

Université de Montréal

**Caractérisation de la sénescence cellulaire durant le développement
embryonnaire de l'axolotl**

Par

Nasim Hosseinali-Sarjany

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences
en biochimie, spécialisation génétique moléculaire

Décembre 2020

© Nasim Hosseinali-Sarjany, 2020

Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Caractérisation de la sénescence cellulaire durant le développement embryonnaire de l'axolotl

Présenté par

Nasim Hosseinali Sarjany

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes :

Luis Rokeach

Président-rapporteur

Stéphane Roy

Directeur de recherche

Frédéric-Antoine Mallette

Membre du jury

Résumé

Depuis plusieurs années, la sénescence cellulaire a été majoritairement étudiée comme un processus causé par le vieillissement des cellules et un mécanisme pour limiter la propagation des cellules précancéreuses. Cette perspective a changé suite aux publications des groupes Serrano et Keyes, qui ont démontré la présence des cellules sénescents très tôt durant le développement embryonnaire de la souris. Dernièrement, le laboratoire de D^r Roy a identifié le pronéphros, un organe transitoire qui est remplacé par le mésonéphros (homologue du rein chez les humains) à la maturité, les fascicules du nerf olfactif ainsi que les gencives comme des zones riches en cellules sénescents durant le développement de l'axolotl. Ces évidences suggèrent que la sénescence est une réponse biologique survenant non seulement lors du vieillissement, mais est également une réponse physiologique pouvant être activée par différents signaux présents dans son environnement. À ce jour, bien que plusieurs chercheurs ciblent l'identification des points de contrôle de la sénescence cellulaire, on connaît peu de chose sur le rôle des cellules sénescents durant le développement embryonnaire et la manière dont celui-ci pourrait influencer la croissance et la morphogenèse des organismes. Dans la présente étude, on cherche à identifier les gènes qui sont importants dans la sénescence développementale. Les résultats de séquençage d'ARN dans le pronéphros de l'axolotl ont démontré un enrichissement significatif du gène PEBP1, qui code pour une protéine surtout connue pour son rôle inhibiteur sur la kinase Raf. De plus, nos résultats semblent démontrer une diminution de l'activité bêta galactosidase dans le pronéphros de l'axolotl en développement lorsque celui-ci est traité à la Locostatin, un inhibiteur pharmacologique qui bloque l'interaction de PEBP1 avec RAF. Nous suggérons que PEBP1 pourrait être important pour soit l'activation ou le maintien du caractère sénescents dans les organes en développement de l'axolotl. Un phénomène qui semble être important pour conserver la fonctionnalité de l'organe en transition.

Mots-clés : Sénescence, développement, axolotl, embryon, RKIP, PEBP1, pronéphros, olfactif, gencives, RNA-seq.

Abstract

For several years, cellular senescence has been mainly studied as a process caused by the aging of cells and a mechanism to limit the propagation of precancerous cells. This perspective changed following the publications of Serrano and Keyes, who demonstrated the presence of senescent cells very early in the embryonic development of mice. Recently, the laboratory of Dr. Roy identified the pronephros, a transient organ which is replaced by the mesonephros (kidney counterpart in humans) at maturity, the olfactory nerve fascicles as well as the gums as areas rich in senescent cells during the development of axolotl. The evidence suggests that senescence is not only related to the aging process, but rather a physiological response which is activated by various signals present in its environment. To date, although several researchers are targeting the identification of control points for the activation of senescence, little is known about the role of senescent cells during embryonic development and how it could influence growth and morphogenesis. In the present study, we seek to identify the genes that are important in developmental senescence. The results of RNA sequencing in the axolotl pronephros have, among other things, demonstrated a significant enrichment of the PEBP1 gene which codes for a protein that acts as an inhibitor of the Raf kinase. Our findings support the idea that cellular senescence that occurs during the embryonic development of the axolotl is dependent on PEBP1 since the pharmacological inhibitor of PEBP1 (Locostatin), which blocks the interaction of PEBP1 with RAF, seems to affect the activity of senescent beta galactosidase. We suggest that PEBP1 is necessary for either the activation or the maintenance of senescence in the pronephros during embryogenesis. We further suggest that embryonic senescence is crucial for the morphogenesis of the developing organ perhaps by keeping the organ functional during the transition.

Keywords : Senescence, Development, Axolotl, RKIP, PEBP1, Pronephros, Olfactory, Gums, RNA-seq.

Table des matières

Résumé	5
Abstract.....	7
Table des matières	9
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	13
Liste des abréviations	15
Remerciements	23
1 Introduction	25
1.1 La cellule comme unité de base	25
1.2 La communication cellulaire.....	25
1.3 Chaque cellule naît d'une cellule (« Omnis cellula e cellula »)	26
1.3.1 Les différentes phases du cycle cellulaire	26
1.3.2 La régulation et les points de contrôle du cycle cellulaire	28
1.4 La fin de vie d'une cellule.....	33
1.4.1 Apoptose : la mort cellulaire programmée	33
1.4.2 Autophagie.....	35
1.4.3 Nécrose.....	36
1.4.4 Sénescence cellulaire	37
1.5 Caractéristiques de la sénescence cellulaire.....	40
1.5.1 Les altérations morphologiques	41
1.5.2 Induction du contenu lysosomal.....	43

1.5.3	Inhibiteurs des kinases dépendantes de la cycline (CDKi) et l'arrêt du cycle cellulaire	44
1.5.4	Les voies de signalisation.....	47
1.5.5	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence: les SASP	50
1.6	Types de sénescence cellulaire.....	52
1.6.1	Sénescence induite (non programmée)	53
1.6.2	Sénescence programmée	57
2	Notre modèle expérimental : l'axolotl.....	65
2.1	L'axolotl : un modèle pour étudier la sénescence.....	65
2.2	Développement embryonnaire de l'axolotl	65
3	Hypothèse de travail.....	69
4	Matériel et méthode	71
5	Résultats.....	77
6	Discussion.....	97
7	Conclusion et perspective.....	113
8	Références bibliographiques.....	117
9	Annexe 1 : Effet de Locostatin sur la régénération de la patte de l'axolotl	135
10	Annexe 2 : Résultats complémentaires	139

Liste des tableaux

Tableau 1 - Liste complète des facteurs de transcription significative identifiés par EnrichR. ... 140

Tableau 2 - Liste des 50 premiers facteurs de transcription significative identifiés par DiRE. ... 141

Tableau 3 - Liste et séquence des amorces RT-qPCR et la synthèse des sondes. 142

Liste des figure

Figure 1 - Les points de contrôle et les phases de la réplication cellulaire.....	28
Figure 2 - Les régulateurs du cycle cellulaire : les cyclines.....	30
Figure 3 - Les différents destins cellulaires.	39
Figure 4 - Différences entre une cellule en prolifération et une cellule sénescence.	41
Figure 5 - Les différents stades du développement embryonnaire de l'axolotl.	67
Figure 6 - Analyse bio-informatique et classification des gènes significativement induits dans le pronéphros.	79
Figure 7 - Analyse Fridman par « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) de gènes exprimés dans les cellules du pronéphros en comparaison avec les cellules de la queue.	81
Figure 8 - Analyse « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) de gènes induits dans le pronéphros (sénescents) en comparaison avec la queue (non-sénescents).	83-85
Figure 8- (suite1) - Analyse « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) de gènes induits dans le pronéphros (sénescents) en comparaison avec la queue (non-sénescents).	84
Figure 8- (suite 2) - Analyse « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) de gènes induits dans le pronéphros (sénescents) en comparaison avec la queue (non-sénescents).	85
Figure 9 - Identification des facteurs de transcription susceptibles d'être augmentés dans les pronéphros.	89
Figure 10 - Identification des gènes connus dans la sénescence.	91
Figure 10 - Identification des gènes connus dans la sénescence.	91
Figure 11 - L'expression des différents marqueurs dans la zone rostrale (bouche/fosse nasale) et la zone troncale de l'axolotl au stade embryonnaire 51.....	94
Figure 12 - Effet des drogues Locostatin et SCH772984 sur l'intensité de SaβG.	96
Figure 13 - Les différentes parties de l'axolotl adulte avec le potentiel de régénérer.	136
Figure 14 - Effets de la Locostatin sur la régénération de la patte de l'axolotl.	138
Figure 15 - Analyse PANTHER de la classification compartimentale des gènes significativement induits dans le pronéphros.	139

Liste des abréviations

- 4EBP1** : Protéine 1 lié au facteur d'initiation eucaryote 4E
- ADN** : L'acide désoxyribonucléique
- AER**: Crête ectodermique apicale
- AKT (PKB)**: Protéine kinase B
- AKT1** : *AKT Serine/Threonine Kinase 1*
- ALPS**: Syndrome lymphoprolifératif auto-immun
- AMPK** : Protéine kinase AMP-dépendante
- ANRIL**: ARN non codant antisens dans le locus INK4
- AP-1** : *Activator protein 1*
- AP2** : *Activating protein 2*
- Apaf-1**: *Apoptotic protease activating factor 1*
- APC/C** : Complexe de promotion de l'anaphase (*Anaphase-promoting complex/cyclosome*)
- ARNm**: ARN messenger
- Arnt** : Translocateur nucléaire de récepteur d'hydrocarbure aryle
- ASPP** : *Apoptosis Stimulating proteins of p53*
- ATFα**: Facteur de transcription activateur (*Activating transcription factor*)
- Atg** : *Autophagy-related genes (gènes liés à l'autophagie)*
- ATM** : *Ataxia telangiectasia mutated*
- ATP** : Adénosine triphosphate
- ATR** : *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*
- AUF1** : *AU-rich element RNA-binding protein 1*
- Bad**: *BCL2 Associated Agonist Of Cell Death*
- BAX**: *BCL2 Associated X*
- Bcl-2** : *B cell lymphoma 2*
- BCL-B**: *B cell lymphoma B*
- Bcl-w/ BCL2L2** : *Bcl-2-like 2*
- Bcl-x**: *B-cell lymphoma-extra large*
- BFL1 A1 / BCL2A1**: *Bcl-2-related protein A1*
- Bid**: *BH3-Interacting Domain Death Agonist*
- Bim**: *BCL-2-like protein 11*
- Bmf**: *Bcl2 Modifying Factor*
- Bmi** : *BMI1 Proto-Oncogene, Polycomb Ring Finger*
- Bmpr1b**: *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B*

BRAF : *B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*
BrdU : Bromo deoxyuridine
BUB1: *Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase*
c-Myc : *Myc proto-oncogene protein*
C/EBP: *CCAAT/enhancer binding protein (CEBP)*
CCNE/ CCNA/ CCNB: Gène codant pour la protéine cycline E/A/B
CDC25C : *Cell Division Cycle 25C*
CDC6: *Cell division cycle 6*
CDK : Kinases dépendantes des cyclines
CDKN1/2A/2B: Inhibiteur de kinase dépendante des cyclines 1/2A/2B
CHK : Protéine-kinase point de contrôle
CIP/KIP : Protéine interagissant avec CDK /Protéine inhibitrice Kinase
CKB : Créatine kinase B
CTIP2 : *COUP-TF-interacting protein 2*
CXCL : *C-X-C Motif Chemokine Ligand*
DDR : Réponse aux dommages de l'ADN
DHFR: Dihydrofolate réductase
DNA-Pkcs : *DNA-dependent protein kinase*
DNMT3b/1: ADN méthyltransférase 3 bêta/1
Dux4 : *Double Homeobox 4*
EIF2 α : Facteur d'initiation eucaryote 2 Alpha
Elk1: *ETS Like-1 protein*
ERK : *Extracellular signal-regulated kinase 2*
ES: Éléments sensibles du promoteur
FADD : *Fas- associated death domain*
FAS-L: Ligand de FAS
Gli1: *Glioma-associated oncogene*
GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
GO : Gene Ontology
Grb2: *Growth factor receptor-bound protein 2*
GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*
GSK-B : *Glycogen Synthase Kinase Beta*
H3K9 : *Methylation of histone H3 lysine 9*
HMGB1 : *High Mobility Group Box 1*
HNF4: *Hepatocyte Nuclear Factor 4*
HnRNP : Ribonucléoprotéides nucléaires hétérogènes
HRAS : *HRas Proto-Oncogene, GTPase*

Hrk: *Harakiri, BCL2 Interacting Protein*
Id1 : *DNA-binding protein inhibitor*
ID1 : *Inhibitor Of DNA Binding 1*
IFN- γ : *Interferon Gamma*
IGFBP1 : *Insulin Like Growth Factor Binding Protein 1*
IL : *Interleukines*
ILK : *Kinase intégrées à l'intégrine*
IOS : *Oncogene-induced senescence*
IPF1: *Insulin Promoter Factor 1*
IRE1 : *Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1*
Jak2 : *Janus Kinase 2*
JAK/STAT: *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*
LMNB1 : *Lamin B1*
Loco : *Locostatin*
M-CSF : *Macrophage Colony-Stimulating Factor*
MAD2 : *Mitotic arrest deficient-2*
MAP2K: *Mitogen-activated protein kinase kinase*
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
MAPKK : *Mitogen-activated protein kinase kinase*
Mcl1: *MCL1 Apoptosis Regulator*
MEC: *Matrice extracellulaire*
MEK: *Mitogen-activated protein kinase*
miRNA : *Micro ARN*
Miz : *Protéine à doigt de zinc interagissant avec Myc*
MK2 : *MAPK-activated protein kinase 2*
MMP: *Protéases de la matrice extracellulaire*
MNK1 : *MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1*
Msi-1 : *Musashi RNA Binding Protein 1*
MSigDB: *Molecular Signatures Database*
mTOR : *Mammalian target of rapamycin*
NAD : *Nicotinamide adénine dinucléotide*
NES: *Score d'enrichissement normalisé*
NF- κ B : *Nuclear Factor Kappa B Subunit 1*
Nkd1: *NKD Inhibitor Of WNT Signaling Pathway 1*
ORC: *Complexe de reconnaissance de l'origine de réplication*
PCBP1 : *Poly(RC) Binding Protein 1*
PEBP1 : *Phosphatidylethanolamine Binding Protein 1*

PERK: *PKR-like ER kinase*
PI3K : Enzyme phosphoinositide 3-kinase
PIM-1 : *Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*
PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate
PKA : Protéine kinase A
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PLK1 : *Polo-like Kinase 1*
PPAR : *Peroxisome proliferator-activated receptor*
PRC1/PRC2 : Complexes répressifs Polycomb 1 / 2
PTEN : *Phosphatase And Tensin Homolog*
Puma: *p53 upregulated modulator of apoptosis*
qPCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction*
RB: protéine rétinoblastome
RBP: Protéine de liaison à l'ARN
RKIP : *Raf Kinase Inhibitor*
RNA-seq : Séquençage d'ARN
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RRM1/RRM2 : Ribonucléotide réductase M1 et M2
RSK : *Ribosomal s6 kinase*
RT-qPCR : *Reverse transcriptase- quantitative Polymerase Chain Reaction*
RTK : Récepteur tyrosine kinase
SAHF : *Senescent associated heterochromatin foci*
SASP : Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SaβG: Bêta-galactosidase lié à la sénescence
Shc: *Src homology and Collagen*
SIRT : *Sirtuin*
SOS : *Son of Sevenless*
Sp1 : *Sp1 Transcription Factor*
Sp3 : *Sp3 Transcription Factor*
STAT: *Signal transducer and activator of transcription*
tBuOOH : *Hydroperoxyde de tert-butyle*
TGF-β : *Transforming growth factor beta*
TNF-α : *Tumor Necrosis Factor Alpha*
TOR : *Target of Rapamycin*
TP53 : *Tumor Protein P53*

UPR: *Unfolded protein Response*

XBP1: Protéine liée à X-box 1

XLP : Syndrome lymphoprolifératif lié à l'X

YB1 : *Y-box binding protein 1*

Je dédie cette thèse à mes parents, Tahereh et Iraj, pour

leur amour et leurs encouragements.

À ma sœur et ma meilleure amie, Nazanin

pour sa complicité et sa fidélité.

À mon fiancé, Farhad,

pour son support et son amour inconditionnels.

