel Adobe LightRoom Classic CC.

10. RT-qPCR

L'ARN total est extrait des cellules grâce au kit RNeasy (Qiagen) selon les instructions. Les ARN sont ensuite inversement transcrits par le kit cDNA reverse transcription (Applied Biosystems)

selon les instructions. Le niveau d'expression des gènes et gènes de ménage sont déterminé en utilisant la librairie universelle de sondes (Universal Probe Library (UPL)) de Roche. Les réactions de polymérisation en chaîne sont réalisées sur un thermocycleur ABI Real Time 7900HT et analysés avec le programme SDS 2.2. La PCR en temps réel quantitative est réalisée en utilisant le taqman gene expression mastermix (Applied Biosystems) et tous les échantillons sont testés en duplicatas. Les niveaux d'ARN des gènes concernés sont normalisés aux niveaux moyennés de GAPDH et/ou HPRT.

11. RNA-seq

Les ARN sont extraits en triplicatas en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen). Les librairies sont réalisées grâce au kit de préparation d'échantillons d'ARN TruSeq (Illumina, San Diego, CA), puis séquencées avec la machine Illumina HiSeq 2000. Les séquences sont comparées au génome de référence avec les programmes Illumina Casava 1.8.1 et Refseq release 63. Les niveaux d'expression des ARNm sont présentés en reads par kilobase par million (RPKM) et ces valeurs sont utilisées pour analyser l'enrichissement fonctionnel des gènes associés aux données séquencées par analyse d'enrichissement de regroupements de gènes⁴⁴⁵ (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) ou g:Profiler⁴⁴⁶.

12. Surfaceome

12.1. Préparation des échantillons

Le surfaceome a été effectué selon le protocole déjà décrit⁴⁴⁷. En bref, les cellules sur glace sont lavées deux fois avec du tampon de biotinylation froid (PBS pH 7.4, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂) puis incubées pendant 1h à 4°C avec 1mg/mL de Sulfo-NHS-LC-biotin (resuspendue dans du tampon de biotinylation). La réaction est arrêtée par un lavage avec 100mM de glycine (dans le tampon de biotinylation) pendant 10mn à 4°C, suivi de deux autres lavages avec le tampon de biotinylation froid seul. Les cellules biotinylées sont ensuite lysées dans le SLB, isolées par pull-down à partir de 10mg de protéines totales avec des billes de résine d'agarose couplé à la streptavidine à haute capacité (Thermo Fisher Scientific) pendant 2h à 4°C. Les billes sont ensuite lavées avec différentes solutions (SLB puis PBS pH 7.4 / 0.5% sodium dodecyl sulfate

(SDS)) afin d'éliminer les possibles contaminants. Les billes sont ensuite incubées avec une solution de PBS/0.5%SDS/100mM dithiothreitol (DTT), pendant 20mn à température pièce. Les billes sont lavées avec une solution d'urée 6M dans 100mM Tris-HCL pH 8.5 puis incubées pendant 20mn à température pièce dans une solution d'urée 6M / 100mM Tris-HCl pH8.5 / 50mM iodoacetamide. De nouveaux lavages sont effectués avec la solution d'urée 6M / 100mM Tris-HCl pH 8.5 puis PBS pH 7.4 et enfin avec de l'eau.

Pour la préparation des peptides, les billes sont rincées trois fois avec une solution de 50mM de bicarbonate d'ammonium pH 8.5 puis resuspendues dans 400µL de cette même solution contenant en plus 4g de trypsine de qualité protéomique (Sigma-Aldrich) sur la nuit à 37°C. La digestion est poursuivie par une nouvelle incubation avec 4µg de trypsine pendant 4h à 37°C. Les peptides sont ensuite récoltés par centrifugation à 10 000g pendant 10mn à température pièce. Les billes sont lavées deux fois avec de l'eau de qualité protéomique. Les peptides sont séchés dans un SpeedVac et re-suspendus dans le solvant pour la spectrométrie de masse (5% Acetonitrile aqueux (ACN), 0.2% acide formique (FA)).

12.2. Spectrométrie de masse et analyse

Les échantillons sont injectés dans une pré-colonne C18 de 1.5µL. Ils sont séparés sur une colonne à phase renversée (150µm i.d. par 150mm) produite dans la plateforme, avec un gradient de 56 minutes de 10 à 30% ACN/0.2% FA et un flux de 600-nl/min dans un système Ultimate 3000 LC (Eksigent, Dublin, CA) connecté à un Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Chaque spectre complet à une résolution de 70000 est suivi par un spectre de 12 tandem-MS (MS-MS) sur les ions précurseurs de charge multiple les plus abondants. Les expériences de MS en tandem sont réalisées en utilisant la dissociation induite par collision à une énergie de collision de 27%. Les échantillons de protéomique sont analysés comme des triplicatas biologiques par condition. Les peptides sont identifiés en utilisant le logiciel PEAKS® 07.0 (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON) et les séquences peptidiques sont confrontées à la database Uniprot humaine. Les tolérances de masse sur les ions précurseurs et fragmentés sont respectivement de 10ppm et 0.01 Da. Le taux d'erreur (false discovery rate ou FDR) pour les peptides et protéines est fixé à 0.5%. Le nombre minimum de peptides par protéine est fixé

à 2 et la longueur minimale du peptide a 6 acides aminés. Les critères de recherche incluent une modification statique des résidus de cystéine à +57.0214 Da ; une modification variable de +15.0049 Da afin d'inclure l'oxydation potentielle des méthionines et une modification de +79.966 Da sur les sérines, thréonines ou tyrosines pour l'identification des phosphorylations. Les données sont visualisées par le logiciel Scaffold 4.4.6. Les facteurs d'abondance spectrale normalisés (NSAF) pour chaque protéine de surface augmentée ou diminuée de façon significative suite au traitement par la chimiothérapie (valeurs Log_2 FC) sont extraites de Scaffold 4.4.6 pour chaque réplica.

12.3. Quantification sans étiquette et analyse des données

Les intensités des peptides précurseurs sont extraites avec l'algorithme intégré du logiciel PEAKS® 8.05. Les protéines sont sélectionnées si elles sont détectées dans au moins 2 réplicas de la même condition biologique (Contrôle ou traitée CP), avec un minimum de 2 peptides uniques. L'unicité des peptides est vérifiée, ainsi que l'inversion leucine/isoleucine, en utilisant neXtProt⁴⁴⁸. Ces protéines sont considérées comme étant « à haute confiance ». Les analyses par ontologie de gène (GO, *Gene ontology*) en considérant les composants cellulaires (GO CC) et annotations fonctionnelles sont réalisées en utilisant g:Profiler⁴⁴⁶ (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/index.cgi>), afin d'avoir une estimation objective du nombre de protéines spécifiques de la surface cellulaire. Nous classons ensuite manuellement toutes les protéines identifiées en notant celles qui contiennent au moins un domaine exposé à la surface cellulaire, qui pourrait être biotinyllé. Pour cela, nous analysons les protéines identifiées comme étant à haute confiance en les recherchant dans la base de données Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Nous définissons ensuite les protéines comme protéines de la membrane plasmique lorsqu'elles contiennent au moins un domaine transmembranaire et une région extracellulaire (p. ex. RTKs), comme étant des composants sécrétés ou extracellulaires lorsqu'ils sont connus pour être sécrétés et interagissant potentiellement avec la surface cellulaire (p. ex, facteurs de croissance, cytokines) et comme étant des contaminants potentiels lorsqu'ils correspondent à des protéines qui ne possèdent pas de domaine extracellulaire (p. ex, des protéines intracellulaires abondantes qui pourraient interagir avec les billes de streptavidine ou des protéines proches de la membrane plasmique qui interagissent intracellulairement avec

des protéines biotinylées). Les protéines sont considérées être augmentées de façon différentielle par le traitement CP si la valeur du $\log_2(\text{CP}/\text{Contrôle})$ est supérieure ou égale à 2 et diminuée si inférieure à 2. Certaines protéines sont seulement identifiées dans la condition contrôle ou CP, rendant impossible le calcul du ratio CP/CTL. Nous assignons donc de façon arbitraire la valeur de +10 si les protéines sont uniquement présentes dans la condition CP et -10 si les protéines sont uniquement présentes dans la condition contrôle. La valeur « ± 10 » fut choisie car elle était plus grande que notre plus haute et faible valeur de ratio CP/Contrôle.

Chapitre 3 – Résultats

1. Les cellules TOV21G entrent en sénescence après exposition à une combinaison chimiothérapeutique.

Nous cherchons à découvrir une nouvelle caractéristique des cellules sénescents, qui pourrait être utilisée comme cible dans le cadre d'une thérapie en deux étapes.

Nous avons choisi d'étudier un modèle de sénescence induite par la chimiothérapie dans le cancer de l'ovaire, ce cancer ayant une forte résistance aux traitements. Nous avons utilisé les cellules TOV21G. Cette lignée cellulaire de carcinome de l'ovaire à cellules claires a été établie à partir d'une tumeur de patiente, avant toute exposition à un traitement chimiothérapeutique. Nous avons traité cette lignée cellulaire avec une combinaison de carboplatine et paclitaxel (CP), ceci étant la stratégie thérapeutique classique pour ce type de cancer. Après 12h de traitement le milieu cellulaire est remplacé, et 7 jours après le traitement nous étudions les cellules (Figure 10). Comme décrit dans l'introduction, les cellules sénescents ont différentes caractéristiques qui permettent de les identifier. Nous avons donc mis en place ce modèle d'étude au laboratoire et vérifié que nous retrouvions ces caractéristiques particulières après le traitement CP.

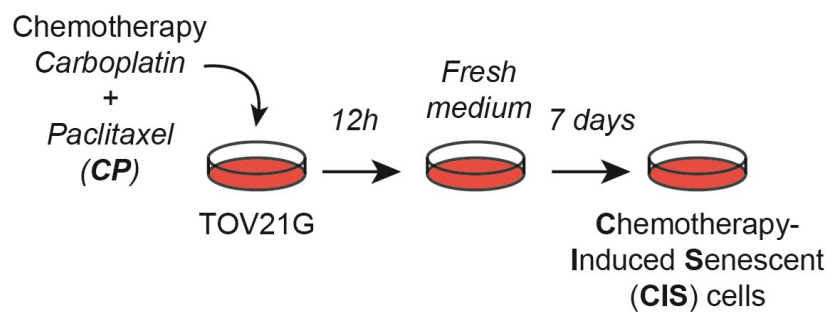


Figure 10. – Présentation du modèle d'étude.

Les cellules TOV21G sont traitées par une combinaison de carboplatine (10 μ M) et de paclitaxel (30nM) (CP) pendant 12h. Le milieu est ensuite changé une première fois, puis tous les 2 ou 3 jours. 5 jours après le traitement les cellules traitées sont lavées au PBS et du milieu sans sérum

est ajouté (sauf précision inverse). 7 jours après le traitement, nous obtenons des cellules sénescents induites par la chimiothérapie (SIC) et pouvons réaliser les expériences. Les cellules contrôles sont mise en plaque 3 jours avant les expériences puis lavées au PBS et leur milieu est changé pour du milieu sans sérum (sauf précision inverse) 2 jours avant les expériences.

Nous avons tout d'abord observé la morphologie des cellules en microscopie par contraste de phase et immunofluorescence avec un marquage de la phalloïdine, une protéine qui se fixe à l'actine filamenteuse (Figure 11). En comparaison avec les cellules contrôles, les cellules traitées ont changé de morphologie après le traitement, elles sont plus larges et étalées.

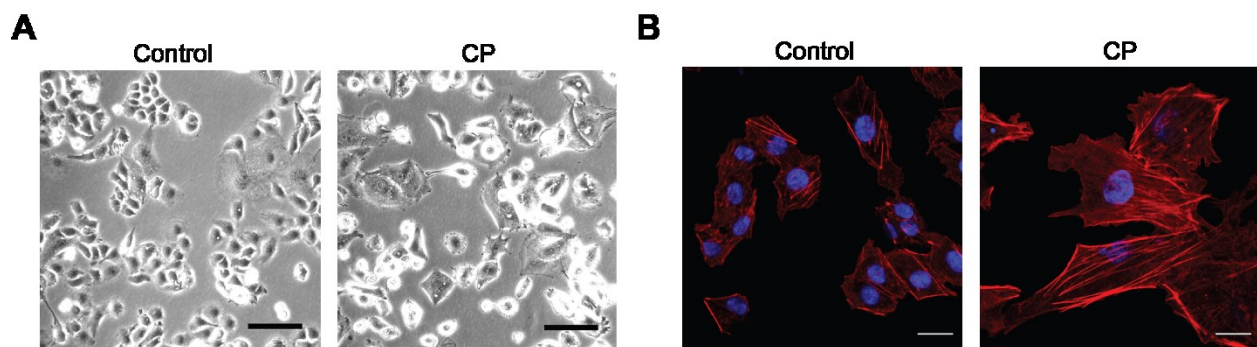


Figure 11. – Les cellules traitées au CP changent de morphologie.

(A) Photographies de cellules contrôles ou traitées au CP en contraste de phase. Échelle : 100 μ m.

(B) Photographies de cellules contrôles ou traitées au CP après un marquage au DAPI, en bleu, pour les noyaux, et à la phalloïdine, en rouge, pour le cytosquelette d'actine. Échelle : 20 μ m.

Une caractéristique majeure des cellules sénescents est leur arrêt de prolifération, elles restent bloquées en phase G1 ou G2. Nous avons alors regardé la proportion de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, avec un marquage à l'iodure de propidium en cytométrie de flux. L'iodure de propidium est un agent intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence plus forte lorsque fixé à des acides nucléiques. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'acides nucléiques : une plus faible intensité pour les cellules en phase G1, une intensité intermédiaire pour les cellules en phase S et une forte intensité pour les cellules en phase G2-M. Nous avons comparé les cellules contrôles cultivées dans un milieu riche en sérum ou pauvre en sérum aux cellules traitées au CP. Les cellules contrôles cultivées dans un milieu

riche en sérum ont une distribution classique de la proportion des phases du cycle cellulaire : 34% de cellules sont en phase G1, 34% en phase S et 26% en phase G2-M. Les cellules contrôles privées de sérum ont une distribution un peu différente : 54% de cellules sont en phase G1, 17% sont en phase S et 27% sont en phase G2-M. L'augmentation de cellules en phase G1 est due à la privation de sérum qui induit un état de quiescence, stoppant la prolifération des cellules. Les cellules CP, qu'elles soient privées de sérum ou non, ont sensiblement la même proportion de cellules en phase G1 : 6% et 7% respectivement ; en phase S : 18% et 16% respectivement ; et en phase G2-M : 70% dans les deux conditions. La privation de sérum a très peu d'impact sur les cellules traitées puisque leur cycle cellulaire est déjà bloqué en phase G2-M, d'après notre analyse du cycle cellulaire. Cet arrêt de prolifération peut être lié à une réponse aux dommages à l'ADN, causée par l'exposition des cellules à la combinaison chimiothérapeutique.

L'un des acteurs principaux de l'arrêt du cycle cellulaire est p53, qui va être phosphorylé suite aux dommages à l'ADN et cela va permettre la transcription de gènes cibles comme p21. Nous avons donc regardé par immunobuvardage l'expression protéique de p53 et sa phosphorylation pour la sérine en position 15, celle-ci étant la cible principale de la kinase ATM lors de la réponse aux dommages à l'ADN et permettant la stabilisation de p53²³⁷ (Figure 12B). Nous avons effectivement observé une augmentation de p53 et de la phosphorylation de sa serine en position 15 dans les cellules traitées. Nous nous sommes aussi intéressés au niveau transcriptionnel et protéique du gène *CDKN1A*, codant pour la protéine p21, une des cibles de p53 et un acteur important dans la sénescence²³⁹ (Figure 12B et C). Avec une RT-qPCR (Reverse transcription polymerase chain reaction), nous avons quantifié que la quantité d'ARN messager (ARNm) de *CDKN1A* est, de façon significative, 8 fois plus importante dans les cellules traitées au CP. Nous avons observé par immunobuvardage que le niveau protéique de p21 est fortement augmenté dans les cellules traitées au CP. Nous avons aussi analysé les niveaux transcriptionnels du gène *CDKN2A*, encodant pour les protéines p16, p16-γ, ARF (p14) et p12 (Figure 12C). p16 participe dans certains modèles de sénescence à l'arrêt de prolifération²⁴⁵. Nous avons observé une plus faible augmentation, mais significative, de la quantité d'ARNm de *CDKN2A* dans les cellules traitées au CP, en comparaison des cellules contrôles.

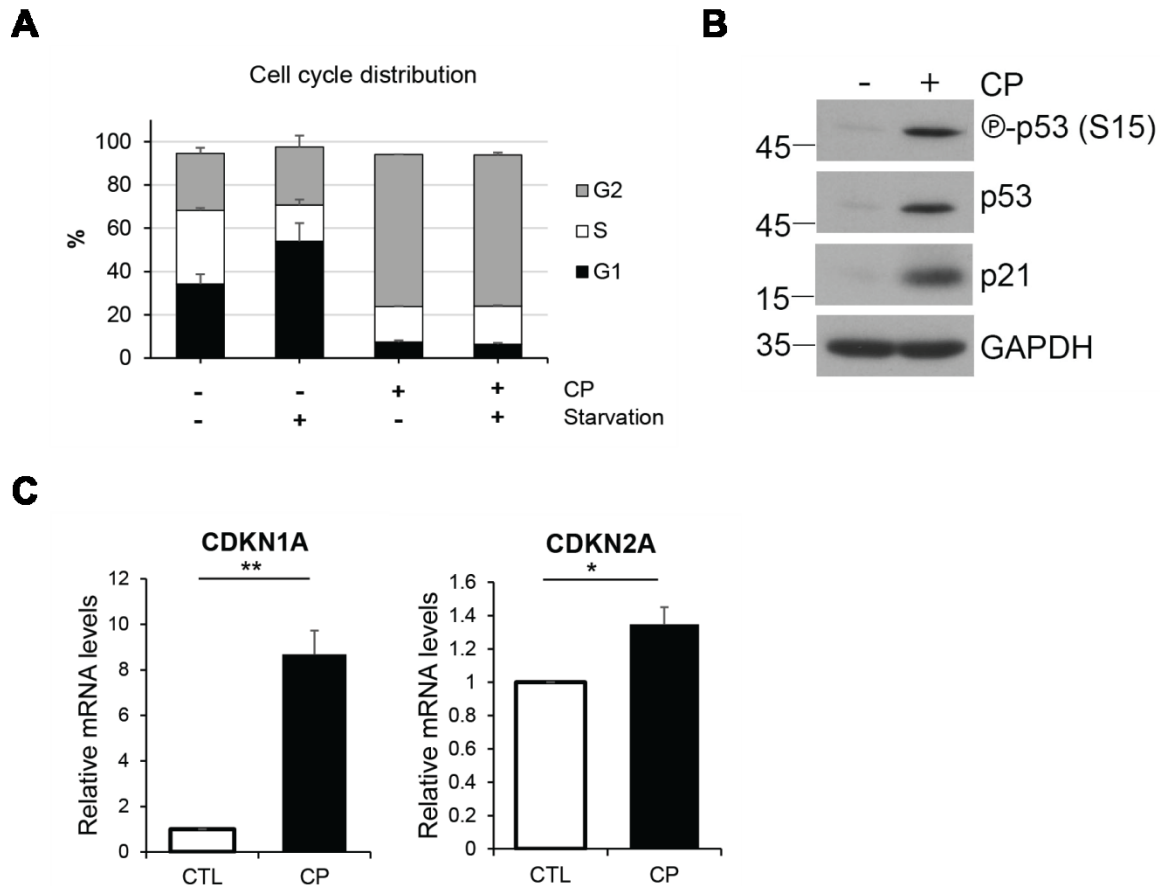


Figure 12. – Les cellules TOV21G traitées au CP arrêtent de proliférer et leur voie de réponse aux dommages à l'ADN est activée.

(A) Analyse du cycle cellulaire. Les cellules contrôles ou traitées au CP sont cultivées dans un milieu enrichi ou pauvre en sérum pendant 48h, puis fixées à l'éthanol froid, marquées à l'iodure de propidium et analysées par cytométrie en flux (n=2). (B) Immunobuvardage de lysats cellulaires des cellules contrôles ou traitées au CP (Image représentative, n>10 pour p21, n=3 pour @-p53 et p53). (C) Analyse transcriptionnelle des cellules contrôles ou traitées au CP pour les gènes CDKN1A ou CDKN2A (n=3).

Un autre moyen d'identifier des cellules sénescents est le test de marquage au X-gal. Ce test permet de détecter l'activité de l'enzyme beta-galactosidase à pH 6, caractéristique des cellules sénescents. L'enzyme va couper le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indoyl β-D-galactopyranoside (X-gal) en une molécule teintant les cellules de bleu. Nous observons effectivement après

marquage que nos cellules traitées au CP sont majoritairement bleues en comparaison des cellules contrôles (Figure 13).

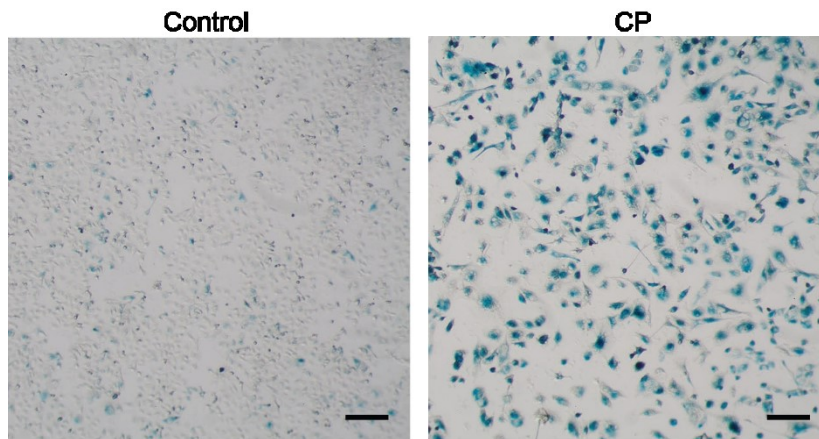


Figure 13. – La β -galactosidase associée à la sénescence est active chez cellules traitées au CP.

Photographie de cellules contrôles ou traitées au CP après marquage au X-gal. Echelle : 0,1mm. (Images représentatives, n=11.)

Ces différents résultats confirment que les cellules TOV21G entrent dans un état de sénescence après avoir été traitées avec la combinaison chimio-thérapeutique CP.

2. Des analyses transcriptionnelles suggèrent des changements à la membrane plasmique des cellules sénescentes

2.1. Analyse transcriptionnelle des cellules TOV21G traitées ou non au CP

Afin d'avoir une idée plus précise des changements internes liés au traitement des cellules par la combinaison CP, nous avons décidé de réaliser une analyse transcriptionnelle des cellules TOV21G traitées au CP ou non. Sur les 19580 ARNm identifiés, plus de la moitié d'entre eux voyaient leur niveau modifié de façon significative après traitement au CP (Figure 14A). Nous avons premièrement conduit une analyse d'enrichissement par liste de gènes (*Gene set enrichment analysis*, GSEA⁴⁴⁵, <https://www.gsea-msigdb.org>). Ce type d'analyse globale donne une première vision d'ensemble des données. Elle compare les changements transcriptionnels

entre les deux conditions avec des changements transcriptionnels déjà connus, appelés signatures, pour représenter, par exemple, l'activation ou l'inhibition d'une voie de signalisation, un état cellulaire particulier, etc. Notre analyse GSEA a montré que nous retrouvons dans notre jeu de données la signature liée à l'activation de p53, ainsi que des signatures de transcriptomes de cellules sénescées déjà publiés, validant une nouvelle fois notre modèle d'étude (Figure 14B).

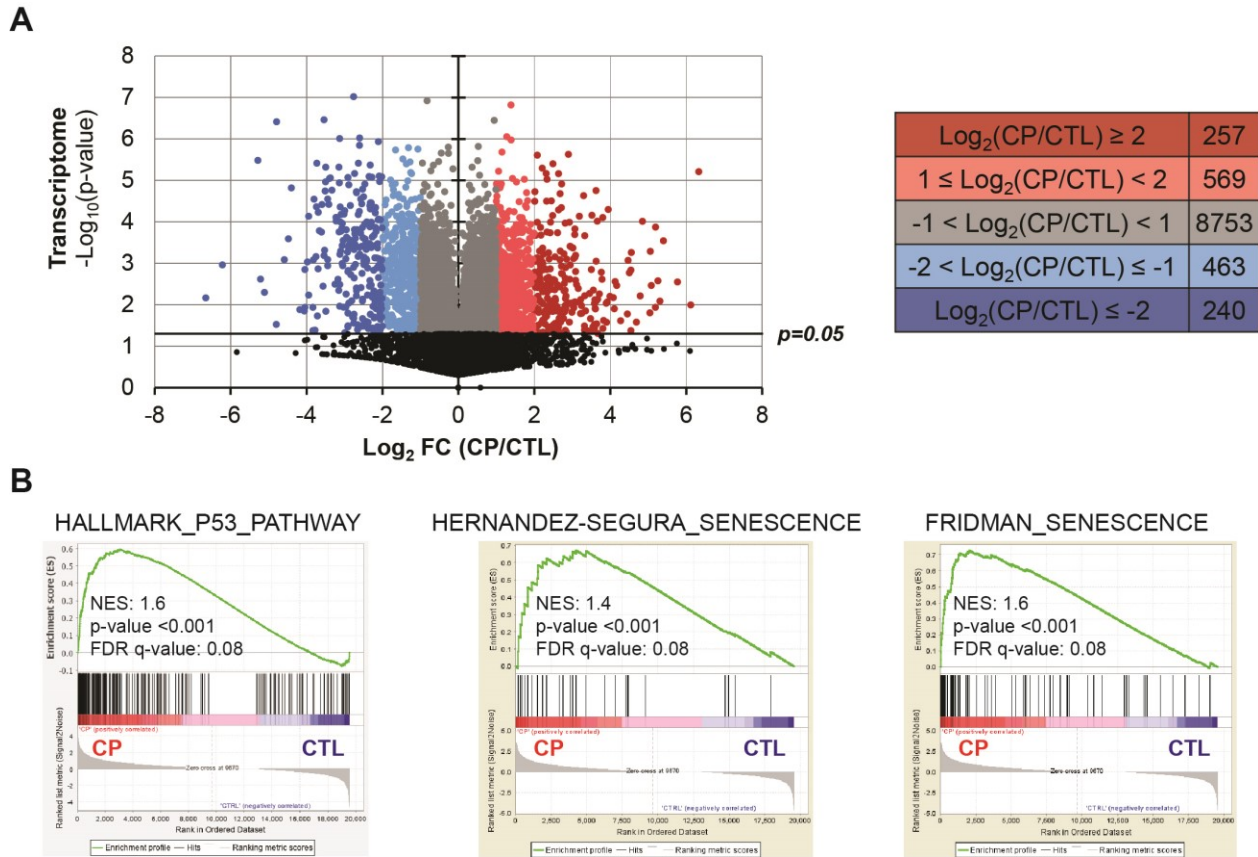


Figure 14. – Analyse transcriptionnelle des cellules TOV21G traitées ou non au CP

(A) Significativité des différents gènes identifiés par le transcriptome (p -valeur ≤ 0.05).
 (B) Analyse GSEA des résultats de transcriptome pour la voie de signalisation de p53 et deux signatures de sénescence publiées (Hernandez–Segura et al.⁴⁴⁹ et Fridman et al.⁴⁵⁰).

Nous avons ensuite soumis les listes des gènes pour lesquels les niveaux transcriptionnels étaient diminués ou augmentés 2 fois à une analyse g:Profiler⁴⁴⁶ (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). Ce type d'analyse permet d'identifier les gènes communs à

notre liste à des listes de gènes regroupés sous des noms, appelés termes GO (*Gene Ontology*). Les termes GO rassemblent les gènes ayant le même type de fonction, ou bien participants aux mêmes processus, voies de signalisation, etc. Ces termes GO sont eux-mêmes regroupés dans différentes catégories comme les processus biologiques ou les composants cellulaires par exemple. Pour la catégorie processus biologiques (*Biological processes*) (Figure 15A), les gènes pour lesquels le niveau transcriptionnel est diminué se rapportent à des termes GO liés au cycle cellulaire, à la mitose et à la ségrégation des chromosomes. C'est attendu sachant que les cellules sénescents ne prolifèrent pas. Pour les gènes dont le niveau transcriptionnel est augmenté, les termes GO indiquent qu'ils sont impliqués, entre autres, dans les processus de réponse aux stimulus, d'adhésion cellulaire, de régulation des mouvements des composants cellulaires, de l'activité catalytique et de la prolifération cellulaire. Les cellules étant traitées par des composés chimiothérapeutiques, l'augmentation transcriptionnelle de gènes liés aux réponses aux stimulus est plutôt attendue. De même, les termes comme adhésion cellulaire, régulation des mouvements des composants cellulaires et régulation de la prolifération cellulaire sont attendus pour des cellules sénescents. En effet, l'état de sénescence implique une forte régulation de la prolifération cellulaire puisque celle-ci est stoppée, ainsi que de fortes modifications internes de la cellule, impliquant une régulation des mouvements des composants cellulaires. Les cellules sénescents sont des cellules qui migrent peu²⁸⁰, supposant une adhésion cellulaire augmentée. Concernant les composants cellulaires (*Cellular components*) (Figure 15B), les gènes dont le niveau transcriptionnel était diminué se rapportaient à des termes GO liés aux chromosomes, au fuseau mitotique. C'était plutôt attendu comme les cellules ne prolifèrent plus. En revanche, les gènes dont le niveau transcriptionnel était augmenté suite au traitement CP appartenait à des listes se rapportant à une localisation liée à la surface cellulaire, à la membrane plasmique.