Remerciements

J'aimerais commencer par remercier mon directeur de recherche, D^r Stéphane Roy, qui a su m'épanouir chaque jour de ma maîtrise. Stéphane, tu m'as rendu ces années les plus agréables qu'elles pouvaient l'être. Tu as toujours été disponible pour moi. Tu m'as guidée et soutenue durant mes hauts et mes bas. Pour ça, je ne te remercierai jamais assez. Je suis très heureuse d'avoir eu un mentor aussi expérimenté et savant que toi. Merci de m'avoir transmis ta passion pour la science. Grâce à toi, je sou mets aujourd'hui un mémoire dont je suis particulièrement fière.

J'aimerais également remercier les personnes que j'ai côtoyées au quotidien durant la plus grande partie de mon projet : Fadi et Éric. Vous m'avez créé un environnement très agréable où faire de la recherche. Merci pour vos conseils innombrables et votre soutien. Vous avez su partager vos expériences et vos connaissances d'une façon remarquable.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire de D^r Gerardo Ferbyre, plus particulièrement Stéphane et Séb, qui m'ont toujours donné de très bons conseils et m'ont accompagnée dans l'avancement de mon projet, de même que les membres du laboratoire de D^r Jean Barbeau, plus particulièrement Annie, pour m'avoir écouté quand j'en avais vraiment besoin. Également un gros merci à tous les membres du laboratoire de D^r Antonio Nanci : Katia, Dainelys et Rima, pour leur générosité et leur disponibilité.

Je tiens également à exprimer ma plus profonde reconnaissance à mes parents, Tahereh et Iraj, ainsi qu'à ma sœur Nazanin. Vous avez toujours cru en moi, même quand je n'étais moi-même pas certaine d'y croire. Merci Maman d'avoir passé des nuits blanches avec moi juste pour ne pas que je me sente seule. Merci de m'avoir pris la main quand j'en avais besoin et surtout merci pour ton amour inconditionnel. Merci Papa d'avoir sacrifié ta jeunesse pour l'avenir de ta famille. Pour ça, je ne te remercierai jamais assez. Tu es l'homme le plus courageux que j'ai connu. Ton support constant est gravé dans mon cœur. Merci également à ma meilleure amie et ma sœur, Nazanin, qui a su calmer mes angoisses et me donner des câlins aux bons moments. Merci de m'avoir toujours poussée à aller plus loin. J'ai une chance incommensurable de vous avoir tous. Je me suis

rendue ici aujourd'hui uniquement grâce à vous. Un immense merci à mon fiancé Farhad pour m'avoir encouragée au quotidien. Merci de m'avoir permis d'atteindre mes objectifs personnels sans stress et sans pression et de t'être toujours montré intéressé par mon projet. Merci de me donner le courage de poursuivre mon rêve. Merci d'avoir assisté aux conférences avec moi et, surtout, merci de m'avoir écouté pratiquer mes présentations. C'est grâce à ton support et ton amour au quotidien que j'ai pu passer à travers cette étape de ma vie.

1 Introduction

1.1 La cellule comme unité de base

La cellule est la plus petite unité vivante de la hiérarchie de l'organisation biologique capable de se produire de façon autonome(1). Les organismes pluricellulaires sont composés de divers types de cellules spécialisées qui, ensemble, peuvent atteindre un niveau d'organisation supérieur, comme les tissus ou les organes(1-5). Collectivement, ces cellules forment une communauté qui, grâce à la communication intercellulaire, réalise différentes fonctions cellulaires(1-9). L'étude de cette communication permet de résoudre les questions biologiques fondamentales tant dans le domaine du développement de l'embryon que de l'anarchie cancéreuse.

1.2 La communication cellulaire

Au cours de l'évolution, les organismes vivants ont développé plusieurs techniques qui permettent aux cellules de communiquer entre elles pour assurer la survie et l'évolution de l'organisme en question. L'exemple le plus simple est celui de la levure, chez laquelle il existe deux types de cellules haploïdes, a et α (10). En présence de nourriture, la cellule α sécrète une phéromone sexuelle, le facteur α , qui est reconnu par les récepteurs de la cellule a (10). Cette communication entre les deux cellules permet une reconnaissance qui mène à leur fusion et la formation d'une cellule diploïde a/α (10). Ainsi, les récepteurs sur les cellules permettent de reconnaître l'information qui leur est donnée par les cellules avoisinantes pour ensuite convertir cette information en une réponse cellulaire (transduction) par une série d'étapes (voie de transduction), qui peut être étalée par une voie d'amplification(1, 11-14). Chez les organismes multicellulaires complexes, les cellules peuvent soit sécréter des facteurs messagers qui agissent directement sur les cellules avoisinantes, soit sécréter des hormones qui peuvent parcourir de longues distances pour agir sur les cellules cibles(1, 15). Les cellules réceptrices répondent au signal reçu sous différentes formes d'activité cellulaire : le réarrangement du cytosquelette(16),

l'activation de certains gènes dans le noyau, la réplication cellulaire(15) , la mort cellulaire par apoptose(15) ou même la sortie du cycle cellulaire et l'entrée dans un état de sénescence(1, 17).

1.3 Chaque cellule naît d'une cellule (« Omnis cellula e cellula »)

La division cellulaire joue un rôle très important pour la survie des organismes. Chez les unicellulaires, la réplication de la cellule engendre la reproduction de l'organisme en entier. Chez les organismes pluricellulaires sexués, la réplication permet le développement de l'organisme à partir d'une seule cellule, le zygote. À la maturité, les humains sont restreints quant à leur capacité de répliquer toutes les cellules de leurs corps et de régénérer des tissus(18). À titre d'exemple, les cellules hépatiques, les cellules de la peau et les cellules du muscle possèdent la capacité de se diviser relativement rapidement, tandis que les neurones sont incapables de se diviser à l'âge adulte(18). Toutefois, d'autres vertébrés moins complexes comme les salamandres peuvent répliquer la plupart des types cellulaires et même régénérer plusieurs parties de leur corps : les membres inférieurs et postérieurs, l'apex du cœur, la queue, le cerveau, les tissus oculaires, les reins, la moelle épinière, et ce, tout le long de leur vie(18). Ces différences entre les organismes permettent de confirmer qu'il existe un mécanisme de régulation moléculaire qui gouverne la reproduction des cellules et le cycle cellulaire.

1.3.1 Les différentes phases du cycle cellulaire

Malgré le fait qu'il existe certaines particularités quant au potentiel de réplication cellulaire des organismes, toutes les cellules eucaryotes passent par le même cycle pour se répliquer(19), et ce, depuis leur formation par la division de leur cellule mère jusqu'à leur propre division en deux cellules filles. Ce cycle est divisé en deux phases principales : l'interphase et la phase mitotique. L'interphase est l'étape la plus longue et représente 90 % du cycle cellulaire(19). Elle se subdivise en trois phases de croissance : la phase G1/G0 (gap 1), la phase S (synthèse d'ADN) et la phase G2 (gap2) (Figure 1) (19). En revanche, la phase mitotique (M) est l'étape la plus courte; c'est celle qui permet la séparation de la cellule mère en deux cellules filles(19). Lorsque la cellule reçoit un

signal pour se répliquer, elle entre dans la phase G1 du cycle cellulaire. Elle augmente alors de taille et synthétise les éléments qui vont lui être nécessaires pour l'étape de la réplication des chromosomes (S), où la cellule fait un double de son matériel génétique, transmet les modifications épigénétiques aux nouveaux brins et synthétise les protéines nécessaires à l'empaquetage de la chromatine. Durant la phase G2, la cellule augmente à nouveau de taille et se prépare pour son entrée dans la phase mitose (M)(19). Cette dernière permet la division de son contenu en deux cellules filles. Cela se fait en quatre étapes : prophase, métaphase, anaphase et télophase(1, 20). La prophase consiste en la condensation progressive de l'ADN et l'éloignement des centrosomes de part et d'autre de la cellule. Les centrosomes sont des structures sur lesquelles sont attachés les microtubules, qui permettent la formation des fibres du fuseau de division et donc la séparation des chromatides sœurs aux extrémités de la cellule(1, 21, 22). Vers la fin de la prophase, la cellule commence la destruction de son enveloppe nucléaire(1, 23). Durant la métaphase, les paires de chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale de façon à ce que chaque kinétochore des cellules sœurs soit face à un pôle(1, 24-26). Par la suite, au cours de l'anaphase, les fuseaux de division guident les chromatides sœurs et permettent leur migration vers le pôle auquel ils font face(1, 27). De cette façon, les deux pôles de la cellule possèdent un nombre équivalent de chromosomes. Finalement, pendant la télophase, les chromosomes sortent de leur état condensé, la membrane nucléaire se reforme et la cellule se prépare à diviser son cytoplasme (cytocinèse) pour former deux cellules filles(1, 28, 29).

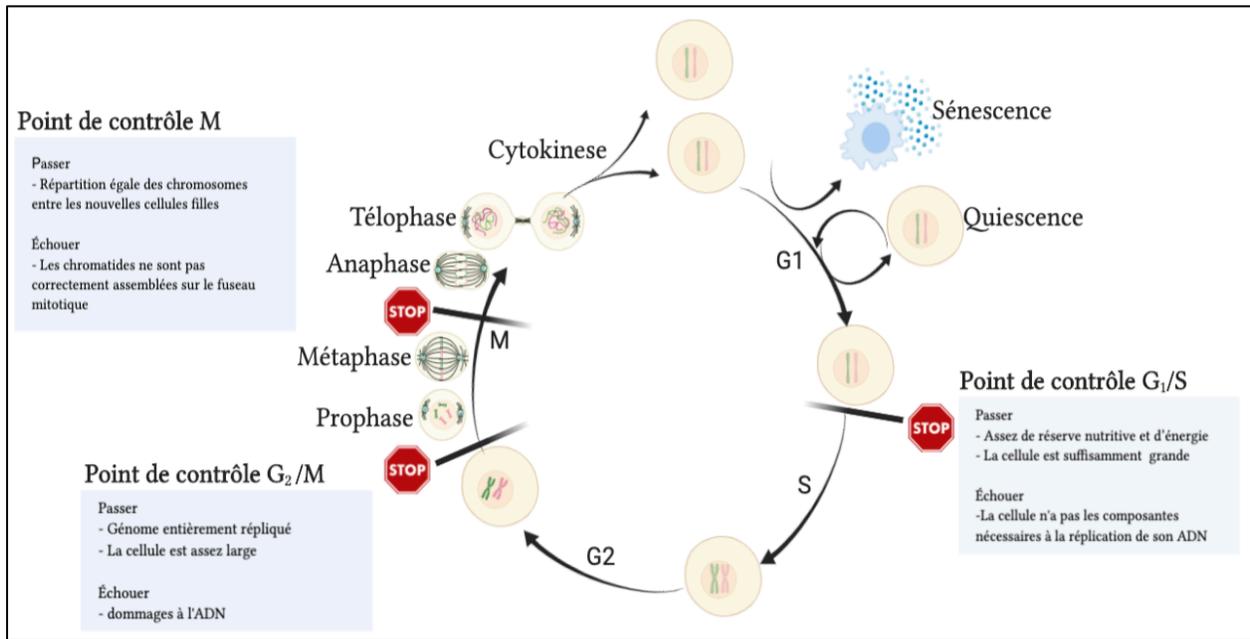


Figure 1 - Les points de contrôle et les phases de la réplication cellulaire.

Le cycle cellulaire est divisé en 4 étapes : G1, S, G2, M. Durant la phase G1, la cellule se prépare à la duplication de son ADN qui survient à la phase S. Une fois l'ADN répliqué, la cellule passe à la phase G2 où elle se prépare à la mitose (M), durant laquelle fait une répartition égale de son contenu pour former deux cellules filles identiques. Le cycle possède trois points de contrôle : G1/S, G2/M et M. L'intégrité de l'ADN est évaluée au point de contrôle G1/S, la duplication correcte des chromosomes au point de contrôle G2/M et la fixation des kinétochores sur les microtubules au point de contrôle M. Image créée avec BioRender.com

1.3.2 La régulation et les points de contrôle du cycle cellulaire

Cette réplication cellulaire, bien qu'elle ne soit pas accessible à tous les types de cellules à tout moment, est un processus très actif chez l'humain adulte, lui laissant jusqu'à 25 millions de divisions chaque seconde(30). Chez la plupart des cellules, la décision d'une cellule à se répliquer dépend particulièrement des stimuli chimiques présents dans son cytoplasme(31). Des expériences de fusion des cellules en différentes phases ont permis de reconnaître à quel point ce cycle est bien régulé. Le fusionnement d'une cellule en phase S avec une cellule en phase G1 mène la cellule en phase G1 à entrer en phase S et à continuer le cycle à partir de ce point(32, 33). Cela démontre la présence d'éléments stimulateurs dans le cytoplasme de la cellule S, qui sont transmis à la cellule G1 et qui permettent son entrée en phase S. Par contre, la fusion de la

cellule en phase G2 avec la cellule en phase S ne provoque pas l'entrée de la cellule G2 en phase S(32, 33). Ces expériences démontrent donc qu'il existe non seulement des éléments stimulateurs, mais aussi des éléments inhibiteurs qui donnent un sens unique à la réplication cellulaire. Ces éléments sont transmis via des mécanismes de reconnaissance et de régulation externes et internes, ainsi que des points de contrôles à des moments critiques du cycle(34-39).

La régulation et la transition entre les phases du cycle cellulaire ont lieu grâce aux protéines cyclines et aux kinases dépendantes de la cycline (CDK)(36, 40-42). La simple activation ou non-activation de ces deux protéines peut décider du destin de la cellule à se diviser ou pas(43). D'ailleurs, la dérégulation des CDK est un marqueur clé pour la détection d'une prolifération cellulaire excessive (cancer) et son inhibition est l'une des pistes thérapeutiques les plus ciblées pour le traitement du cancer(44-46). À titre d'exemple, les inhibiteurs de CDK4/6 tels que le palbociclib, ribociclib et abemaciclib sont couramment utilisés pour traités le cancer du sein métastatique(47). Les cyclines sont des protéines dont la concentration subit des fluctuations cycliques, tandis que les CDK sont des kinases, ciblant les sérines/thréonines, dont les concentrations sont constantes à travers le cycle cellulaire(36). Ces kinases sont sous forme inactive à leur état normal.(48) Leur activité dépend des niveaux de cyclines et des facteurs mitogènes dans leur environnement(48). Leur activation se fait suite à leur liaison aux cyclines(48). Chez les humains, il existe 29 cyclines et 20 CDK, dont les 7 premiers régulent le cycle cellulaire et les autres la transcription des gènes(49). Les différentes combinaisons de cyclines et de CDK permettent la formation d'une variété d'hétérodimères CDK/cyclines spécifiques à chaque phase du cycle cellulaire (Figure 2)(50, 51). Les cyclines répondent aux signaux extracellulaires et intracellulaires et agissent comme régulateurs des CDK, la sous-unité enzymatique du complexe(49). Ces réponses peuvent mener à l'activation et/ou la phosphorylation des protéines dont la cellule a besoin pour passer à travers la phase où elle se trouve. Les fluctuations cycliques des complexes cyclines/CDK font en sorte que la cellule a développé des réponses efficaces et rapides quant à l'inactivation ou la dissociation du complexe. En effet, la cellule peut soit bloquer l'activité enzymatique de la CDK grâce à des inhibiteurs de la famille INK, soit empêcher l'interaction de la CDK avec sa cycline grâce à des CDK interagissant avec les protéines CIP/KIP, ou même dégrader la cycline et recycler la CDK pour une cycline

nouvellement synthétisé(49). Lorsque l'arrêt du cycle est provoqué par un dommage à l'ADN, la cellule peut également empêcher le passage des phases aux points de contrôle en bloquant l'expression des facteurs mitogènes qui affecte la transition des phases du cycle cellulaire (p. ex. les complexes *Skp1-Cul1-F-box protein* (SCF) et *anaphase-promoting complex/cyclosome* (APC/C))(49).

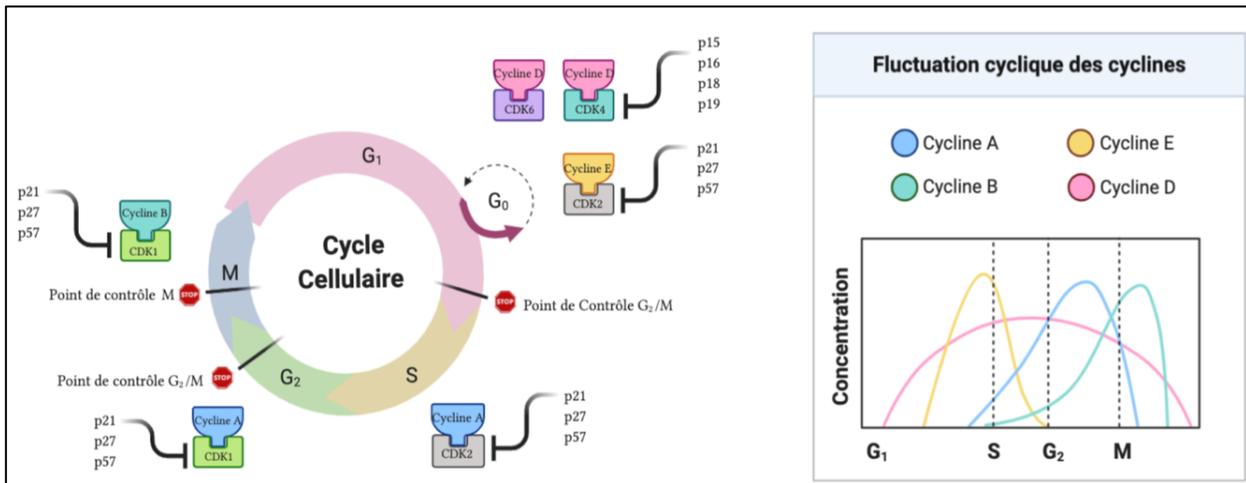


Figure 2 - Les régulateurs du cycle cellulaire : les cyclines.

Les différentes phases du cycle cellulaire eucaryote sont régulées par l'expression des cyclines qui, lorsqu'associées à la kinase CDK, activent les protéines dont la cellule a besoin pour passer à travers la phase où elle se trouve. Les complexes CDK/cyclines sont exprimés de manière cyclique et leur expression peut être inhibée par des inhibiteurs spécifiques de kinase dépendant de la cycline (CDKi) : p15, p16, p18, p19, p21, p27 et p57. Il existe également trois points de contrôle dans le cycle cellulaire : G₁/S, G₂/M et intra-M où la cellule vérifie qu'elle possède tout ce dont elle a besoin avant de progresser. Image inspirée de *OpenStax College, Biology*, créée avec BioRender.com

1.3.2.1 Les CDK dans le cycle cellulaire

Chez les mammifères, la plupart des cellules matures sont soit dans un état de repos temporaire (quiescence) qui correspond à l'entrée à la phase G₀ ou permanent (sénescence), un état cellulaire qui représente l'arrêt du cycle cellule et la sortie en phase G₁(52). Contrairement aux cellules en sénescence, les cellules en quiescence peuvent se répliquer en rentrant dans le cycle cellulaire à la phase G₁(53). Cela se produit lorsque les cellules reçoivent un signal mitogène, généralement médié par les voies MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)(53). Ces signaux sont reçus par cycline D qui procède à l'activation des CDK4 et CDK6(31, 52, 54, 55). Les

complexes CDK4/cycline D et CDK6/cycline D peuvent par la suite phosphoryler la protéine associée au rétinoblastome (Rb) qui, dans l'état non phosphorylé, bloque la famille de facteur de transcription E2F(56). La libération de E2F permet la transcription de plusieurs gènes nécessaires à la progression du cycle, tels que CCNE (cycline E), CCNA (cycline A) et CCNB (cycline B), DHFR (dihydrofolate réductase), RRM1/RRM2 (ribonucléotide réductase M1 et M2), PLK1 (*polo-like kinase 1*), MAD2 (*spindle checkpoint protein MAD2*) et BUB1 (*BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase*)(49). Vers la fin de la phase G1, la protéine cycline E activée s'associe avec CDK2. Le complexe cycline E/CDK2 activé va non seulement assurer l'enchaînement du cycle cellulaire des phases G1 à S par la rephosphorylation de la protéine Rb, mais elle va aussi activer la transcription des gènes nécessaire à la réplication de l'ADN, la duplication des centrosomes et la synthèse des histones(56). De plus, durant la phase G1, la cellule va définir l'origine de réplication de son ADN à l'aide des protéines du complexe de reconnaissance de l'origine de réplication (ORC), dont la protéine de contrôle du cycle cellulaire 6 (CDC6) fait partie(57). Une fois le complexe formé, les protéines de régulation recrutent d'autres protéines et permettent la formation d'un complexe pré-réplivative qui active l'entrée la réplication de l'ADN et l'entrée en phase S(19, 57). Durant la phase S, l'ADN est dupliqué sans l'influence des facteurs mitogènes environnementaux(31, 58). La transition de la phase S à G2 se fait grâce à la cycline A qui remplace la cycline E lorsque celle-ci est dégradée pour former le complexe cycline A/CDK2(56, 59-61). Vers la fin de la phase S, le complexe cycline A/CDK2 va préparer la cellule à passer à la phase G2 en phosphorylant à nouveau le facteur de transcription E2F(61). À la phase G2, le complexe cycline A/CDK2 active des gènes pour assurer l'arrêt de la réplication de l'ADN. Vers la fin de la phase G2, la cycline A se dissocie de CDK2 et s'associe à CDK1 pour permettre la transition à la phase mitotique (M)(52, 62). À la phase M, la cycline A est dégradée et remplacée par la cycline B pour former le complexe cycline B/CDK1(51, 63, 64)Ce complexe active tout gène nécessaire pour la condensation des chromosomes, la destruction de l'enveloppe nucléaire et la formation du fuseau mitotique. Durant cette phase ont lieu plusieurs évènements complexes excessivement bien régulés. Plus spécifiquement, la cellule passe à travers plusieurs étapes (prométaphase, métaphase, anaphase et télophase) pour diviser son contenu en deux cellules filles(52, 65). Les mécaniques de la séparation des chromosomes de part et d'autre de la cellule (anaphase) se font

lorsque l'activité de CDK1 est diminuée et que la cycline B est dégradée(66). Finalement, le cycle cellulaire se termine à la phase cytokinèse, où la cellule mère divise son cytoplasme pour donner naissance à deux cellules filles(52, 65).

1.3.2.2 Les points de contrôle du cycle cellulaire

Bien que la variation d'expression des CDK soit aussi bien régulée et ordonnée, la cellule ne se fie pas uniquement à leur expression pour permettre le passage entre ses phases de réplication. Il existe également des points de contrôle à des moments critiques du cycle qui permettent de vérifier que l'étape précédente a été complétée correctement avant d'ordonner la progression de la cellule à l'étape suivante (Figure 1-2)(52, 67, 68). Ces points de contrôle sont situés à la fin des phases G1, G2 et au milieu de la phase M. Le point de contrôle G1 permet de contrôler deux événements, à savoir si l'environnement de la cellule est favorable à la réplication (possède assez de réserves de nutriments et d'énergie) et si sa taille est suffisamment grande (52, 69). Tant que la cellule n'a pas réussi ces épreuves, cette barrière ne peut être franchie. Mais une fois le point de contrôle passé, la cellule devient indépendante de son environnement et sa réplication est assurée(69). Le point de contrôle G2 se situe juste avant l'entrée à la phase mitotique (M)(34, 52). Durant cette période, la cellule vérifie la quantité et la qualité de l'ADN. Elle veut s'assurer que tout le matériel génétique a effectivement été répliqué, et ce, sans aucune erreur, avant de procéder à la division de la cellule en deux cellules filles(34, 52). Dans le cas échéant, soit que la cellule répare l'erreur dans son matériel génétique ou qu'elle déclenche la mort par apoptose(34). Finalement, le dernier point de contrôle est durant la phase M, plus spécifiquement pendant la métaphase. La cellule doit confirmer que chaque kinétochore est bien attaché à une fibre de fuseau et que les chromosomes sont parfaitement alignés sur le plan équatorial(52, 68). Si un chromosome est mal placé, la cellule mettra en pause la mitose, laissant le temps au fuseau de capturer le chromosome avant de séparer les chromosomes sœurs et de passer à l'étape de cytokinèse(52, 68).

1.4 La fin de vie d'une cellule

De façon générale, les organismes multicellulaires fournissent un effort constant afin de maintenir un équilibre homéostatique entre le nombre de nouvelles cellules générées et le nombre de cellules éliminées. Une prolifération excessive peut causer le développement de maladies telles que le cancer et ainsi potentiellement causer la mort de l'organisme, tandis qu'un niveau de mort cellulaire excessif peut entraîner des maladies telles que les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer ou le Parkinson. Durant le développement, selon les différentes phases, l'organisme passe à travers des vagues de prolifération et de mort cellulaire pour finalement former les différents organes et l'anatomie de l'organisme(70). Un exemple très bien étudié est la formation des doigts et des orteils qui, très tôt durant le développement, apparaissent sous forme de palmure; puis, à un stade spécifique, la mort cellulaire s'active au niveau interdigital pour donner leur forme définitive aux doigts et aux orteils(70).

Il existe quatre types de destins cellulaires : apoptose, autophagie, nécrose et sénescence. Parmi ceux-ci, l'apoptose, l'autophagie et la nécrose sont des types de morts cellulaires tandis que la sénescence est un état d'arrêt permanent de la réplication cellulaire. Ces destins cellulaires peuvent être programmés, c'est-à-dire qu'elles peuvent être activées en présence ou en l'absence de stimuli extrinsèques et intrinsèques, et d'autres sont accidentelles, c'est-à-dire que les cellules sont exposées à des forces physiques (haute pression, température ou forces osmotiques), chimiques (variations extrêmes du pH) ou mécaniques (cisaillement). Ainsi, en fonction de l'état de la cellule et des conditions dans lesquelles elle se trouve, un type de mort cellulaire pourrait être privilégié par rapport aux autres.

1.4.1 Apoptose : la mort cellulaire programmée

L'apoptose, également connue sous le nom de « suicide cellulaire », est un processus physiologique nécessaire à l'homéostasie tissulaire(71, 72). Il joue un rôle très important dans le développement de l'organisme, entre autres pour la formation des doigts et des pieds(73), l'élimination des cellules nerveuses non fonctionnelles(74) et l'involution des cellules épithéliales alvéolaires durant le développement des glandes mammaires(75). C'est un processus sélectif et

très bien régulé qui assure la destruction des cellules sans avoir à stresser ou endommager les cellules avoisinantes(71, 76, 77). De la sorte, l'élimination des cellules ne laisse aucune cicatrice, ce qui évite à l'organisme de passer par une étape de guérison de la plaie(78). Le processus est médié par une série d'enzymes protéases à cystéine appelées les caspases(79). Il existe deux types de caspases : les initiateurs (caspase 9) et les exécuteurs (caspase 3 et 7)(79). Les deux types sont présents dans la cellule sous forme inactive (pro-caspase)(79). Les caspases initiateurs s'active par auto clivage lorsqu'un signal apoptotique est détecté(79). Ceux-ci peuvent par la suite activer les caspases exécuteurs par un clivage interne pour permettre la destruction de la cellule(79).

Deux voies peuvent activer l'apoptose : une voie intrinsèque et une voie extrinsèque (Figure 3A). La voie intrinsèque est médiée par la famille des protéines BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*). Il existe trois sous-familles des BCL-2 : les pro-apoptotiques BH3 (Bim, Bid, Puma, Noxa, Hrk, Bmf et Bad), les molécules effectrices pro-apoptotiques (BAX et BAK) et les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, BFL1/A1 , Bcl-w et Bcl-B)(80). La plupart des cellules de l'organisme expriment en permanence un mélange de protéines anti- et pro-apoptotique(81). En réponse à un stimulus apoptotique (un stress cellulaire, en particulier le stress mitochondrial causé par des facteurs tels que les dommages à l'ADN et le choc thermique), cette balance est altérée et les protéines pro-apoptotiques sont surexprimées(80, 81). Les protéines pro-apoptotiques servent à activer les protéines BAX et BAK qui, ultimement, vont faire des pores dans la membrane externe de la mitochondrie pour libérer les cytochromes C, qui, en association avec la protéine Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), forment un complexe d'activation des caspases et causent la destruction de la cellule(80). Dans des conditions saines, les protéines anti-apoptotiques se lient aux protéines pro-apoptotiques pour bloquer leur activité enzymatique et la formation des pores(80).

La voie extrinsèque est activée lorsqu'un signal externe est transmis à la cellule par une interaction ligand-récepteur pour induire l'apoptose (Figure 3A). Généralement, cette interaction vient des ligands qui sont exprimés sur la membrane des cellules tueuses naturelles (de l'anglais *Natural Killer*) du système immunitaire(82). Plus précisément, le signal est transmis via les ligands FAS (FAS-L) qui se lient aux récepteurs transmembranaires sur les cellules cibles. Cette liaison

déclenche l'agrégation de plusieurs récepteurs à la surface de la cellule cible et le recrutement de la protéine adaptatrice, FADD (*Fas-associated death domain*), dans le cytoplasme de la cellule. La protéine FADD active à son tour les différentes caspases de manière successive pour finalement mener à l'activation de la caspase 3, un membre de la famille des caspases pour débiter la dégradation de la cellule(80). Durant le processus de la mort cellulaire par apoptose, qu'il soit activé de manière intrinsèque ou extrinsèque, les cellules apoptotiques subissent plusieurs changements morphologiques : la chromatine se condense (pycnose) et se fragmente (caryorrhexis), la cellule rétrécit, le cytosquelette se brise et son contenu s'englobe dans une partie de la membrane plasmique pour former des corps apoptotiques(71). Peu de temps après, l'équipe de nettoyage cellulaire (les cellules phagocytaires des cellules immunitaires) engloutit les corps, recycle leur contenu et se débarrasse des débris(71).

1.4.2 Autophagie

L'autophagie est un processus cellulaire hautement conservé chez les eucaryotes qui permet le recyclage des cellules et les organelles endommagées. Le terme autophagie vient du grec : *auto* (soi-même) et *phagein* (manger). En biologie cellulaire, ce processus décrit une forme de nettoyage cellulaire où les cellules mangent les organelles et les composantes endommagées. Ce mécanisme ubiquitaire est une autre façon de maintenir l'homéostasie des cellules eucaryotes. Elle est caractérisée comme un processus catabolique responsable de dégrader les macromolécules et les organites intracellulaires endommagés afin de recycler leur cytoplasme par une voie de dégradation lysosomale (83). Plusieurs conditions cellulaires sont capables d'augmenter le niveau d'autophagie basale de la cellule. Par cela, on entend la carence nutritionnelle, l'hypoxie, le stress métabolique et l'infection virale. Lors du processus autophagique, les cellules reçoivent l'ordre de décomposer et recycler leurs organites (Figure 3B) (83). Pour ce faire, les cellules autophagiques vont englober leurs organites dans des vacuoles à double membrane pour former des autophagosomes(83). Ces derniers se fusionnent avec des lysosomes qui s'occupent de dégrader le contenu séquestré(83). Ce processus, bien qu'il soit mécaniquement très simple, ne peut être activé sans la présence des Atg (*autophagy-related*

genes)(83). Il existe plusieurs voies de régulation pour le processus, mais les plus fréquentes impliquent l'activité de la protéine cible de la rapamycine (TOR) et de la protéine kinase A (PKA).

1.4.3 Nécrose

Contrairement à l'apoptose, la nécrose est une mort cellulaire non programmée. Elle peut être causée par une grande variété de blessures à la fois physiques et biologiques. Les blessures physiques peuvent être des coupures, des brûlures, la privation d'oxygène (anoxie) et l'hyperthermie. Les blessures biologiques peuvent inclure une attaque immunologique et des infections telles que la pneumonie, l'herpès simplex, la varicelle-zona, l'adénovirus, de même que des infections bactériennes et fongiques.