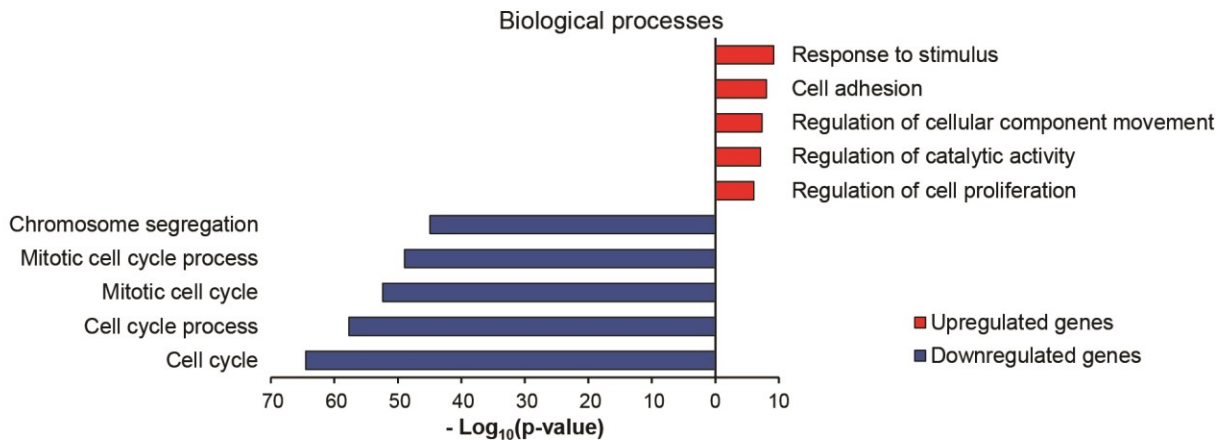
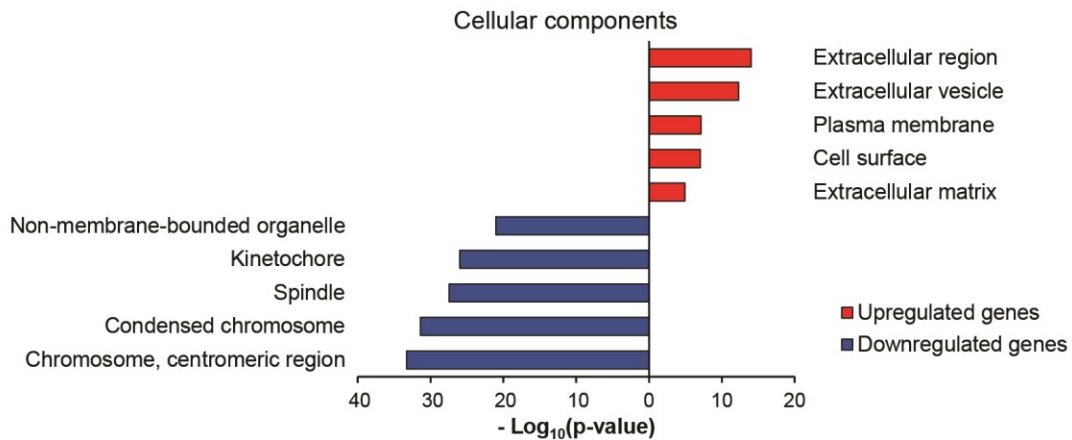
A**B**

Figure 15. – L’analyse des termes GO des changements transcriptionnels significatifs révèle un impact sur différents processus biologiques et au niveau de différents composants cellulaires.

Analyse g:Profiler des changements transcriptionnels significatifs de plus de 2 fois (niveaux augmentés en rouge et diminués en bleu) dans les cellules TOV21G traitées au CP en comparaison des cellules contrôles, vis-à-vis (A) des processus biologiques, (B) des composants cellulaires.

2.2. Analyse des changements transcriptionnels dans différents modèles de sénescence

Nous nous sommes demandés si cette caractéristique était observable dans d’autres modèles de sénescence. Nous avons donc étudié plusieurs transcriptomes réalisés sur différents modèles

de cellules, étant entrées en sénescence de différentes façons. Nous avons comparé les transcriptomes de différentes lignées de fibroblastes^{451,452} (BJ, IMR90, MRC-5, HFF, WI-38), de cellules endothéliales⁴⁵¹ (HAEC et HUVEC) et une lignée de liposarcome⁴⁵³ (LS8817), étant entrées en sénescence suite à un nombre élevé de passages en culture cellulaire, à l'introduction d'un oncogène (HRAS^{G12V}), à une exposition à des irradiations ou à des drogues comme la doxorubicine. Nous nous sommes intéressés aux gènes dont le niveau transcriptionnel était 2 fois plus important ou plus faible dans les cellules sénescents que les cellules contrôles et soumis ces listes à des analyses g:Profiler. La liste des termes GO communs a été obtenue en utilisant un diagramme de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Concernant les gènes ayant un niveau transcriptionnel diminué, nous nous sommes intéressés aux termes GO significatifs se rapportant aux processus biologiques (Figure 16A). Nous nous attendions à obtenir des termes GO liés au cycle cellulaire comme les cellules sont sénescents. Nous avons obtenu pour la majorité des modèles des termes GO comme prolifération de la population cellulaire, cycle cellulaire, division cellulaire et réplication de l'ADN. Les cellules sénescents, par définition, ne progressant pas dans le cycle cellulaire, ce résultat était attendu et va dans le sens des modèles cellulaires utilisés. Un autre terme GO était souvent partagé par les différents modèles, il s'agissait du terme « développement de système ». Ce terme regroupe les gènes impliqués dans les processus participant à la formation d'un organisme jusqu'à son stade mature. Ce terme GO est donc très général. Pour mieux comprendre pourquoi ce terme GO apparaissait dans notre analyse, nous avons étudié spécifiquement les gènes compris dans ce terme GO pour chaque transcriptome et soumis chaque liste réduite de gènes à la méthode d'analyse PANTHER (*Protein analysis through evolutionary relationships*) (<http://pantherdb.org/>). Cette méthode permet de classer les gènes ou protéines provenant d'analyses à haut débit, selon leur famille, leur fonction moléculaire, les processus biologiques et voies biologiques dans lesquelles ils sont impliqués. Nous souhaitions décortiquer le terme GO « développement de système » et avons donc regardé dans quelles voies biologiques étaient impliqués les gènes de chaque transcriptome dans ce terme GO. La voie biologique qui regroupait le plus de gènes à chaque fois et dans chaque liste réduite était la voie Wnt. La voie de signalisation Wnt est une voie

ayant un rôle dans la prolifération⁴⁵⁴, la différenciation⁴⁵⁵ et la survie des cellules⁴⁵⁶. Nous avons identifié certains gènes impliqués dans la voie Wnt (par exemple WNT2, HELLS et WNT7B) comme étant diminués dans plusieurs transcriptomes analysés et également identifiés comme diminués dans différentes publications étudiant la sénescence⁴⁵⁷⁻⁴⁵⁹. Nous pouvons donc supposer que le terme « développement de système » ressort dans cette analyse à cause des gènes impliqués dans la voie Wnt. Il pourrait ainsi être intéressant de regarder si la voie Wnt est effectivement diminuée dans les cellules TOV21G traitées au CP. Seule l'analyse du transcriptome des cellules de liposarcome traitées à la doxorubicine n'a pas donné de résultats à cause d'un trop faible nombre de gènes diminués de façon significative. Nous avons ensuite analysé les gènes dont le niveau transcriptionnel était augmenté de façon significative et retenu les termes GO liés aux composants cellulaires (Figure 16B). Tous les transcriptomes analysés avaient la même réponse, avec des termes GO significatifs comme surface cellulaire, périphérie cellulaire, membrane plasmique et composant de la membrane plasmique. Les termes GO significatifs qui ressortaient des analyses transcriptionnelles de différents modèles de sénescence étaient donc liés à la surface cellulaire.

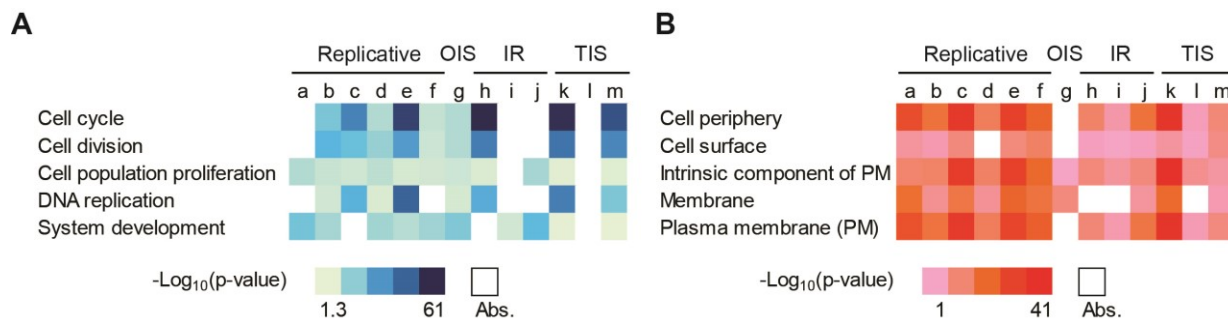


Figure 16. – L'analyse des termes GO des changements transcriptionnels en terme de processus biologiques et au niveau des composants cellulaires révèle des impacts identiques entre différents modèles de sénescence.

Analyse g: Profiler des changements transcriptionnels significatifs de plus de 2 fois vis-à-vis (A) des processus biologiques, (B) des composants cellulaires, d'après les transcriptomes publiés des études suivantes : Casella et al.⁴⁵¹ (a : IMR90, f : WI-38, sénescence répliquative ; g : WI-38 HRAS^{G12V}; h : HAEC, i : HUVEC, j : IMR90, irradiés ; k : WI-38 traités par doxorubicine) ;

*Marthandan et al.*⁴⁵² (*b* : BJ, *c* : HFF, *d* : MRC-5, *e* : WI-38, sénescence répllicative) ; *Kovatcheva et al.*⁴⁵³ (*l* : LS8817 traités par doxorubicine) et notre étude (*m* : TOV21G traités au CP).

3. Analyse des changements à la surface des cellules sénescents

L'étude de transcriptomes de cellules sénescents nous a indiqué que des changements avaient lieu à la surface des cellules sénescents. Nous avons voulu identifier les protéines dont l'enrichissement était modifié à la surface des cellules sénescents, en pensant qu'elles pourraient ensuite être utilisées pour mieux caractériser les cellules CIS, voir les cibler. Nous avons analysé le surfaceome des cellules sénescents à l'aide d'une technique de protéomique mise au point au laboratoire⁴⁴⁷ (Figure 17A). Cette technique consiste en la biotinylation spécifique des groupements amine primaires des protéines à la surface des cellules. Le réactif de biotine se fixe sur ces groupements et ensuite nous pouvons récupérer ces protéines biotinylées grâce à un enrichissement d'affinité avec des billes enrobées de streptavidine (Figure 17B). Après quelques lavages rigoureux, les protéines biotinylées sont découpées en peptides grâce à l'action enzymatique de la trypsine. Nous soumettons ensuite ces peptides à la plateforme de spectrométrie de masse pour réaliser une expérience de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Enfin il reste à quantifier les intensités de peptides obtenues et analyser à quelles protéines correspondent ces peptides. Nous utilisons une méthode de quantification dite sans étiquette car nous n'avons pas ajouté d'acides aminés lourds ou léger pour différencier nos conditions. Nous avons réalisé 3 répliques biologiques de chaque condition et en observant les intensités de peptides nous voyons que les répliques au sein de chaque condition se ressemblent et que les 2 conditions sont bien distinctes l'une de l'autre (Figure 17A). En effet, la composition protéique à la surface cellulaire est fortement modifiée après le traitement des cellules au CP (Figure 17C). Sur les 1377 protéines identifiées, près de la moitié (48,6%) d'entre elles voyait leur répartition à la surface cellulaire significativement modifiée après traitement. 246 protéines et 125 protéines à la surface étaient significativement augmentées ou diminuées de plus de deux fois, respectivement.

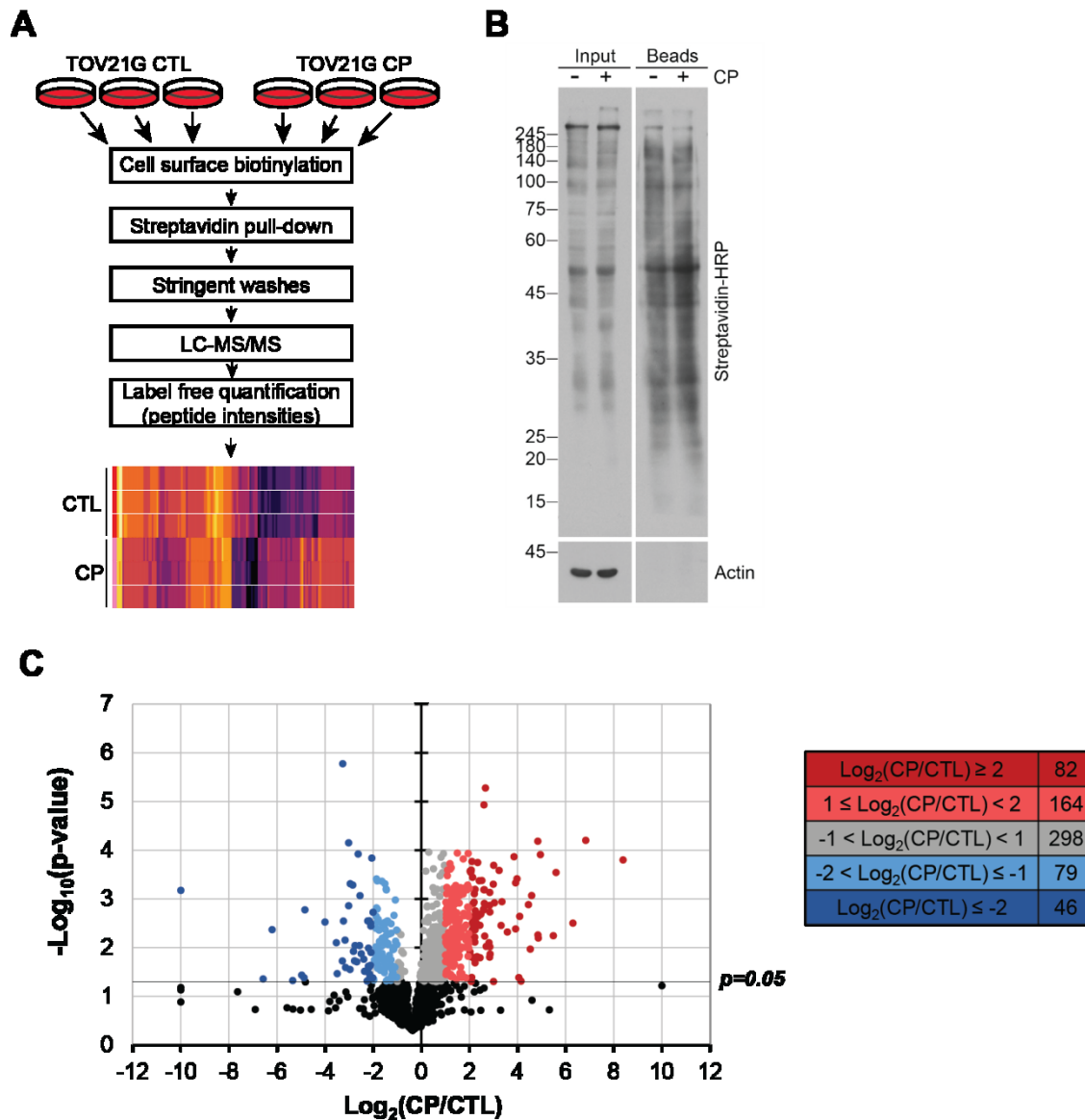


Figure 17. – La méthode du surfaceome permet l’identification de nombreux changements protéiques à la surface des cellules TOV21G traitées au CP.

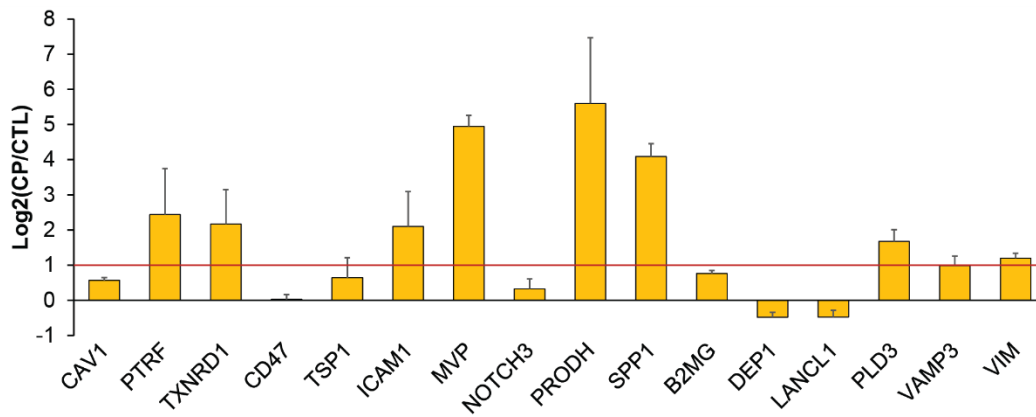
(A) Schéma du protocole de surfaceome. L’expérience est réalisée en triplicats pour chaque condition. Les cellules sont lavées puis incubées en présence d’un réactif spécifique de biotine. Les cellules sont ensuite lysées et nous récupérons les protéines biotinylées à l’aide d’un enrichissement d’affinité streptavidine-biotine. Les protéines biotinylées sont ensuite découpées en peptides suite à une exposition à la trypsine puis nous soumettons les peptides à une chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie en tandem. Les peptides sont alors

identifiés et en utilisant une base de donnée, permettant l'identification des protéines associées. L'intensité des peptides va donner une indication de l'abondance de la protéine associée. En comparant ces intensités entre les conditions, nous pouvons déduire de l'enrichissement ou non à la surface de cette protéine suite au traitement CP. (B) Immunobuvardage du lysat cellulaire de cellules contrôles ou traitées avant (input) ou après (billes) enrichissement d'affinité à la streptavidine-biotine. L'anticorps contre la streptavidine reconnaît les protéines biotinylées. (Image représentative, n=3). (C) Significativité des différentes protéines identifiées par le surfaceome (p -valeur ≤ 0.05).

Nous nous sommes demandés si ces changements étaient dus à des modifications transcriptionnelles. Cependant, en confrontant les valeurs des ratios CP/CTL du transcriptome avec ceux du surfaceome, la corrélation obtenue était très faible, de l'ordre de $R^2=0,2$. Les changements à la surface n'étaient donc pas uniquement expliqués par des changements transcriptionnels.

En étudiant les protéines identifiées dans ce surfaceome, nous nous sommes rendus compte qu'une signature de protéines déjà connues pour être impliquées dans la sénescence pouvait être distinguée (Figure 18A et B). Ces protéines ont été identifiées dans différents modèles de cellules sénescences : des cellules endothéliales, pulmonaires, d'artères, de sein, saines ou cancéreuses, chez l'homme ou la souris, *in vitro* ou *in vivo*. Certaines protéines sont connues pour promouvoir l'état de sénescence, comme la thrombospondin-1 (TSP1)⁴⁶⁰⁻⁴⁶² ou participer à son établissement comme la caveolin-1⁴⁶³⁻⁴⁶⁵ (CAV1) ou Notch3⁴⁶⁶, sa maintenance, comme la proline deshydrogénase⁴⁶⁷ (PRODH) ou la protéine de voute majeure⁴⁶⁸ (MVP), ou sa régulation comme cavin-1⁴⁶³ (PTRF, *Polymerase I and transcript release factor*). Certaines ont seulement déjà été identifiées dans d'autres modèles de sénescence comme étant augmentées à la surface, comme B2MG (*Beta-2 microglobulin*), DEP1, LANCL1 (*LanC like 1*), PDL3 (Phospholipase D3), VAMP3⁴⁶⁹, ICAM-1⁴⁷⁰ (*Intercellular adhesion molecule 1*) et la vimentine⁴⁷¹ (VIM). Nous avons également vérifié l'augmentation à la surface de certaines protéines par enrichissement d'affinité streptavidine-biotine suivi d'un immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre ces protéines (Figure 18C). Nous avons pris les exemples de PTRF et CAV1. PTRF est fortement enrichie à la surface de façon significative ($\text{Log}_2(\text{CP/CTL})=2,44$) alors qu'on observe une

diminution significative au niveau transcriptionnel de son gène ($\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})=-1,14$). CAV1 a une faible diminution significative au niveau transcriptionnel ($\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})=-0,19$) et la protéine est enrichie de façon significative à la surface ($\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})=0,57$). Nous avons pu observer par immunobuvardage que PTRF et CAV1 sont plus enrichis dans la fraction liée aux billes pour les cellules CP en comparaison aux cellules contrôles.

A**B**

Protein	Log ₂ (CP/CTL)	Authors	Journal	Year
CAV1 PTRF	CAV1 : 0.56 PTRF : 2.44	Bai et al	Cell Res	2011
CAV1 TXNRD1	CAV1 : 0.56 TXNRD1 : 2.16	Volonte and Galbiati	EMBO Rep	2009
CD47 TSP1	CD47 : 0.02 TSP1 : 0.64	Gao et al	Cell Death & Disease	2016
		Meijles et al	Sci Signal	2017
		Guillon et al	Cell Death & Disease	2019
ICAM1	0.19	Gorgoulis et al	Lab Invest	2005
MVP	4.94	Pasillas et al	MCP	2015
NOTCH3	0.32	Cui et al	Cancer Res	2013
PRODH	5.60	Nagano et al	J Cell Sci	2017
SPP1	4.08	Saker et al	ATVBAHA	2016
B2MG, DEP1, LANCL1, PLD3, VAMP3,	B2MG : 0.76 DEP1 : -0.48 LANCL1 : -0.48 PLD3 : 1.67 VAMP3 : 0.98	Althubiti et al	Cell Death & Disease	2014
VIM	1.2	Frescas et al	PNAS	2017

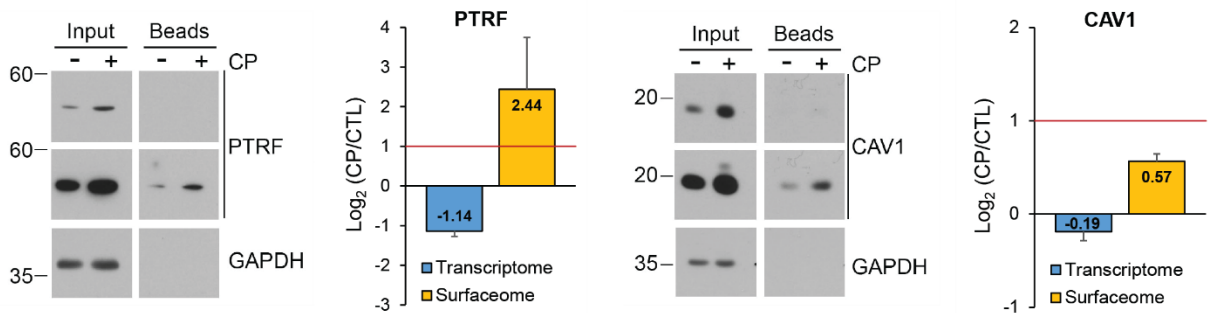
C

Figure 18. – Identification d’une signature de protéines connues pour leur implication dans la sénescence.

(A) Identification et valeur du surfaceome ($\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})$) de la signature de protéines connues pour leur implication dans la sénescence. (B) Tableau des références bibliographiques des protéines impliquées dans la signature de protéines connues pour leur implication dans la sénescence. (C) Immunobuvardage pour les protéines PTRF et CAV1 du lysat cellulaire de cellules contrôles ou traitées avant (input) ou après (beads) enrichissement d'affinité à la streptavidine-biotine (Images représentatives, $n=3$).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux processus biologiques dans lesquels étaient impliquées les protéines dont la présence avait été modifiée de façon significative suite au traitement CP en utilisant le logiciel g:Profiler (Figure 19). Les protéines dont la présence à la surface a été diminuée plus de 2 fois, de façon significative, sont des protéines impliquées en majorité dans les processus de transport transmembranaires de différentes molécules (acides aminés, acides organiques, acides carboxyliques), de migration cellulaire, de voies de signalisation depuis un récepteur de surface et du développement du système nerveux. Les protéines dont la présence à la surface a été augmentée plus de 2 fois de façon significative, sont des protéines impliquées en majorité dans les processus d'exocytose et de sécrétion, de l'immunité, de l'adhésion cellulaire, du développement du système nerveux, des transports de lipides et de l'import dans la cellule. Le fait que les termes GO soient liés à des processus de sécrétion est attendu car les cellules sénescents sécrètent de nombreuses molécules. Cette caractéristique est appelée phénotype associé à la sénescence (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*, SASP) et est responsable de l'impact des cellules sénescents sur leur microenvironnement.

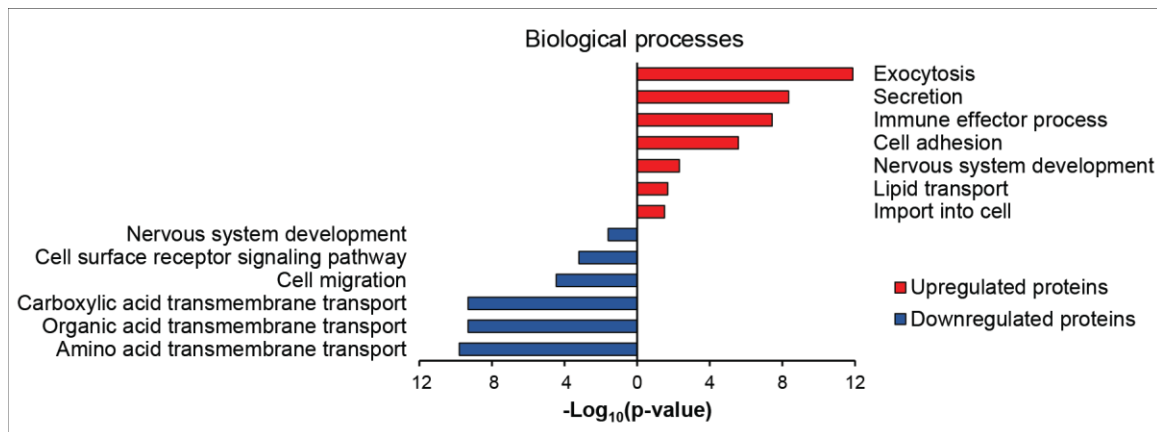


Figure 19. – L’analyse des termes GO liés aux protéines dont l’enrichissement est modifié à la surface après traitement CP révèle un impact sur différents processus biologiques.

Analyse g:Profiler des protéines dont le $\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})$ est inférieur à -1 (Downregulated proteins en bleu) ou supérieur à 1 (Upregulated proteins en rouge) et significatif ($p\text{-valeur} \leq 0.05$).

Nous avons ensuite restreint notre étude aux protéines dont la présence était augmentée à la surface cellulaire de plus de 4 fois, de façon significative (Figure 20). Nous avons utilisé le logiciel d’analyse STRING (<https://string-db.org>), qui permet de visualiser les interactions entre protéines et les appartenances de celles-ci à différents termes GO. Nous avons choisi de nous focaliser sur les protéines qui étaient contenues dans les listes reliées à la sécrétion, ce processus étant particulièrement important pour les cellules sénescents (SASP). Nous avons donc retenu les listes sécrétion, exocytose régulée et transport régulé par les vésicules, qui ont un taux de faux positif (*False Discovery Rate*, FDR) minimum, ici entre $8,81 \cdot 10^{-5}$ et $2,5 \cdot 10^{-4}$. Plusieurs protéines sont communes aux différentes listes. Cependant, une protéine nous a particulièrement intrigué car elle venait d’être identifiée dans un mécanisme de sécrétion mais hors d’un contexte physiologique⁴²⁵. Il s’agit de la protéine DNAJC5.

Secretion

FDR: $9,7 \cdot 10^{-4}$

Regulated exocytosis

FDR: $2,8 \cdot 10^{-4}$

Vesicle-mediated transport

FDR: $5,0 \cdot 10^{-3}$

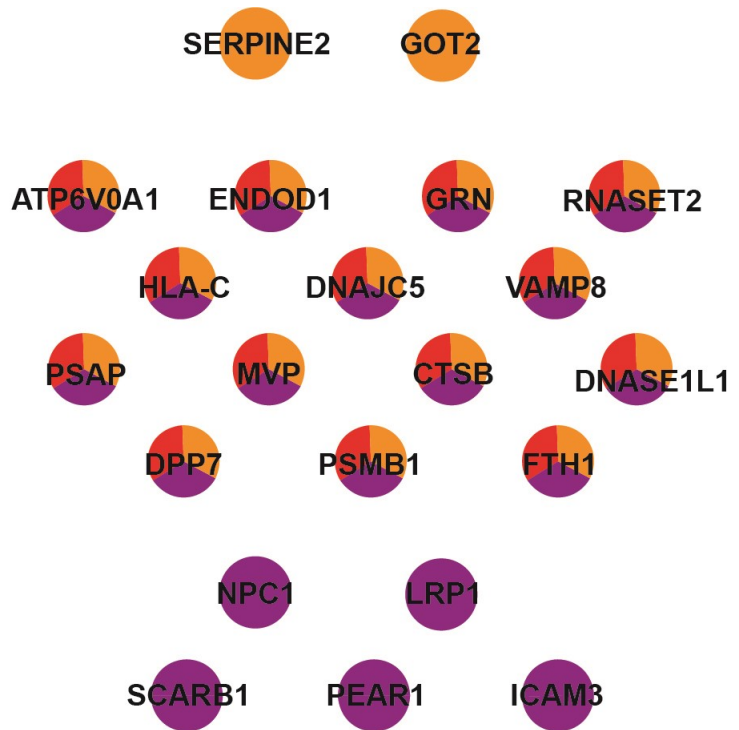


Figure 20. – Les protéines enrichies à la surface des cellules TOV21G traitées au CP sont impliquées dans des processus de sécrétion, d'exocytose régulée et de transport par les vésicules.