Les premiers signes cellulaires de nécrose comprennent un changement au niveau du métabolisme oxydatif intracellulaire, notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la déplétion en ATP, causée par le gonflement des mitochondries (Figure 3C) (84). Plus tard, la chromatine se condense, les organites cytoplasmiques se perturbent, activent des protéases (en particulier les calpaïnes et les cathepsines) et la cellule se sépare des cellules avoisinantes(84). Par la suite le lysosome est détruit, ce qui cause la libération de plusieurs enzymes qui sont normalement stockées dans les lysosomes. Ces enzymes sont aptes à digérer les composants cellulaires et même la cellule en entier(84). Une fois le lysosome détruit, le noyau se gonfle, s'assombrit (pycnose) et finit par se rompre (caryolyse)(85). La membrane externe de la cellule se brise et entraîne une perte de capacité de pompage ionique et un flux rapide d'ions sodium et calcium dans l'environnement intracellulaire; cela change les concentrations intracellulaires et extracellulaires de soluté et mène à un choc osmotique(86). Les cellules qui meurent par nécrose libèrent des produits nocifs qui endommagent les cellules avoisinantes. De même, le manque de signalisation des cellules qui meurent par nécrose rend plus difficile leur reconnaissance par le système immunitaire. Ainsi, la libération du contenu intracellulaire après des dommages à la membrane cellulaire cause de l'inflammation et endommage les cellules avoisinantes.

1.4.4 Sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire est un autre type de destin cellulaire. Ce phénomène a originalement été observé par les chercheurs Hayflick et Moorhead, qui ont noté une capacité limitée de prolifération *in vitro* pour les fibroblastes primaires humains(87). Au cours de leur expérimentation, ils ont pu observer que nonobstant des facteurs de croissance ajoutés, le nombre de mitoses des cellules en culture diminuait graduellement jusqu'à atteindre zéro. Ce phénomène, aujourd'hui connu sous le nom de la sénescence répllicative, était à cette époque référée comme la dernière étape de la durée de vie, d'où le nom sénescence qui remonte au latin *senex*, qui signifie « vieux ». Plusieurs hypothèses ont été émises dans le but de justifier ce phénomène, qui à ce moment était très mal compris. Certains ont commencé à parler de la sénescence comme d'un processus inévitable qui augmente en corrélation avec la perte de la capacité de régénération tissulaire qui vient avec l'âge. Cela les a menés à se questionner sur la raison pour laquelle la sénescence n'a pas été contre-sélectionnée durant l'évolution afin de permettre à l'organisme de vivre plus longtemps. Quelques années plus tard, le rôle de la sénescence durant l'embryogenèse et sa puissance pour combattre les cellules tumorales ont permis d'expliquer sa conservation à l'échelle évolutive. À l'heure actuelle, de plus en plus de chercheurs sont convaincus que la sénescence est une destinée cellulaire qui peut être induite par différents stimuli, naturels ou non, et qui affecte le développement embryonnaire, le dommage à l'ADN (vieillesse) et la suppression tumorale. Ainsi, autant de recherches sont effectuées pour trouver des thérapies contre le cancer que contre les maladies qui altèrent l'homéostasie tissulaire et qui viennent avec l'âge.

Quel que soit le type cellulaire ou les conditions qui causent l'activation de la sénescence, les cellules sénescents s'arrêtent à la phase G1 du cycle cellulaire (Figure 3D). Ces cellules, bien qu'elles soient incapables de proliférer, restent métaboliquement et transcriptionnellement actives(88). Cela leur permet de modifier graduellement le patron d'expression des gènes pour atteindre un phénotype protéique complètement différent de la cellule en prolifération. La sortie de cycle est faite de façon permanente puisqu'aucun stimulus physiologique connu ne peut stimuler les cellules sénescents à réintégrer le cycle cellulaire(89). Lorsque leur présence n'est

plus nécessaire, ces cellules sont éliminées par les cellules du système immunitaire, notamment les macrophages(90-92) les cellules NK (93) et les neutrophiles(94).

Bien que ce processus soit utilisé pour défendre l'organisme contre une dérégulation génétique, l'accumulation des cellules sénescents est, autant chez les organismes complexes que les organismes unicellulaires, responsables de plusieurs maladies liées à l'âge(95). Parmi ces maladies, on note la sarcopénie(96), l'athérosclérose(97), l'insuffisance cardiaque(98-100), l'ostéoporose(101), la dégénérescence maculaire(102, 103), l'insuffisance pulmonaire(104), l'insuffisance rénale(105) et des maladies neurodégénératives importantes telles que les maladies d'Alzheimer(106) et de Parkinson(107). Le mécanisme cellulaire qui cause l'apparition de ces pathologies reste jusqu'aujourd'hui inconnu. Certains chercheurs croient que la diminution de l'efficacité du système immunitaire avec l'âge est la cause des accumulations des cellules sénescents observées(108, 109). L'équipe de Baker a créé des souris INK-ATTAC (*INK-linked apoptosis through targeted activation of caspase*) qui permet l'élimination sélective des cellules p16-positives par l'ajout d'un composé synthétique: AP2018(110). Ainsi ils ont observé un retard dans l'apparition des maladies liées à l'âge lorsque les souris étaient traitées entre 12 à 18 mois (moment où l'accumulation de p16 est accentuée). Ces expériences ont confirmé le rôle néfaste de la sénescence durant le vieillissement(110).

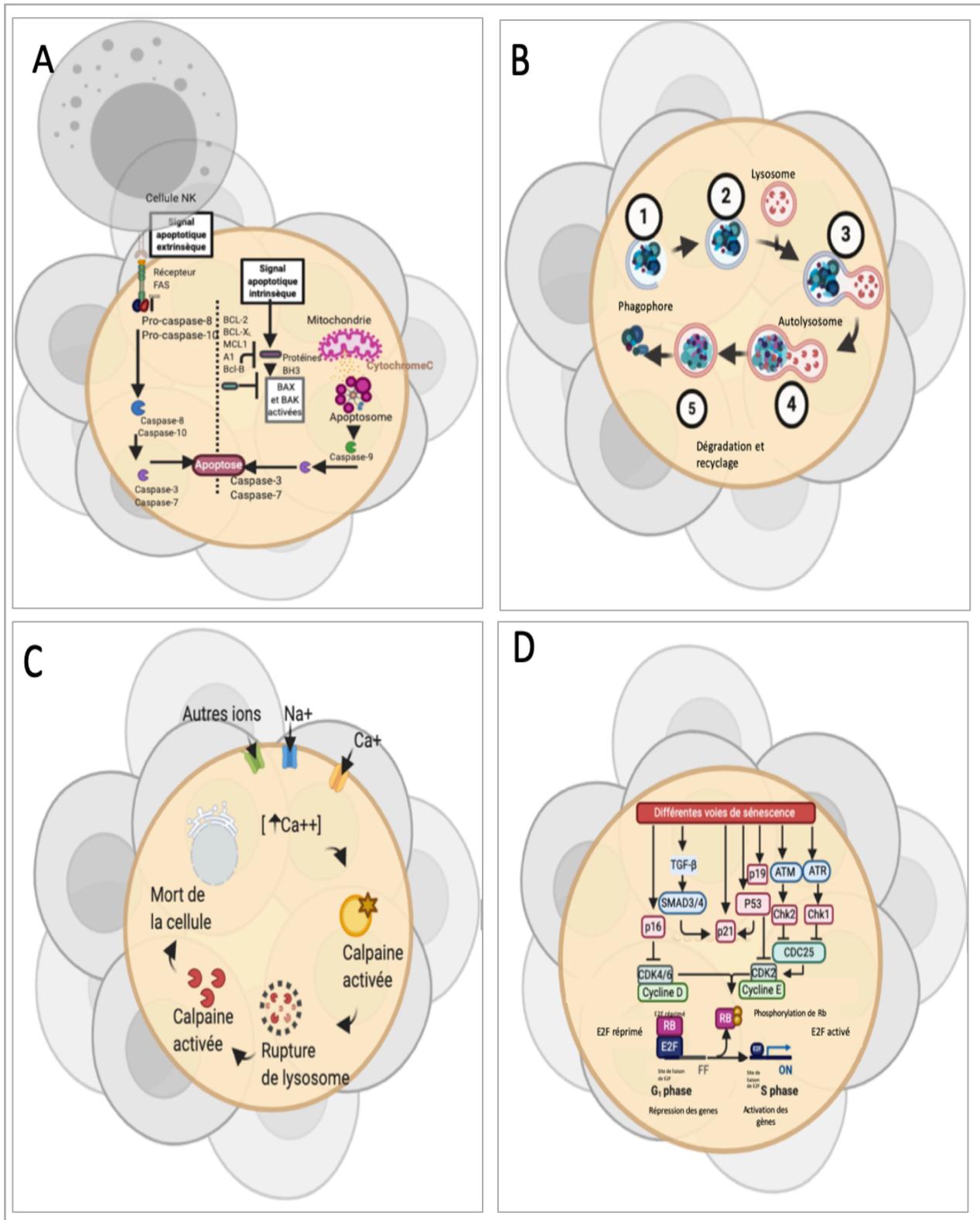


Figure 3 - Les différents destins cellulaires.

(Figure 3 –Suite)

En réponse à un stimulus quelconque ou simplement pour garder l'homéostasie cellulaire, les cellules peuvent activer différentes voies pour changer leurs destins **(A)** L'apoptose, également connue sous le nom de suicide cellulaire, est une mort cellulaire programmée qui peut être activée suite à un stimulus intrinsèque ou extrinsèque. La mort de la cellule est assurée grâce aux enzymes caspases qui clivent des protéines spécifiques dans le cytoplasme et le noyau. La mort cellulaire par apoptose a un effet sélectif et n'a aucune influence sur les cellules avoisinantes. **(B)** L'autophagie est un autre type de destin cellulaire qui permet le recyclage de la cellule ou des organelles endommagées. Pour se faire, les organites endommagés sont englobés dans des vacuoles à double membrane pour former des autophagosomes. Ces derniers se fusionnent avec des lysosomes qui s'occupent de dégrader le contenu séquestré. Le recyclage de la cellule est sélectif et n'influence pas les cellules avoisinantes. **(C)** La mort cellulaire par nécrose survient lorsque la cellule est accidentellement exposée à des blessures physiques ou biologiques qui mènent à l'activation des protéases, en particulier les calpaïnes et les cathepsines. Ces cellules subissent une perturbation au niveau des pompes ioniques, ce qui cause une entrée rapide de Ca^{+} dans le cytoplasme et un choc osmotique. Les cellules nécrotiques produisent des produits nocifs qui endommagent les cellules avoisinantes. **(D)** La sénescence est un type de destin cellulaire qui permet à la cellule de rester métaboliquement active sans pour autant pouvoir se répliquer. Elle est causée par une sortie irréversible du cycle cellulaire à la phase G1. Les cellules sénescents, tout dépendamment du contexte, activent par différentes voies les inhibiteurs de CDK, notamment p21 et p53. Ces deux protéines empêchent la phosphorylation de la protéine Rb qui, dans un état non phosphorylé, bloque la transcription de E2F qui régule le cycle cellulaire et la synthèse de l'ADN. Les cellules sénescents sécrètent des cytokines ou des chimiokines appelés SASP pour influencer les cellules avoisinantes à entrer en sénescence ou même à se répliquer. Image créée avec BioRender.com

1.5 Caractéristiques de la sénescence cellulaire

Les cellules sénescents ont une carte d'identité phénotypique très spécifique. Leur identification débute avec l'activation des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p16 (111) et p21(112, 113), ainsi que la sortie du cycle cellulaire(114). Par la suite, la cellule procède graduellement à des changements morphologiques qui mènent à l'aplatissement et l'élargissement de la cellule(114-116). Ensuite, des changements apparaissent au niveau de la chromatine, une nucléation des foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) et une perte graduelle de la lamine B1 (protéines près de la membrane nucléaire interne)(114). À ce stade, la cellule augmente ses niveaux d'activité de la β -galactosidase lysosomale et débute la

sécrétion des composantes de SASP (phénotype sécrétoire associé à la sénescence) pour attirer l'attention des cellules du système immunitaire(114). Plus tard, si la sénescence persiste, les modifications morphologiques et chromatiennes se maintiennent, mais un changement au niveau de la nature des composantes de SASP peut être observé(117).

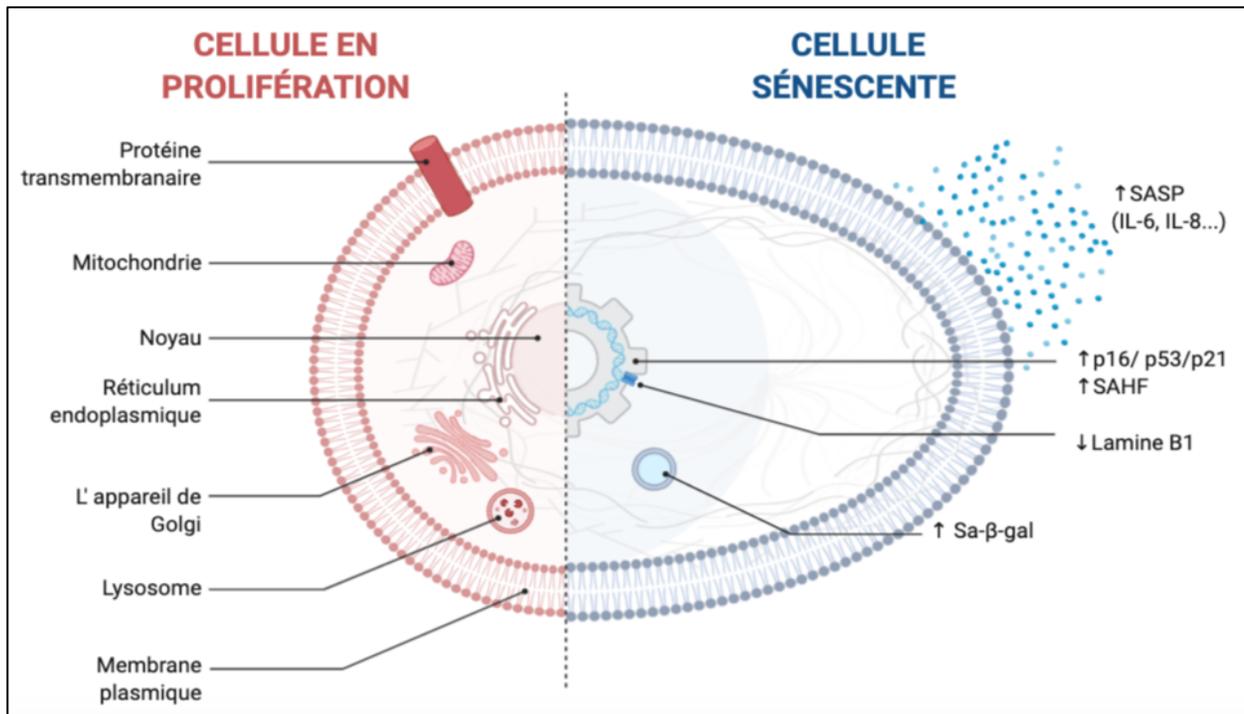


Figure 4 - Différences entre une cellule en prolifération et une cellule sénescence.

À gauche : la cellule en prolifération a une forme régulière. Le noyau est intact, les gènes prolifératifs sont exprimés. Des niveaux basaux de β -galactosidase sont exprimés par le lysosome. Les différents organites sont identifiés sur la photo. **À droite** : une cellule sénescence qui est en arrêt irréversible du cycle cellulaire. Elle est étalée et a une forme irrégulière. L'intégrité nucléaire est compromise ; nucléation des foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) et perte graduelle de la lamine B1. La transcription des inhibiteurs du cycle cellulaire (p16/p53/p21) est induite. La cellule sénescence a une activité lysosomale induite, qui mène à une augmentation de β -galactosidase acide. La cellule est incapable de proliférer, mais reste métaboliquement active et sécrète des SASP. Image créée avec BioRender.com

1.5.1 Les altérations morphologiques

In vitro, une caractéristique clé pour l'identification des cellules en sénescence est l'augmentation de taille, la forme irrégulière et l'élargissement de la cellule(118). À ce jour, plusieurs cherchent

à comprendre les voies cellulaires qui causent ce changement rapide. Des études ont démontré que les protéines cytosquelettiques, notamment la vimentine et les protéines qui permettent la liaison de la cellule au cytosquelette, tels que comme les kinases intégrées à l'intégrine (ILK) et les protéines de la famille ezrin-radixin-moesin (ERM), sont en partie responsables de l'expansion de la cellule(119, 120). En effet, il a été démontré que chez les cellules sénescences, la vimentine est plus épaisse et plus longue que chez une cellule non sénescence, et que les INK suractivées causent l'accumulation de fibronectine et la diminution de la polymérisation de F-actine (121, 122). De plus, l'activation de la sénescence par la transfection de la protéine Rb dans les cellules ostéosarcome (SAOS-2) a démontré une augmentation de la forme active de la protéine ezrin, un membre de la famille des protéines ERM (ezrin, radixin and moesin) (120). Cette protéine, lorsqu'activée, se lie d'un part aux molécules d'adhésion transmembranaire et d'autre part à l'actine et cause le changement morphologique observé chez les cellules sénescences(120). L'activation d'Ezrin se fait par une phosphorylation directe de la thréonine 235 (T235) par CDK5 qui est pour sa part activée en présence de la forme phosphorylée de protéine Rb(120).

Au niveau de l'augmentation de la taille des cellules sénescences, l'hypothèse retenue est que la diminution de la dégradation des protéines, en plus d'une augmentation de synthèse de protéines (les SASP), cause une augmentation de la masse protéique et donc une augmentation de la taille de la cellule. En accord avec cette hypothèse, des études ont démontré une induction de la voie de la réponse des protéines mal repliées (UPR : *Unfolded Protein Response*). Celle-ci a pour but de restaurer l'homéostasie du réticulum endoplasmique et de dégrader les protéines mal repliées(123). Elle est activée par les protéines détectrices de stress du réticulum endoplasmique qui agissent sur les protéines effectrices PERK, IRE1 et ATF6 α (123, 124). La protéine PERK agit pour diminuer la synthèse globale des protéines en phosphorylant la sous-unité alpha du facteur d'initiation de la traduction (EIF2 α)(123). La protéine IRE1a effectue un épissage de l'ARN messenger de XBP1 (*X-box binding protein 1*) pour induire l'expression des gènes impliqués dans le contrôle de qualité des protéines (123). La protéine ATF6 α agit comme un facteur de transcription et active les gènes nécessaires à la voie UPR(123). Elle peut également se lier sur le promoteur de vimentine pour activer sa transcription(123). D'ailleurs, l'inhibition de l'expression

de ATF6 α par un l'ARN interférant a démontré une diminution de l'expression de la protéine vimentine et une restauration à la forme normale de la cellule(123).

1.5.2 Induction du contenu lysosomal

Le β -galactosidase est un enzyme lysosomal présent dans tous les types cellulaires qui, à des niveaux de pH optimaux (entre 4,2 et 4,6), permet l'hydrolyse des β -galactosides en monosaccharides par la rupture des liaisons glycosidiques(125). *In vitro*, son activité est mesurée par l'ajout de son substrat : le chromogène 5-bromo-4-chloro-3-indoyl β -galactopyranoside (X-gal) qui, lorsque clivé par l'enzyme, produit un composé bleu insoluble(126).

Durant les années 90, les chercheurs ont identifié une augmentation de l'activité enzymatique de β -galactosidase à mesure que les cellules atteignaient leur limite de réplication et entraient dans un état sénescence(127, 128). Cette augmentation a, plus tard, été associée à l'augmentation de la masse lysosomale qui survient durant la sénescence(129). En effet, les cellules sénescences expriment un isoforme de β -galactosidase : la β -galactosidase associée à la sénescence (Sa β G) qui est codée à partir du même gène qui code pour la β -galactosidase lysosomal classique, *GLB1*(130). Malgré cette ressemblance, ces deux protéines ne sont pas détectables dans les mêmes conditions(130). L'accumulation de β -galactosidase dans les cellules sénescences permet sa détection dans des conditions suboptimales, soit à un pH 6,0 au lieu de 7,0(130).Récemment, des expériences de modification du pH lysosomal par des drogues sur des cellules sénescences et des cellules jeunes (non sénescences) ont confirmé que l'activité de Sa β G est indépendante aux altérations de pH. En effet, malgré la variation de pH, les cellules sénescences continuent à exprimer plus de β -galactosidase que les cellules non sénescences(128).

Chez les humains, *GLB1* (Beta-galactosidase1) est le gène qui code pour la protéine bêta-galactosidase (130). Ce gène peut être activé par la liaison de Sp1 sur son promoteur et inhibé par la voie de signalisation NOTCH(117, 131, 132). La voie exacte qui cause l'induction de son expression chez les cellules sénescences est jusqu'à ce jour inconnue. Chose certaine, le niveau de transcription de *GLB1* n'est pas proportionnel à la quantité d'enzymes actives dans la cellule. En effet, *GLB1* actif est régulé de façon post-transcriptionnelle à deux niveaux : l'épissage

alternatif de son ARNm et le clivage de la séquence d'acides aminés pour former deux peptides qui, en se liant ensemble, forment l'enzyme actif(133, 134).

1.5.3 Inhibiteurs des kinases dépendantes de la cycline (CDKi) et l'arrêt du cycle cellulaire

Les kinases dépendantes de la cycline (CDK) sont des protéines qui jouent un rôle crucial pour permettre la progression du cycle cellulaire et la réplication de la cellule. Leurs inhibiteurs, p16, p15 et p21, codés respectivement par les gènes *CDKN2A*, *CDKN2B* et *CDKN1*, sont les clés de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'activation de la sénescence. L'expression de ces protéines est régulée au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel.

p16 : La protéine p16, également connu sous le nom p16^{Ink4}, interagit directement avec les CDK4/6 et ralentit le passage de la phase G1 à S dans le cycle cellulaire (114, 135). L'expression de p16 est très dynamique. Elle est majoritairement régulée par des protéines impliquées dans l'épigénétique, telles que les méthyltransférases DNMT3b et DNMT1 qui, en exécutant des patrons de méthylation, causent la répression de la transcription(136). L'inactivation de DNMT1 par son inhibiteur permet la déméthylation du promoteur *CDKN2A*, l'induction de l'expression de p16, l'inhibition des CDK 4 et 6, la sortie de la cellule en phase G1 et l'activation de la sénescence(137). De plus, la dé méthylation de la lysine 27 sur l'histone 3 (H3K27) par l'histone déméthylase JMJD3 est une autre régulation épigénétique qui permet l'activation du gène *CDKN2A* et l'activation de la sénescence(138). Toutefois, la méthylation n'est pas le seul moyen de balancer l'expression de la protéine p16. En effet, l'ARN non codant antisens dans le locus INK4 (ANRIL) peut également recruter les deux complexes répressifs Polycomb, PRC1 et PRC2, qui, par l'intermédiaire des différentes protéines, effectuent des modifications épigénétiques sur les histones et bloquent l'expression du gène(135). Pour activer la sénescence, l'oncogène Ras réduit l'expression d'ANRIL et empêche les modifications épigénétiques de se produire, ce qui augmente l'expression de la protéine p16(135). Certains facteurs de transcription tels que INK4A, YB1, ID1, AP-1 (C-Jun) peuvent directement réprimer la transcription de p16 tandis que d'autres tels que Sp1, Ets, AP-1 (sous-unité B-Jun) et PPAR-γ peuvent l'activer(135, 139, 140). La transcription du

gène p16 n'est pas le seul moyen pour la cellule de réguler son expression. Les ribonucléoprotéides nucléaires hétérogènes (hnRNP) A1 et A2 (famille des modulateurs d'épissage), sont importants pour l'épissage alternatif du pré-ARNm p16 et pour assurer la stabilité de son ARN messenger(141). Sans elles, l'ARNm de p16 est dégradé et la protéine n'est pas exprimée. De plus, la liaison de la protéine hnRNP D, également connue sous le nom de AUF1, à l'ARN messenger de p16 dégrade l'ARN messenger de p16 (142). Lorsque l'expression de la protéine p16 n'est plus nécessaire, la protéine dont l'affinité pour CDK4 est modulée par la phosphorylation de Ser140 et la méthylation de Arg138 est poly-ubiquitinée et dégradée par le protéasome (135, 143).

p15 : La protéine p15 est un inhibiteur de l'activité kinase des cyclines CDK 4 et 6(144). Ainsi elle permet l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1(144). L'expression du gène p15 est d'une part contrôlée par des modifications épigénétiques régulées par les complexes Polycomb PRC et de l'autre par l'activation de la voie TGF- β (145, 146). Chez les cellules en division, le proto-oncogène c-myc est lié au promoteur de p15 et bloque sa transcription(147). Lorsque la cellule reçoit un signal pour arrêter la division cellulaire, TGF- β agit en empêchant la liaison de c-myc sur son promoteur par l'intermédiaire des protéines Miz-1 (*Myc-Interacting Zinc Finger Protein 1*) et Arnt (translocateur nucléaire de récepteur d'hydrocarbure aryle)(147). De plus, TGF- β induit l'expression de p15 par l'intermédiaire de ses modulateurs transcriptionnels, les SMAD (148). Ces derniers peuvent soit se lier directement sur une région du promoteur, soit collaborer avec Sp1, facteur de transcription avec des domaines à doigts de zinc qui se lie aux motifs riches en GC du promoteur et régule positivement l'expression de p15(148). La protéine p15 est également étudiée pour son rôle dans les voies MAPK et P13K/AKT/FOXO3. La voie de signalisation MAPK (également connue sous le nom Ras/Raf/MEK/ERK1/2) permet la transmission de signaux extracellulaires jusqu'au noyau par l'intermédiaire des récepteurs de tyrosine et une cascade de signalisation qui mène à l'activation de différentes kinases cytoplasmiques(149). Lorsque la cellule reçoit un signal mitogène en provenance des récepteurs de la tyrosine, elle recrute la protéine SOS (*Son of Sevenless*) par les domaines intracellulaires Shc et Grb2, catalyse la conversion du Ras/guanosine diphosphate inactif en Ras/guanosine triphosphate actif qui à son tour active Raf. La protéine Raf active ERK1/2 en catalysant sa phosphorylation à Tyr204/187 et

Thr202/185 par l'intermédiaire de la protéine MEK1/2 (également connue sous le nom MAP2K) (149, 150). Ainsi, ERK1/2 se lie à l'importin-7 et se déplace du cytoplasme vers le noyau, où elle fonctionne comme un régulateur pour la transcription de différents facteurs de transcription, y compris Elk1, c-Myc, ATF6, p53 et les activateurs de transcription (STAT), c-Jun et c-Fos (149, 151). Ces facteurs de transcription régulent l'expression de différents gènes responsables de la progression du cycle cellulaire(151). Les protéines effectrices de MAPK peuvent également influencer l'expression post-transcriptionnelle des gènes de la sénescence en régulant par phosphorylation l'activité des protéines de liaison à l'ARN (RBP) telles que AUF1 et hnRNP (149). De plus, les substrats de MAPK (MK2, MNK1 et RSK) semblent être essentiels pour la traduction des facteurs SASP(149). Concrètement, des études récentes ont démontré que chez plusieurs types cellulaires humains et murins, la suractivation de la voie MAPK par la surexpression des oncogènes Ras et Raf (forme activée) peut également mener à l'activation de la sénescence(152, 153). La suractivation de Raf ou Ras semblerait induire le stress cellulaire et activer les points de contrôle des dommages à l'ADN qui mènent à la phosphorylation de la protéine suppresseuse de tumeur p53(154-156). Celle-ci peut alors activer la transcription de plusieurs gènes importants pour l'arrêt du cycle cellulaire, dont *CDKN1A* et *CDKN2A*, codant respectivement pour les protéines p21 et p16 (153). La transcription de la protéine p15 est également contrôlée par la voie AKT (également connu sous le nom PI3K/AKT/FOXO3). Cette voie est surtout étudiée pour son rôle dans la prolifération cellulaire pour promouvoir la survie et la réplication de la cellule suite à un signal extracellulaire(157). Lorsque la cellule reçoit le signal, souvent par l'intermédiaire des facteurs de croissance qui se lient aux récepteurs tyrosine kinases (RTK), elle active les récepteurs par phosphorylation et provoque leur dimérisation(157). À ce point, l'enzyme phosphoinositide 3-kinase (PI3K) catalyse la production de phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PIP3) en phosphorylant le phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP2), les lipides de la membrane plasmique(157). Ainsi, le PIP3 lié à la bicouche lipidique interne de la membrane plasmique favorise le recrutement et l'activation de l'AKT, une sérine/thréonine kinase(157). Cette protéine, une fois activée, phosphoryle différentes protéines qui peuvent activer des gènes ou des protéines pour assurer différentes fonctions cellulaires, y compris la sénescence, la survie cellulaire, la croissance, la prolifération et l'angiogénèse(157). En effet, bien que AKT soit surtout

impliqué dans la prolifération cellulaire, une étude a démontré que l'inhibition du facteur de transcription FOXO par AKT pourrait augmenter les niveaux cellulaires des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et induire la sénescence(158).

p21 : La protéine p21, codée par le gène *CDKN1A*, est un des marqueurs les plus utilisés pour identifier la sénescence cellulaire(159, 160). Selon les conditions cellulaires, la protéine p21 peut être activée directement par p53, ou de façon indépendante à p53 par des facteurs de transcription pouvant se lier aux éléments de liaison à l'ADN, dont Sp1 (159, 161). D'autres facteurs de transcription tels c-myc, Id1, CTIP2, CUT et les récepteurs X de rétinoïdes régulent négativement la transcription de p21 en se liant directement sur son promoteur(161). De façon indirecte, le facteur de transcription AUF1 peut influencer la transcription de p21 en modifiant le patron d'expression de ses régulateurs, p53 ou c-myc (142). De plus, le transcrit de p21 est régulé négativement par des microRNA (miRNA) : miR-17-92, miR-106a-363 et miR-106b-25, et par la protéine liant à l'ARN (*RNA binding protein*) : Msi-1. D'autre part, l'ARN messager est stabilisé par les protéines liant à l'ARN : HuR, PCBP1 et TAX(161). Quant à sa protéine, elle est régulée par les kinases AKT1, PKA, PKC, PIM-1 ou GSK-B qui, lorsque phosphorylées sur certaines séquences de sérine et thréonine, peuvent diminuer la stabilité de la protéine et causer sa dégradation(161).

Une fois activée, la protéine p21 bloque l'activité des kinases CDK1, CDK2, CDK4 et CDK6 et empêche le passage de la progression des cellules de la phase G1 à S(162). Sa surexpression cause une accumulation des cellules en phase G1(162).

1.5.4 Les voies de signalisation

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la plupart des inducteurs de la sénescence passent par les voies *TP53/CDKN1A* ou *pRb/CDKN2A* pour permettre l'arrêt de la prolifération cellulaire et la sortie en phase G1.