Analyse STRING des protéines dont le $\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})$ est supérieur à 2 et significatif ($p\text{-valeur} \leq 0.05$).

4. Étude du rôle de DNAJC5 dans les cellules sénescences

4.1. Validation des données et présentation des outils nécessaires pour l'étude

Nous avons donc choisi le candidat DNAJC5 pour notre étude. DNAJC5 a été identifié dans le transcriptome et le surfaceome (Figure 21A). Le niveau transcriptionnel de *DNAJC5* est légèrement augmenté, de manière significative ($\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})=0,37$), et sa présence à la surface est augmentée de plus de 4 fois ($\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})=2,19$), de façon significative. Dans un premier temps, nous avons cherché à valider ces résultats. En utilisant la technique de RT-qPCR nous avons pu confirmer la légère augmentation de l'expression de *DNAJC5* au niveau

transcriptionnel (Figure 21B). Un enrichissement d'affinité streptavidine-biotine suivi d'un immunobuvardage, nous a également permis de confirmer l'augmentation de la présence de DNAJC5 à la surface des cellules CP en comparaison des cellules contrôles (Figure 21C).

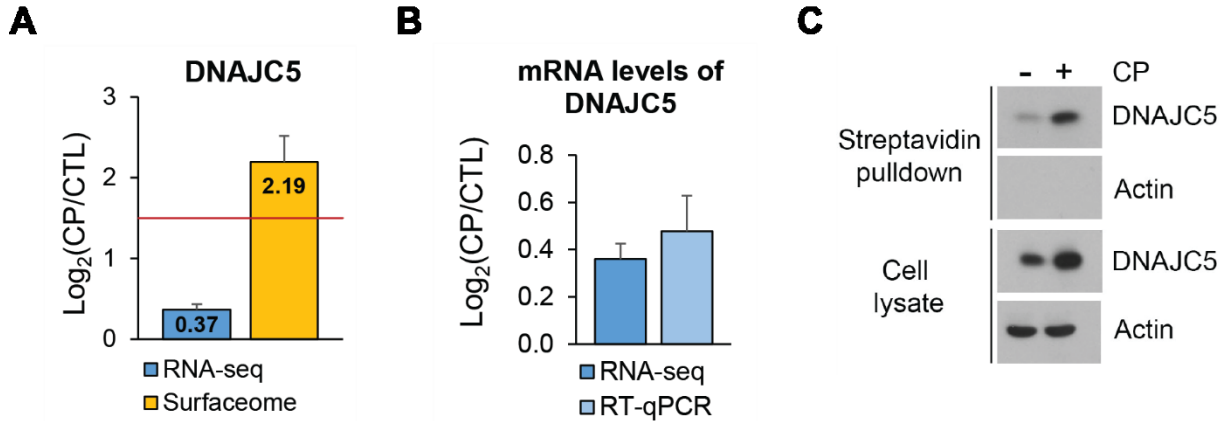


Figure 21. – DNAJC5 est enrichi à la surface des cellules sénescents.

(A) Valeurs de $\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})$ obtenues pour DNAJC5 lors des expériences de transcriptome et surfaceome. (B) Validation des niveaux transcriptionnels de DNAJC5 dans les cellules traitées en comparaison des cellules contrôles, réalisé par RT-qPCR. ($n=3$) (C) Validation de l'enrichissement à la surface de DNAJC5 par enrichissement d'affinité streptavidine-biotine suivi d'un immunobuvardage avec anticorps dirigés contre DNAJC5 et l'actine (contrôle de charge et contrôle de la fraction enrichie). (Image représentative, $n=3$)

Afin de mieux comprendre le rôle de DNAJC5 dans les cellules traitées au CP, nous avons choisi d'utiliser la méthode des petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) pour inhiber l'expression de DNAJC5 dans les cellules TOV21G traitées au CP. Sur 5 shRNAs testés, nous avons sélectionné les deux (#13 et #91) qui inhibaient le mieux l'expression de DNAJC5 (Figure 22A). Ils ciblent la région du 3'UTR, ce qui est également intéressant si nous souhaitons faire des expériences de sauvetage par la suite. Nous avons mis au point un protocole spécifique pour inhiber DNAJC5 dans notre modèle d'étude (Figure 22B). Les cellules sont infectées, sélectionnées et mises en plaques avant traitement, afin de mieux contrôler les paramètres d'ensemencement. Nous souhaitons également éviter d'avoir à décoller et mettre en plaque les cellules traitées, afin de les perturber le moins possible. L'infection est toujours réalisée avec le même lot de virus

congelé, ce qui participe à limiter au maximum les variations entre expériences. Nous avons vérifié dans un premier temps que l'inhibition de *DNAJC5* était toujours présente après le traitement des cellules par la combinaison CP, au niveau transcriptionnel par RT-qPCR (Figure 22C), et au niveau protéique par immunobuvardage (Figure 22D).

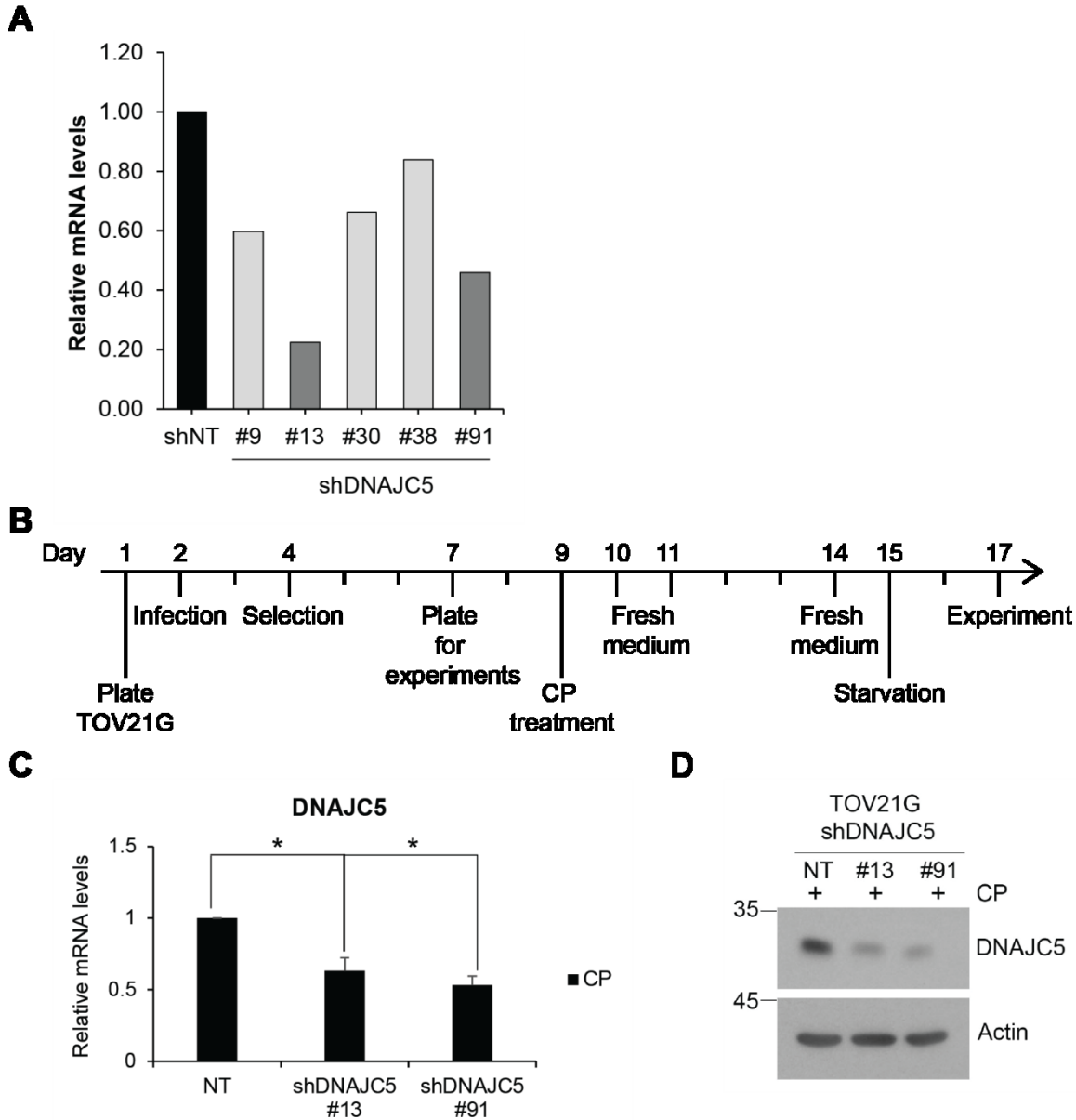


Figure 22. – Protocole et validation d'inhibition de l'expression de *DNAJC5* par shRNA.

(A) Analyse transcriptionnelle pour *DNAJC5* en présence d'un shRNA contrôle (shNT, sh non target) et de shRNAs dirigés contre *DNAJC5* dans les cellules TOV21G. La validation des niveaux

transcriptionnels de DNAJC5 se fait par RT-qPCR. (n=1) (B) Protocole d'inhibition de DNAJC5 dans notre modèle d'étude. (C) Validation au niveau transcriptionnel par RT-qPCR de l'inhibition de DNAJC5 par les shRNA choisis (shDNAJC5 #13 et #91), après traitement CP. (n=4) (D) Validation au niveau protéique par immunobuvardage de l'inhibition de DNAJC5 par les shRNAs choisis, après traitement CP. (Image représentative, n=9).

4.2. Rôle de DNAJC5 dans la sécrétion des protéines mal repliées dans les cellules sénescences.

La première hypothèse que nous souhaitions tester était de savoir si la plus forte présence de DNAJC5 à la surface des cellules suite au traitement CP était due à l'activation de la voie de sécrétion associée aux protéines mal repliées (MAPS). Comme décrit lors de l'introduction, DNAJC5 est un des composants principaux de cette voie de sécrétion⁴²⁵. Cette chaperonne conduit les protéines cytosoliques mal repliées depuis la surface du réticulum endoplasmique jusqu'à la surface extracellulaire, par l'intermédiaire de sa localisation sur les endosomes tardifs (Figure 23A). À la membrane plasmique, DNAJC5 est sécrétée, soit seule, soit en combinaison avec la protéine mal repliée qu'elle chaperonne. Il n'est pas encore clair si DNAJC5 peut également rester fixée à la membrane plasmique après avoir relâché la protéine mal repliée, pour être ensuite de nouveau internalisée. Nous devons donc nous assurer dans un premier temps que DNAJC5 était bien sécrétée par les cellules traitées au CP. Pour cela, nous avons utilisé un protocole de centrifugations successives (Figure 23B). Le milieu sans sérum était laissé sur les cellules pendant 48h, afin de le concentrer au maximum en protéines. Après récolte, il subissait une première centrifugation de 20 minutes à 2000g, permettant de se débarrasser des débris cellulaires et des grosses vésicules extracellulaires⁴⁷². Ensuite le surnageant était transféré dans un tube de concentration et centrifugé 3 fois à 4000g pendant 40 minutes. Ceci permettait de passer d'un volume d'environ 4mL à moins de 100µL, qui pouvait alors être dosé et préparé en échantillon pour immunobuvardage. Les échantillons peuvent être préparés de deux façons. La première, ensuite appelée « R CL » pour Ratio *Cell lysate* (ratio lysat cellulaire), consiste à préparer les échantillons de milieu conditionné en prenant en compte le ratio des concentrations protéiques des lysats cellulaires associés. Cette façon permet d'équilibrer le fait que les cellules produisent plus de protéines dans une condition que dans une autre. La

deuxième, appelée « R M » pour *Ratio Medium* (ratio milieu) consiste à préparer les échantillons avec une quantité protéique fixe selon les conditions. Cette méthode permet de comparer la sécrétion totale des cellules présentes dans la boîte. Nous avons soumis ce protocole au milieu conditionné de cellules TOV21G contrôles ou traitées au CP (Figure 23C). Dans la figure 23C, les échantillons ont été préparés selon la méthode R CL. Nous n'avons pas pu obtenir de figure pour la méthode R M à cause d'un bruit de fond de l'anticorps trop important sur les membranes. Nous avons pu observer par immunobuvardage que DNAJC5 était sécrétée par les cellules et que l'intensité de la bande spécifique est plus forte pour les cellules traitées au CP. Pour étudier le MAPS nous aurions aimé suivre une protéine mal repliée dans les cellules traitées au CP. Cependant, ces protéines sont actuellement inconnues. C'est pourquoi nous avons décidé d'induire l'expression d'une protéine qui se replie mal dans nos cellules. Nous avons utilisé 2 modèles différents, utilisés dans les articles décrivant le MAPS : la protéine GFP1-10 et la protéine α -synucléine. La protéine GFP1-10 est un variant tronqué de la GFP, manquant le dernier feuillet beta, ce qui perturbe son repliement. La protéine α -synucléine est une protéine connue pour mal se replier et former des fibres, ce qui participe par exemple à la dégénérescence neuronale dans la maladie d'Alzheimer. Nous avons établi des lignées stables exprimant la GFP1-10 ou l' α -synucléine. Nous avons ensuite récolté les milieux conditionnés des cellules traitées au CP ou non, pour observer la sécrétion des protéines mal repliées (Figure 23 D et E). Nous avons pu observer une sécrétion plus importante des protéines mal repliées pour les cellules traitées au CP, que les échantillons soient préparés selon la méthode R CL (Figure 23 Di) ou bien si la même quantité de milieu conditionné était chargée (méthode R M) (Figure 23 Dii et E).

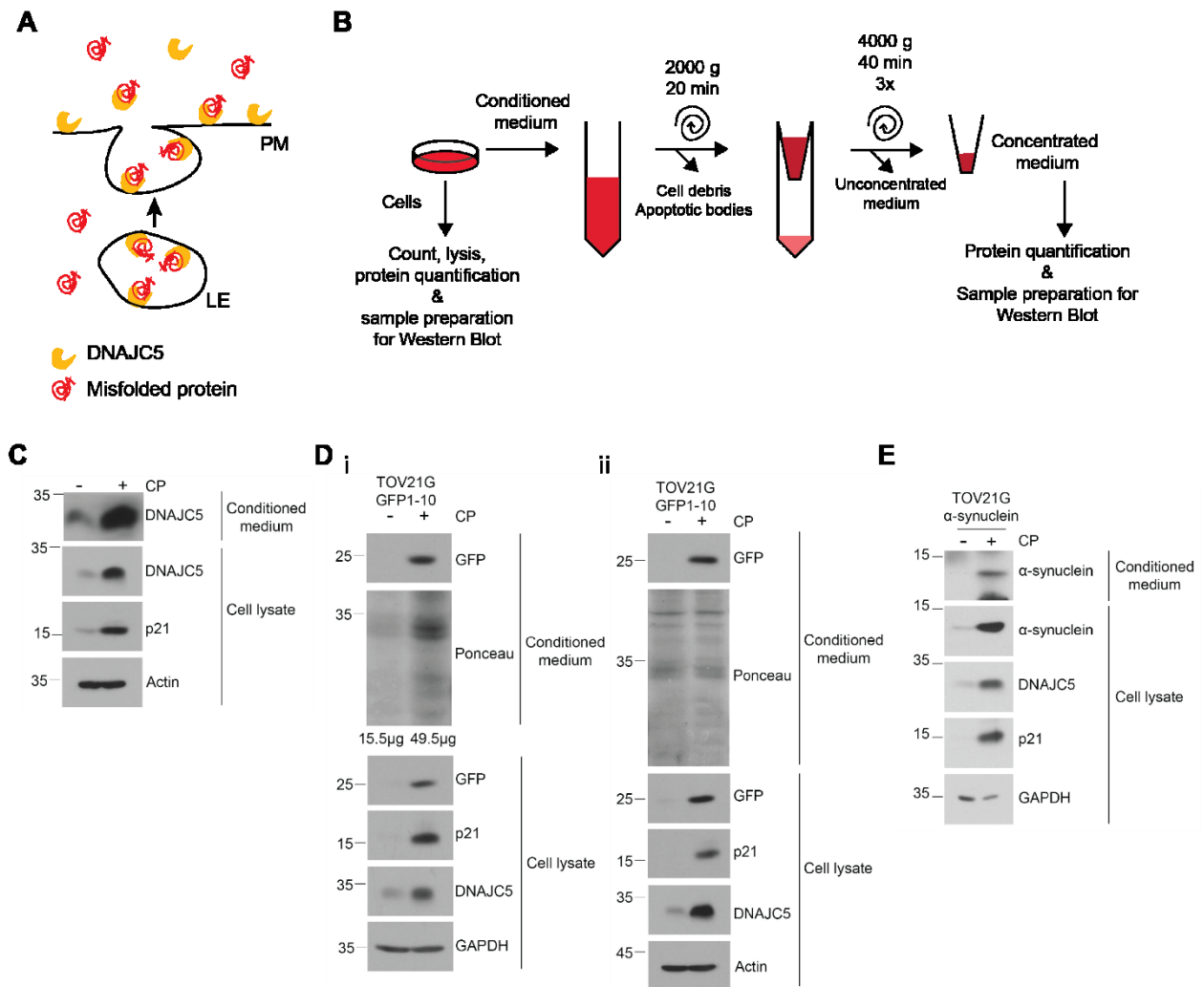


Figure 23. – Outils d'étude du MAPS et validation de la sécrétion de protéines mal repliées dans les cellules TOV21G après traitement CP.

(A) Schéma simplifié du MAPS. PM : membrane plasmique, LE : endosome tardif (late endosome). (B) Protocole de concentration du milieu conditionné. (C) Immunobuvardage du lysat cellulaire et du milieu conditionné de cellules TOV21G contrôles ou traitées au CP. Les échantillons du milieu conditionné ont été réalisés en prenant en compte le ratio des concentrations protéiques des lysats cellulaires (R_{CL}). (Image représentative, $n=3$) (D) Immunobuvardage du lysat cellulaire et du milieu conditionné de cellules TOV21G GFP1-10 contrôles ou traitées au CP. (i) Les échantillons du milieu conditionné ont été réalisés en prenant en compte le ratio des concentrations protéiques des lysats cellulaires (R_{CL}). (Image représentative, $n=4$) (ii) Les échantillons du milieu conditionné ont été réalisés en utilisant la

même quantité de protéine (R M). (Image représentative, n=3) (E) Immunobuvardage du lysat cellulaire et du milieu conditionné de cellules TOV21G α -synucléine contrôles ou traitées au CP. Les échantillons du milieu conditionné ont été réalisés en utilisant la même quantité de protéine (R M). (Images représentatives, n=3)

Nous avons ensuite utilisé notre protocole d'inhibition de l'expression de *DNAJC5* pour voir si cela modifiait la sécrétion des protéines mal repliées. Sachant que *DNAJC5* est un composant essentiel du MAPS, si cette voie de sécrétion était présente dans les cellules traitées au CP nous nous attendions à voir une diminution de la sécrétion des protéines mal repliées dans le milieu. Concernant le niveau protéique des protéines mal repliées au sein du lysat cellulaire, nous pouvions nous attendre à voir une augmentation de celui-ci si la sécrétion des protéines était inhibée. Nous avons soumis le milieu conditionné de cellules inhibées pour l'expression de *DNAJC5*, ou non, traitées au CP, au protocole de concentration. Nous avons préparé des échantillons contenant la même quantité de protéines. Nous avons parfois obtenu une diminution de la sécrétion de la protéine considérée pour un shRNA mais pas l'autre (figure 24Ai et ii, B ii et iii) ou même une augmentation de la sécrétion (figure 24Aiii), ou bien une diminution de la sécrétion (figure 24Bi). Les niveaux protéiques de la GFP1-10 ou de l' α -synucléine dans le lysat cellulaire étaient également modifiés par l'inhibition de *DNAJC5*, sans que nous puissions conclure si cela était dû à une modification de la sécrétion. Différentes hypothèses peuvent expliquer ces résultats : l'inhibition de *DNAJC5* n'est pas assez importante pour inhiber la sécrétion des protéines, il existe un autre système de sécrétion des protéines mal repliées, les protéines non sécrétées sont dégradées, les effets hors cibles des shRNA. Nous n'avons malheureusement pas pu obtenir une réponse claire concernant l'impact de l'inhibition de *DNAJC5* sur la sécrétion des protéines mal repliées, malgré des expériences répétées plusieurs fois. De plus, nous avons cherché à savoir si *DNAJC5* interagissait avec la GFP1-10, à l'aide d'expériences d'enrichissement d'affinité dans un sens ou dans l'autre. Nous n'avons pas observé d'interaction, après plusieurs expériences (données non montrées).

Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'activation du MAPS dans les cellules sénescentes, comme l'augmentation de *DNAJC5* à la surface cellulaire aurait pu le suggérer.

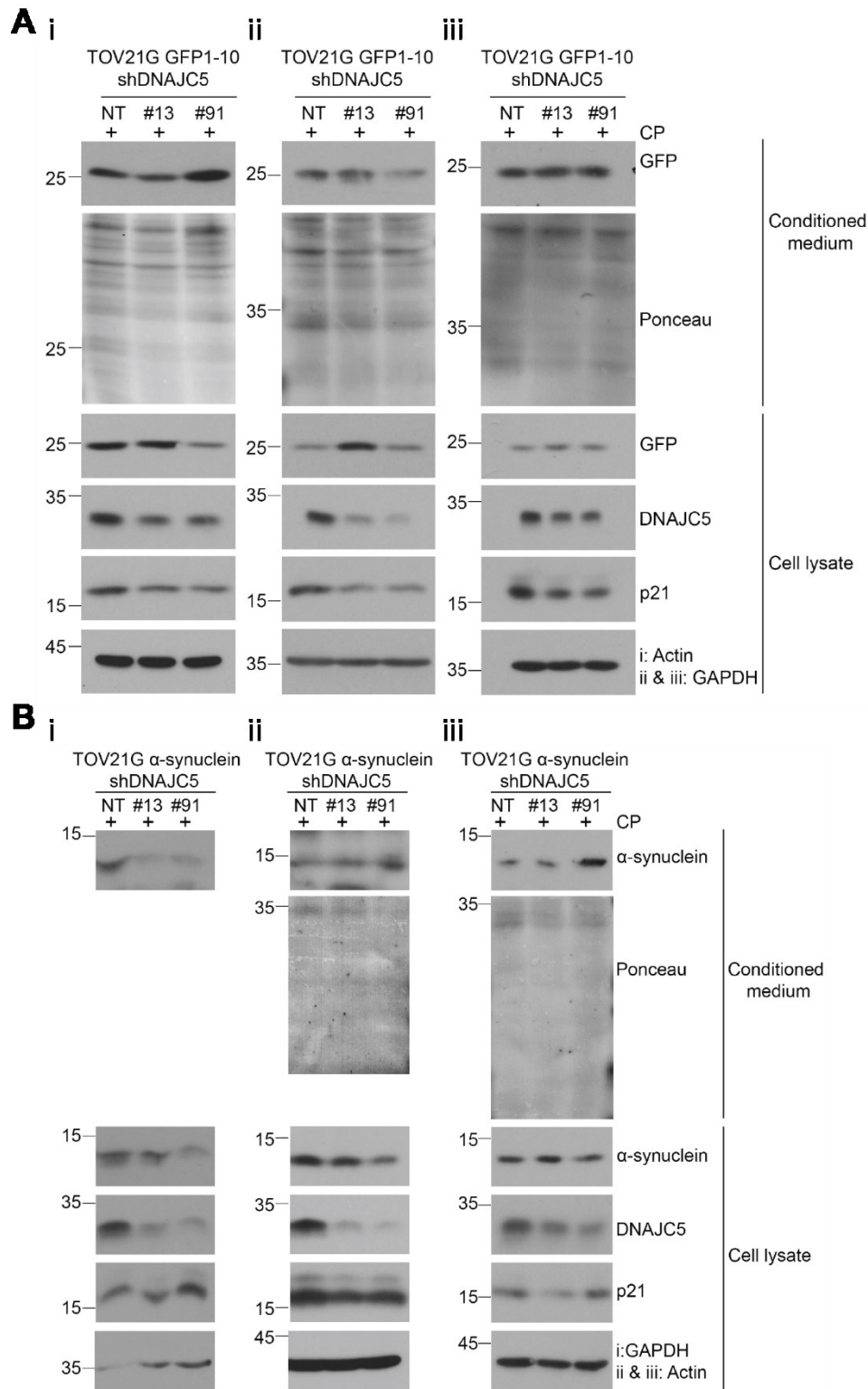


Figure 24. – Impact de l’inhibition de l’expression de *DNAJC5* sur la sécrétion des protéines mal repliées lors de la sénescence induite par le traitement CP des cellules TOV21G.

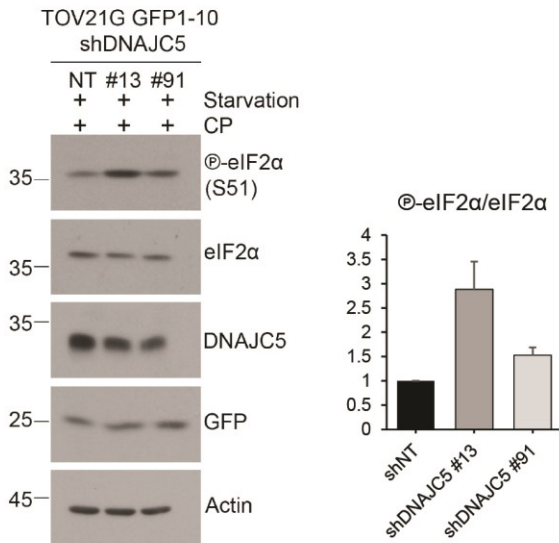
Immunobuvardage du lysat cellulaire et du milieu conditionné de cellules (A) TOV21G GFP1-10 ou (B) TOV21G α -synucléine contrôles ou traitées au CP. Les expériences sont indépendantes.

4.3. Rôle de DNAJC5 dans le maintien de l'homéostasie protéique

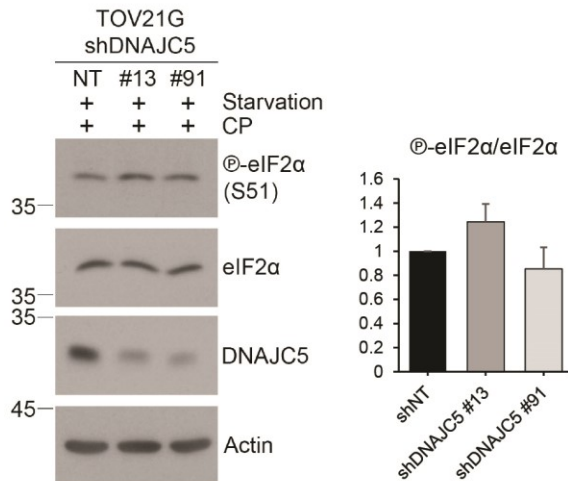
Une autre hypothèse que nous avions émise était que DNAJC5, étant une chaperonne et pouvant participer au processus du MAPS, participerait à réguler le stress protéique des cellules sénescentes. En effet, DNAJC5, en participant à la sécrétion de protéines mal repliées via le MAPS, contribue au maintien de l'homéostasie du protéome⁴⁰². Il est connu que les cellules sénescentes ont un stress protéotoxique plus important⁴⁷³. Il existe différentes voies de régulation du stress protéotoxique, comme, entre autres, le système d'ubiquitine-protéasome (UPS), la macro-autophagie, la voie des agrosomes ou la réponse intégrée de stress (ISR)⁴⁷⁴. Nous nous sommes focalisés sur cette dernière. Cette voie est activée en réponse à différents stress cellulaires, extrinsèques ou intrinsèques. Quatre kinases peuvent être activées selon le signal de stress considéré : GCN2 (*General control nonderepressible 2*) (déprivation en nutriments), PKR (Protéine kinase R) (infection virale), HRI (*Heme-regulated inhibitor*) (déprivation de l'hème) et PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*) (stress du réticulum endoplasmique). Cette activation va résulter en la phosphorylation de eIF2 α (*Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1*) sur sa sérine 51 puis induire la diminution globale de la traduction, sauf pour certaines protéines impliquées dans la réponse au stress⁴⁷⁵. Si DNAJC5 participait à réguler le stress protéotoxique, nous nous attendions à voir une augmentation de la phosphorylation de eIF2 α dans les cellules où l'expression de *DNAJC5* était inhibée. Nous avons regardé par immunobuvardage la modification d'intensité de phosphorylation de la protéine eIF2 α lors de l'inhibition de *DNAJC5*, dans les cellules exprimant (Figure 25A) ou non (Figure 25B et C) la GFP1-10. Les cellules exprimant la GFP1-10 contiennent plus de protéines mal repliées que les cellules parentales et donc potentiellement un stress protéotoxique plus élevé. Nous avons effectivement observé une tendance à l'augmentation de la phosphorylation de eIF2 α lorsque l'expression de *DNAJC5* était inhibée, et cette tendance était plus forte dans les cellules exprimant la GFP1-10 (A) en comparaison des cellules parentales (B). La tendance à l'augmentation était plus forte pour le shRNA #13 que le #91. Ces expériences ont été réalisées en condition sans sérum, ce qui peut provoquer un stress

protéotoxique chez les cellules et participer à l'activation de la voie eIF2 α . Nous avons donc réalisé également cette expérience dans les cellules parentales, en présence de sérum et nous avons retrouvé cette tendance à l'augmentation après inhibition de *DNAJC5*. *DNAJC5* pourrait donc participer au maintien de l'homéostasie protéique dans les cellules sénescents.