La voie p53/CDKN1A : La protéine p53 est souvent identifiée comme étant le gardien du génome(163). Cette protéine hautement conservée est un suppresseur de tumeur puissant qui, dans des conditions pro-tumorale, agit en induisant l'apoptose, la sénescence ou l'arrêt transitoire du cycle cellulaire(163). Mis à part son rôle de défense de l'organisme, la protéine p53 joue également un rôle important dans le développement de l'organisme, depuis le zygote

jusqu'au stade adulte et au vieillissement. Sa fonction est d'analyser les besoins de la cellule et d'y répondre en se liant aux promoteurs des gènes, soit pour les activer ou les inhiber. Ceci dit, une variété de stimuli peuvent mener à la l'activation de la protéine p53 et affecter la transcription de plus de 3 661 gènes(163). Le choix des gènes et des voies cellulaires dépend majoritairement du type de stress (l'état dans lequel se trouve la cellule) et de modifications post-transcriptionnelles de p53. Par exemple, lorsqu'un stress oxydatif est induit dans les cellules du fibroblaste, les niveaux de la protéine p53 activée augmentent proportionnellement à l'intensité et à la durée du stress(164). À des niveaux létaux, p53 active les gènes nécessaires à l'apoptose. En dessous de ce seuil, la cellule favorise plutôt l'arrêt temporaire (quiescence) ou permanent (sénescence) du cycle cellulaire(164). Les modifications post-transcriptionnelles de p53 ont également leur mot à dire dans l'activation des gènes. En général, sa phosphorylation corrèle avec le nombre de transcrits de ses gènes cibles(163). Ainsi, plus p53 est phosphorylée et plus de gènes sont transcrits. Chez les cellules sénescents, l'acétylation sur des sites spécifiques de la protéine p53 empêche sa phosphorylation dans son N terminal et restreint son affinité sur le promoteur des gènes(163). Ainsi, seuls les gènes ayant une forte affinité pour p53 seront activés, comme *CDKN1A*(163). Le gène *CDKN1A*, qui code pour la protéine inhibitrice de CDK, p21, a un rôle très important dans la sénescence cellulaire(159, 165). En effet, non seulement la protéine empêche le passage de la phase G1 à S en bloquant l'activité des cyclines/CDK2, CDK1 et CDK4/6, mais elle inhibe l'apoptose en se liant aux caspases et bloque leur activité (165, 166).

La protéine p21 est également capable d'induire la sénescence de façon indépendante à p53 par des facteurs de transcription qui se lient aux éléments sensibles (ES) (*responsive elements*) à proximité de son promoteur(167). Parmi ces facteurs de transcription, Sp1, Sp3, les transducteurs de signaux et des activateurs de transcription (STAT), les E2F1 et 3, les SMAD, AP-2, BETA2, GAX, CCAAT/*enhancer binding protein- α* (CEBP α) et CEBP β sont les plus étudiés(167). La protéine Sp1 peut agir directement sur ES de p21, par l'intermédiaire de Dux4 et intégrine β 1, ou encore des récepteurs nucléaires tels que les récepteurs de la vitamine D, les rétinoïdes et les androgènes(166, 168). De même, Sp1 peut être activée par des signaux antiprolifératifs en provenance de TGF- β pour ensuite activer p21 (169, 170).

Comme discuté plus haut, la protéine p53 est également impliquée dans l'activation de la mort cellulaire par apoptose. Le choix du type de mort cellulaire dépend des conditions dans laquelle la cellule se trouve. Si une mort cellulaire instantanée est requise, la cellule pourrait avantager l'apoptose. Par contre, si la cellule a besoin d'agir sur ses cellules avoisinantes ou de persister plus longtemps sans même pouvoir se répliquer, elle va opter pour la sénescence. Dans tous les cas, la cellule doit assurer la transmission de l'information à la protéine p53, qui est impliquée dans les deux processus. Une récente découverte a permis d'identifier les protéines ASPP (*Apoptosis Stimulating Proteins of p53*) 1 et 2 comme des transmetteurs de cette information. En effet, lorsque ASPP1 ou ASPP2 se lie au domaine de liaison de l'ADN sur le promoteur de p53, ce dernier favorise la transactivation des gènes apoptotiques comme Bax et active l'apoptose(171). Le cas échéant, la protéine p21 activée assure l'inhibition de la voie apoptotique en bloquant l'activité des procaspase 3, caspase 8 et caspase 10 pour potentiellement activer la sénescence(166).

La voie pRb/p16 : Une autre voie qui mène à l'activation de la sénescence est la voie rétinoblastome (Rb)/p16(135). La protéine p16, codé par le gène *CDKN2A*, a un rôle très important dans l'activation de la sénescence. Telle que mentionnée plutôt, cette protéine de 16 kDa interagit directement avec les CDK 4/6 pour empêcher le passage de la phase G1 à S(114, 135). La régulation et l'activation de la transcription de p16 sont l'un des éléments les plus étudiés dans le domaine de la sénescence, puisque de nombreuses études ont démontré un effet direct de la protéine p16 sur le cycle cellulaire : son inhibition induit la prolifération cellulaire et sa suractivation provoque la sortie prématurée du cycle cellulaire(172-177). Lorsque l'expression de la protéine p16 dépasse le niveau basal, la protéine bloque la prolifération en se liant spécifiquement à CDK4 du complexe CDK4-cycline D pour inhiber son activité catalytique, qui est de déposer des groupements phosphates sur la protéine Rb, protéine qui régule l'activité du facteur de transcription E2F(178). Ce facteur de transcription fait partie d'une famille de huit protéines capables de se lier au motif consensus E2F (TTTCGCGC), présent sur le promoteur de nombreux gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN, la progression du cycle cellulaire et la mitose(179). Les E2F1-3 sont responsables de l'expression des gènes durant la réplication normale de la cellule, alors que les E2F4-5 sont impliqués dans la répression transcriptionnelle pour permettre l'entrée dans un état de quiescence (un état réversible d'arrêt cellulaire)(179).

Les E2F6 sont impliqués dans la régulation d'expression des gènes des complexes répresseurs Polycomb(179). Les E2F7-8, quant à eux, sont des répresseurs transcriptionnels(179). Le E2F7, gène cible de p53, est le seul membre de sa famille hautement induit durant la sénescence(180). Il permet l'arrêt de la transcription des gènes prolifératifs(180).

1.5.5 Phénotype sécrétoire associé à la sénescence: les SASP

Les cellules sénescentes, bien qu'elles soient incapables de proliférer, restent métaboliquement actives et sécrètent des SASP (*senescence-associated secretory phenotype*)(114). Les gènes codant pour les molécules SASP sont hétérogènes, temporels et dépendent du type cellulaire(181). Les composantes des SASP, soit les protéases de la matrice extracellulaire (MMP-1, MMP-3, MMP-10, MMP-12, MMP-13, MMP-14, PAI-1), les interleukines (IL-6 IL-7, IL-1 α , IL-1 β , IL-13, IL-15) et les chimiokines (IL-8, MCP-2, MCP-4, MIP-1 α , MIP-3 α), sont autant responsables de la dégénération du tissu et de la suppression tumorale que de l'initiation d'un cancer(182, 183). En effet, la sécrétion des SASP par les cellules sénescentes peut soit agir sur elles-mêmes (autocrine) ou causer des changements chez les cellules avoisinantes (paracrine) (182). Ces petites molécules peuvent activer plusieurs voies de signalisation, dont la sénescence (sénescence secondaire paracrine). Cette amplification de signal simplifie leur reconnaissance par des cellules du système immunitaire et assure leur destruction(182).

Les composantes du SASP étant très différentes les unes des autres, leur transcription est régulée à plusieurs niveaux. De façon générale, pour la plupart des types de sénescence (vieillesse, dommage à l'ADN, activation par un oncogène, etc.), le stress que subit la cellule cause des dommages à l'ADN, ce qui active les voies de signalisation qui mènent à l'activation des facteurs de transcription pro-inflammatoire NF- κ B et protéine de liaison à l'activateur CCAAT bêta C/EBP β (184, 185). Toutefois, il a été démontré qu'en fonction des conditions dans laquelle la cellule se trouve, elle peut activer d'autres voies, telles que la voie JAK2/STAT3, pour induire l'expression des SASP principalement immunosuppressives comme CXCL1/CXCL2, GM-CSF, M-CSF, IL-10 et IL-13(184). À l'opposé, l'expression du facteur de transcription SIRT1 a un effet néfaste sur la sécrétion des SASP. Cette protéine peut soit se lier directement sur les promoteurs des IL-6 et IL-

8 pour inhiber leur expression, soit bloquer l'activité des facteurs de transcription p53, FOXO et NF- κ B par désacétylation (186). La protéine SIRT1 n'est pas la seule protéine identifiée qui peut influencer l'expression des composantes de SASP par des changements épigénétiques. En effet, l'activation de la sénescence par la voie du dommage à l'ADN (DDR) mène à la dégradation du méthyltransférase G9a et GLP, des mono- et di-méthyltransférases de H3K9 et à une diminution des marques répressives sur les histones des promoteurs IL-6 et IL-8 (187). Une autre régulation épigénétique des SASP est effectuée par macroH2A1(188). Cette protéine, qui est à la base une composante du nucléosome, joue un rôle crucial pour l'expression des SASP (notamment IL-1A, IL-1B, IL-6, IL-8 et MMP-1) et l'activation de la sénescence paracrine (188). Malgré cela, les voies de signalisation activées durant la sénescence ne promeuvent pas toujours son activation. En effet, lorsque la sénescence est activée, le stress sur le réticulum endoplasmique induit l'expression des réactifs de l'oxygène (ROS) et la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) pour dissocier macroH2A sur les promoteurs des composantes des SASP, afin d'inhiber leur expression et de regagner l'homéostasie(188). Une fois transcrites, les SASP sont également régulées de façon post-transcriptionnelle par la kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), et ce, de deux manières(189). En premier lieu, mTOR permet la stabilité des ARNm des cytokines et la traduction de IL-1A(189). L'inhibition de mTOR par la rapamycine diminue les transcrits de plusieurs cytokines, bloque l'expression de l'IL-1A et diminue l'activité du facteur de transcription NF-Kb(189). En second lieu, mTOR et 4EBP1 (facteurs d'initiation de la traduction) contrôlent l'expression des protéines effectrices de MAPK (notamment MK2) pour réguler la traduction de l'ARNm des SASP(190, 191). Plus spécifiquement, MK2 exprimée ajoute des groupements phosphate à la protéine ZFP36L1 pour bloquer son activité, qui est de dégrader l'ARNm des SASP (IL-1 β , IL-6 et IL-8)(190, 191). Une autre régulation des SASP est faite au niveau post-traductionnel. En effet, ces petites molécules sont en général synthétisées sous forme de précurseur (non actifs). Dès lors nécessaires, ces cytokines sont clivées dans leur N-terminaux par des protéases spécifiques pour composer la forme mature de la cytokine(192). À titre d'exemple, la protéase associée à la membrane plasmique calpaïne, activée par le calcium, est responsable du clivage du précurseur de l'IL-1 α (31 kDa) à sa forme mature (18 kDa)(192).

De plus, de récentes études ont démontré des transcriptomes distincts entre les cellules sénescents primaires et secondaires(131). Notamment, la diminution d'expression des collagènes de fibrilles (collagène 1A1, 3A1 et 5A1) chez les cellules sénescents induites (primaires) n'est pas observée chez les cellules sénescents secondaires(193). De plus, ces expériences ont démontré que NOTCH1 agit comme un régulateur important pour la transcription des composantes SASP et la formation de deux sécrétomes distincts(131). En effet, ces études ont pu démontrées que le sécrétome des cellules sénescents induites (primaires) est composé majoritairement des facteurs pro-inflammatoires qui sont régulés par le facteur de transcription C/EBP β , tandis que la sénescence non induite (secondaire), activée par un contact cellule-cellule (juxtacrine), est riche en NOTCH1(131). L'expression induite de NOTCH1 cause l'inhibition de C/EBP β , l'activation de la voie TGF- β (*Transforming growth factor beta*) et la transcription des SASP anti-inflammatoires. Ainsi, les vagues d'expression de NOTCH1 durant la sénescence sont une explication de la composition dynamique des SASP (131). De façon intéressante, les expériences de culture cellulaire ont démontré que chez les cellules dont la sénescence a été induite par oncogène (IOS), l'activation de la sénescence secondaire se faisait pendant la phase de transition (entre la prolifération précoce et l'activation de la sénescence) et qu'elle est fortement dépendante de l'activité de NOTCH1(131).

1.6 Types de sénescence cellulaire

La sénescence est, depuis sa découverte, surtout étudiée à partir des différentes lignées cellulaires. À la base, ces cellules sont en mode prolifératif. Elles entrent dans une phase d'arrêt de réplication et de sortie du cycle cellulaire permanent lorsqu'elles font face à un stress quelconque (sénescence induite). Plusieurs agents sont utilisés pour induire la sénescence in vitro et, en fonction de l'agent utilisé, la cellule peut activer des voies de signalisation et des gènes spécifiques pour stopper sa réplication. La sénescence peut survenir de façon non programmée suite à un basculement dans l'intégrité de la cellule : dommage d'ADN, conditions oncogéniques ou dysfonctionnement mitochondrial. Ces dommages peuvent autant activer la mort par apoptose que la sénescence. Le choix dépend entièrement de l'état de la cellule et détermine

l'influence qu'elle aura sur les cellules avoisinantes. La sénescence peut également être activée de façon naturelle (sénescence programmée). C'est le cas pour la sénescence réplivative et la sénescence durant la régénération, la guérison de la plaie et le développement embryonnaire.

1.6.1 Sénescence induite (non programmée)

1.6.1.1 Sénescence suite à un stress (Stress-induced senescence)

En culture, les cellules peuvent faire face à différents types de stress qui mène à l'activation de la sénescence. Parmi ces nombreux stress (cytokines, cuivre, hypoxie), les stress oxydatifs causés par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'hydroperoxyde de tert-butyle (tBuOOH) sont les plus utilisés(194-197). En fonction du protocole choisi, les cellules peuvent être exposées au stress une seule fois pour obtenir une population cellulaire mixte de cellules sénescents et en prolifération, ou alors être exposés à des doses chroniques de stress pour augmenter le pourcentage de la population sénescents(198). Ces agents causent des dommages à l'ADN et activent la sénescence par les mêmes voies que la sénescence réplivative(194). Par conséquent, les voies de signalisation par lesquelles la sénescence induite par un stress est activée sont les mêmes que pour la sénescence réplivative et la sénescence suite à un dommage à l'ADN (description ci-bas)(194, 199).

1.6.1.2 Sénescence induite par les drogues thérapeutiques (Therapy induced *senescence*)

Dans les études sur l'activation de la sénescence comme thérapie contre les cellules cancéreuses, l'utilisation des agents qui causent des dommages à l'ADN, tels que la bleomycine ou la doxorubicine, est très commune(200). Ces drogues activent des voies pour reconnaître des lésions de l'ADN et ainsi débiter la cascade de signalisation cellulaire qui mène à la réparation de l'ADN et à une pause dans la progression du cycle cellulaire (activation du point de contrôle). Lorsque la cellule est incapable de réparer le dommage dans son ADN par la voie de réponse au dommage d'ADN (DDR), elle déclare sa mort (200, 201). Chez les humains, il existe trois voies de

DDR, chacune médiée par l'un des transducteurs suivants : ATM, ATR ou DNA-Pkcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) (202). Ces transducteurs sont recueillis au site du dommage de l'ADN par les protéines senseurs et passent par des étapes de stabilisation et d'activation avant d'être totalement actifs(202). La forme active des transducteurs recrute ensuite les protéines effectrices, CHK1 ou CHK2 (*check point kinases*) qui permettent l'amplification du signal par l'activation de divers substrats, dont les régulateurs du cycle cellulaire(202). Ces derniers activent le processus d'inhibition des cyclines-CDK spécifiques aux trois points de contrôle du cycle cellulaire : G1/S, intra-S et G2/M. Plus spécifiquement, CHK1 phosphoryle CDC25C sur Ser216 pour provoquer son exportation nucléaire pour inhibition du complexe cyclineB-CDK1 et empêcher l'entrée de la cellule en mitose (point de contrôle G2/M)(203). Les kinases CHK1 et CHK2 phosphorylent et causent la dégradation de la protéine CDC25A, protéine nécessaire pour l'activation de CDK2 en phase G1 et au cours de la phase S (point de contrôle G1/S et intra-S) (203, 204).

L'activation de la DDR agit également au niveau transcriptionnel pour permettre l'inhibition du cycle cellulaire. Plus précisément, ces voies induisent la phosphorylation de p53 sur plusieurs résidus sérine/thréonine et augmentent l'activité transcriptionnelle et la stabilité de p53(159). La protéine p53 à son tour augmente la transcription de p21 en se liant directement sur son promoteur(159).

Une autre hypothèse est que la voie DDR pourrait avoir un effet positif sur l'activation de la sénescence induit par un oncogène. Pour supporter cette idée, l'équipe de Ferbeyre a démontré une suractivation des protéines impliquées dans la voie de la réponse aux dommages de l'ADN, tels que ATM, ATR, Chk1, et Chk2, dans la sénescence induite par les oncogènes STAT5A et RASV12(205). De plus, il a montré que la simple inhibition de l'ATM par de petits ARN en épingle à cheveux (ARNsh) en parallèle avec l'inactivation de la protéine Rb peut contourner l'activation de la sénescence dans ces mêmes conditions (205). Ces observations ont été effectuées en parallèle avec une diminution de l'expression de la protéine p53, protéine essentielle pour l'activation de ce type de sénescence(152, 205).

Ces expériences ont complété celles effectuées par l'équipe de Bartkova qui, elle, avait montré que l'inhibition de la protéine ATM inhibait non seulement la sénescence, mais augmentait également l'agressivité et la taille de la tumeur chez la souris(154). Ce qui a par la suite été expliqué par l'équipe de Di Micco comme une succession d'évènement qui survient lorsque les cellules sont soumises à des conditions oncogéniques(155). En effet, il semblerait qu'en présence d'oncogènes, les cellules entreraient dans une phase de réplication intense qui causerait des dommages à l'ADN et activerait la voie DDR pour ultimement activer une réponse antitumorale par l'activation de la sénescence(155). Somme toute, ces expériences ensemble ont confirmé que les protéines impliquées dans l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN, du moins l'ATM, contribuent fortement à l'activation de la sénescence induite par l'oncogène(154, 155, 205).

1.6.1.3 Sénescence induite par un oncogène (OIS)

La sénescence cellulaire est également activée de façon naturelle afin d'empêcher la transformation cellulaire. Lorsque les cellules font face à des stimuli qui causent leur prolifération incontrôlée, elles vont activer des mécanismes de défense contre le développement d'une tumeur. Le type de défense activée dépend largement des conditions dans lesquelles la cellule se retrouve. Toutefois, étant donné que les cellules en sénescence sont capables d'influencer et surtout d'activer la sénescence chez les cellules avoisinantes, ce destin cellulaire est très avantageux et permet la répartition du signal chez un plus grand groupe de cellules. En culture, ce type de sénescence est observé par l'ajout des oncogènes tels que Ras, B-Raf, sérine/thréonine kinase (BRAF) ou par l'inactivation des suppresseurs de tumeur tels que PTEN(118, 206, 207). En 1997, l'équipe de Serrano a montré que bien que l'oncogène Ras soit impliqué dans plusieurs types de cancer, la transfection de HRAS dans les cellules d'origine murine (rat) et les fibroblastes embryonnaires humains causait l'arrêt de la prolifération cellulaire(152). Cet état de la cellule était observé en parallèle avec une induction des inhibiteurs p16 et p19 et la phosphorylation de la protéine Rb(152). Ces observations, ainsi que plusieurs autres expériences *in vivo* effectuées par d'autres chercheurs, ont confirmé que les oncogènes sont capables d'activer la sénescence par l'intermédiaire de la cascade de signalisation MAPK, qui mène à l'inhibition de Bmi1,

l'inhibiteur de p16 et p19 (206, 208). De plus, le Ras suractivé conduit à la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à l'activation de DDR qui, comme expliqué précédemment, active la sénescence via l'activation de p53(206).

1.6.1.4 Sénescence liée à un dysfonctionnement mitochondrial (MiDAS)

La mitochondrie est l'organe intracellulaire responsable de la production d'énergie chez la cellule(209). Notamment, elle permet l'oxydation de NADH (généralisé entre autres par les acides gras) en NAD⁺ et la production des électrons qui seront éventuellement utilisés pour la production d'ATP(209, 210). Cet organe, bien qu'il soit situé à une certaine distance du noyau, est capable de communiquer avec celui-ci par une voie de signalisation mitochondrie-noyau, ainsi que de contrôler différents processus cellulaires tels que la différenciation, l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire(211). Dans des conditions optimales, la mitochondrie produit de l'ATP grâce au coenzyme NADH (*nicotinamide adenine dinucleotide*), qui agit à titre de navette pour transporter les électrons à la chaîne respiratoire(209). Lorsque la mitochondrie n'est plus capable de fournir assez de NAD⁺, elle mène à une dérégulation du ratio NAD⁺/NADH, qui envoie une alerte au noyau pour activer la mort de la cellule par sénescence. Par ailleurs, des études ont démontré une diminution du NAD⁺ dans plusieurs tissus des organismes âgés(212), ce qui démontre une potentielle connexion entre les niveaux de NAD⁺, l'âge et la sénescence.

Bien que la voie de signalisation mitochondrie-noyau qui mène à l'activation de la sénescence ne soit pas très bien comprise, plusieurs marqueurs sont utilisés pour identifier ce type de sénescence : une diminution du ratio NAD⁺/NADH qui cause l'activation de AMPK et du facteur de transcription TP53(213), une augmentation du taux de lamine B1 (LMNB1)(214), une diminution de l'expression du groupe de protéines de mobilité (HMGB1)(215), une augmentation de l'expression de p21(216) et l'absence des SASP pro-inflammatoire IL1- α , IL- β , IL-6 et IL-8(213). Récemment, une étude a identifié les gènes sirtuines, plus spécifiquement SIRT3 et SIRT5, comme des suppresseurs de sénescence et des modulateurs de SASP(213).

1.6.2 Sénescence programmée

1.6.2.1 Sénescence réplivative

La sénescence réplivative était le premier type de sénescence cellulaire découvert(87). Elle fait le lien entre la limite de prolifération des cellules somatiques et le raccourcissement des télomères(115, 118). Les télomères sont des complexes de ribonucléoprotéines présents à la fin des chromosomes, qui les protègent des détériorations et des fusions non désirées entre les chromosomes(217). Leur raccourcissement est dû au manque d'extrémité 3'OH sur le dernier fragment Okazaki à l'extrémité 3' et le besoin d'une amorce d'ARN sur l'ADN en voie de réplification(218). L'ADN polymérase, qui nécessite la présence d'un groupement 3'OH pour se lier et synthétiser l'ADN complémentaire, ne reconnaît pas cette section et crée un vide(218). Heureusement pour nous, ce vide n'a aucun effet sur l'intégrité du génome puisqu'il est aux extrémités du chromosome, sur les télomères. Toutefois, étant donné qu'une partie du télomère est perdue à chaque division cellulaire, après un certain nombre de réplifications, elle atteint une limite qui ne lui permet plus de protéger le génome(218). C'est à ce stade que la cellule arrête de répliquer et active des voies de signalisation qui mène à la sénescence(217, 219). Durant la sénescence réplivative, les deux voies classiques de la sénescence, c'est-à-dire les voies p53/p21 et p16/pRb et la voie de dommage liée à l'ADN, sont activées (Figure 3D)(217). Dans des conditions saines, les SASP sécrétés sont de type pro-inflammatoire (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, *tumour necrosis factor alpha* (TNF- α) et *interferon-gamma* (IFN- γ))(93, 94, 220, 221). Elles permettent le recrutement des cellules du système immunitaire et leur propre élimination par celles-ci(221). Ces étapes permettent la réparation tissulaire et un retour à l'homéostasie tissulaire. Dans les conditions malsaines, ces SASP sont de type anti-inflammatoire (IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-37 et TGF- β 1), ce qui empêche leur reconnaissance par les cellules du système immunitaire et contribue à leur accumulation dans le tissu. L'accumulation des SASP à long terme cause des inflammations chroniques que l'on observe avec le vieillissement(221, 222). Des études ont démontré que l'élimination des cellules sénescents chez les organismes âgés peut prévenir les maladies liées à l'âge et prolonger leur espérance de vie(223-226).

1.6.2.2 Sénescence dans la guérison de la plaie

La sénescence cellulaire tient également un rôle important dans la guérison des plaies(227-230). Ce processus, chez les mammifères, implique l'activation des médiateurs de l'inflammation ainsi que la synthèse et le dépôt rapides de la matrice extracellulaire (MEC) pour prévenir les infections bactériennes et assurer l'intégrité des tissus pendant la réparation(229, 230). La guérison des plaies est un processus complexe composé de quatre phases distinctes : hémostase, inflammation, migration/prolifération et remodelage(229, 230). Son efficacité dépend de la prolifération de myofibroblastes, c'est-à-dire des fibroblastes exprimant l'actine et jouant un rôle important dans la contraction et la fermeture de la plaie, en plus de permettre la production de MEC. Les composants des MEC modulent les activités cellulaires impliquées dans le processus de cicatrisation des plaies : migration, prolifération cellulaire, synthèse de nouvelles matrices extracellulaires et la revascularisation des tissus lésés(229, 230). Cette production doit être très bien régulée puisque sa surproduction peut causer la fibrose, une augmentation anormale du tissu conjonctif, une cicatrice chronique pouvant causer des pathologies vasculaires périphériques ou l'artériosclérose(228). Ainsi, afin d'empêcher la surproduction de MEC, les myofibroblastes arrêtent de proliférer et entrent en phase de sénescence. Il s'agit d'un processus qui est régulé par la protéine de la matrice extracellulaire, CCN1, via une cascade de signalisation qui cause l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation de p53(230). Les ROS accumulés induisent l'activation de p38 et ERK, qui à leur tour vont activer p16/pRb, protéines qui, telles qu'expliquées précédemment, mènent à l'arrêt du cycle cellulaire(227, 230). En parallèle, les SASP sécrétés par les cellules sénescents, particulièrement les facteurs de croissance et les protéases, participent à la guérison de la plaie de deux façons. D'abord, elles permettent l'attraction des cellules du système immunitaire sur les lieux pour protéger la plaie d'une infection bactérienne et ensuite, elles assurent la communication entre les tissus avoisinants pour stimuler la réparation(91, 231).

1.6.2.3 Sénescence dans la régénération

En plus de la guérison de la plaie, la sénescence est également impliquée dans le processus de la régénération des structures chez les organismes avec le potentiel de régénération(232). En effet, comme il en sera discuté plus loin, les salamandres, plus spécifiquement les axolotls, ont une grande capacité de régénérer la plupart de leurs structures durant toute leur vie(18). Ce processus est très complexe et nécessite l'activation de plusieurs processus cellulaires tel que la guérison de la plaie, le recrutement des cellules immunitaires, la dédifférenciation des cellules progénitrices en quiescence, l'activation du cycle cellulaire et finalement la re-différenciation en divers types cellulaires(18, 233). Très récemment, l'équipe de Maximina H. Yun a démontré que l'amputation des membres de l'axolotl était suivie d'une augmentation importante des cellules en sénescence, puis d'une diminution soudaine lorsque le tissu est complètement régénéré(232). Contrairement, l'activation de la sénescence est observée en parallèle avec une induction de prolifération cellulaire(232). Ces observations corrélerent avec les expériences de Mosteiro où la reprogrammation des cellules différenciées par la transfection de OSKM était montrée dépendante de la sénescence et la sécrétion des SASP, notamment IL-6.(234). Ces observations pourraient être expliquées par le pouvoir des SASP à influencer le comportement de leurs cellules voisines et leurs effets bénéfiques sur la plasticité et la reprogrammation des cellules(235).

Dans le cas de la régénération, les SASP sont importantes à différentes étapes. D'abord, l'exposition transitoire des SASP peut fournir des signaux régénératifs qui induisent la plasticité de la cellule(235). Un événement particulièrement important pour la dédifférenciation et la prolifération des cellules progénitrices dans la régénération tissulaire(235). Ensuite, les SASP permettent le remodelage de la matrice extracellulaire et l'expression transitoire des facteurs de croissance et de protéines qui permettent la migration, la forme, la survie, la différenciation et la prolifération des cellules (236, 237). Finalement, elles permettent le recrutement des cellules du système immunitaire qui non seulement se débarrassent des débris cellulaires, mais fournissent également des signaux permettant la prolifération ou la différenciation des cellules souches et des cellules progénitrices(233). En somme, bien que les voies de signalisation qui mènent à l'activation de la sénescence durant la régénération ne soient pas complètement comprises, de plus en plus d'études démontrent que la sénescence cellulaire est aussi importante que la

prolifération cellulaire pour permettre la régénération de structures complexes chez les salamandres.

1.6.2.4 Sénescence développementale

Récemment, les laboratoires de Serrano, Keyes et Roy ont découvert que la sénescence n'est pas uniquement un processus activé par un stimulus ou avec l'âge (238-240). En effet, ils ont démontré que la sénescence est un processus cellulaire très bien régulé, qui apparaît à un moment et un emplacement spécifique. Son activation ne dépend pas de l'âge de l'organisme, mais plutôt de ses besoins. Ainsi, durant le développement embryonnaire de plusieurs organismes tels que le poussin, la caille, le poisson zébré, le xénope, le rat-taupe nu, l'axolotl, la souris et même l'humain, la sénescence est activée dans des organes nécessitant une restructuration morphologique(241). À première vue, c'est un processus qui permet à l'organe de conserver sa fonction durant la transition et permet la survie de l'organisme.

Serrano et Keyes ont accompli leurs recherches principalement sur l'embryon de souris. Un modèle qui, en plus de sa fidélité à l'embryogenèse humaine, a une génétique très bien connue qui permet d'identifier des phénotypes associés à un gène par une approche de mutagenèse dirigée(238). Serrano a marqué l'embryon de souris avec un marqueur spécifique de sénescence associée à l'activité bêta-galactosidase acide (SA β G) et a observé un enrichissement des cellules sénescents dans deux organes fortement conservés durant l'évolution : le mésonéphros et le sac de l'oreille interne(238). Le mésonéphros est une structure transitoire pour le développement des reins définitif (métanéphros) chez les mammifères. Chez l'humain, cette structure arrête de se développer et disparaît au 24^e ou 25^e jour embryonnaire(242). Quant au sac endolymphatique de l'oreille interne, sa fonction est variée. Il permet la filtration des déchets endolymphatiques des canaux cochléaires et vestibulaires qui sont respectivement impliqués dans l'audition et l'équilibre de l'oreille, la résorption de l'endolymphe et la défense immunitaire(243). La forte accumulation de sénescence cellulaire dans le mésonéphros a été détectée au moment de sa régression et a diminué une fois les tubules disparus(238). De même, la haute concentration de cellules sénescents dans le sac endolymphatique a été détectée au début de sa désagrégation(238). L'équipe de Serrano a identifié que, contrairement aux autres types de sénescence, seule l'expression des inhibiteurs p21, p27 et p15 (p16 n'a pas été testé)

était significativement augmentée durant la sénescence développementale(238). Le facteur de transcription p53, qui module l'arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence réplivative induit par un oncogène et dans la guérison de la plaie, n'a pas augmenté durant la sénescence développementale(238). En effet, les embryons mutés pour le gène de p53 n'ont démontré aucune différence au niveau de l'activation de la sénescence dans le mésonéphros et le sac endolymphatique(200). Ces données suggèrent que p21 permet l'arrêt du cycle cellulaire de façon indépendante à p53. De plus, les mutations qui empêchent les inhibiteurs p15, p16, p18 et p19 à se lier aux kinases dépendantes aux cyclines 4/6 (CDK4/6) n'ont indiqué aucun changement au niveau de l'activité de SaβG(239). Ainsi, Serrano a démontré que contrairement aux autres types de sénescence, la sénescence développementale n'était ni médiée par les inhibiteurs du cycle cellulaire, ni par les réponses aux dommages à l'ADN (p53).

De façon plus intéressante, le séquençage d'ARN du mésonéphros sauvage en comparaison avec celui muté pour le gène p21 (impliqué dans la sénescence développementale) a indiqué une augmentation des voies embryonnaires TGF-β, Hedgehog et WNT ainsi qu'une induction des gènes impliqués dans ces voies (Bmpr1b, Gli1 et Nkd1)(238). À l'exception de TGF-β, l'augmentation des autres gènes/voies n'a pas été détectée dans les autres types de sénescence. De plus, comme dans la sénescence réplivative induite par un oncogène et dans la guérison de la plaie, Serrano a identifié une accumulation des cellules du système immunitaire, plus précisément des macrophages, auprès des cellules en sénescence et qui permettaient leur élimination(238).