A



B



C

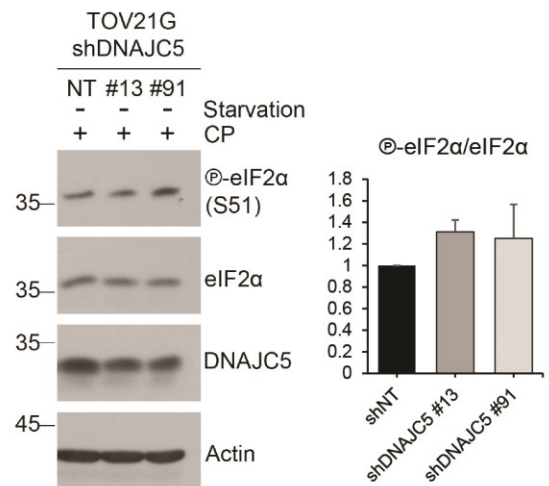


Figure 25. – Impact de l'inhibition de l'expression de *DNAJC5* sur une voie de réponse au stress protéotoxique.

(A) Immunobuvardage du lysat cellulaire de cellules TOV21G GFP1-10 en milieu sans sérum et graphique de densitométrie pour le ratio @-eIF2 α /eIF2 α (Image représentative, n=3). (B, C) Immunobuvardage du lysat cellulaire de cellules TOV21G GFP1-10 en milieu sans sérum (B) ou

avec sérum (C) et graphique de densitométrie pour le ratio $\text{p21}/\text{eIF2}\alpha$ (Image représentative, $n=3$).

4.4. Rôle de DNAJC5 dans l'établissement et/ou le maintien de l'état de sénescence

Enfin, nous nous sommes demandés si DNAJC5 participait à l'établissement et/ou au maintien de l'état de sénescence. Nous avons d'abord récupéré des lysats cellulaires à différents temps avant et après le traitement CP (Figure 26A). Nous avons observé par immunobuvardage que l'expression protéique de DNAJC5 augmentait graduellement en même temps que l'établissement de l'état de sénescence, repéré ici par l'intensité de la bande spécifique de p21. Nous avons ensuite regardé comment le niveau protéique de p21 évoluait après l'inhibition de DNAJC5. Nous avons pu observer par immunobuvardage une diminution de l'intensité de la bande spécifique de p21 après inhibition de DNAJC5. p21 étant une cible de p53, nous nous sommes demandés si cette augmentation pouvait être liée à une diminution de l'activité de p53. Pour cela, nous avons regardé par immunobuvardage l'intensité de la phosphorylation de p53 (Figure 26B). Nous observons une tendance à l'augmentation de la phosphorylation de p53 suite à l'inhibition de DNAJC5 mais la grande variabilité entre les expériences ne nous permet pas de conclure pour p53. La stabilisation de p53 peut induire l'apoptose. Nous avons compté manuellement après un test d'exclusion au bleu trypan le nombre de cellules vivantes avant traitement et 7 jours après le traitement dans des cellules où DNAJC5 avait été inhibé, ou non. Nous avons comparé les ratios du nombre de cellules vivantes à jour 7 sur le nombre de cellules vivantes avant traitement lorsque DNAJC5 était inhibé ou non (Figure 26C). Nous n'avons pas observé de différence entre les cellules inhibées ou non pour DNAJC5. Suite à l'observation de la diminution des niveaux protéiques de p21, nous nous sommes demandés si l'inhibition de DNAJC5 avait un impact sur le déroulement du cycle cellulaire. Nous nous sommes alors intéressés au niveau transcriptionnel de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire suite à l'inhibition de DNAJC5. Nous avons récolté les ARNm des cellules après inhibition de DNAJC5 et traitement au CP et réalisé une RT-qPCR (Figure 26C). Nous avons regardé les niveaux transcriptionnels de TP53, encodant pour la protéine p53 et ceux de CDKN1A, encodant pour la protéine p21. Les niveaux transcriptionnels de TP53 étaient plutôt stables. Concernant CDKN1A,

nous avons pu observer une diminution significative du niveau transcriptionnel pour le shRNA #13. Il y a seulement une tendance à la diminution pour le shRNA #91. Nous nous sommes ensuite intéressés aux niveaux transcriptionnels du gène de la cycline E1, *CCNE1*, qui régule le passage de la phase G1 à S, du gène de la cycline A2 (*CCNA2*), qui régule le passage de la phase S à G2 et du gène de la cycline B1 (*CCNB1*), qui régule le passage de la phase G2 à M. Nous avons pu observer une tendance à l'augmentation pour les niveaux transcriptionnels des 3 gènes considérés, et même une augmentation significative pour le shRNA #13 pour le gène de la cycline A2. Ces résultats suggèreraient que DNAJC5 a un rôle dans l'établissement et le maintien de l'état de sénescence.

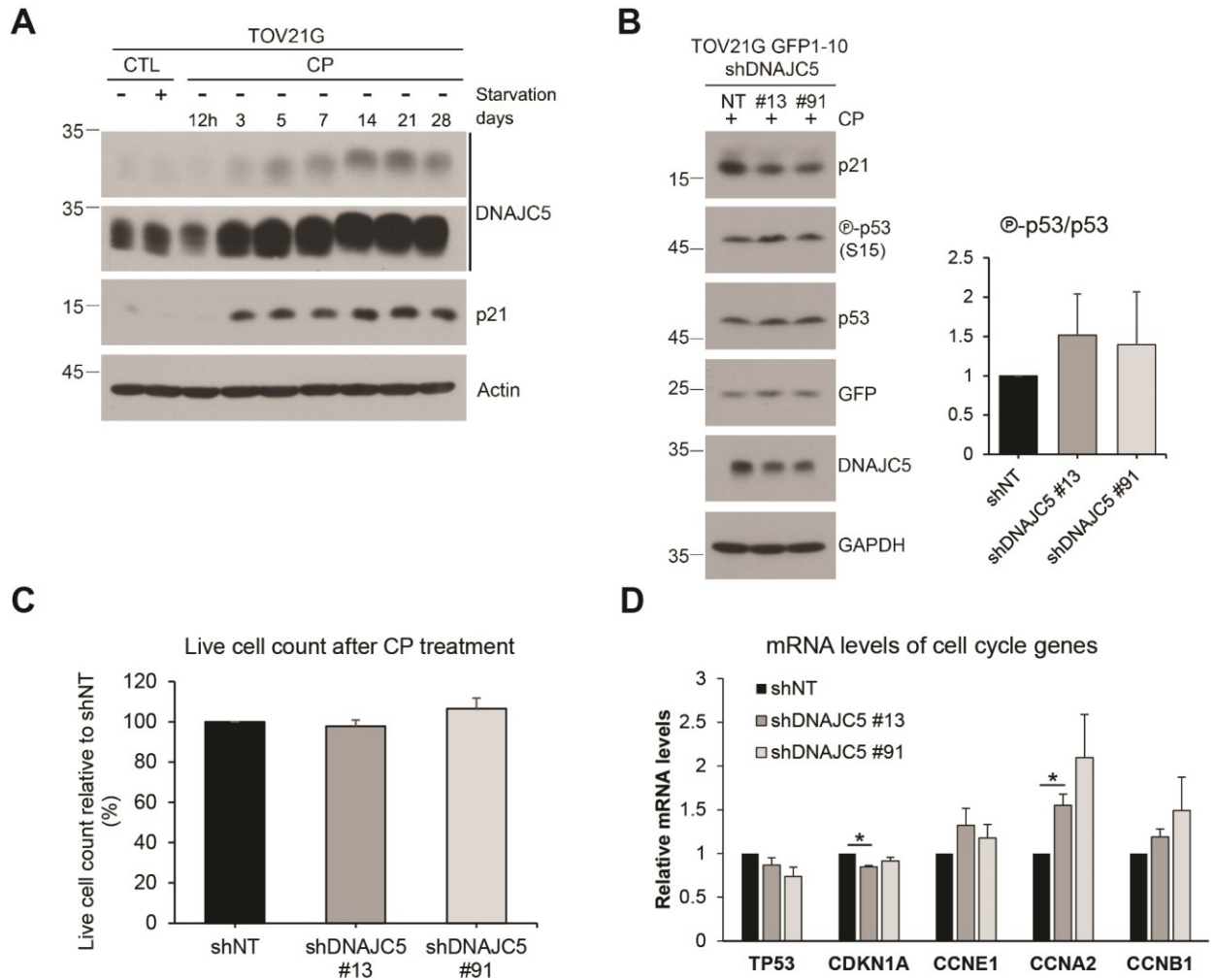


Figure 26. – L’expression de DNAJC5 est augmentée avec la sénescence et son inhibition impacte l’expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire mais n’impacte pas la survie.

(A) Immunobuvardage du lysat cellulaire de cellules TOV21G contrôles ou traitées, récupéré à différents temps après traitement (n=1). (B) Immunobuvardage du lysat cellulaire de cellules TOV21G GFP1-10 traitées et inhibées, ou non, pour DNAJC5 et graphique de densitométrie pour le ratio @-p53/p53 (Image représentative, n=3). (C) Comptage du nombre de cellules vivantes à jour 7 après traitement après test d’exclusion au bleu trypan, normalisé au nombre de cellules vivantes avant traitement et relatif au shNT (n=4). (D) Analyse des niveaux transcriptionnels de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, par RT-qPCR (n=3).

4.5. DNAJC5 est augmenté dans d'autres modèles de sénescence

Dans un dernier temps, nous nous sommes demandés si l'augmentation de DNAJC5 suite au traitement CP était restreinte à l'inducteur de sénescence, la combinaison CP, ou au type de cellules, les TOV21G. Nous avons donc utilisé des lysats cellulaires de l'équipe du Dr Francis Rodier (CrCHUM, Montréal) provenant de cellules TOV21G ou HCA2-hT, ces derniers étant des fibroblastes, entrées en sénescence après irradiation à 10 Gy (Figure 27). Nous avons pu observer par immunobuvardage une augmentation des niveaux protéiques de DNAJC5 dans les cellules irradiées, en comparaison des cellules contrôles. L'augmentation de DNAJC5 au niveau protéique est donc présente dans d'autres modèles de sénescence.

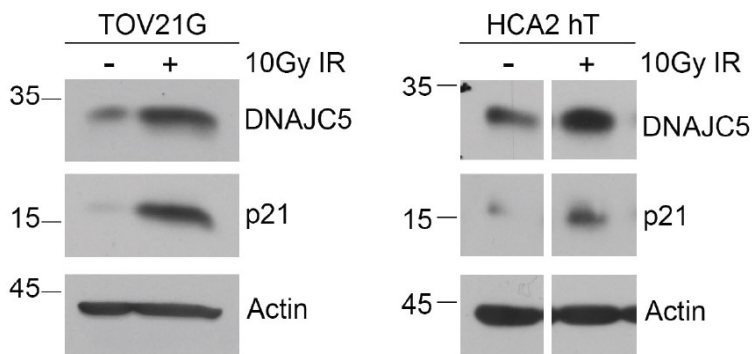


Figure 27. – Le niveau protéique total de DNAJC5 est augmenté dans les cellules TOV21G et HCA-2 hT après induction de la sénescence par irradiation.

Immunobuvardage du lysat cellulaire de cellules TOV21G ou HCA-2 hT, contrôles ou irradiées à 10Gy (n=1). Les échantillons ont été réalisés par le Dr Y.Zhan et le Dr N. Malaquin de l'équipe du Dr F. Rodier.

Chapitre 4 – Discussion

1. Rappel des résultats

Le cancer de l’ovaire à cellules claires est un cancer rare (6% des cas de cancers épithéliaux de l’ovaire) et dont le taux de survie aux stades avancés est très faible suite à la résistance aux traitements chimiothérapeutiques^{43,44}. Différents destins cellulaires s’offrent aux cellules traitées par la chimiothérapie. Elles peuvent mourir par apoptose, continuer de proliférer, arrêter temporairement de proliférer, entrer en catastrophe mitotique ou en sénescence²⁶. Les cellules sénescents ne se divisent plus mais restent métaboliquement actives. Elles sécrètent en particulier un mélange complexe de molécules appelé SASP^{206,208}. Le SASP est responsable de la plupart des impacts des cellules sénescents sur le microenvironnement. Cet impact peut être bénéfique ou délétère pour le patient, selon la composition du SASP^{28,323,476}. Une stratégie thérapeutique a donc émergé ces dernières années, afin d’utiliser le côté positif des cellules sénescents, tout en essayant de minimiser leur impact sur le microenvironnement. La stratégie « crochet-uppercut » consiste à induire la sénescence dans les cellules cancéreuses, permettant la maîtrise de la croissance tumorale, puis à supprimer spécifiquement ces cellules sénescents afin d’éviter tout effet délétère sur le patient²². Connaître parfaitement le fonctionnement et les caractéristiques des cellules sénescents induites par la chimiothérapie est donc indispensable pour pouvoir cibler ces cellules et proposer de nouvelles combinaison thérapeutiques. La majorité (66%) des drogues approuvées répertoriées dans la base de données DrugBank⁴⁷⁷ (<https://go.drugbank.com/>) cible des molécules de surface⁴⁷⁸. Partant de ces constats, nous avons étudié les changements à la surface de cellules SIC dans un modèle de COCC.

Nous avons commencé notre étude en mettant en place un modèle de sénescence induite par la chimiothérapie dans le cancer de l’ovaire à cellules claires. Sept jours après un traitement de 12h de carboplatine et paclitaxel, les cellules TOV21G montraient des caractéristiques représentatives de la sénescence. Les cellules avaient changé de morphologie, elles étaient arrêtées à la phase G2 du cycle cellulaire, surexprimaient p21 et possédaient une activité β -galactosidase associée à la sénescence cellulaire. Nous avons ensuite réalisé une analyse transcriptomique de ces cellules sénescents en comparaison aux cellules contrôles. Avec une

analyse globale des résultats, nous avons observé que de nombreux changements semblaient se produire à la surface cellulaire. Nous avons alors effectué une analyse protéomique des protéines de surface des cellules traitées au CP et des cellules contrôles. Effectivement, de nombreux changements avaient lieu à la surface des cellules : 246 et 125 protéines étaient respectivement augmentées ou diminuées, de façon significative, à la surface des cellules sénescents. Une analyse globale des processus dans lesquels étaient impliquées les protéines augmentées à la surface nous a appris que plusieurs participaient aux mécanismes de sécrétion. La protéine DNAJC5, une chaperonne contribuant au transport des protéines cytoplasmiques mal repliées par l'intermédiaire du MAPS, nous a particulièrement intéressés. Nous avons cherché à savoir si le MAPS était actif dans les cellules traitées au CP. Nous avons montré que DNAJC5 était effectivement surexprimée dans les cellules sénescents et également sécrétée. Suite à la création de lignées cellulaires exprimant des protéines modèles ayant tendance à mal se replier (GFP1-10 et α -synucléine), nous avons confirmé que ces protéines pouvaient être sécrétées dans notre modèle d'étude. Afin d'observer l'importance de DNAJC5 dans la sécrétion de ces protéines, nous avons inhibé l'expression de *DNAJC5* par shRNA dans ces lignées cellulaires. Suite à l'obtention de résultats contradictoires, nous n'avons pas pu conclure sur l'activation du MAPS dans les cellules sénescents. De façon intéressante, nous avons constaté que l'inhibition de *DNAJC5* augmentait la phosphorylation de eIF2 α mais aussi diminuait les niveaux protéiques et transcriptionnels de p21. Les niveaux protéiques et transcriptionnels de p53 n'étaient, eux, pas modifiés. Nous avons également étudié les niveaux transcriptionnels de différents gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Nous avons observé une tendance à la hausse pour les niveaux transcriptionnels des gènes *CCNE1*, *CCNB1* et en particulier de *CCNA2*. Enfin, nous avons montré que DNAJC5 était également surexprimée dans d'autres modèles de sénescence.

2. Les cellules TOV21G entrent en sénescence après le traitement CP

Lorsque les patientes sont prises en charge pour un COCC de stade 3 ou plus, la survie à 5 ans est très faible à cause des résistances aux traitements et l'absence de thérapie ciblée⁴⁴. La stratégie thérapeutique n'a pas changé depuis de très nombreuses années (combinaison de carboplatine et paclitaxel), et appelle donc à de nouvelles propositions. Nous utilisons une

lignée de COCC de stade III provenant d'une patiente encore jamais traitée à la chimiothérapie¹⁴⁴, nous permettant d'étudier l'impact de la combinaison utilisée en clinique au niveau cellulaire et moléculaire. Nous avons montré que ces cellules entrent en sénescence suite au traitement par la combinaison chimiothérapeutique (Figure 11-15). En observant les cellules TOV21G la journée suivant le traitement, nous avons également observé que certaines cellules étaient mortes. Afin de compléter notre étude nous pourrions quantifier le nombre de cellules mortes après le traitement par un marquage à l'annexine V et au iodure de propidium en cytométrie en flux. Le traitement CP induirait donc une combinaison de réponses cellulaires dans les cellules CP. Te poele et al. ont été les premiers à observer des cellules sénescents dans des coupes de tumeurs de patientes traitées par de la chimiothérapie¹⁵⁴. Demaria et al., en utilisant un modèle murin, ont montré que les cellules sénescents peuvent participer à la rechute du patient²⁸. L'entrée en sénescence des cellules de COCC suite au traitement utilisé en clinique pourrait participer à expliquer le fort taux de rechute des patientes après traitement. Il serait intéressant d'étudier la présence de marqueurs de la sénescence dans des coupes de tumeurs de patientes traitées au CP.

Les cellules TOV21G ne sont pas mutées pour *TP53*. Nous observons effectivement que la protéine p53 est stabilisée et phosphorylée après le traitement CP (Figure 12B). Nous retrouvons une forte augmentation du niveau transcriptionnel et protéique de p21 dans ce modèle, une cible de p53 (Figure 12B-C). Enfin, nous retrouvons une signature de la voie de p53 dans l'analyse du transcriptome (Figure 14B), indiquant que l'arrêt de prolifération se fait probablement via la voie p53/p21 dans notre modèle. Nous pourrions confirmer cela en inhibant p53 dans notre modèle à l'aide d'une stratégie par ARN interférent (shTP53). Nous observerions ensuite s'il y a des différences entre les lignées TOV21G shNT et shTP53 pour différents marqueurs de la sénescence, dont l'arrêt du cycle cellulaire et l'expression protéique et transcriptionnelle de p21. Si l'entrée en sénescence se fait bien par la voie p53/p21, nous devrions observer une diminution de l'expression des marqueurs de sénescence dans les cellules TOV21G shTP53 en comparaison des cellules NT.

Nous ne pouvons pas réellement conclure pour l'augmentation du niveau de p16 car nous avons observé le niveau transcriptionnel de *CDKN2A*, qui code pour plusieurs protéines (Figure 12C).

L'utilisation de sondes spécifiques pour p16 serait nécessaire, ainsi qu'une vérification par immunobuvardage.

Les analyses globales par GSEA de signatures publiées^{449,450} valident bien notre modèle de sénescence (Figure 14B). Pour réaliser nos *heatmaps* (cartes en dégradé de couleurs), nous avons choisi différents modèles de sénescence, provenant de laboratoires différents, avec des types cellulaires et inducteurs différents (Figure 16). L'analyse globale des gènes diminués dans les cellules sénescents donne des termes GO liés au cycle cellulaire. Nous n'avons pas pu obtenir de termes GO pour le transcriptome de Kovatcheva et al.⁴⁵³ car le nombre de gènes diminués était trop faible. Les termes GO reliés aux gènes augmentés dans le transcriptome ont rapport à la surface cellulaire dans tous les modèles.

3. De nombreux changements ont lieu à la surface des cellules sénescents

L'analyse des protéines de surface (surfaceome) est un défi de par la rareté des protéines de surface (14.3%) en comparaison des protéines cytoplasmiques⁴⁷⁸. Réussir à extraire de la bicouche lipidique certaines protéines de surface très hydrophobes (récepteurs aux protéines G avec 7 domaines transmembranaires, par exemple) demande un détergent assez fort pour l'extraction, et doux pour ne pas détruire les autres protéines. Nous avons utilisé le triton X-100, un détergent non-dénaturant (contrairement au SDS par exemple) qui s'associe aux parties hydrophobiques des protéines, permettant leur extraction grâce à la création de micelles. Pour notre analyse de surfaceome, nous avons utilisé la méthode de biotinylation de surface (CSB pour *cell surface biotinylation*) (Figure 17). Cette méthode est dite sans étiquette car nous n'utilisons pas de milieu avec des acides aminés lourds ou légers comme dans le SILAC (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*). La biotine va être appliquée sur les cellules à froid, ce qui évite son internalisation car les processus d'endocytose seront arrêtés. La biotine sera donc restreinte aux protéines de surface, qui seront enrichies après la lyse par la capture d'affinité streptavidine-biotine. Notre étude est ainsi une des premières à isoler spécifiquement les protéines de surface de cellules sénescents en comparaison des études publiées qui utilisaient préférentiellement des kits d'extractions des membranes, sans les distinguer⁴⁷⁹. La

spectrométrie de masse va nous permettre d'identifier les protéines situées à la surface plasmique. Celles-ci peuvent être transmembranaires (récepteur...), associées à la membrane (ancres glycosylphosphatidylinositol...) ou associées à des protéines de surface (ligand lié à son récepteur, ou lié au glycosylphosphatidylinositol). Le CSB est une méthode semi-quantitative car elle nous permet de comparer deux conditions (ou plus) sans donner d'information sur la quantité précise d'une protéine particulière à la membrane. Nous avons choisi de sélectionner les protéines ayant été identifiées avec 2 peptides uniques minimum pour une identification robuste. Les cellules sénescents sont plus volumineuses que les cellules contrôles. Afin de minimiser ce biais, nous avons normalisé chaque intensité par la somme des intensités de la condition considérée, ce qui revient à une normalisation par rapport à la quantité de protéines totales. Cette méthode permet de sous-estimer les augmentations en comparaison d'une méthode qui normaliserait par cellule.

Au sein des protéines identifiées, nous avons retrouvé une liste de protéines déjà connues pour avoir un rôle dans la sénescence (Figure 18). Il est à noter que certaines protéines identifiées à la surface de cellules sénescents ne l'ont pas été dans notre étude. Par exemple, Kim et al. ont montré que DPP4 était surexprimé à la surface de fibroblastes dans un modèle de sénescence répliquative⁴⁷⁹. Cela pourrait s'expliquer par la différence de type cellulaire et d'inducteur considéré. Nous pouvons suggérer un panel restreint de protéines enrichies à la surface des cellules sénescents de plus d'une fois par rapport aux cellules contrôles. Cette signature comporterait les protéines suivantes : CAV1, PTRF, TXNRD1, TSP1, MVP, PRODH, SPP1, B2MG, PDL3, VAMP3 et VIM. Il serait intéressant de réaliser des surfaceomes avec la technique du CSB dans d'autres modèles de sénescence afin de confirmer l'existence d'une signature commune de protéines de surface. Cette expérience nous permettrait aussi de créer des signatures de protéines de surface dans chaque type de sénescence (répliquative, OIS, SIC..). Ces signatures seraient un nouveau moyen d'identifier les cellules sénescents. Ces signatures pourraient être utilisées sur des coupes de tissus en utilisant par exemple la technique d'immunofluorescence cyclique, qui permet de visualiser jusqu'à 60 protéines différentes sur une seule coupe de tissu⁴⁸⁰.

Lors de notre étude, nous avons choisi de nous focaliser sur les protéines augmentées à la surface cellulaire. Néanmoins, les protéines diminuées à la surface cellulaire nous apprennent aussi beaucoup. Nous avons par exemple observé que de nombreux transporteurs de solutés (SLC, *solute carrier*) étaient diminués à la surface des cellules sénescences. Cette famille de transporteurs contient 400 gènes impliqués dans le transport d'acides aminés, acides gras, neurotransmetteurs, ions inorganiques et de sucres⁴⁸¹. Cette observation amène différentes questions. Si les acides aminés ne transitent plus par des transporteurs membranaires, quelle(s) voie(s) empruntent-ils ? Comment la cellule sénescence se procure les blocs de constructions nécessaires à la fabrication des protéines, qu'elle produit en quantité importante pour le SASP ? Les transporteurs diminués, ou au contraire, ceux qui ne sont pas diminués, concernent-ils certains acides aminés en particuliers ? Cela pourrait indiquer une dépendance (ou non) à une voie de métabolisme particulière. Ogiwara et al. ont récemment montré que l'expression de *SLC7A11* était fortement diminuée dans les cancers déficients pour ARID1A¹³⁷. Ce transporteur permet l'import de la cystine dans la cellule, qui une fois transformée en cystéine, participera au métabolisme du glutathion, une molécule antioxydante. Cette voie métabolique évite l'accumulation de ROS dans la cellule. La diminution d'expression du transporteur diminue la quantité de cystéine à entrer dans la cellule. La voie métabolique du glutathion ne fonctionne alors plus à son plein potentiel, induisant une accumulation des ROS dans la cellule. Cela devient une vulnérabilité pour la cellule, qui peut alors être tuée par des inhibiteurs de la voie métabolique, dans le principe de la stratégie « crochet-uppercut »¹³⁷. Le COCC est un cancer déficient pour ARID1A dans 40 à 67% des cas^{43,53,62,79,482}. Les cellules TOV21G, des cellules de COCC, sont déficientes pour ARID1A¹⁴⁵. Nous avons trouvé dans l'analyse de notre surfaceome que *SLC7A11* est effectivement l'un des SLC les plus diminués à la surface des cellules traitées au CP. Il serait intéressant de voir si la diminution de ces transporteurs à la membrane est une caractéristique des cellules sénescences et si elle participe à l'arrêt du cycle cellulaire ou en est une conséquence.

Les termes GO fortement enrichis dans notre analyse des protéines augmentées à la surface sont, entre autres, sécrétion, exocytose régulée et transport médié par les vésicules (Figure 19). Ce résultat n'est pas très surprenant, étant donné que les cellules sénescences sécrètent le

SASP. Le SASP, de par la multitude des molécules qui le compose, est responsable de la majorité des impacts des cellules sénescentes sur leur microenvironnement³²³. En savoir plus sur les voies de sécrétion liées au SASP permettrait donc de trouver des moyens d'inhiber ces mécanismes, orienter la composition du SASP et en conséquence, ses effets. La majorité des protéines identifiées appartiennent à ces termes GO parce qu'elles sont elles-mêmes sécrétées, comme SERPINE2⁴⁸³ (*Serine proteinase inhibitor, clade E member 2*), CTSB⁴⁸⁴ (*Cathepsin B*), FTH1⁴⁸⁵ (*ferritin heavy chain 1*) (Figure 20). VAMP8 et DNAJC5, en revanche, ont été identifiées comme étant nécessaires à certaines voies de sécrétion (Figure 20). VAMP8 est une protéine SNARE, participant au mécanisme de fusion des vésicules intracellulaires à la membrane^{379,486-488}. DNAJC5 est une chaperonne impliquée dans le processus d'exo- et endocytose^{428,432,437,489,490}. Elle est aussi un composant clé d'une nouvelle voie de sécrétion non-conventionnelle, encore non identifiée dans la sénescence, qui nécessite VAMP8^{402,425}.

4. La surexpression de DNAJC5 pourrait indiquer une activation du MAPS

Comme vu dans l'introduction, les protéines ayant une séquence signal sont sécrétées par la voie de sécrétion conventionnelle dans la majorité du temps. Les protéines n'ayant pas de séquence signal, comme IL-1 β , sont sécrétées par les voies de sécrétion non-conventionnelles³⁸⁷. DNAJC5 est une protéine impliquée dans la voie de sécrétion non-conventionnelle du MAPS⁴²⁵. DNAJC5 est localisée à la membrane des endosomes tardifs, lysosomes et à la membrane plasmique⁴²⁵. Nous avons montré avec le surfaceome et vérifié par une biotinylation de surface suivie d'une purification d'affinité streptavidine-biotine et d'un immunobuvardage, que DNAJC5 était enrichie à la surface des cellules sénescentes (Figure 21). Nous avons observé que la quantité totale de protéine DNAJC5 était également augmentée dans le lysat des cellules sénescentes. L'augmentation de présence de DNAJC5 à la membrane plasmique peut être due à cette augmentation de protéine totale, mais n'exclut pas un recrutement spécifique de DNAJC5 à la membrane plasmique. Nous aurions souhaité ajouter une expérience d'immunofluorescence pour observer la localisation de DNAJC5 dans les cellules sénescentes en comparaison des cellules contrôles. Cette expérience est en cours

d'optimisation. DNAJC5 peut être localisé au niveau des lysosomes⁴²⁵. L'augmentation de DNAJC5 pourrait être liée à l'augmentation de la masse lysosomale des cellules sénescences. Nous pourrions regarder par immunofluorescence si la masse lysosomale est modifiée suite à l'inhibition de *DNAJC5*.

Le MAPS commence par le recrutement des protéines cytoplasmiques mal repliées par la protéase d'ubiquitine USP19, située sur la membrane du RE⁴⁰². Elle les transmet ensuite à Hsc70 et à sa co-chaperonne DNAJC5, située sur des endosomes tardifs proches du RE⁴²⁵. Xu et al. ont montré que les protéines mal repliées et DNAJC5 vont se retrouver à l'intérieur de l'endosome. L'endosome tardif avec DNAJC5 et la protéine mal repliée transitent jusqu'à la membrane plasmique, où il fusionne avec elle et libère DNAJC5 et la protéine, en partie sous forme de complexes.

DNAJC5 est une protéine associée aux membranes grâce à son domaine riche en cystéines palmitoylées⁴³². Si DNAJC5 peut être associée à la membrane externe de l'endosome, rien n'indique que DNAJC5 ne pourrait plus l'être une fois à l'intérieur de l'endosome. Lors de la fusion de la vésicule avec la membrane plasmique, une partie des complexes pourraient être relâchés dans le milieu et une partie des chaperonnes pourraient rester associées à la membrane. Si le MAPS était actif dans les cellules sénescences, cela pourrait expliquer l'enrichissement de DNAJC5 à la membrane plasmique.

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'augmentation de DNAJC5 était liée à l'activation du MAPS dans les cellules traitées au CP.

Le MAPS peut être activé par la surexpression de USP19 et/ou la surexpression de DNAJC5^{402,425}. La sécrétion de protéines mal repliées n'est pas complètement inhibée lorsque USP19 est supprimée par CRISPR^{402,425} (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Ce résultat indique plusieurs choses. Les protéines mal repliées peuvent ne pas avoir besoin de passer par l'étape de déubiquitination menée par USP19 et/ou DNAJC5 pourrait être impliquée dans d'autres mécanismes de sécrétion encore non identifiés. Au niveau transcriptionnel, le niveau de USP19 n'est pas modifié entre les cellules contrôles et les cellules traitées au CP. L'étude du MAPS dans les cellules TOV21G traitées au CP nécessiterait de vérifier le niveau

protéique de USP19 entre nos deux conditions par immunobuvardage. Il faudrait aussi observer si la sécrétion des protéines mal repliées est modifiée après inhibition de USP19 dans les cellules sénescents avec des shRNAs.

Il est important de noter que le MAPS a été décrit dans des modèles cellulaires de surexpression exogènes des protéines participant à ce mécanisme (USP19, DNAJC5)^{402,425}. Dans les cellules TOV21G traitées au CP la surexpression de DNAJC5 est endogène. Si nous montrons que le MAPS est activé dans les cellules sénescents, cela serait la première fois que ce mécanisme est observé dans des conditions physiologiques.

L'identité des protéines mal repliées n'est pas connue dans les cellules sénescents. Nous avons donc utilisé deux protéines modèles, la GFP1-10 et l' α -synucléine. Ces protéines ont tendance à mal se replier ou à former des agrégats^{425,491}. Elles ont été utilisées par l'équipe du Dr Yihong Ye pour démontrer l'existence du MAPS lors de la surexpression de USP19 et/ou de DNAJC5^{402,425}.

Nous avons observé que les cellules sénescents expriment une quantité plus importante de GFP1-10 et d' α -synucléine que les cellules contrôles (Figure 23). Cette augmentation peut être transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, ou due à une diminution de la dégradation de ces protéines. Nous avons testé par RT-qPCR l'expression de GFP1-10 entre des cellules contrôles et sénescents dans deux expériences différentes (données non montrées). Les résultats étaient contradictoires, ne nous permettant pas de conclure et nécessitent d'être répétés. L'augmentation pourrait aussi être due à une diminution de la dégradation ou à une augmentation de la stabilité des protéines considérées.

Nous avons montré que DNAJC5, la GFP1-10 et l' α -synucléine sont sécrétées par les cellules sénescents (Figure 23). Si le MAPS est actif dans les cellules sénescents nous nous attendons à voir une interaction entre DNAJC5 et la GFP1-10 ou l' α -synucléine. Les optimisations des co-immunoprécipitations de DNAJC5 et GFP1-10 ou α -synucléine dans le lysat cellulaire sont en cours et nous planifions de tester l'interaction dans le milieu extracellulaire également. Si la sécrétion de ces protéines se fait par le MAPS, l'inhibition de *DNAJC5* devrait diminuer leur quantité dans le milieu extracellulaire. Nous n'avons pas réussi à obtenir de résultats concluants pour ces expériences. Nous pouvons expliquer ces résultats de différentes manières. La

déplétion partielle de DNAJC5 pourrait être en cause. Nous pourrions réaliser des lignées avec la technique de CRISPR-Cas9 pour *DNAJC5* afin d'étudier l'impact d'une déplétion totale de DNAJC5 dans les cellules TOV21G traitées au CP. Il pourrait aussi s'agir d'un problème technique, nécessitant une optimisation du protocole de concentration des milieux conditionnés, ou bien un effet hors-cible des shRNAs. Dans la figure 24B, dans 2 expériences sur 3 la sécrétion de l' α -synucléine a été augmentée pour le shDNAJC5 #91. Ce shRNA pourrait également inhiber le transcrite de *FIG4* (*Factor-induced gene 4*) comme vu sur le portail de la plateforme de génomique du Broad Institute (<https://portals.broadinstitute.org>). *FIG4* code pour une protéine participant à la régulation de la taille et du trafic de compartiments vésiculaires comme les lysosomes, les endosomes et autophagosomes dans différents organismes⁴⁹²⁻⁴⁹⁴. Sbrissa et al. ont montré que l'inhibition de *FIG4* pouvait mener à une augmentation de la formation de corps multivésiculaires⁴⁹³. Ces compartiments sont nécessaires à la formation des exosomes. L' α -synucléine peut être sécrétée par les exosomes^{401,495,496}. Nous savons que les cellules sénescents sécrètent plus de vésicules extracellulaires³⁵⁰ et que DNAJC5 n'est pas connu pour intervenir dans ce mécanisme⁴²⁵. Un effet hors cible du shDNAJC5 #91 envers les transcrits de *FIG4* pourrait expliquer l'augmentation de sécrétion de l' α -synucléine par une augmentation de la sécrétion d'exosomes. Nous allons vérifier les niveaux transcriptionnels de *FIG4* par RT-qPCR lors de l'inhibition de *DNAJC5*. La sécrétion des protéines mal repliées pourrait ainsi être compensée par d'autres mécanismes. L' α -synucléine est une protéine sans séquence signal, qui utilise des voies de sécrétion non-conventionnelles, comme celle des exosomes^{497,498}. Cependant, Lee et al. ont montré que la GFP1-10 n'était pas sécrétée par des exosomes, même lorsque le MAPS était inhibé en utilisant un mutant de USP19⁴⁰². Les mécanismes compensatoires pourraient être différents selon que l'on considère la GFP1-10 ou l' α -synucléine. Nous pourrions étudier la sécrétion des exosomes après inhibition de *DNAJC5* en utilisant un protocole d'ultracentrifugations successives du milieu conditionné. Nous réaliserions ensuite un immunobuvardage du surnageant et du culot contenant les vésicules pour la GFP1-10 ou l' α -synucléine.

L' α -synucléine a également été observée dans des vésicules sécrétoires où elle a été intégrée sans passer par le RE ou l'appareil de Golgi⁴⁹⁶⁻⁴⁹⁸. Outre le MAPS, d'autres voies de sécrétion

non-conventionnelles pourraient participer à la sécrétion de la GFP1-10 et de l' α -synucléine. L' α -synucléine peut également utiliser des tunnels de nanotubes, des ponts membranaires stratifiés par de l'actine entre deux cellules⁴⁹⁹. Les tunnels de nanotubes ont déjà été observés chez les cellules sénescents⁵⁰⁰. Pour se débarrasser de protéines mal repliées, les cellules pourraient donc compenser l'inhibition de *DNAJC5* et du MAPS par un autre mécanisme, comme les nanotubes. Enfin, l'expression de *DNAJC5* n'est inhibée qu'à environ 50% avec la technique des shRNAs (Figure 22C), ce qui n'est peut-être pas suffisant pour voir une réduction drastique de la sécrétion. Nous pourrions créer des lignées déficientes pour *DNAJC5* avec la technique de CRISPR-Cas9 pour inhiber complètement son expression. Une dernière hypothèse est que le MAPS n'est pas activé dans les cellules sénescents mais cette conclusion ne peut être tirée qu'après avoir obtenu les résultats des expériences de co-immunoprécipitation détaillées ci-dessus.

DNAJC5 participe à la régulation de l'exocytose et l'endocytose en interagissant avec des protéines impliquées dans ces processus comme SNAP25⁴⁹⁰, la syntaxine⁴³³, la synaptotagmine⁵⁰¹ et la dynamine⁴³⁷. Que le MAPS soit actif ou non dans les cellules sénescents, nous souhaiterions savoir si *DNAJC5* est nécessaire pour la sécrétion du SASP. Pour répondre à cette question, nous souhaiterions réaliser une analyse protéomique du sécrétome des cellules sénescents inhibées ou non pour *DNAJC5*.

DNAJC5 est phosphorylée sur sa serine 10 par la protéine kinase A⁵⁰², Akt⁵⁰³ et la protéine kinase C gamma⁵⁰⁴, ce qui induit un changement de conformation de la protéine⁵⁰⁵. Ce changement de conformation n'empêche pas la liaison avec Hsc70⁵⁰². La phosphorylation de la serine 10 participe à la régulation de l'exocytose⁵⁰². En s'intéressant à la dynamique des pores de fusion des vésicules à la membrane, des expériences avec des mutants phosphodéficients indiquent une diminution de la capacité de sécrétion (le pore se referme très vite)⁵⁰⁶. Les expériences conduites avec les mutants phosphomimétiques indiquent au contraire une prolongation de la durée d'ouverture du pore de fusion⁵⁰⁶. Il serait intéressant d'étudier le niveau de phosphorylation de *DNAJC5* dans les cellules sénescents vis-à-vis des cellules contrôles. Nous souhaiterions également savoir si la phosphorylation de *DNAJC5* est impliquée dans la sécrétion du SASP. Pour cela nous pourrions créer des lignées en utilisant la technique

de CRISPR-Cas9 pour enlever le gène *DNAJC5* endogène et le remplacer par le gène *DNAJC5* muté pour la sérine 10, en remplaçant la sérine par un résidu non-phosphorylable ou phosphomimétique.

5. La surexpression de DNAJC5 pourrait participer à maintenir l'homéostasie protéique

Le MAPS étant un moyen de diminuer la concentration intracellulaire en protéines mal repliées, ce mécanisme contribue à la maintenance de l'homéostasie protéique⁴⁰². Les cellules sénescents, de par la production intense de molécules pour le SASP, ont un niveau élevé de protéotoxicité^{473,507}. Nous avons alors émis l'hypothèse que *DNAJC5* participait à réguler le stress protéotoxique des cellules sénescents. Les cellules possèdent différents moyens de gérer les protéines mal repliées : soit le système des chaperonnes de choc thermique permet le repliement des protéines, soit elles sont dégradées⁴⁷⁴. Les protéines mal repliées peuvent être dégradées par le système ubiquitine-protéasome ou par l'autophagie³⁹¹. Les protéines mal repliées polyubiquitinylées peuvent également s'agréger et être alors séquestrées dans des compartiments appelés agrésomes. Les protéines seront alors soumises aux chaperonnes pour repliement ou bien dégradées par autophagie^{391,508}. Lors d'un trop plein de protéines non ou mal repliées, la cellule déclenche la réponse aux protéines mal repliées suite à l'activation de PERK, IRE1 α (*Inositol-requiring enzyme 1*) et/ou ATF6 α (*Activating transcription factor 6*). Ces trois protéines sont situées à la membrane du RE. L'activation de PERK et IRE1 α diminue la synthèse protéique et celle d'ATF6 α participe à augmenter la capacité de repliement du RE⁴⁷⁴. Nous nous sommes intéressés au niveau de phosphorylation de eIF2 α sur la sérine 51. eIF2 α est une sous-unité régulatrice du complexe eIF2, nécessaire pour la traduction des ARN messagers. C'est la sous-unité qui comprend le site de fixation à l'ARN messager et le site de phosphorylation du complexe eIF2⁴⁷⁵. Cette protéine est phosphorylée par PERK lorsque la réponse aux protéines mal repliées est initiée et témoigne d'une haute protéotoxicité dans la cellule. Il faut noter que cette protéine est également phosphorylée lors de l'activation de GCN2 en cas de déprivation en nutriments, de PKR après une infection virale et de HRI en cas de déprivation de l'hème⁴⁷⁵. Lors de la réponse au stress, la phosphorylation de eIF2 α va empêcher

la formation du complexe de pré-initiation de la traduction. La traduction dépendante de la coiffe 5' sera alors globalement inhibée. Certains ARN messagers comprenant un cadre de lecture ouvert dans leur région 5' non-codante pourront être traduits en protéines, comme c'est le cas pour le facteur de transcription ATF4⁴⁷⁵. ATF4 induit l'expression de gènes impliqués dans le transport des acides aminés, le métabolisme, la protection du stress oxydatif, l'homéostasie protéique et l'apoptose⁵⁰⁹. Nous avons montré que lorsque *DNAJC5* était inhibé, la phosphorylation de eIF2 α au niveau de la sérine 51 était augmentée, témoignant d'une augmentation du stress protéotoxique (Figure 25). Pour confirmer ce résultat, nous pourrions regarder par RT-qPCR l'induction des gènes cibles comme ATF4, mais également l'activation des deux autres voies de la réponse au stress du RE (IRE1 α et ATF6 α). L'activation de IRE1 α donne lieu à l'épissage spécifique de XBP-1 (*X-box binding protein 1*) en XBP-1s (*spliced XBP-1*), un facteur de transcription induisant l'expression de chaperonnes et de protéines impliquées dans la voie de dégradation associée au RE. IRE1 α , par le recrutement de TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*), participe également à l'activation de NF- κ B et de JNK⁵¹⁰ (*c-Jun N-terminal kinase*). L'activation de IRE1 α peut être vérifiée par un immunobuvardage montrant l'augmentation de XBP-1s et la phosphorylation de IRE1 α et JNK. Une RT-qPCR nous indiquera également les niveaux transcriptionnels des gènes cibles de XBP-1s. Une fois activé, ATF6 α est transféré à l'appareil de Golgi, où la protéine sera clivée. Le fragment cytosolique en résultant est un facteur de transcription permettant l'expression de XBP1 et de chaperonnes du RE comme BiP⁵¹⁰. Il est possible de visualiser ce fragment par immunobuvardage. Il aurait également été intéressant de comparer les niveaux de phosphorylation de eIF2 α des cellules contrôles avec les cellules CP dans lesquelles l'expression de *DNAJC5* a été inhibée, ou non.

DNAJC5 pourrait participer à cet effet protecteur contre la protéotoxicité par l'intermédiaire du MAPS ou par d'autres mécanismes. Nous pourrions compléter notre analyse de la protéotoxicité lors de l'inhibition de *DNAJC5* en nous intéressant aux autres mécanismes de régulation de celle-ci : l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome. Concernant l'autophagie nous pourrions étudier les flux autophagiques et voir si l'inhibition de *DNAJC5* augmente ou diminue ces flux. Le fonctionnement du système ubiquitine-protéasome peut être évalué par immunobuvardage, en comparant les quantités de conjugués d'ubiquitine et de protéines

oxydées. Les différentes activités (chymotrypsine, trypsine et caspase) du protéasome seront aussi évaluées⁵¹¹. Enfin, nous pourrions comparer le nombre d'agresomes entre des cellules traitées ou non, inhibées ou non pour *DNAJC5*.

6. Un rôle pour *DNAJC5* dans le maintien et/ou l'établissement de la sénescence ?

Nous avons montré que l'expression de *DNAJC5* augmentait avec l'établissement de l'état de sénescence (Figure 26A). Lors de l'inhibition de *DNAJC5*, le niveau transcriptionnel et protéique de p21 diminuait mais non ceux de p53 (Figure 26B). *DNAJC5* pourrait participer à l'établissement et/ou au maintien de la sénescence. Tout d'abord, il faut noter que dans notre protocole expérimental, l'inhibition de *DNAJC5* a lieu avant le traitement par la chimiothérapie (Figure 22B). Notre protocole évalue donc le rôle de *DNAJC5* dans l'établissement de la sénescence. Nous aimerions réaliser nos expériences avec des shRNAs inducibles. L'inhibition de *DNAJC5* pourra donc être induite avant l'entrée en sénescence, mais également après et à différents temps pendant l'établissement de cet état. Nous étudierons l'impact de l'inhibition de *DNAJC5* sur les différents marqueurs de l'état de sénescence. Il serait particulièrement intéressant d'étudier le niveau transcriptionnel et protéique de p16, qui pourrait prendre le relai pour maintenir l'état de sénescence. Il serait également intéressant d'observer si la surexpression de *DNAJC5* dans des cellules non sénescents induirait l'expression de marqueurs de la sénescence, ou si l'établissement de la sénescence serait plus rapide si le traitement était réalisé après la surexpression de *DNAJC5*.

L'inhibition de *DNAJC5* semble avoir un impact particulier sur p21, sans modifier l'expression de p53 (Figure 26B). P14^{ARF}, une protéine codée par un gène du locus INK4, pourrait maintenir l'expression de p53 en empêchant sa dégradation par MDM2^{512,513}. p53 n'est pas muté dans nos cellules et peut donc toujours induire l'apoptose. La diminution de l'expression de p21 pourrait conduire à la mort programmée des cellules. Nous n'avons pas observé de mortalité plus importante suite à l'inhibition de *DNAJC5* en comptant manuellement les cellules après un test au bleu trypan (Figure 26C). Il serait important de confirmer cela, par exemple par cytométrie

en flux avec un marquage d'annexine V et d'iodure de propidium. Nous vérifierions également si le nombre de cellules entrant en catastrophe mitotique est plus important après inhibition de *DNAJC5*. Il serait également intéressant d'étudier par RT-qPCR le niveau transcriptionnel d'autres gènes cibles de p53 comme *PUMA*⁵¹⁴ ou *NOXA*⁵¹⁵, gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques, ou bien *CDC25C*⁵¹⁶, gène participant à la réparation de l'ADN. Ces résultats pourraient nous donner des indices concernant les réponses observées lors de l'inhibition de l'expression de *DNAJC5*.

DNAJC5 pourrait donc participer à l'expression de p21 par un mécanisme indépendant de p53. Le TGF- β est une molécule sécrétée, qui suite à la liaison à ses récepteurs, active différentes voies de signalisation. La voie canonique passe par l'activation des R-Smad, qui une fois dimérisées avec Smad4, transiteront dans le noyau et induiront l'expression de gènes cibles, dont p21⁵¹⁷. Le TGF- β est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, la réponse immunitaire, la production de ROS, l'autophagie, la réponse aux dommages à l'ADN, l'apoptose et la sénescence⁵¹⁸. Différentes études ont montré que le TGF- β pouvait induire ou participer à l'induction de l'état de sénescence^{190,324,519,520}. Munoz-Espin et al. ont montré que le TGF- β était important pour l'induction de la sénescence dans le développement embryonnaire, par l'induction de l'expression de p21¹⁹⁰. Nüchel et al. ont récemment montré que le TGF- β 1 (un des isoformes du TGF- β) était sécrété par une voie de sécrétion non-conventionnelle⁵²¹. Le TGF- β contient une séquence signal et transite donc par le RE et l'appareil de Golgi. Nüchel et al. ont découvert que le TGF- β était détourné du Golgi par GRASP55 pour être séquestré dans des autophagosomes destinés à la sécrétion⁵²¹. *DNAJC5* participant aux processus d'exocytose, son inhibition pourrait empêcher la sécrétion du TGF- β , ce qui pourrait inhiber en partie l'expression de p21. Nous pourrions commencer à vérifier cette hypothèse en comparant les niveaux de TGF- β 1 sécrétés par ELISA, ainsi que les niveaux de phosphorylation de SMAD par immunobuvardage avant et après inhibition de *DNAJC5*. Il est important de noter que d'autres voies de signalisation peuvent intervenir, laissant présager un problème plus complexe.

L'inhibition de *DNAJC5* diminue les niveaux transcriptionnels et protéiques de p21. Nous avons également observé une tendance à la hausse pour les niveaux transcriptionnels de gènes codant

pour les kinases dépendantes des cyclines régulant le cycle cellulaire (Figure 26D). Ces premiers résultats pourraient indiquer une reprise de la prolifération des cellules. Plusieurs expériences permettraient de répondre à cette hypothèse. Nous regarderions l'incorporation d'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) pendant la phase S et verrions si le nombre de cellules se divisant est plus important dans les cellules inhibées pour *DNAJC5*. Une analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux nous indiquerait si la répartition des phases du cycle est différente dans la population après inhibition de *DNAJC5*.

Nous avons montré que l'augmentation protéique de *DNAJC5* n'était pas restreinte à notre modèle d'étude (Figure 27). Il sera important de reproduire nos résultats dans d'autres lignées cellulaires et d'autres modèles de sénescence.

Pour conclure, identifier les protéines interagissant avec *DNAJC5* dans les cellules sénescents, ou non, est important pour mieux identifier le rôle de *DNAJC5* au sein de la sénescence et des différents mécanismes auxquels cette protéine peut prendre part. Une expérience d'immunoprécipitation de *DNAJC5* suivie de spectrométrie en masse permettrait de répondre à cet objectif.

7. D'autres protéines augmentées à la surface des cellules traitées au CP seraient intéressantes à étudier dans le contexte de la sénescence

Parmi les protéines augmentées à la surface cellulaire, outre *DNAJC5*, nous avons identifié deux protéines qui seraient intéressantes à étudier dans le cadre de la sénescence cellulaire. Il s'agit de *PCDHGC3* (Protocadhérine gamma C3) et *ENTPD1* (*Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1*).

PCDHGC3 est enrichie à la membrane plasmique des cellules traitées au CP de plus de 8 fois ($\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})=4,8$), de manière significative ($-\text{Log}_{10}(\text{p-value})=4,1$). *PCDHGC3* est une protéine possédant un domaine extracellulaire composé de 6 motifs cadhérine, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. *PDHGC3* n'a encore pas été étudiée

dans le contexte de la sénescence. Il a été montré que cette protéine participait à l'adhésion cellule-cellule⁵²². Gabbert et al. ont découvert très récemment que la délétion totale de cette protéine dans des cellules endothéliales induisait une augmentation de la prolifération des cellules, une dérégulation de voies de signalisation et une inhibition de l'expression de molécules de signalisation et inflammatoires⁵²³. De façon intéressante, il a été montré que, contrairement aux autres protocadhérines gamma, uniquement l'isoforme PCDHGC3 pouvait inhiber la voie de signalisation Wnt⁵²⁴. Mah et al. ont montré que la protéine PCDHGC3 entrait en compétition avec la protéine Dishevelled pour l'interaction avec la protéine Axin1 et que le domaine cytoplasmique de PCDHGC3 interagissait alors avec Axin1 et stabilisait celle-ci à la membrane. Cette séquestration d'Axin1 empêcherait alors son interaction avec d'autres composants de la voie Wnt et donc l'activation de cette dernière⁵²⁴. De plus, il a été observé que PCDHGC3 pouvait être clivée à différents endroits^{522,525}. Les fragments produits pourraient induire alors différentes réponses. Le domaine extracellulaire est clivé par la protéine ADAM10⁵²². Nous retrouvons d'ailleurs également ADAM10 enrichie de façon significative à la membrane plasmique des cellules traitées au CP. Ce clivage inhibe l'adhésion cellulaire et est nécessaire au clivage du domaine intracellulaire par le complexe protéase γ -sécrétase^{522,525}. Le fragment intracellulaire produit peut alors rejoindre le noyau⁵²⁵. Il pourrait avoir un impact sur la transcription de certains gènes, comme c'est le cas pour le fragment intracellulaire produit par le clivage de la N-cadhérine⁵²⁶. Hamsch et al. ont montré dans un modèle murin que le fragment intracellulaire de PCDHGC3 induisait l'expression du locus des protocadhérines gamma⁵²⁷. Aucune fonction n'a encore été démontrée pour le fragment extracellulaire clivé de PCDHGC3, ce qui mériterait investigation. Il existe des inhibiteurs spécifiques d'ADAM10 et du complexe γ -sécrétase qui nous permettraient d'étudier l'impact de l'inhibition du clivage de PCDHGC3 par exemple sur l'adhésion cellulaire des cellules sénescents⁵²² et sur la potentielle transcription de gènes cibles. L'inhibition de PCDHGC3 par shRNA ou par la technique CRISPR-Cas9 nous permettrait de mieux comprendre son rôle dans la sénescence et potentiellement dans l'expression de molécules du SASP.

La protéine ENTPD1 est également fortement enrichie de façon significative à la surface des cellules traitées au CP ($\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})=3,8$). Cette protéine est connue pour son rôle

immunosuppresseur. Elle catalyse la transformation de l'ATP et ADP extracellulaire en adénosine mono-phosphate (AMP)⁵²⁸. CD73 déphosphoryle ensuite l'AMP pour donner de l'adénosine⁵²⁹, qui en se fixant sur le récepteur A2A présent sur les cellules immunitaires lymphocytes T⁵³⁰ et cellules NK⁵³¹, les inhibera et empêchera leur action anti-tumorale^{532,533}. Les cellules T régulatrices utilisent cette stratégie pour inhiber les cellules T⁵³². Häusler et al. ont montré que ENTPD1 et CD73 étaient exprimées dans des biopsies de tissu cancéreux ovarien (et non dans du tissu ovarien sain) et dans des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire⁵³⁴. Les auteurs ont également prouvé que l'adénosine produit par les cellules cancéreuses, grâce à la présence d'ENTPD1 et CD73 à la membrane, était responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale⁵³⁴. Nous n'avons pas identifié CD73 à la surface des cellules TOV21G avec la méthode du surfaceome mais d'après notre analyse transcriptomique cette protéine est plus fortement exprimée dans les cellules traitées au CP ($\text{Log}_2(\text{CP}/\text{CTL})=1,4$) et ce, de façon significative. Il serait important d'étudier par immunobuvardage ou cytométrie en flux si la protéine CD73 est exprimée à la surface des cellules traitées au CP. Nous pourrions vérifier les résultats de surfaceome pour ENTPD1 également. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'enrichissement de la protéine ENTPD1 à la surface des cellules traitées au CP sur leurs capacités immunosuppressives, en réalisant par exemple des co-cultures de cellules sénescents et cellules immunitaires et en étudiant la mortalité des cellules immunitaires, en présence ou non d'un inhibiteur de ENTPD1. Ces expériences pourraient nous en apprendre plus sur l'immunosuppression réalisée par les cellules sénescents traitées par la chimiothérapie.

Chapitre 5 – Conclusion

Cette étude s'est intéressée à réaliser une analyse protéomique de la surface de cellules sénescents suite à la chimiothérapie, dans le cancer de l'ovaire à cellules claires. Nous avons observé que de nombreux changements avaient lieu à la surface des cellules SIC. Les protéines augmentées à la surface étaient particulièrement impliquées dans des mécanismes de sécrétion, renforçant l'importance du SASP. Nous avons identifié une protéine encore jamais étudiée dans le contexte de la sénescence : DNAJC5. Il a été découvert récemment que cette chaperonne participe à la sécrétion de protéines cytoplasmiques mal repliées par l'intermédiaire d'un mécanisme nommé MAPS⁴²⁵. Nous avons alors cherché si ce mécanisme était actif dans les cellules SIC. Nous avons montré que DNAJC5 était surexprimée et sécrétée dans les cellules sénescents. Nous avons créé des lignées cellulaires exprimant des protéines modèles qui ont tendance à mal se replier (GFP1-10 et α -synucléine). Nous avons observé que la GFP1-10 et l' α -synucléine étaient sécrétées par les cellules SIC. En inhibant *DNAJC5* dans nos lignées cellulaires, nous n'avons pas pu identifier clairement si DNAJC5 était nécessaire à la sécrétion de ces protéines dans notre modèle. Cette question demande des recherches plus approfondies et plus d'optimisation technique. Nous avons observé que l'inhibition de *DNAJC5* augmentait la phosphorylation de eIF2 α , une protéine clé dans la réponse au stress protéotoxique. Nos résultats suggèrent donc que même si ce n'est pas par l'intermédiaire du MAPS, DNAJC5 participe à réguler le stress protéotoxique des cellules sénescents. Nous avons également montré que l'inhibition de *DNAJC5* impactait négativement le niveau protéique et transcriptionnel de p21, une protéine impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en sénescence. Nos recherches pointent vers un rôle de DNAJC5 dans l'établissement et/ou la maintenance de la sénescence, nécessitant plus d'investigations. Cette étude est la première à montrer la surexpression de DNAJC5 dans la sénescence, laissant présager de nouvelles découvertes sur la sénescence induite par la chimiothérapie. À long terme, ces découvertes pourraient être utilisées dans le cadre d'une stratégie thérapeutique de type « crochet-uppercut ».

Références bibliographiques

- 1 DeVita, V. T., Jr. & Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* **68**, 8643-8653, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6611 (2008).
- 2 Krumbhaar, E. B. & Krumbhaar, H. D. The Blood and Bone Marrow in Yellow Cross Gas (Mustard Gas) Poisoning: Changes produced in the Bone Marrow of Fatal Cases. *J Med Res* **40**, 497-508 493 (1919).
- 3 Huggins, C. & Hodges, C. V. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Research* **1**, 293-297 (1941).
- 4 Furth, J., Kahn, M. C. & Breedis, C. The Transmission of Leukemia of Mice with a Single Cell. *The American Journal of Cancer* **31**, 276-282, doi:10.1158/ajc.1937.276 (1937).
- 5 Skipper, H. E., Schabel, F. M., Jr. & Wilcox, W. S. Experimental Evaluation of Potential Anticancer Agents. Xiii. On the Criteria and Kinetics Associated with "Curability" of Experimental Leukemia. *Cancer Chemother Rep* **35**, 1-111 (1964).
- 6 Devita, V. T., Jr., Serpick, A. A. & Carbone, P. P. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Ann Intern Med* **73**, 881-895, doi:10.7326/0003-4819-73-6-881 (1970).
- 7 Frei, E., 3rd *et al.* Combination chemotherapy in advanced Hodgkin's disease. Induction and maintenance of remission. *Ann Intern Med* **79**, 376-382, doi:10.7326/0003-4819-79-3-376 (1973).
- 8 Fisher, B. *et al.* 1-Phenylalanine mustard (L-PAM) in the management of primary breast cancer. A report of early findings. *N Engl J Med* **292**, 117-122, doi:10.1056/NEJM197501162920301 (1975).
- 9 Bonadonna, G. *et al.* Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med* **294**, 405-410, doi:10.1056/NEJM197602192940801 (1976).
- 10 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).

- 11 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70, doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9 (2000).
- 12 Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921, doi:10.1038/35057062 (2001).
- 13 Venter, J. C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351, doi:10.1126/science.1058040 (2001).
- 14 Lesterhuis, W. J., Haanen, J. B. & Punt, C. J. Cancer immunotherapy--revisited. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 591-600, doi:10.1038/nrd3500 (2011).
- 15 Vasan, N., Baselga, J. & Hyman, D. M. A view on drug resistance in cancer. *Nature* **575**, 299-309, doi:10.1038/s41586-019-1730-1 (2019).
- 16 Hartwell, L. H., Szankasi, P., Roberts, C. J., Murray, A. W. & Friend, S. H. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science* **278**, 1064-1068, doi:10.1126/science.278.5340.1064 (1997).
- 17 Dobzhansky, T. Genetics of natural populations; recombination and variability in populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **31**, 269-290 (1946).
- 18 Huang, A., Garraway, L. A., Ashworth, A. & Weber, B. Synthetic lethality as an engine for cancer drug target discovery. *Nat Rev Drug Discov* **19**, 23-38, doi:10.1038/s41573-019-0046-z (2020).
- 19 O'Neil, N. J., Bailey, M. L. & Hieter, P. Synthetic lethality and cancer. *Nat Rev Genet* **18**, 613-623, doi:10.1038/nrg.2017.47 (2017).
- 20 Bian, Y. *et al.* Synthetic genetic array screen identifies PP2A as a therapeutic target in Mad2-overexpressing tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 1628-1633, doi:10.1073/pnas.1315588111 (2014).
- 21 Bailey, M. L. *et al.* Glioblastoma cells containing mutations in the cohesin component STAG2 are sensitive to PARP inhibition. *Mol Cancer Ther* **13**, 724-732, doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0749 (2014).
- 22 Wang, L. & Bernards, R. Taking advantage of drug resistance, a new approach in the war on cancer. *Front Med* **12**, 490-495, doi:10.1007/s11684-018-0647-7 (2018).

- 23 Sieben, C. J., Sturmlechner, I., van de Sluis, B. & van Deursen, J. M. Two-Step Senescence-Focused Cancer Therapies. *Trends Cell Biol* **28**, 723-737, doi:10.1016/j.tcb.2018.04.006 (2018).
- 24 Saleh, T. *et al.* Clearance of therapy-induced senescent tumor cells by the senolytic ABT-263 via interference with BCL-XL -BAX interaction. *Mol Oncol*, doi:10.1002/1878-0261.12761 (2020).
- 25 Hangauer, M. J. *et al.* Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* **551**, 247-250, doi:10.1038/nature24297 (2017).
- 26 Roninson, I. B., Broude, E. V. & Chang, B. D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* **4**, 303-313, doi:10.1054/drup.2001.0213 (2001).
- 27 Roberson, R. S., Kussick, S. J., Vallieres, E., Chen, S. Y. & Wu, D. Y. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* **65**, 2795-2803, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1270 (2005).
- 28 Demaria, M. *et al.* Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov* **7**, 165-176, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0241 (2017).
- 29 Capparelli, C. *et al.* CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle* **11**, 3599-3610, doi:10.4161/cc.21884 (2012).
- 30 Wang, X. *et al.* Evidence of Cisplatin-induced Senescent-like Growth Arrest in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Cancer Research* **58**, 5019-5022 (1998).
- 31 Sidi, R. *et al.* Induction of senescence markers after neo-adjuvant chemotherapy of malignant pleural mesothelioma and association with clinical outcome: an exploratory analysis. *Eur J Cancer* **47**, 326-332, doi:10.1016/j.ejca.2010.09.044 (2011).
- 32 Chang, B.-D. *et al.* A Senescence-like Phenotype Distinguishes Tumor Cells That Undergo Terminal Proliferation Arrest after Exposure to Anticancer Agents. *Cancer Research* **59**, 3761-3767 (1999).

- 33 Elmore, L. W. *et al.* Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J Biol Chem* **277**, 35509-35515, doi:10.1074/jbc.M205477200 (2002).
- 34 Wang, L. *et al.* High-Throughput Functional Genetic and Compound Screens Identify Targets for Senescence Induction in Cancer. *Cell Rep* **21**, 773-783, doi:10.1016/j.celrep.2017.09.085 (2017).
- 35 Fuhrmann-Stroissnigg, H. *et al.* Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat Commun* **8**, 422, doi:10.1038/s41467-017-00314-z (2017).
- 36 Zhu, Y. *et al.* The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* **14**, 644-658, doi:10.1111/ace1.12344 (2015).
- 37 Zhu, Y. *et al.* New agents that target senescent cells: the flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)* **9**, 955-963, doi:10.18632/aging.101202 (2017).
- 38 Samaraweera, L., Adomako, A., Rodriguez-Gabin, A. & McDaid, H. M. A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Sci Rep* **7**, 1900, doi:10.1038/s41598-017-01964-1 (2017).
- 39 Barzilai, N., Crandall, J. P., Kritchevsky, S. B. & Espeland, M. A. Metformin as a Tool to Target Aging. *Cell Metab* **23**, 1060-1065, doi:10.1016/j.cmet.2016.05.011 (2016).
- 40 Wang, Y. *et al.* Discovery of piperlongumine as a potential novel lead for the development of senolytic agents. *Aging (Albany NY)* **8**, 2915-2926, doi:10.18632/aging.101100 (2016).
- 41 Wang, C. *et al.* Inducing and exploiting vulnerabilities for the treatment of liver cancer. *Nature* **574**, 268-272, doi:10.1038/s41586-019-1607-3 (2019).
- 42 Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394-424, doi:10.3322/caac.21492 (2018).
- 43 Matsuzaki, S. *et al.* Potential targets for ovarian clear cell carcinoma: a review of updates and future perspectives. *Cancer Cell Int* **15**, 117, doi:10.1186/s12935-015-0267-0 (2015).

- 44 Torre, L. A. *et al.* Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* **68**, 284-296, doi:10.3322/caac.21456 (2018).
- 45 Amano, T., Chano, T., Yoshino, F., Kimura, F. & Murakami, T. Current Position of the Molecular Therapeutic Targets for Ovarian Clear Cell Carcinoma: A Literature Review. *Healthcare (Basel)* **7**, doi:10.3390/healthcare7030094 (2019).
- 46 Orezza, J. P. *et al.* Prognostic implication of endometriosis in clear cell carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* **110**, 336-344, doi:10.1016/j.ygyno.2008.05.025 (2008).
- 47 Sugiyama, T. *et al.* Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* **88**, 2584-2589 (2000).
- 48 Winter, W. E., 3rd *et al.* Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* **25**, 3621-3627, doi:10.1200/JCO.2006.10.2517 (2007).
- 49 Karnezis, A. N., Cho, K. R., Gilks, C. B., Pearce, C. L. & Huntsman, D. G. The disparate origins of ovarian cancers: pathogenesis and prevention strategies. *Nat Rev Cancer* **17**, 65-74, doi:10.1038/nrc.2016.113 (2017).
- 50 Kurman, R. J. & Shih Ie, M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *Am J Pathol* **186**, 733-747, doi:10.1016/j.ajpath.2015.11.011 (2016).
- 51 Salazar, C., Campbell, I. G. & Gorringer, K. L. When Is "Type I" Ovarian Cancer Not "Type I"? Indications of an Out-Dated Dichotomy. *Front Oncol* **8**, 654, doi:10.3389/fonc.2018.00654 (2018).
- 52 Kuchenbaecker, K. B. *et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* **317**, 2402-2416, doi:10.1001/jama.2017.7112 (2017).
- 53 Prat, J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch* **460**, 237-249, doi:10.1007/s00428-012-1203-5 (2012).

- 54 Sato, N. *et al.* Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer Res* **60**, 7052-7056 (2000).
- 55 Ogawa, S. *et al.* Ovarian endometriosis associated with ovarian carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* **77**, 298-304, doi:10.1006/gyno.2000.5765 (2000).
- 56 Pearce, C. L. *et al.* Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol* **13**, 385-394, doi:10.1016/S1470-2045(11)70404-1 (2012).
- 57 Zondervan, K. T. *et al.* Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 9, doi:10.1038/s41572-018-0008-5 (2018).
- 58 Yamaguchi, K. *et al.* Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress. *Clin Cancer Res* **14**, 32-40, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1614 (2008).
- 59 Murakami, K., Kotani, Y., Nakai, H. & Matsumura, N. Endometriosis-Associated Ovarian Cancer: The Origin and Targeted Therapy. *Cancers (Basel)* **12**, doi:10.3390/cancers12061676 (2020).
- 60 Itamochi, H., Kigawa, J. & Terakawa, N. Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci* **99**, 653-658, doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00747.x (2008).
- 61 Reid, B. M., Permuth, J. B. & Sellers, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med* **14**, 9-32, doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084 (2017).
- 62 Shibuya, Y. *et al.* Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinoma with next generation sequencing. *Genes Chromosomes Cancer* **57**, 51-60, doi:10.1002/gcc.22507 (2018).
- 63 Jones, S. *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* **330**, 228-231, doi:10.1126/science.1196333 (2010).

- 64 Itamochi, H. *et al.* Whole-genome sequencing revealed novel prognostic biomarkers and promising targets for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Br J Cancer* **117**, 717-724, doi:10.1038/bjc.2017.228 (2017).
- 65 Murakami, R. *et al.* Exome Sequencing Landscape Analysis in Ovarian Clear Cell Carcinoma Shed Light on Key Chromosomal Regions and Mutation Gene Networks. *Am J Pathol* **187**, 2246-2258, doi:10.1016/j.ajpath.2017.06.012 (2017).
- 66 Mittal, P. & Roberts, C. W. M. The SWI/SNF complex in cancer - biology, biomarkers and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **17**, 435-448, doi:10.1038/s41571-020-0357-3 (2020).
- 67 Guan, B., Wang, T. L. & Shih Ie, M. ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers. *Cancer Res* **71**, 6718-6727, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1562 (2011).
- 68 Kuo, K. T. *et al.* Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* **174**, 1597-1601, doi:10.2353/ajpath.2009.081000 (2009).
- 69 Leitao, M. M. *et al.* Mutation and expression of the TP53 gene in early stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* **93**, 301-306, doi:10.1016/j.ygyno.2004.01.043 (2004).
- 70 Caumanns, J. J., Wisman, G. B. A., Berns, K., van der Zee, A. G. J. & de Jong, S. ARID1A mutant ovarian clear cell carcinoma: A clear target for synthetic lethal strategies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* **1870**, 176-184, doi:10.1016/j.bbcan.2018.07.005 (2018).
- 71 Kelso, T. W. R. *et al.* Chromatin accessibility underlies synthetic lethality of SWI/SNF subunits in ARID1A-mutant cancers. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.30506 (2017).
- 72 Chandler, R. L. *et al.* Coexistent ARID1A-PIK3CA mutations promote ovarian clear-cell tumorigenesis through pro-tumorigenic inflammatory cytokine signalling. *Nat Commun* **6**, 6118, doi:10.1038/ncomms7118 (2015).
- 73 De, P. & Dey, N. Mutation-Driven Signals of ARID1A and PI3K Pathways in Ovarian Carcinomas: Alteration Is An Opportunity. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20225732 (2019).

- 74 Yamashita, Y. *et al.* Met is the most frequently amplified gene in endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma and correlates with worsened prognosis. *PLoS One* **8**, e57724, doi:10.1371/journal.pone.0057724 (2013).
- 75 Tan, D. S., Miller, R. E. & Kaye, S. B. New perspectives on molecular targeted therapy in ovarian clear cell carcinoma. *Br J Cancer* **108**, 1553-1559, doi:10.1038/bjc.2013.126 (2013).
- 76 Fruman, D. A. *et al.* The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* **170**, 605-635, doi:10.1016/j.cell.2017.07.029 (2017).
- 77 Manning, B. D. & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381-405, doi:10.1016/j.cell.2017.04.001 (2017).
- 78 Leslie, N. R. & Downes, C. P. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem J* **382**, 1-11, doi:10.1042/BJ20040825 (2004).
- 79 Oda, K., Hamanishi, J., Matsuo, K. & Hasegawa, K. Genomics to immunotherapy of ovarian clear cell carcinoma: Unique opportunities for management. *Gynecol Oncol* **151**, 381-389, doi:10.1016/j.ygyno.2018.09.001 (2018).
- 80 Alsop, K. *et al.* BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol* **30**, 2654-2663, doi:10.1200/JCO.2011.39.8545 (2012).
- 81 Fujimura, M., Hidaka, T. & Saito, S. Selective inhibition of the epidermal growth factor receptor by ZD1839 decreases the growth and invasion of ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* **8**, 2448-2454 (2002).
- 82 Yamamoto, S. *et al.* Gene amplification and protein overexpression of MET are common events in ovarian clear-cell adenocarcinoma: their roles in tumor progression and prognostication of the patient. *Mod Pathol* **24**, 1146-1155, doi:10.1038/modpathol.2011.70 (2011).
- 83 Fujimura, M. *et al.* HER2 is frequently over-expressed in ovarian clear cell adenocarcinoma: possible novel treatment modality using recombinant monoclonal antibody against HER2, trastuzumab. *Jpn J Cancer Res* **93**, 1250-1257, doi:10.1111/j.1349-7006.2002.tb01231.x (2002).

- 84 Tan, D. S. *et al.* Genomic analysis reveals the molecular heterogeneity of ovarian clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* **17**, 1521-1534, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1688 (2011).
- 85 Rahman, M. T. *et al.* Prognostic and therapeutic impact of the chromosome 20q13.2 ZNF217 locus amplification in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer* **118**, 2846-2857, doi:10.1002/cncr.26598 (2012).
- 86 Cohen, P. A., Donini, C. F., Nguyen, N. T., Lincet, H. & Vendrell, J. A. The dark side of ZNF217, a key regulator of tumorigenesis with powerful biomarker value. *Oncotarget* **6**, 41566-41581, doi:10.18632/oncotarget.5893 (2015).
- 87 Tsuchiya, A. *et al.* Expression Profiling in Ovarian Clear Cell Carcinoma: Identification of Hepatocyte Nuclear Factor-1 β ; as a Molecular Marker and a Possible Molecular Target for Therapy of Ovarian Clear Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology* **163**, 2503-2512, doi:10.1016/S0002-9440(10)63605-X (2003).
- 88 Yamaguchi, K. *et al.* Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes. *Oncogene* **29**, 1741-1752, doi:10.1038/onc.2009.470 (2010).
- 89 Lopes-Coelho, F. *et al.* HNF1 β drives glutathione (GSH) synthesis underlying intrinsic carboplatin resistance of ovarian clear cell carcinoma (OCCC). *Tumour Biol* **37**, 4813-4829, doi:10.1007/s13277-015-4290-5 (2016).
- 90 Mogami, T. *et al.* Annexin A4 is involved in proliferation, chemo-resistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *PLoS One* **8**, e80359, doi:10.1371/journal.pone.0080359 (2013).
- 91 Boussios, S. *et al.* Wise Management of Ovarian Cancer: On the Cutting Edge. *J Pers Med* **10**, doi:10.3390/jpm10020041 (2020).
- 92 Mikula-Pietrasik, J. *et al.* Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells. *Cell Mol Life Sci*, doi:10.1007/s00018-018-2954-1 (2018).
- 93 Wang, D. & Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 307-320, doi:10.1038/nrd1691 (2005).

- 94 Ozols, R. F. *et al.* Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* **21**, 3194-3200, doi:10.1200/JCO.2003.02.153 (2003).
- 95 Weaver, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell* **25**, 2677-2681, doi:10.1091/mbc.E14-04-0916 (2014).
- 96 Schiff, P. B. & Horwitz, S. B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1561-1565, doi:10.1073/pnas.77.3.1561 (1980).
- 97 Goff, B. A. *et al.* Clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy in stage III disease. *Gynecol Oncol* **60**, 412-417, doi:10.1006/gyno.1996.0065 (1996).
- 98 Itamochi, H. *et al.* Low proliferation activity may be associated with chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary. *Obstetrics & Gynecology* **100**, 281-287, doi:[https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(02\)02040-9](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(02)02040-9) (2002).
- 99 Itamochi, H. *et al.* Sensitivity to anticancer agents and resistance mechanisms in clear cell carcinoma of the ovary. *Jpn J Cancer Res* **93**, 723-728, doi:10.1111/j.1349-7006.2002.tb01312.x (2002).
- 100 Tsuda, H. *et al.* Identification of overexpression and amplification of ABCF2 in clear cell ovarian adenocarcinomas by cDNA microarray analyses. *Clin Cancer Res* **11**, 6880-6888, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0751 (2005).
- 101 Ohishi, Y. *et al.* ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **8**, 3767-3775 (2002).
- 102 Schwartz, D. R. *et al.* Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Res* **62**, 4722-4729 (2002).
- 103 Kim, A. *et al.* Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin. *Int J Cancer* **125**, 2316-2322, doi:10.1002/ijc.24587 (2009).
- 104 Morimoto, A. *et al.* Annexin A4 induces platinum resistance in a chloride-and calcium-dependent manner. *Oncotarget* **5**, 7776-7787, doi:10.18632/oncotarget.2306 (2014).

- 105 Matsuzaki, S. *et al.* Annexin A4-conferred platinum resistance is mediated by the copper transporter ATP7A. *Int J Cancer* **134**, 1796-1809, doi:10.1002/ijc.28526 (2014).
- 106 Amano, T. *et al.* Abundance of mitochondrial superoxide dismutase is a negative predictive biomarker for endometriosis-associated ovarian cancers. *World J Surg Oncol* **17**, 24, doi:10.1186/s12957-019-1565-0 (2019).
- 107 DeLair, D. *et al.* Morphologic spectrum of immunohistochemically characterized clear cell carcinoma of the ovary: a study of 155 cases. *Am J Surg Pathol* **35**, 36-44, doi:10.1097/PAS.0b013e3181ff400e (2011).
- 108 Kobel, M. *et al.* A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *Am J Surg Pathol* **33**, 14-21, doi:10.1097/PAS.0b013e3181788546 (2009).
- 109 Hemachandra, L. P. *et al.* Mitochondrial Superoxide Dismutase Has a Protumorigenic Role in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Cancer Res* **75**, 4973-4984, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3799 (2015).
- 110 Reed, E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res* **11**, 6100-6102, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1083 (2005).
- 111 Reed, E., Yu, J. J., Davies, A., Gannon, J. & Armentrout, S. L. Clear cell tumors have higher mRNA levels of ERCC1 and XPB than other histological types of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 5299-5305 (2003).
- 112 Du, P., Wang, Y., Chen, L., Gan, Y. & Wu, Q. High ERCC1 expression is associated with platinum-resistance, but not survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett* **12**, 857-862, doi:10.3892/ol.2016.4732 (2016).
- 113 Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241, doi:10.1016/s0092-8674(00)80405-5 (1997).
- 114 Brunet, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868, doi:10.1016/s0092-8674(00)80595-4 (1999).
- 115 Dijkers, P. F. *et al.* FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol* **156**, 531-542, doi:10.1083/jcb.200108084 (2002).

- 116 Mayo, L. D. & Donner, D. B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11598-11603, doi:10.1073/pnas.181181198 (2001).
- 117 Zhou, B. P. *et al.* HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* **3**, 973-982, doi:10.1038/ncb1101-973 (2001).
- 118 Villunger, A. *et al.* p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**, 1036-1038, doi:10.1126/science.1090072 (2003).
- 119 Berg, T., Notttrup, T. J. & Roed, H. Gemcitabine for recurrent ovarian cancer - a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* **155**, 530-537, doi:10.1016/j.ygyno.2019.09.026 (2019).
- 120 Pujade-Lauraine, E. *et al.* Pegylated liposomal Doxorubicin and Carboplatin compared with Paclitaxel and Carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *J Clin Oncol* **28**, 3323-3329, doi:10.1200/JCO.2009.25.7519 (2010).
- 121 Pignata, S. *et al.* Carboplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus pegylated liposomal doxorubicin as first-line treatment for patients with ovarian cancer: the MITO-2 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* **29**, 3628-3635, doi:10.1200/JCO.2010.33.8566 (2011).
- 122 Chelariu-Raicu, A., Coleman, R. L. & Sood, A. K. Anti-Angiogenesis Therapy in Ovarian Cancer: Which Patient is It Most Likely to Benefit? *Oncology (Williston Park)* **33** (2019).
- 123 Mabuchi, S. *et al.* Vascular endothelial growth factor is a promising therapeutic target for the treatment of clear cell carcinoma of the ovary. *Mol Cancer Ther* **9**, 2411-2422, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0169 (2010).
- 124 Kuroda, T. & Kohno, T. Precision medicine for ovarian clear cell carcinoma based on gene alterations. *Int J Clin Oncol* **25**, 419-424, doi:10.1007/s10147-020-01622-z (2020).
- 125 Rahman, M. *et al.* Clinicopathologic and biological analysis of PIK3CA mutation in ovarian clear cell carcinoma. *Hum Pathol* **43**, 2197-2206, doi:10.1016/j.humpath.2012.03.011 (2012).

- 126 Mabuchi, S. *et al.* mTOR is a promising therapeutic target both in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant clear cell carcinoma of the ovary. *Clin Cancer Res* **15**, 5404-5413, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0365 (2009).
- 127 Farley, J. H. *et al.* A phase II evaluation of temsirolimus in combination with carboplatin and paclitaxel followed by temsirolimus consolidation as first-line therapy in the treatment of stage III-IV clear cell carcinoma of the ovary. *Journal of Clinical Oncology* **34**, 5531-5531, doi:10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.5531 (2016).
- 128 Takano, M. *et al.* Clear cell carcinoma of the ovary: a retrospective multicentre experience of 254 patients with complete surgical staging. *Br J Cancer* **94**, 1369-1374, doi:10.1038/sj.bjc.6603116 (2006).
- 129 Kim, H. J. *et al.* c-MET as a Potential Therapeutic Target in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Sci Rep* **6**, 38502, doi:10.1038/srep38502 (2016).
- 130 Konstantinopoulos, P. A. *et al.* Phase II study of single-agent cabozantinib in patients with recurrent clear cell ovarian, primary peritoneal or fallopian tube cancer (NRG-GY001). *Gynecol Oncol* **150**, 9-13, doi:10.1016/j.ygyno.2018.04.572 (2018).
- 131 Bookman, M. A., Darcy, K. M., Clarke-Pearson, D., Boothby, R. A. & Horowitz, I. R. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* **21**, 283-290, doi:10.1200/JCO.2003.10.104 (2003).
- 132 Koopman, T. *et al.* HER2 immunohistochemistry in endometrial and ovarian clear cell carcinoma: discordance between antibodies and with in-situ hybridisation. *Histopathology* **73**, 852-863, doi:10.1111/his.13704 (2018).
- 133 Kim, K. H. *et al.* SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med* **21**, 1491-1496, doi:10.1038/nm.3968 (2015).
- 134 Williamson, C. T. *et al.* ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A. *Nat Commun* **7**, 13837, doi:10.1038/ncomms13837 (2016).

- 135 Miller, R. E. *et al.* Synthetic Lethal Targeting of ARID1A-Mutant Ovarian Clear Cell Tumors with Dasatinib. *Mol Cancer Ther* **15**, 1472-1484, doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0554 (2016).
- 136 Bitler, B. G. *et al.* ARID1A-mutated ovarian cancers depend on HDAC6 activity. *Nat Cell Biol* **19**, 962-973, doi:10.1038/ncb3582 (2017).
- 137 Ogiwara, H. *et al.* Targeting the Vulnerability of Glutathione Metabolism in ARID1A-Deficient Cancers. *Cancer Cell* **35**, 177-190 e178, doi:10.1016/j.ccell.2018.12.009 (2019).
- 138 Berns, K. *et al.* ARID1A mutation sensitizes most ovarian clear cell carcinomas to BET inhibitors. *Oncogene* **37**, 4611-4625, doi:10.1038/s41388-018-0300-6 (2018).
- 139 Mirza, M. R. *et al.* The forefront of ovarian cancer therapy: update on PARP inhibitors. *Ann Oncol* **31**, 1148-1159, doi:10.1016/j.annonc.2020.06.004 (2020).
- 140 Hamanishi, J. *et al.* Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* **33**, 4015-4022, doi:10.1200/JCO.2015.62.3397 (2015).
- 141 Anglesio, M. S. *et al.* IL6-STAT3-HIF signaling and therapeutic response to the angiogenesis inhibitor sunitinib in ovarian clear cell cancer. *Clin Cancer Res* **17**, 2538-2548, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3314 (2011).
- 142 Nishio, H. *et al.* Immunosuppression through constitutively activated NF-kappaB signalling in human ovarian cancer and its reversal by an NF-kappaB inhibitor. *Br J Cancer* **110**, 2965-2974, doi:10.1038/bjc.2014.251 (2014).
- 143 Peng, J. *et al.* Chemotherapy Induces Programmed Cell Death-Ligand 1 Overexpression via the Nuclear Factor-kappaB to Foster an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer. *Cancer Res* **75**, 5034-5045, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3098 (2015).
- 144 Provencher, D. M. *et al.* Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **36**, 357-361, doi:10.1290/1071-2690(2000)036<0357:COFNEO>2.0.CO;2 (2000).

- 145 Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C. & Schultz, N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* **4**, 2126, doi:10.1038/ncomms3126 (2013).
- 146 Barretina, J. *et al.* The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* **483**, 603-607, doi:10.1038/nature11003 (2012).
- 147 Wu, J. N. & Roberts, C. W. ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov* **3**, 35-43, doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0361 (2013).
- 148 Ligresti, G. *et al.* PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle* **8**, 1352-1358, doi:10.4161/cc.8.9.8255 (2009).
- 149 Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-636, doi:10.1016/0014-4827(65)90211-9 (1965).
- 150 Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621, doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6 (1961).
- 151 Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460, doi:10.1038/345458a0 (1990).
- 152 Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **14**, 501-513, doi:10.1016/s1097-2765(04)00256-4 (2004).
- 153 Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* **8**, 2540-2551, doi:10.1101/gad.8.21.2540 (1994).
- 154 te Poele, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J. & Joel, S. P. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **62**, 1876-1883 (2002).
- 155 Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638-642, doi:10.1038/nature05327 (2006).

- 156 Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-637, doi:10.1038/nature05268 (2006).
- 157 Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M. F. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev* **21**, 43-48, doi:10.1101/gad.1487307 (2007).
- 158 Mallette, F. A. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence. *Cell Cycle* **6**, 1831-1836, doi:10.4161/cc.6.15.4516 (2007).
- 159 de Magalhaes, J. P. *et al.* Gene expression and regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human foreskin fibroblasts expressing or not telomerase. *Exp Gerontol* **39**, 1379-1389, doi:10.1016/j.exger.2004.06.004 (2004).
- 160 Borodkina, A., Shatrova, A., Abushik, P., Nikolsky, N. & Burova, E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany NY)* **6**, 481-495, doi:10.18632/aging.100673 (2014).
- 161 Munro, J., Barr, N. I., Ireland, H., Morrison, V. & Parkinson, E. K. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp Cell Res* **295**, 525-538, doi:10.1016/j.yexcr.2004.01.017 (2004).
- 162 Bakkenist, C. J. & Kastan, M. B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506, doi:10.1038/nature01368 (2003).
- 163 Alimonti, A. *et al.* A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest* **120**, 681-693, doi:10.1172/JCI40535 (2010).
- 164 Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **192**, 547-556, doi:10.1083/jcb.201009094 (2011).
- 165 Wiley, C. D. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab* **23**, 303-314, doi:10.1016/j.cmet.2015.11.011 (2016).

- 166 Kang, T. W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **479**, 547-551, doi:10.1038/nature10599 (2011).
- 167 Minamino, T. *et al.* A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* **15**, 1082-1087, doi:10.1038/nm.2014 (2009).
- 168 Hernandez-Segura, A., Nehme, J. & Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol* **28**, 436-453, doi:10.1016/j.tcb.2018.02.001 (2018).
- 169 Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367, doi:10.1073/pnas.92.20.9363 (1995).
- 170 Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D. & Sedivy, J. M. Cellular senescence in aging primates. *Science* **311**, 1257, doi:10.1126/science.1122446 (2006).
- 171 Wang, C. *et al.* DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* **8**, 311-323, doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00481.x (2009).
- 172 Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189, doi:10.1038/nature16932 (2016).
- 173 Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236, doi:10.1038/nature10600 (2011).
- 174 Chang, J. *et al.* Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* **22**, 78-83, doi:10.1038/nm.4010 (2016).
- 175 Baar, M. P. *et al.* Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **169**, 132-147 e116, doi:10.1016/j.cell.2017.02.031 (2017).
- 176 de Keizer, P. L. *et al.* Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer Res* **70**, 8526-8536, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1563 (2010).
- 177 Mihara, M. *et al.* p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**, 577-590, doi:10.1016/s1097-2765(03)00050-9 (2003).
- 178 Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* **31**, 722-733, doi:10.1016/j.devcel.2014.11.012 (2014).

- 179 Munoz-Espin, D. & Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 482-496, doi:10.1038/nrm3823 (2014).
- 180 Hecker, L. *et al.* Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med* **6**, 231ra247, doi:10.1126/scitranslmed.3008182 (2014).
- 181 Markowski, D. N. *et al.* HMGA2 expression in white adipose tissue linking cellular senescence with diabetes. *Genes Nutr* **8**, 449-456, doi:10.1007/s12263-013-0354-6 (2013).
- 182 Sousa-Victor, P. *et al.* Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* **506**, 316-321, doi:10.1038/nature13013 (2014).
- 183 Krizhanovsky, V. *et al.* Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* **134**, 657-667, doi:10.1016/j.cell.2008.06.049 (2008).
- 184 Jun, J. I. & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* **12**, 676-685, doi:10.1038/ncb2070 (2010).
- 185 Wolstein, J. M. *et al.* INK4a knockout mice exhibit increased fibrosis under normal conditions and in response to unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**, F1486-1495, doi:10.1152/ajprenal.00378.2010 (2010).
- 186 Zhu, F. *et al.* Senescent cardiac fibroblast is critical for cardiac fibrosis after myocardial infarction. *PLoS One* **8**, e74535, doi:10.1371/journal.pone.0074535 (2013).
- 187 Mizuno, S. *et al.* p53 Gene deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **300**, L753-761, doi:10.1152/ajplung.00286.2010 (2011).
- 188 Diez-Juan, A. & Andres, V. The growth suppressor p27(Kip1) protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB J* **15**, 1989-1995, doi:10.1096/fj.01-0130com (2001).
- 189 Clements, M. E., Chaber, C. J., Ledbetter, S. R. & Zuk, A. Increased cellular senescence and vascular rarefaction exacerbate the progression of kidney fibrosis in aged mice following transient ischemic injury. *PLoS One* **8**, e70464, doi:10.1371/journal.pone.0070464 (2013).

- 190 Munoz-Espin, D. *et al.* Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104-1118, doi:10.1016/j.cell.2013.10.019 (2013).
- 191 Storer, M. *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119-1130, doi:10.1016/j.cell.2013.10.041 (2013).
- 192 Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660-665, doi:10.1038/nature03841 (2005).
- 193 Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**, 725-730, doi:10.1038/nature03918 (2005).
- 194 Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* **10**, 51-57, doi:10.1038/nrc2772 (2010).
- 195 Dankort, D. *et al.* A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev* **21**, 379-384, doi:10.1101/gad.1516407 (2007).
- 196 Young, A. P. *et al.* VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol* **10**, 361-369, doi:10.1038/ncb1699 (2008).
- 197 Sarkisian, C. J. *et al.* Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**, 493-505, doi:10.1038/ncb1567 (2007).
- 198 Pollock, P. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**, 19-20, doi:10.1038/ng1054 (2003).
- 199 Lin, W. M. *et al.* Outcome of patients with de novo versus nevus-associated melanoma. *J Am Acad Dermatol* **72**, 54-58, doi:10.1016/j.jaad.2014.09.028 (2015).
- 200 Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720-724, doi:10.1038/nature03890 (2005).
- 201 Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656-660, doi:10.1038/nature05529 (2007).
- 202 Nelson, G. *et al.* A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell* **11**, 345-349, doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00795.x (2012).

- 203 Laberge, R. M. *et al.* MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol* **17**, 1049-1061, doi:10.1038/ncb3195 (2015).
- 204 Pereira, B. I. *et al.* Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8(+) T cell inhibition. *Nat Commun* **10**, 2387, doi:10.1038/s41467-019-10335-5 (2019).
- 205 Ahadi, S. *et al.* Personal aging markers and ageotypes revealed by deep longitudinal profiling. *Nat Med* **26**, 83-90, doi:10.1038/s41591-019-0719-5 (2020).
- 206 Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12072-12077, doi:10.1073/pnas.211053698 (2001).
- 207 Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J. & Beausejour, C. M. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* **281**, 29568-29574, doi:10.1074/jbc.M603307200 (2006).
- 208 Coppe, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* **6**, 2853-2868, doi:10.1371/journal.pbio.0060301 (2008).
- 209 Rohnlalter, V. *et al.* A multi-stage process including transient polyploidization and EMT precedes the emergence of chemoresistant ovarian carcinoma cells with a dedifferentiated and pro-inflammatory secretory phenotype. *Oncotarget* **6**, 40005-40025, doi:10.18632/oncotarget.5552 (2015).
- 210 Saleh, T., Tyutyunyk-Massey, L. & Gewirtz, D. A. Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence as a Model of Disease Recurrence after Dormancy. *Cancer Res*, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3437 (2019).
- 211 Saleh, T. *et al.* Tumor cell escape from therapy-induced senescence. *Biochem Pharmacol* **162**, 202-212, doi:10.1016/j.bcp.2018.12.013 (2019).
- 212 Milanovic, M. *et al.* Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* **553**, 96-100, doi:10.1038/nature25167 (2018).
- 213 Reyes, J. *et al.* Fluctuations in p53 Signaling Allow Escape from Cell-Cycle Arrest. *Mol Cell* **71**, 581-591 e585, doi:10.1016/j.molcel.2018.06.031 (2018).

- 214 Hsu, C. H., Altschuler, S. J. & Wu, L. F. Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy. *Cell* **178**, 361-373 e312, doi:10.1016/j.cell.2019.05.041 (2019).
- 215 Lee, J. H. & Paull, T. T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**, 551-554, doi:10.1126/science.1108297 (2005).
- 216 Zou, L. & Elledge, S. J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**, 1542-1548, doi:10.1126/science.1083430 (2003).
- 217 Shiloh, Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* **31**, 402-410, doi:10.1016/j.tibs.2006.05.004 (2006).
- 218 Zou, L. Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response. *Genes Dev* **21**, 879-885, doi:10.1101/gad.1550307 (2007).
- 219 Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J. & Elledge, S. J. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**, 1713-1716, doi:10.1126/science.1065521 (2001).
- 220 Kozlov, S. V. *et al.* Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J* **25**, 3504-3514, doi:10.1038/sj.emboj.7601231 (2006).
- 221 Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**, 42462-42467, doi:10.1074/jbc.C100466200 (2001).
- 222 Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-5868, doi:10.1074/jbc.273.10.5858 (1998).
- 223 Lou, Z. *et al.* MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* **21**, 187-200, doi:10.1016/j.molcel.2005.11.025 (2006).
- 224 Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M. & Elledge, S. J. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* **421**, 961-966, doi:10.1038/nature01446 (2003).
- 225 Fernandez-Capetillo, O. *et al.* DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* **4**, 993-997, doi:10.1038/ncb884 (2002).

- 226 Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T. & Chen, J. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J Cell Biol* **153**, 613-620, doi:10.1083/jcb.153.3.613 (2001).
- 227 St Onge, R. P., Udell, C. M., Casselman, R. & Davey, S. The human G2 checkpoint control protein hRAD9 is a nuclear phosphoprotein that forms complexes with hRAD1 and hHUS1. *Mol Biol Cell* **10**, 1985-1995, doi:10.1091/mbc.10.6.1985 (1999).
- 228 Zou, L., Cortez, D. & Elledge, S. J. Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev* **16**, 198-208, doi:10.1101/gad.950302 (2002).
- 229 Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y. & Dunphy, W. G. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* **124**, 943-955, doi:10.1016/j.cell.2005.12.041 (2006).
- 230 Liu, S. *et al.* Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol* **26**, 6056-6064, doi:10.1128/MCB.00492-06 (2006).
- 231 Buscemi, G. *et al.* Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. *Oncogene* **23**, 7691-7700, doi:10.1038/sj.onc.1207986 (2004).
- 232 Liu, Q. *et al.* Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**, 1448-1459 (2000).
- 233 Matsuoka, S. *et al.* Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10389-10394, doi:10.1073/pnas.190030497 (2000).
- 234 Gatei, M. *et al.* Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* **278**, 14806-14811, doi:10.1074/jbc.M210862200 (2003).
- 235 Bartek, J. & Lukas, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* **3**, 421-429, doi:10.1016/s1535-6108(03)00110-7 (2003).
- 236 Mailand, N. *et al.* Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425-1429, doi:10.1126/science.288.5470.1425 (2000).
- 237 Banin, S. *et al.* Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**, 1674-1677, doi:10.1126/science.281.5383.1674 (1998).

- 238 Shieh, S. Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. & Prives, C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* **14**, 289-300 (2000).
- 239 Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331, doi:10.1016/s0092-8674(00)81871-1 (1997).
- 240 Abbas, T. & Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* **9**, 400-414, doi:10.1038/nrc2657 (2009).
- 241 d'Adda di Fagagna, F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* **8**, 512-522, doi:10.1038/nrc2440 (2008).
- 242 Beroukhi, R. *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **463**, 899-905, doi:10.1038/nature08822 (2010).
- 243 Poi, M. J. *et al.* Evidence that P12, a specific variant of P16(INK4A), plays a suppressive role in human pancreatic carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **436**, 217-222, doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.078 (2013).
- 244 Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. & Bar-Sagi, D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* **1**, 20-26, doi:10.1038/8991 (1999).
- 245 Li, J., Poi, M. J. & Tsai, M. D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. *Biochemistry* **50**, 5566-5582, doi:10.1021/bi200642e (2011).
- 246 Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-707, doi:10.1038/366704a0 (1993).
- 247 Russo, A. A., Tong, L., Lee, J. O., Jeffrey, P. D. & Pavletich, N. P. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* **395**, 237-243, doi:10.1038/26155 (1998).
- 248 Lukas, J. *et al.* Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* **375**, 503-506, doi:10.1038/375503a0 (1995).

- 249 Mihara, K. *et al.* Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* **246**, 1300-1303, doi:10.1126/science.2588006 (1989).
- 250 Zindy, F. *et al.* Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. *Cell Growth Differ* **8**, 1139-1150 (1997).
- 251 Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* **114**, 1299-1307, doi:10.1172/JCI22475 (2004).
- 252 Brenner, A. J., Stampfer, M. R. & Aldaz, C. M. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* **17**, 199-205, doi:10.1038/sj.onc.1201919 (1998).
- 253 Ramirez, R. D. *et al.* Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* **15**, 398-403, doi:10.1101/gad.859201 (2001).
- 254 Velicescu, M. *et al.* Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells. *Cancer Res* **62**, 2378-2384 (2002).
- 255 Venturelli, S. *et al.* Differential induction of apoptosis and senescence by the DNA methyltransferase inhibitors 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumor cells. *Mol Cancer Ther* **12**, 2226-2236, doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0137 (2013).
- 256 Xiu, M. *et al.* The transcriptional repressor HBP1 is a target of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cell cycle regulation. *Mol Cell Biol* **23**, 8890-8901, doi:10.1128/mcb.23.23.8890-8901.2003 (2003).
- 257 Pan, K. *et al.* HBP1-mediated transcriptional regulation of DNA methyltransferase 1 and its impact on cell senescence. *Mol Cell Biol* **33**, 887-903, doi:10.1128/MCB.00637-12 (2013).
- 258 Yap, K. L. *et al.* Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell* **38**, 662-674, doi:10.1016/j.molcel.2010.03.021 (2010).

- 259 Bracken, A. P. *et al.* The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev* **21**, 525-530, doi:10.1101/gad.415507 (2007).
- 260 Itahana, K. *et al.* Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* **23**, 389-401, doi:10.1128/mcb.23.1.389-401.2003 (2003).
- 261 Barilari, M. *et al.* ZRF1 is a novel S6 kinase substrate that drives the senescence programme. *EMBO J* **36**, 736-750, doi:10.15252/emj.201694966 (2017).
- 262 Richly, H. *et al.* Transcriptional activation of polycomb-repressed genes by ZRF1. *Nature* **468**, 1124-1128, doi:10.1038/nature09574 (2010).
- 263 Shoji, W., Inoue, T., Yamamoto, T. & Obinata, M. MIDA1, a protein associated with Id, regulates cell growth. *J Biol Chem* **270**, 24818-24825, doi:10.1074/jbc.270.42.24818 (1995).
- 264 Ohtani, N. *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067-1070, doi:10.1038/35059131 (2001).
- 265 Zheng, W., Wang, H., Xue, L., Zhang, Z. & Tong, T. Regulation of cellular senescence and p16(INK4a) expression by Id1 and E47 proteins in human diploid fibroblast. *J Biol Chem* **279**, 31524-31532, doi:10.1074/jbc.M400365200 (2004).
- 266 Pagliuca, A., Gallo, P., De Luca, P. & Lania, L. Class A helix-loop-helix proteins are positive regulators of several cyclin-dependent kinase inhibitors' promoter activity and negatively affect cell growth. *Cancer Res* **60**, 1376-1382 (2000).
- 267 Wang, X. *et al.* The proximal GC-rich region of p16(INK4a) gene promoter plays a role in its transcriptional regulation. *Mol Cell Biochem* **301**, 259-266, doi:10.1007/s11010-007-9427-4 (2007).
- 268 Passegue, E. & Wagner, E. F. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J* **19**, 2969-2979, doi:10.1093/emboj/19.12.2969 (2000).

- 269 Gan, Q. *et al.* PPAR{gamma} accelerates cellular senescence by inducing p16INK4{alpha} expression in human diploid fibroblasts. *J Cell Sci* **121**, 2235-2245, doi:10.1242/jcs.026633 (2008).
- 270 Courtois-Cox, S. *et al.* A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 459-472, doi:10.1016/j.ccr.2006.10.003 (2006).
- 271 Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M. & Green, M. R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **132**, 363-374, doi:10.1016/j.cell.2007.12.032 (2008).
- 272 Acosta, J. C. *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006-1018, doi:10.1016/j.cell.2008.03.038 (2008).
- 273 Kortlever, R. M., Higgins, P. J. & Bernardis, R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol* **8**, 877-884, doi:10.1038/ncb1448 (2006).
- 274 Dorr, J. R. *et al.* Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* **501**, 421-425, doi:10.1038/nature12437 (2013).
- 275 Alexander, K. & Hinds, P. W. Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. *Mol Cell Biol* **21**, 3616-3631, doi:10.1128/MCB.21.11.3616-3631.2001 (2001).
- 276 Alexander, K., Yang, H. S. & Hinds, P. W. Cellular senescence requires CDK5 repression of Rac1 activity. *Mol Cell Biol* **24**, 2808-2819, doi:10.1128/mcb.24.7.2808-2819.2004 (2004).
- 277 Yang, H. S. & Hinds, P. W. Increased ezrin expression and activation by CDK5 coincident with acquisition of the senescent phenotype. *Mol Cell* **11**, 1163-1176, doi:10.1016/s1097-2765(03)00135-7 (2003).
- 278 Algrain, M., Turunen, O., Vaheri, A., Louvard, D. & Arpin, M. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J Cell Biol* **120**, 129-139, doi:10.1083/jcb.120.1.129 (1993).
- 279 Gary, R. & Bretscher, A. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* **6**, 1061-1075, doi:10.1091/mbc.6.8.1061 (1995).

- 280 Moujaber, O. *et al.* Cellular senescence is associated with reorganization of the microtubule cytoskeleton. *Cell Mol Life Sci* **76**, 1169-1183, doi:10.1007/s00018-018-2999-1 (2019).
- 281 Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. & Erusalimsky, J. D. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**, 3613-3622 (2000).
- 282 Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195, doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x (2006).
- 283 Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. & Toussaint, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* **4**, 1798-1806, doi:10.1038/nprot.2009.191 (2009).
- 284 Rodier, F. *et al.* DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* **124**, 68-81, doi:10.1242/jcs.071340 (2011).
- 285 Huyen, Y. *et al.* Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**, 406-411, doi:10.1038/nature03114 (2004).
- 286 Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. & Bonner, W. M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**, 905-916, doi:10.1083/jcb.146.5.905 (1999).
- 287 Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**, 973-979, doi:10.1038/ncb1909 (2009).
- 288 Chandra, T. *et al.* Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Mol Cell* **47**, 203-214, doi:10.1016/j.molcel.2012.06.010 (2012).
- 289 Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-716, doi:10.1016/s0092-8674(03)00401-x (2003).

- 290 Yosef, R. *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* **7**, 11190, doi:10.1038/ncomms11190 (2016).
- 291 Ryu, S. J., Oh, Y. S. & Park, S. C. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ* **14**, 1020-1028, doi:10.1038/sj.cdd.4402091 (2007).
- 292 Sanders, Y. Y. *et al.* Histone modifications in senescence-associated resistance to apoptosis by oxidative stress. *Redox Biol* **1**, 8-16, doi:10.1016/j.redox.2012.11.004 (2013).
- 293 Ryu, S. J. *et al.* On the role of major vault protein in the resistance of senescent human diploid fibroblasts to apoptosis. *Cell Death Differ* **15**, 1673-1680, doi:10.1038/cdd.2008.96 (2008).
- 294 Lee, Y. H. *et al.* c-myb has a character of oxidative stress resistance in aged human diploid fibroblasts: regulates SAPK/JNK and Hsp60 pathway consequently. *Biogerontology* **11**, 267-274, doi:10.1007/s10522-009-9244-0 (2010).
- 295 Al-Khalaf, H. H. & Aboussekhra, A. Survivin expression increases during aging and enhances the resistance of aged human fibroblasts to genotoxic stress. *Age (Dordr)* **35**, 549-562, doi:10.1007/s11357-011-9378-2 (2013).
- 296 Kwon, S. M., Hong, S. M., Lee, Y. K., Min, S. & Yoon, G. Metabolic features and regulation in cell senescence. *BMB Rep* **52**, 5-12 (2019).
- 297 Aird, K. M. & Zhang, R. Metabolic alterations accompanying oncogene-induced senescence. *Mol Cell Oncol* **1**, e963481, doi:10.4161/23723548.2014.963481 (2014).
- 298 Wiley, C. D. & Campisi, J. From Ancient Pathways to Aging Cells-Connecting Metabolism and Cellular Senescence. *Cell Metab* **23**, 1013-1021, doi:10.1016/j.cmet.2016.05.010 (2016).
- 299 Kaplon, J. *et al.* A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* **498**, 109-112, doi:10.1038/nature12154 (2013).
- 300 James, E. L. *et al.* Senescent human fibroblasts show increased glycolysis and redox homeostasis with extracellular metabolomes that overlap with those of irreparable DNA

- damage, aging, and disease. *J Proteome Res* **14**, 1854-1871, doi:10.1021/pr501221g (2015).
- 301 Li, M. *et al.* Oncogene-induced cellular senescence elicits an anti-Warburg effect. *Proteomics* **13**, 2585-2596, doi:10.1002/pmic.201200298 (2013).
- 302 Garcia-Prat, L. *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* **529**, 37-42, doi:10.1038/nature16187 (2016).
- 303 Nacarelli, T. & Sell, C. Targeting metabolism in cellular senescence, a role for intervention. *Mol Cell Endocrinol* **455**, 83-92, doi:10.1016/j.mce.2016.08.049 (2017).
- 304 Correia-Melo, C. & Passos, J. F. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim Biophys Acta* **1847**, 1373-1379, doi:10.1016/j.bbabbio.2015.05.017 (2015).
- 305 Passos, J. F. *et al.* Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biol* **5**, e110, doi:10.1371/journal.pbio.0050110 (2007).
- 306 Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X. & Ferbeyre, G. Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* **29**, 4495-4507, doi:10.1128/MCB.01868-08 (2009).
- 307 Passos, J. F. *et al.* Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* **6**, 347, doi:10.1038/msb.2010.5 (2010).
- 308 Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* **221**, 3-12, doi:10.1002/path.2697 (2010).
- 309 Gewirtz, D. A. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy* **9**, 808-812, doi:10.4161/auto.23922 (2013).
- 310 Kwon, Y., Kim, J. W., Jeoung, J. A., Kim, M. S. & Kang, C. Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot. *Mol Cells* **40**, 607-612, doi:10.14348/molcells.2017.0151 (2017).
- 311 Kang, H. T., Lee, K. B., Kim, S. Y., Choi, H. R. & Park, S. C. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One* **6**, e23367, doi:10.1371/journal.pone.0023367 (2011).

- 312 Young, A. R. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**, 798-803, doi:10.1101/gad.519709 (2009).
- 313 Huang, Y. H. *et al.* Autophagy promotes radiation-induced senescence but inhibits bystander effects in human breast cancer cells. *Autophagy* **10**, 1212-1228, doi:10.4161/auto.28772 (2014).
- 314 Slobodnyuk, K. *et al.* Autophagy-induced senescence is regulated by p38alpha signaling. *Cell Death Dis* **10**, 376, doi:10.1038/s41419-019-1607-0 (2019).
- 315 Narita, M. *et al.* Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* **332**, 966-970, doi:10.1126/science.1205407 (2011).
- 316 Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194-1217, doi:10.1016/j.cell.2013.05.039 (2013).
- 317 Hohn, A. *et al.* Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol* **11**, 482-501, doi:10.1016/j.redox.2016.12.001 (2017).
- 318 Nystrom, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J* **24**, 1311-1317, doi:10.1038/sj.emboj.7600599 (2005).
- 319 Shelton, D. N., Chang, E., Whittier, P. S., Choi, D. & Funk, W. D. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* **9**, 939-945, doi:10.1016/s0960-9822(99)80420-5 (1999).
- 320 Chang, B. D. *et al.* Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4291-4296, doi:10.1073/pnas.97.8.4291 (2000).
- 321 Basisty, N., Kale, A., Patel, S., Campisi, J. & Schilling, B. The power of proteomics to monitor senescence-associated secretory phenotypes and beyond: toward clinical applications. *Expert Rev Proteomics*, 1-12, doi:10.1080/14789450.2020.1766976 (2020).
- 322 Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K. & Campisi, J. Cell surface-bound IL-1alpha is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17031-17036, doi:10.1073/pnas.0905299106 (2009).

- 323 Coppe, J. P., Desprez, P. Y., Krtolica, A. & Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **5**, 99-118, doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102144 (2010).
- 324 Tremain, R. *et al.* Defects in TGF-beta signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing v-Ha-ras. *Oncogene* **19**, 1698-1709, doi:10.1038/sj.onc.1203471 (2000).
- 325 Gorgoulis, V. *et al.* Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* **179**, 813-827, doi:10.1016/j.cell.2019.10.005 (2019).
- 326 Faget, D. V., Ren, Q. & Stewart, S. A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer*, doi:10.1038/s41568-019-0156-2 (2019).
- 327 Wolf, J., Rose-John, S. & Garbers, C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine* **70**, 11-20, doi:10.1016/j.cyto.2014.05.024 (2014).
- 328 Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 878-888, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034 (2011).
- 329 Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A. & Bhatt, A. N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol* **37**, 11553-11572, doi:10.1007/s13277-016-5098-7 (2016).
- 330 Sapochnik, M., Fuertes, M. & Arzt, E. Programmed cell senescence: role of IL-6 in the pituitary. *J Mol Endocrinol* **58**, R241-R253, doi:10.1530/JME-17-0026 (2017).
- 331 Baggiolini, M., Walz, A. & Kunkel, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* **84**, 1045-1049, doi:10.1172/JCI114265 (1989).
- 332 David, J. M., Dominguez, C., Hamilton, D. H. & Palena, C. The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines (Basel)* **4**, doi:10.3390/vaccines4030022 (2016).
- 333 Chien, Y. *et al.* Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev* **25**, 2125-2136, doi:10.1101/gad.17276711 (2011).

- 334 Kang, C. *et al.* The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* **349**, aaa5612, doi:10.1126/science.aaa5612 (2015).
- 335 Freund, A., Patil, C. K. & Campisi, J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J* **30**, 1536-1548, doi:10.1038/emboj.2011.69 (2011).
- 336 Hoare, M. *et al.* NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol* **18**, 979-992, doi:10.1038/ncb3397 (2016).
- 337 Chen, Q., Sun, L. & Chen, Z. J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol* **17**, 1142-1149, doi:10.1038/ni.3558 (2016).
- 338 Dou, Z. *et al.* Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* **550**, 402-406, doi:10.1038/nature24050 (2017).
- 339 Gluck, S. *et al.* Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol* **19**, 1061-1070, doi:10.1038/ncb3586 (2017).
- 340 Takahashi, A. *et al.* Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* **9**, 1249, doi:10.1038/s41467-018-03555-8 (2018).
- 341 Toso, A. *et al.* Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep* **9**, 75-89, doi:10.1016/j.celrep.2014.08.044 (2014).
- 342 Kumar, S., Millis, A. J. & Baglioni, C. Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4683-4687, doi:10.1073/pnas.89.10.4683 (1992).
- 343 Kuilman, T. *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019-1031, doi:10.1016/j.cell.2008.03.039 (2008).
- 344 Alspach, E. *et al.* p38MAPK plays a crucial role in stromal-mediated tumorigenesis. *Cancer Discov* **4**, 716-729, doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0743 (2014).

- 345 Jang, M. K. *et al.* The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* **19**, 523-534, doi:10.1016/j.molcel.2005.06.027 (2005).
- 346 Tasdemir, N. *et al.* BRD4 Connects Enhancer Remodeling to Senescence Immune Surveillance. *Cancer Discov* **6**, 612-629, doi:10.1158/2159-8290.CD-16-0217 (2016).
- 347 Aird, K. M. *et al.* HMGB2 orchestrates the chromatin landscape of senescence-associated secretory phenotype gene loci. *J Cell Biol* **215**, 325-334, doi:10.1083/jcb.201608026 (2016).
- 348 Coppe, J. P. *et al.* Tumor suppressor and aging biomarker p16(INK4a) induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J Biol Chem* **286**, 36396-36403, doi:10.1074/jbc.M111.257071 (2011).
- 349 Misawa, T., Tanaka, Y., Okada, R. & Takahashi, A. Biology of extracellular vesicles secreted from senescent cells as senescence-associated secretory phenotype factors. *Geriatr Gerontol Int* **20**, 539-546, doi:10.1111/ggi.13928 (2020).
- 350 Lehmann, B. D. *et al.* Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res* **68**, 7864-7871, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6538 (2008).
- 351 Colombo, M., Raposo, G. & Thery, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 255-289, doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326 (2014).
- 352 Lujambio, A. *et al.* Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. *Cell* **153**, 449-460, doi:10.1016/j.cell.2013.03.020 (2013).
- 353 Eggert, T. *et al.* Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* **30**, 533-547, doi:10.1016/j.ccell.2016.09.003 (2016).
- 354 Canino, C. *et al.* SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene* **31**, 3148-3163, doi:10.1038/onc.2011.485 (2012).
- 355 Aifuwa, I. *et al.* Senescent stromal cells induce cancer cell migration via inhibition of RhoA/ROCK/myosin-based cell contractility. *Oncotarget* **6**, 30516-30531, doi:10.18632/oncotarget.5854 (2015).

- 356 Luo, X. *et al.* Stromal-Initiated Changes in the Bone Promote Metastatic Niche Development. *Cell Rep* **14**, 82-92, doi:10.1016/j.celrep.2015.12.016 (2016).
- 357 Herranz, N. & Gil, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* **128**, 1238-1246, doi:10.1172/JCI95148 (2018).
- 358 Gonzalez-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L. & Munoz-Espin, D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J*, doi:10.1111/febs.15570 (2020).
- 359 Benham, A. M. Protein secretion and the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a012872, doi:10.1101/cshperspect.a012872 (2012).
- 360 Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-358, doi:10.1126/science.1096303 (1975).
- 361 Park, E. & Rapoport, T. A. Mechanisms of Sec61/SecY-mediated protein translocation across membranes. *Annu Rev Biophys* **41**, 21-40, doi:10.1146/annurev-biophys-050511-102312 (2012).
- 362 Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B. & Rapoport, T. A. Transport route for synaptobrevin via a novel pathway of insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J* **14**, 217-223 (1995).
- 363 Rabu, C., Wipf, P., Brodsky, J. L. & High, S. A precursor-specific role for Hsp40/Hsc70 during tail-anchored protein integration at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **283**, 27504-27513, doi:10.1074/jbc.M804591200 (2008).
- 364 Guna, A., Volkmar, N., Christianson, J. C. & Hegde, R. S. The ER membrane protein complex is a transmembrane domain insertase. *Science* **359**, 470-473, doi:10.1126/science.aao3099 (2018).
- 365 Stefanovic, S. & Hegde, R. S. Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* **128**, 1147-1159, doi:10.1016/j.cell.2007.01.036 (2007).
- 366 Schuldiner, M. *et al.* The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* **134**, 634-645, doi:10.1016/j.cell.2008.06.025 (2008).
- 367 Mariappan, M. *et al.* A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature* **466**, 1120-1124, doi:10.1038/nature09296 (2010).

- 368 Shao, S., Rodrigo-Brenni, M. C., Kivlen, M. H. & Hegde, R. S. Mechanistic basis for a molecular triage reaction. *Science* **355**, 298-302, doi:10.1126/science.aah6130 (2017).
- 369 Hessa, T. *et al.* Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature* **475**, 394-397, doi:10.1038/nature10181 (2011).
- 370 Vilardi, F., Stephan, M., Clancy, A., Janshoff, A. & Schwappach, B. WRB and CAML are necessary and sufficient to mediate tail-anchored protein targeting to the ER membrane. *PLoS One* **9**, e85033, doi:10.1371/journal.pone.0085033 (2014).
- 371 Johnson, N. *et al.* TRC40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. *J Cell Sci* **125**, 3612-3620, doi:10.1242/jcs.102608 (2012).
- 372 Shao, S. & Hegde, R. S. A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell* **147**, 1576-1588, doi:10.1016/j.cell.2011.11.048 (2011).
- 373 Lakkaraju, A. K. *et al.* Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol Biol Cell* **23**, 2712-2722, doi:10.1091/mbc.E12-03-0228 (2012).
- 374 Lang, S. *et al.* Different effects of Sec61alpha, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci* **125**, 1958-1969, doi:10.1242/jcs.096727 (2012).
- 375 Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K. & Rapoport, T. A. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* **97**, 553-564, doi:10.1016/s0092-8674(00)80767-9 (1999).
- 376 Cross, B. C., Sinning, I., Lührink, J. & High, S. Delivering proteins for export from the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 255-264, doi:10.1038/nrm2657 (2009).
- 377 Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K. & Hartl, F. U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 781-791, doi:10.1038/nrm1492 (2004).
- 378 Barlowe, C. K. & Miller, E. A. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* **193**, 383-410, doi:10.1534/genetics.112.142810 (2013).
- 379 Bruns, D. & Jahn, R. Molecular determinants of exocytosis. *Pflugers Arch* **443**, 333-338, doi:10.1007/s00424-001-0742-4 (2002).

- 380 Li, L. & Chin, L. S. The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci* **60**, 942-960, doi:10.1007/s00018-003-2240-7 (2003).
- 381 Peters, C. *et al.* Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature* **409**, 581-588, doi:10.1038/35054500 (2001).
- 382 Rizo, J. & Rosenmund, C. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 665-674, doi:10.1038/nsmb.1450 (2008).
- 383 Rabouille, C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol* **27**, 230-240, doi:10.1016/j.tcb.2016.11.007 (2017).
- 384 Giuliani, F., Grieve, A. & Rabouille, C. Unconventional secretion: a stress on GRASP. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 498-504, doi:10.1016/j.ceb.2011.04.005 (2011).
- 385 Steringer, J. P., Muller, H. M. & Nickel, W. Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2--a novel type of protein translocation across membranes? *J Mol Biol* **427**, 1202-1210, doi:10.1016/j.jmb.2014.07.012 (2015).
- 386 Zeitler, M., Steringer, J. P., Muller, H. M., Mayer, M. P. & Nickel, W. HIV-Tat Protein Forms Phosphoinositide-dependent Membrane Pores Implicated in Unconventional Protein Secretion. *J Biol Chem* **290**, 21976-21984, doi:10.1074/jbc.M115.667097 (2015).
- 387 Monteleone, M., Stow, J. L. & Schroder, K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* **74**, 213-218, doi:10.1016/j.cyto.2015.03.022 (2015).
- 388 Adamczyk, M., Griffiths, R., Dewitt, S., Knauper, V. & Aeschlimann, D. P2X7 receptor activation regulates rapid unconventional export of transglutaminase-2. *J Cell Sci* **128**, 4615-4628, doi:10.1242/jcs.175968 (2015).
- 389 McGrath, J. P. & Varshavsky, A. The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* **340**, 400-404, doi:10.1038/340400a0 (1989).
- 390 Sonveaux, N., Vigano, C., Shapiro, A. B., Ling, V. & Ruyschaert, J. M. Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem* **274**, 17649-17654, doi:10.1074/jbc.274.25.17649 (1999).
- 391 Dikic, I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem* **86**, 193-224, doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044908 (2017).

- 392 Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F. & Malhotra, V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol* **188**, 527-536, doi:10.1083/jcb.200911154 (2010).
- 393 Zhang, M., Kenny, S. J., Ge, L., Xu, K. & Schekman, R. Translocation of interleukin-1beta into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.11205 (2015).
- 394 Curwin, A. J. *et al.* ESCRT-III drives the final stages of CUPS maturation for unconventional protein secretion. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.16299 (2016).
- 395 Kowal, J., Tkach, M. & Thery, C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* **29**, 116-125, doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004 (2014).
- 396 Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* **18**, 883-891, doi:10.1038/nm.2753 (2012).
- 397 Tkach, M. & Thery, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**, 1226-1232, doi:10.1016/j.cell.2016.01.043 (2016).
- 398 Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G. & Dubyak, G. R. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* **179**, 1913-1925, doi:10.4049/jimmunol.179.3.1913 (2007).
- 399 Saman, S. *et al.* Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem* **287**, 3842-3849, doi:10.1074/jbc.M111.277061 (2012).
- 400 Rajendran, L. *et al.* Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11172-11177, doi:10.1073/pnas.0603838103 (2006).
- 401 Emmanouilidou, E. *et al.* Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* **30**, 6838-6851, doi:10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010 (2010).

- 402 Lee, J. G., Takahama, S., Zhang, G., Tomarev, S. I. & Ye, Y. Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **18**, 765-776, doi:10.1038/ncb3372 (2016).
- 403 Yoo, J. S. *et al.* Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem* **277**, 11401-11409, doi:10.1074/jbc.M110263200 (2002).
- 404 Kim, J. *et al.* Monomerization and ER Relocalization of GRASP Is a Requisite for Unconventional Secretion of CFTR. *Traffic* **17**, 733-753, doi:10.1111/tra.12403 (2016).
- 405 Gee, H. Y., Noh, S. H., Tang, B. L., Kim, K. H. & Lee, M. G. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell* **146**, 746-760, doi:10.1016/j.cell.2011.07.021 (2011).
- 406 Liu, T., Daniels, C. K. & Cao, S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* **136**, 354-374, doi:10.1016/j.pharmthera.2012.08.014 (2012).
- 407 Chappell, T. G. *et al.* Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* **45**, 3-13, doi:10.1016/0092-8674(86)90532-5 (1986).
- 408 Szabo, A. *et al.* The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10345-10349, doi:10.1073/pnas.91.22.10345 (1994).
- 409 Palleros, D. R., Welch, W. J. & Fink, A. L. Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5719-5723, doi:10.1073/pnas.88.13.5719 (1991).
- 410 Hohfeld, J., Minami, Y. & Hartl, F. U. Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**, 589-598, doi:10.1016/0092-8674(95)90099-3 (1995).
- 411 Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S. & Wang, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2560-2570, doi:10.1007/s00018-006-6192-6 (2006).

- 412 Kampinga, H. H. & Craig, E. A. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 579-592, doi:10.1038/nrm2941 (2010).
- 413 Tsai, J. & Douglas, M. G. A conserved HPD sequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J Biol Chem* **271**, 9347-9354, doi:10.1074/jbc.271.16.9347 (1996).
- 414 Elwi, A. N., Lee, B., Meijndert, H. C., Braun, J. E. & Kim, S. W. Mitochondrial chaperone DnaJA3 induces Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 1366-1376, doi:10.1016/j.biocel.2012.05.004 (2012).
- 415 Westhoff, B., Chapple, J. P., van der Spuy, J., Hohfeld, J. & Cheetham, M. E. HSP70 is a neuronal shuttling factor for the sorting of chaperone clients to the proteasome. *Curr Biol* **15**, 1058-1064, doi:10.1016/j.cub.2005.04.058 (2005).
- 416 Bermak, J. C., Li, M., Bullock, C. & Zhou, Q. Y. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat Cell Biol* **3**, 492-498, doi:10.1038/35074561 (2001).
- 417 Yi, Z., Yuan, Z., Rice, C. M. & MacDonald, M. R. Flavivirus replication complex assembly revealed by DNAJC14 functional mapping. *J Virol* **86**, 11815-11832, doi:10.1128/JVI.01022-12 (2012).
- 418 Tchernev, V. T. *et al.* The Chediak-Higashi protein interacts with SNARE complex and signal transduction proteins. *Mol Med* **8**, 56-64 (2002).
- 419 Jung, J. *et al.* The HSP70 co-chaperone DNAJC14 targets misfolded pendrin for unconventional protein secretion. *Nat Commun* **7**, 11386, doi:10.1038/ncomms11386 (2016).
- 420 Kim, J., Gee, H. Y. & Lee, M. G. Unconventional protein secretion - new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases. *J Cell Sci* **131**, doi:10.1242/jcs.213686 (2018).
- 421 Schotman, H., Karhinen, L. & Rabouille, C. dGRASP-mediated noncanonical integrin secretion is required for Drosophila epithelial remodeling. *Dev Cell* **14**, 171-182, doi:10.1016/j.devcel.2007.12.006 (2008).

- 422 Dimou, E. & Nickel, W. Unconventional mechanisms of eukaryotic protein secretion. *Curr Biol* **28**, R406-R410, doi:10.1016/j.cub.2017.11.074 (2018).
- 423 Hassink, G. C. *et al.* The ER-resident ubiquitin-specific protease 19 participates in the UPR and rescues ERAD substrates. *EMBO Rep* **10**, 755-761, doi:10.1038/embor.2009.69 (2009).
- 424 Lee, J. G., Kim, W., Gygi, S. & Ye, Y. Characterization of the deubiquitinating activity of USP19 and its role in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* **289**, 3510-3517, doi:10.1074/jbc.M113.538934 (2014).
- 425 Xu, Y. *et al.* DNAJC5 facilitates USP19-dependent unconventional secretion of misfolded cytosolic proteins. *Cell Discov* **4**, 11, doi:10.1038/s41421-018-0012-7 (2018).
- 426 Lu, Y. *et al.* USP19 deubiquitinating enzyme supports cell proliferation by stabilizing KPC1, a ubiquitin ligase for p27Kip1. *Mol Cell Biol* **29**, 547-558, doi:10.1128/MCB.00329-08 (2009).
- 427 Braun, J. E., Wilbanks, S. M. & Scheller, R. H. The cysteine string secretory vesicle protein activates Hsc70 ATPase. *J Biol Chem* **271**, 25989-25993, doi:10.1074/jbc.271.42.25989 (1996).
- 428 Chamberlain, L. H. & Burgoyne, R. D. The molecular chaperone function of the secretory vesicle cysteine string proteins. *J Biol Chem* **272**, 31420-31426, doi:10.1074/jbc.272.50.31420 (1997).
- 429 Zinsmaier, K. E. Cysteine-string protein's neuroprotective role. *J Neurogenet* **24**, 120-132, doi:10.3109/01677063.2010.489625 (2010).
- 430 Fontaine, S. N. *et al.* DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *EMBO J* **35**, 1537-1549, doi:10.15252/embj.201593489 (2016).
- 431 Lee, J. *et al.* Secretion of misfolded cytosolic proteins from mammalian cells is independent of chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* **293**, 14359-14370, doi:10.1074/jbc.RA118.003660 (2018).

- 432 Chamberlain, L. H. & Burgoyne, R. D. The cysteine-string domain of the secretory vesicle cysteine-string protein is required for membrane targeting. *Biochem J* **335** (Pt 2), 205-209, doi:10.1042/bj3350205 (1998).
- 433 Chamberlain, L. H. *et al.* The synaptic vesicle protein, cysteine-string protein, is associated with the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes and interacts with syntaxin 4. *J Cell Sci* **114**, 445-455 (2001).
- 434 Noskova, L. *et al.* Mutations in DNAJC5, encoding cysteine-string protein alpha, cause autosomal-dominant adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Am J Hum Genet* **89**, 241-252, doi:10.1016/j.ajhg.2011.07.003 (2011).
- 435 Braun, J. E. & Scheller, R. H. Cysteine string protein, a DnaJ family member, is present on diverse secretory vesicles. *Neuropharmacology* **34**, 1361-1369, doi:10.1016/0028-3908(95)00114-I (1995).
- 436 Chamberlain, L. H., Henry, J. & Burgoyne, R. D. Cysteine string proteins are associated with chromaffin granules. *J Biol Chem* **271**, 19514-19517, doi:10.1074/jbc.271.32.19514 (1996).
- 437 Zhang, Y. Q. *et al.* Identification of CSPalpha clients reveals a role in dynamin 1 regulation. *Neuron* **74**, 136-150, doi:10.1016/j.neuron.2012.01.029 (2012).
- 438 Burgoyne, R. D. & Morgan, A. Cysteine string protein (CSP) and its role in preventing neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* **40**, 153-159, doi:10.1016/j.semcdb.2015.03.008 (2015).
- 439 Zinsmaier, K. E., Eberle, K. K., Buchner, E., Walter, N. & Benzer, S. Paralysis and early death in cysteine string protein mutants of *Drosophila*. *Science* **263**, 977-980, doi:10.1126/science.8310297 (1994).
- 440 Fernandez-Chacon, R. *et al.* The synaptic vesicle protein CSP alpha prevents presynaptic degeneration. *Neuron* **42**, 237-251, doi:10.1016/s0896-6273(04)00190-4 (2004).
- 441 Tiwari, S. S. *et al.* Evidence that the presynaptic vesicle protein CSPalpha is a key player in synaptic degeneration and protection in Alzheimer's disease. *Mol Brain* **8**, 6, doi:10.1186/s13041-015-0096-z (2015).

- 442 Benitez, B. A. *et al.* Exome-sequencing confirms DNAJC5 mutations as cause of adult neuronal ceroid-lipofuscinosis. *PLoS One* **6**, e26741, doi:10.1371/journal.pone.0026741 (2011).
- 443 Cadieux-Dion, M. *et al.* Recurrent mutations in DNAJC5 cause autosomal dominant Kufs disease. *Clin Genet* **83**, 571-575, doi:10.1111/cge.12020 (2013).
- 444 Greaves, J. *et al.* Palmitoylation-induced aggregation of cysteine-string protein mutants that cause neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* **287**, 37330-37339, doi:10.1074/jbc.M112.389098 (2012).
- 445 Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550, doi:10.1073/pnas.0506580102 (2005).
- 446 Raudvere, U. *et al.* g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* **47**, W191-W198, doi:10.1093/nar/gkz369 (2019).
- 447 Aubert, L. *et al.* Copper bioavailability is a KRAS-specific vulnerability in colorectal cancer. *Nat Commun* **11**, 3701, doi:10.1038/s41467-020-17549-y (2020).
- 448 Schaeffer, M. *et al.* The neXtProt peptide uniqueness checker: a tool for the proteomics community. *Bioinformatics* **33**, 3471-3472, doi:10.1093/bioinformatics/btx318 (2017).
- 449 Hernandez-Segura, A. *et al.* Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol* **27**, 2652-2660 e2654, doi:10.1016/j.cub.2017.07.033 (2017).
- 450 Fridman, A. L. & Tainsky, M. A. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling. *Oncogene* **27**, 5975-5987, doi:10.1038/onc.2008.213 (2008).
- 451 Casella, G. *et al.* Transcriptome signature of cellular senescence. *Nucleic Acids Res* **47**, 7294-7305, doi:10.1093/nar/gkz555 (2019).
- 452 Marthandan, S. *et al.* Similarities in Gene Expression Profiles during In Vitro Aging of Primary Human Embryonic Lung and Foreskin Fibroblasts. *Biomed Res Int* **2015**, 731938, doi:10.1155/2015/731938 (2015).

- 453 Kovatcheva, M. *et al.* ATRX is a regulator of therapy induced senescence in human cells. *Nat Commun* **8**, 386, doi:10.1038/s41467-017-00540-5 (2017).
- 454 Tetsu, O. & McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-426, doi:10.1038/18884 (1999).
- 455 Packard, M. *et al.* The Drosophila Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation. *Cell* **111**, 319-330, doi:10.1016/s0092-8674(02)01047-4 (2002).
- 456 Masckauchan, T. N., Shawber, C. J., Funahashi, Y., Li, C. M. & Kitajewski, J. Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis* **8**, 43-51, doi:10.1007/s10456-005-5612-9 (2005).
- 457 Ye, X. *et al.* Downregulation of Wnt signaling is a trigger for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Mol Cell* **27**, 183-196, doi:10.1016/j.molcel.2007.05.034 (2007).
- 458 Gao, L. *et al.* Lung cancer deficient in the tumor suppressor GATA4 is sensitive to TGFBR1 inhibition. *Nat Commun* **10**, 1665, doi:10.1038/s41467-019-09295-7 (2019).
- 459 Zhou, R., Han, L., Li, G. & Tong, T. Senescence delay and repression of p16INK4a by Lsh via recruitment of histone deacetylases in human diploid fibroblasts. *Nucleic Acids Res* **37**, 5183-5196, doi:10.1093/nar/gkp533 (2009).
- 460 Gao, Q., Chen, K., Gao, L., Zheng, Y. & Yang, Y. G. Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits cell cycle progression and induces senescence in endothelial cells. *Cell Death Dis* **7**, e2368, doi:10.1038/cddis.2016.155 (2016).
- 461 Meijles, D. N. *et al.* The matricellular protein TSP1 promotes human and mouse endothelial cell senescence through CD47 and Nox1. *Sci Signal* **10**, doi:10.1126/scisignal.aaj1784 (2017).
- 462 Guillon, J. *et al.* Regulation of senescence escape by TSP1 and CD47 following chemotherapy treatment. *Cell Death Dis* **10**, 199, doi:10.1038/s41419-019-1406-7 (2019).
- 463 Bai, L. *et al.* Regulation of cellular senescence by the essential caveolar component PTRF/Cavin-1. *Cell Res* **21**, 1088-1101, doi:10.1038/cr.2011.56 (2011).

- 464 Volonte, D. & Galbiati, F. Inhibition of thioredoxin reductase 1 by caveolin 1 promotes stress-induced premature senescence. *EMBO Rep* **10**, 1334-1340, doi:10.1038/embor.2009.215 (2009).
- 465 Volonte, D. & Galbiati, F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. *Cancer Metastasis Rev*, doi:10.1007/s10555-020-09875-w (2020).
- 466 Cui, H., Kong, Y., Xu, M. & Zhang, H. Notch3 functions as a tumor suppressor by controlling cellular senescence. *Cancer Res* **73**, 3451-3459, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3902 (2013).
- 467 Nagano, T. *et al.* Proline dehydrogenase promotes senescence through the generation of reactive oxygen species. *J Cell Sci* **130**, 1413-1420, doi:10.1242/jcs.196469 (2017).
- 468 Pasillas, M. P. *et al.* Proteomic analysis reveals a role for Bcl2-associated athanogene 3 and major vault protein in resistance to apoptosis in senescent cells by regulating ERK1/2 activation. *Mol Cell Proteomics* **14**, 1-14, doi:10.1074/mcp.M114.037697 (2015).
- 469 Althubiti, M. *et al.* Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell Death Dis* **5**, e1528, doi:10.1038/cddis.2014.489 (2014).
- 470 Gorgoulis, V. G. *et al.* p53-dependent ICAM-1 overexpression in senescent human cells identified in atherosclerotic lesions. *Lab Invest* **85**, 502-511, doi:10.1038/labinvest.3700241 (2005).
- 471 Frescas, D. *et al.* Senescent cells expose and secrete an oxidized form of membrane-bound vimentin as revealed by a natural polyreactive antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E1668-E1677, doi:10.1073/pnas.1614661114 (2017).
- 472 Kowal, J. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E968-977, doi:10.1073/pnas.1521230113 (2016).
- 473 Abbadie, C. & Pluquet, O. Unfolded Protein Response (UPR) Controls Major Senescence Hallmarks. *Trends Biochem Sci* **45**, 371-374, doi:10.1016/j.tibs.2020.02.005 (2020).
- 474 Guang, M. H. Z. *et al.* Targeting Proteotoxic Stress in Cancer: A Review of the Role that Protein Quality Control Pathways Play in Oncogenesis. *Cancers (Basel)* **11**, doi:10.3390/cancers11010066 (2019).

- 475 Pakos-Zebrucka, K. *et al.* The integrated stress response. *EMBO Rep* **17**, 1374-1395, doi:10.15252/embr.201642195 (2016).
- 476 Obenauf, A. C. *et al.* Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* **520**, 368-372, doi:10.1038/nature14336 (2015).
- 477 Wishart, D. S. *et al.* DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res* **34**, D668-672, doi:10.1093/nar/gkj067 (2006).
- 478 Bausch-Fluck, D. *et al.* The in silico human surfaceome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E10988-E10997, doi:10.1073/pnas.1808790115 (2018).
- 479 Kim, K. M. *et al.* Identification of senescent cell surface targetable protein DPP4. *Genes Dev* **31**, 1529-1534, doi:10.1101/gad.302570.117 (2017).
- 480 Labrie, M. *et al.* Proteomics advances for precision therapy in ovarian cancer. *Expert Rev Proteomics* **16**, 841-850, doi:10.1080/14789450.2019.1666004 (2019).
- 481 Zhang, Y., Zhang, Y., Sun, K., Meng, Z. & Chen, L. The SLC transporter in nutrient and metabolic sensing, regulation, and drug development. *J Mol Cell Biol*, doi:10.1093/jmcb/mjy052 (2018).
- 482 Yamashita, Y. Ovarian cancer: new developments in clear cell carcinoma and hopes for targeted therapy. *Jpn J Clin Oncol* **45**, 405-407, doi:10.1093/jjco/hyu221 (2015).
- 483 Yang, Y., Xin, X., Fu, X. & Xu, D. Expression pattern of human SERPINE2 in a variety of human tumors. *Oncol Lett* **15**, 4523-4530, doi:10.3892/ol.2018.7819 (2018).
- 484 Mijanovic, O. *et al.* Cathepsin B: A sellsword of cancer progression. *Cancer Lett* **449**, 207-214, doi:10.1016/j.canlet.2019.02.035 (2019).
- 485 Essen, A. *et al.* Serum ferritin: a tumor marker for renal cell carcinoma. *J Urol* **145**, 1134-1137, doi:10.1016/s0022-5347(17)38555-5 (1991).
- 486 Wong, S. H. *et al.* Endobrevin, a novel synaptobrevin/VAMP-like protein preferentially associated with the early endosome. *Mol Biol Cell* **9**, 1549-1563, doi:10.1091/mbc.9.6.1549 (1998).
- 487 Wang, C. C. *et al.* A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells. *Dev Cell* **7**, 359-371, doi:10.1016/j.devcel.2004.08.002 (2004).

- 488 Marshall, M. R. *et al.* VAMP8-dependent fusion of recycling endosomes with the plasma membrane facilitates T lymphocyte cytotoxicity. *J Cell Biol* **210**, 135-151, doi:10.1083/jcb.201411093 (2015).
- 489 Jacobsson, G. & Meister, B. Molecular components of the exocytotic machinery in the rat pituitary gland. *Endocrinology* **137**, 5344-5356, doi:10.1210/endo.137.12.8940356 (1996).
- 490 Sharma, M., Burre, J. & Sudhof, T. C. CSPalpha promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nat Cell Biol* **13**, 30-39, doi:10.1038/ncb2131 (2011).
- 491 Marques, O. & Outeiro, T. F. Alpha-synuclein: from secretion to dysfunction and death. *Cell Death Dis* **3**, e350, doi:10.1038/cddis.2012.94 (2012).
- 492 Bharadwaj, R., Cunningham, K. M., Zhang, K. & Lloyd, T. E. FIG4 regulates lysosome membrane homeostasis independent of phosphatase function. *Hum Mol Genet* **25**, 681-692, doi:10.1093/hmg/ddv505 (2016).
- 493 Sbrissa, D. *et al.* Core protein machinery for mammalian phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate synthesis and turnover that regulates the progression of endosomal transport. Novel Sac phosphatase joins the ArPIKfyve-PIKfyve complex. *J Biol Chem* **282**, 23878-23891, doi:10.1074/jbc.M611678200 (2007).
- 494 Chow, C. Y. *et al.* Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* **448**, 68-72, doi:10.1038/nature05876 (2007).
- 495 Gustafsson, G. *et al.* Secretion and Uptake of alpha-Synuclein Via Extracellular Vesicles in Cultured Cells. *Cell Mol Neurobiol* **38**, 1539-1550, doi:10.1007/s10571-018-0622-5 (2018).
- 496 Tsunemi, T., Hamada, K. & Krainc, D. ATP13A2/PARK9 regulates secretion of exosomes and alpha-synuclein. *J Neurosci* **34**, 15281-15287, doi:10.1523/JNEUROSCI.1629-14.2014 (2014).
- 497 Lee, H. J., Patel, S. & Lee, S. J. Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* **25**, 6016-6024, doi:10.1523/JNEUROSCI.0692-05.2005 (2005).

- 498 Jang, A. *et al.* Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J Neurochem* **113**, 1263-1274, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06695.x (2010).
- 499 Abounit, S. *et al.* Tunneling nanotubes spread fibrillar alpha-synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J* **35**, 2120-2138, doi:10.15252/embj.201593411 (2016).
- 500 Whitehead, J. *et al.* Tunneling nanotubes mediate the expression of senescence markers in mesenchymal stem/stromal cell spheroids. *Stem Cells* **38**, 80-89, doi:10.1002/stem.3056 (2020).
- 501 Boal, F., Laguerre, M., Milochau, A., Lang, J. & Scotti, P. A. A charged prominence in the linker domain of the cysteine-string protein Cspalpha mediates its regulated interaction with the calcium sensor synaptotagmin 9 during exocytosis. *FASEB J* **25**, 132-143, doi:10.1096/fj.09-152033 (2011).
- 502 Evans, G. J. *et al.* Phosphorylation of cysteine string protein by protein kinase A. Implications for the modulation of exocytosis. *J Biol Chem* **276**, 47877-47885, doi:10.1074/jbc.M108186200 (2001).
- 503 Evans, G. J. *et al.* Protein kinase B/Akt is a novel cysteine string protein kinase that regulates exocytosis release kinetics and quantal size. *J Biol Chem* **281**, 1564-1572, doi:10.1074/jbc.M503628200 (2006).
- 504 Shirafuji, T. *et al.* The Role of Cysteine String Protein alpha Phosphorylation at Serine 10 and 34 by Protein Kinase Cgamma for Presynaptic Maintenance. *J Neurosci* **38**, 278-290, doi:10.1523/JNEUROSCI.1649-17.2017 (2018).
- 505 Patel, P., Prescott, G. R., Burgoyne, R. D., Lian, L. Y. & Morgan, A. Phosphorylation of Cysteine String Protein Triggers a Major Conformational Switch. *Structure* **24**, 1380-1386, doi:10.1016/j.str.2016.06.009 (2016).
- 506 Chiang, N. *et al.* Phosphomimetic mutation of cysteine string protein-alpha increases the rate of regulated exocytosis by modulating fusion pore dynamics in PC12 cells. *PLoS One* **9**, e99180, doi:10.1371/journal.pone.0099180 (2014).

- 507 Chen, H. *et al.* MacroH2A1 and ATM Play Opposing Roles in Paracrine Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Mol Cell* **59**, 719-731, doi:10.1016/j.molcel.2015.07.011 (2015).
- 508 Rodriguez-Gonzalez, A. *et al.* Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation. *Cancer Res* **68**, 2557-2560, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5989 (2008).
- 509 Wortel, I. M. N., van der Meer, L. T., Kilberg, M. S. & van Leeuwen, F. N. Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends Endocrinol Metab* **28**, 794-806, doi:10.1016/j.tem.2017.07.003 (2017).
- 510 Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086, doi:10.1126/science.1209038 (2011).
- 511 Maher, P. Proteasome Assay in Cell Lysates. *Bio Protoc* **4**, doi:10.21769/bioprotoc.1028 (2014).
- 512 Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W. G. ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and p53 Tumor Suppression Pathways. *Cell* **92**, 725-734, doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81401-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81401-4) (1998).
- 513 Javelaud, D. & Besancon, F. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol Chem* **277**, 37949-37954, doi:10.1074/jbc.M204497200 (2002).
- 514 Nakano, K. & Vousden, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**, 683-694, doi:10.1016/s1097-2765(01)00214-3 (2001).
- 515 Oda, E. *et al.* Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-1058, doi:10.1126/science.288.5468.1053 (2000).
- 516 St Clair, S. *et al.* DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol Cell* **16**, 725-736, doi:10.1016/j.molcel.2004.11.002 (2004).

- 517 Datto, M. B. *et al.* Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5545-5549, doi:10.1073/pnas.92.12.5545 (1995).
- 518 Zhang, Y., Alexander, P. B. & Wang, X. F. TGF-beta Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, doi:10.1101/cshperspect.a022145 (2017).
- 519 Katakura, Y., Nakata, E., Miura, T. & Shirahata, S. Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 110-115, doi:10.1006/bbrc.1999.0129 (1999).
- 520 Acosta, J. C. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* **15**, 978-990, doi:10.1038/ncb2784 (2013).
- 521 Nuchel, J. *et al.* TGFB1 is secreted through an unconventional pathway dependent on the autophagic machinery and cytoskeletal regulators. *Autophagy* **14**, 465-486, doi:10.1080/15548627.2017.1422850 (2018).
- 522 Reiss, K. *et al.* Regulated ADAM10-dependent ectodomain shedding of gamma-protocadherin C3 modulates cell-cell adhesion. *J Biol Chem* **281**, 21735-21744, doi:10.1074/jbc.M602663200 (2006).
- 523 Gabbert, L., Dilling, C., Meybohm, P. & Burek, M. Deletion of Protocadherin Gamma C3 Induces Phenotypic and Functional Changes in Brain Microvascular Endothelial Cells In Vitro. *Frontiers in Pharmacology* **11**, doi:10.3389/fphar.2020.590144 (2020).
- 524 Mah, K. M., Houston, D. W. & Weiner, J. A. The gamma-Protocadherin-C3 isoform inhibits canonical Wnt signalling by binding to and stabilizing Axin1 at the membrane. *Sci Rep* **6**, 31665, doi:10.1038/srep31665 (2016).
- 525 Haas, I. G., Frank, M., Veron, N. & Kemler, R. Presenilin-dependent processing and nuclear function of gamma-protocadherins. *J Biol Chem* **280**, 9313-9319, doi:10.1074/jbc.M412909200 (2005).
- 526 Marambaud, P. *et al.* A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* **114**, 635-645, doi:10.1016/j.cell.2003.08.008 (2003).

- 527 Hambsch, B., Grinevich, V., Seeburg, P. H. & Schwarz, M. K. γ -Protocadherins, presenilin-mediated release of C-terminal fragment promotes locus expression. *J Biol Chem* **280**, 15888-15897, doi:10.1074/jbc.M414359200 (2005).
- 528 Wang, T. F. & Guidotti, G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. *J Biol Chem* **271**, 9898-9901 (1996).
- 529 DePierre, J. W. & Karnovsky, M. L. Ecto-enzyme of granulocytes: 5'-nucleotidase. *Science* **183**, 1096-1098, doi:10.1126/science.183.4129.1096 (1974).
- 530 Huang, S., Apasov, S., Koshiba, M. & Sitkovsky, M. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* **90**, 1600-1610 (1997).
- 531 Young, A. *et al.* A2AR Adenosine Signaling Suppresses Natural Killer Cell Maturation in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* **78**, 1003-1016, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2826 (2018).
- 532 Deaglio, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **204**, 1257-1265, doi:10.1084/jem.20062512 (2007).
- 533 Ohta, A. *et al.* A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13132-13137, doi:10.1073/pnas.0605251103 (2006).
- 534 Hausler, S. F. *et al.* Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* **60**, 1405-1418, doi:10.1007/s00262-011-1040-4 (2011).