Parallèlement, l'équipe de Keyes a identifié de la sénescence au niveau de la queue, des vésicules de l'oreille et du cerveau, de la fermeture du tube neural, de l'endoderme intestinal et au niveau de la crête ectodermique apicale (AER) des membres chez la souris en développement (E11.5)(239). Keyes et son équipe ont également démontré que les zones sénescents incorporaient moins de BrdU (diminution de la prolifération cellulaire) et exprimaient plus de p21, sans pour autant exprimer plus de p53, p16 ou p19(239). Ces résultats, bien qu'ils soient similaires aux résultats de Serrano, sont différents des autres voies de sénescence connues où l'activation de p21 était constatée en parallèle avec celles de p53(159, 163, 165). Selon leurs résultats, p21 seul, est capable d'introduire la sénescence et de permettre la formation des différentes structures. Ainsi, ils ont créé une souris transgénique *Knock-out* de p21 et ont montré que la

sénescence au niveau de l'AER chez cette souris était remplacée par l'apoptose, ce qui lui permettait de se développer normalement(222). Toutefois, la déficience en p21 avait un impact sur la prolifération du mésenchyme en dessous de l'AER. En effet, le mésenchyme et l'AER sont interdépendants via un croisement de signalisation : l'AER active la prolifération cellulaire du mésenchyme par l'activation de phospho-ERK (pERK) qui, à son tour, émet des signaux pour conserver la fonction AER. Ainsi, l'équipe de Keyes s'est intéressée à la possibilité que les signaux de sénescence reçus par l'AER proviennent du mésenchyme. Pour répondre à la question, ils ont créé des souris transgéniques pour un inhibiteur de pERK et ont observé une diminution significative des cellules sénescents dans l'AER. Ils ont donc confirmé que la sénescence dans l'AER est médiée par son intersignalisation avec le mésenchyme(239).

De son côté, l'équipe de Roy a démontré de la sénescence au niveau du pronéphros (un organe transitoire qui est remplacé par le mésonéphros), de l'épithélium olfactif des fascicules nerveux, des organes latéraux et des gencives de l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*)(240). Ces zones ont été identifiées à proximité des cellules démontrant des niveaux importants de ERK phosphorylé, qui, tel que démontré par Keyes, semblent avoir un rôle dans le maintien du caractère de sénescence. L'équipe de Roy s'est également intéressée à savoir si la sénescence durant le développement était liée ou non à l'inflammation. Ainsi, ils ont comparé l'ARN des SASP d'une zone riche (pronéphros) avec une zone dépourvue (queue) de sénescence(240). De cette façon, ils ont pu observer que contrairement aux transcrits de l'interleukine pro-inflammatoire, le transcrit de l'interleukine anti-inflammatoire (IL-10) était significativement plus élevé dans la zone riche en sénescence(240). Ces données semblent indiquer que les SASP sécrétées dans la sénescence développementale chez l'axolotl sont de type non inflammatoire.

Parallèlement, l'équipe de Roy s'est questionnée sur l'aspect évolutif de la sénescence et s'est intéressée à savoir si la sénescence était également impliquée dans le développement des organismes plus simples, tels que le poisson zébré. À sa grande surprise, l'équipe a noté la présence de sénescence très tôt (8-13 somites) chez les cellules avec le destin de devenir le sac vitellin, une structure transitoire qui permet l'approvisionnement nutritif de l'embryon pendant son développement(240). Aux stades 20-25 somites et jusqu'à quatre jours après la fécondation, la sénescence cellulaire a également été perçue dans les cellules qui formeront l'intestin. Du

septième au quinzième jour, la structure du sac vitellin est perdue et la sénescence devient restreinte à l'extrémité cloacale de l'intestin(218). Ces résultats viennent confirmer que la sénescence cellulaire est un processus qui a été conservé durant l'évolution et qui permet le remodelage ou la disparition graduelle des structures transitoires.

2 Notre modèle expérimental : l'axolotl

2.1 L'axolotl : un modèle pour étudier la sénescence

L'axolotl (*Ambystoma mexicanum*) est l'un des modèles les plus utilisés en biologie moderne pour étudier le développement embryonnaire, la formation des structures, l'organogenèse et la régénération. En effet, en plus d'avoir des embryons de grande taille et un développement embryonnaire très lent, cette salamandre néoténique a également la particularité de ne pas se métamorphoser et de conserver son mode de vie aquatique tout le long de sa vie, ce qui facilite son entretien au laboratoire.

En plus de son pouvoir régénératif remarquable, l'axolotl est également résistant aux différents cancers (non pas parce que l'animal n'exprime pas les voies cellulaires, mais bien parce qu'il est capable de mieux les contrôler et de les utiliser à son avantage) (244). Par exemple, la régénération de sa patte entière est un processus très complexe qui nécessite une orchestration cellulaire et moléculaire bien contrôlée. Le processus débute avec la formation d'un caillot de cellules sanguines au site de coupure et la formation d'une couche de cellules d'épiderme pour fermer la plaie(245-247). Ensuite, une structure en forme de cône connue sous le nom de blastème se forme(248-250). Plus tard, les cellules qui composent le blastème se différencient pour donner naissance aux cellules osseuses, cartilagineuses et musculaires(251). Finalement, une division cellulaire s'en suit pour permettre la formation de la structure du membre perdu(252). Chez l'humain, la différenciation cellulaire et la prolifération cellulaire excessive sont les principales causes de cancer. Cela nous laisse croire que l'axolotl a non seulement un meilleur contrôle de son cycle cellulaire, mais aussi une meilleure communication cellulaire, ce qui lui permet d'arrêter la prolifération lorsque nécessaire.

2.2 Développement embryonnaire de l'axolotl

Les premiers stades embryonnaires de l'axolotl ont été décrits pour la première fois en 1975 par Schreckenberg et Jacobson(252) et ensuite par Armstrong et Malacinski en 1989(253) . Ces

chercheurs se sont basés sur les stades embryonnaires de l'*Ambystoma maculatum*, un autre type de salamandre, décrits en 1969 par Harrison(254). Schreckenber et Jacobson ont caractérisé le développement de l'axolotl en fonction des traits physiologiques (morphologie) et du développement des organes internes des embryons disséqués(252).

Chez l'axolotl, la fécondation est un processus interne qui a lieu lorsque la femelle prend les spermatozoaires déposés par le mâle. En temps normal, la femelle dépose entre 250 et 500 œufs quelques heures après la fécondation (253). Ces œufs sont enfermés dans une couche de gelée transparente qui les protège des blessures et des infections bactériennes. Au moment de l'éjection, les œufs sont sous forme unicellulaire (Stade 1) (253). Elles passent à travers les premières divisions cellulaires (Stade 7) pour finalement former une boule de cellules, la blastula (Stade 9) (253). Graduellement a lieu la gastrulation, où la blastula s'organise en différentes couches germinales : endoderme, mésoderme et ectoderme (Stades 10-12) (253). Par la suite a lieu la neurulation, durant laquelle la plaque neurale est transformée en tube dans le but de former la moelle épinière et le cerveau (Stades 13-20) (253). Les cellules de crête neurale sont également formées durant la neurulation. Elles migrent loin du tube neural et donnent naissance à différents types cellulaires tels que les neurones. À partir de ce stade, l'embryon commence à prendre forme et à développer ses organes internes. Ceci débute avec le bourgeonnement précoce de la queue (*Early Tailbud*), le début de la formation des branchies et les pronéphros (Stades 21-25) (253). À la fin du stade 26, les conduits paramésonephrotiques (*Phronephric duct*) sont bien définis, une petite queue est formée et un arc branchial s'est développé (253). Ensuite, d'autres organes commencent à faire leur apparition, la queue continue à grandir et la taille des conduits paramésonephrotiques continue à augmenter (253). Au stade 28, les fosses nasales prennent forme et donnent naissance aux premières traces des organes olfactifs (253). Les stades 31 à 34 sont consacrés au développement des paires de somites (253). Ce qui permet à la queue et la tête de l'animal en développement de se placer sur un axe droit. Au stade 35, les premiers chromatophores et les premiers battements de cœur de l'animal apparaissent (253). Durant les stades 36 à 43 débute le développement des branchies, de la bouche et des membres. Enfin, c'est au stade 41 que l'embryon éclot et devient libre (253). Un peu plus tard, la bouche de l'animal est complètement formée et ouverte (253). À ce moment, l'animal doit être nourri pour

assurer sa survie. Au laboratoire, nous utilisons des bébés crevettes saumures puisque le mouvement et la couleur de ces crevettes les rendent visibles et faciles à avaler pour l'animal. Bien entendu, à partir de ce stade, le développement de l'animal dépend de sa routine alimentaire. En général, l'axolotl atteint la maturité sexuelle vers 18 mois et peut être gardé en captivité pendant 15 ans (253).

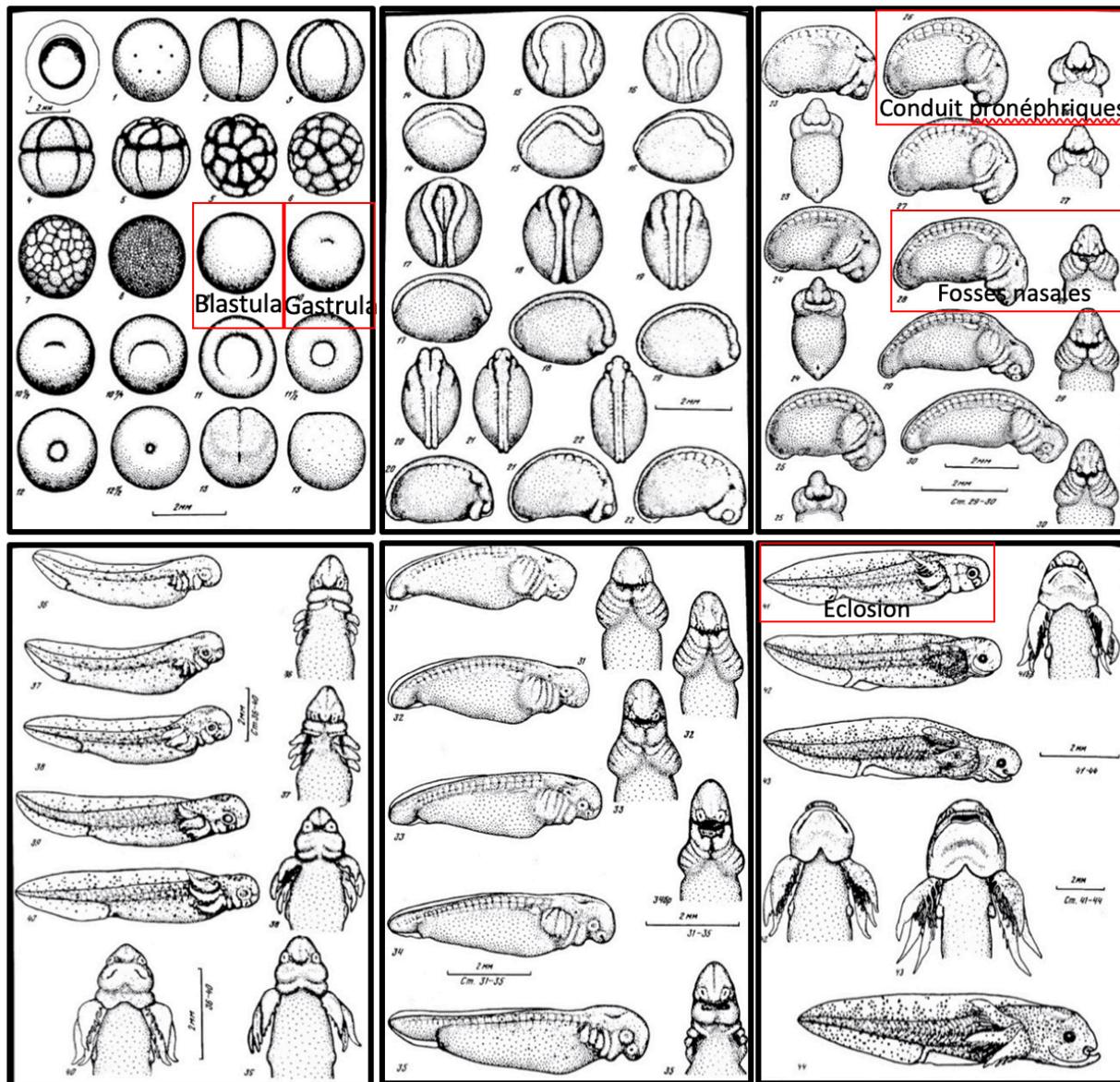


Figure 5- Les différents stades du développement embryonnaire de l'axolotl.

Figure adaptée de Armstrong et Malacinski, 1989(253)

3 Hypothèse de travail

Depuis très longtemps, la sénescence cellulaire était caractérisée comme un mécanisme pour prévenir la réplication des cellules endommagées, précancéreuses et myofibroblastiques. Des études récentes ont démontré la présence de cellules sénescents durant le développement précoce de la souris et de l'axolotl, plus précisément au niveau des structures transitoires et du centre de signalisation (AER). Ce phénomène a changé la perception des chercheurs et les a ramenés à se questionner sur la fonction évolutive de la sénescence. Est-ce que la sénescence pourrait jouer un rôle dans le remodelage des organes (le pronéphros de l'axolotl et le mésonéphros de la souris) ou leur élimination (sac vitellin du poisson-zèbre) durant le développement embryonnaire ? Pourquoi la cellule n'active pas l'apoptose, un phénomène également connu pour la morphogénèse des tissus et des organes ? Quel phénomène lui permet d'activer la sénescence plutôt que l'apoptose dans certaines structures embryonnaires ? Quels sont les gènes et les voies de signalisation qui permettent d'activer la sénescence durant le développement ? À ce jour, les réponses à ces questions dans le contexte de la sénescence développementale sont inconnues. Les données préliminaires démontrent qu'à l'exception de p21, l'activation de la sénescence développementale ne dépend pas des inhibiteurs du cycle cellulaire. De plus, notre laboratoire a rapporté que les cellules à proximité des cellules sénescents expriment la forme active de ERK (phospho-ERK1/2). Cette observation laisse penser que la voie ERK est soit responsable de l'activation de la sénescence, soit que la sénescence activée cause l'activation de ERK sur les cellules avoisinantes.

Nous proposons l'hypothèse de l'existence d'une nouvelle voie qui impliquerait l'activation d'un gène avec des effets inhibiteurs sur les protéines du cycle cellulaire (et non l'activation des inhibiteurs du cycle cellulaire). Cette voie aurait un impact négatif sur les voies de signalisation prolifératives, telles de ERK. De plus, nous pensons que la sénescence développementale est un phénomène irremplaçable qui permet le changement morphogénique des organes en développement.

4 Matériel et méthode

Conformité et éthique animale

Des embryons d'axolotl de type sauvage ont été achetés auprès du Ambystoma Genetic Stock Center (Lexington, KY). Toutes les expériences et manipulations sur les animaux ont été effectuées conformément aux exigences de la Politique institutionnelle sur l'utilisation des animaux en recherche et en enseignement de l'Université de Montréal, approuvée par le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA).

Marquage au β -galactosidase

Les embryons ont été fixés avec 0,5 % de glutaraldéhyde dans du PBS à 4 °C pendant 6 heures, puis rincés deux fois pendant 15 min à 4 °C dans du PBS à un pH 5,5 contenant $MgCl_2$ 1 mM. Par la suite, les embryons ont été marqués pour Sa β G en utilisant le colorant X-gal solution (0,1 % X-gal, ferrocyanure de potassium 5 mM, potassium 5 mM ferricyanure, chlorure de sodium 150 mM et chlorure de magnésium 2 mM dans du PBS, pH 5,5) pendant 6 h à 37 °C. Pour confirmer la spécificité de Sa β G, des embryons contrôles ont été colorés dans des conditions identiques avec la seule différence que le pH de X-gal a été ajusté à 7,5 pour lequel Sa β G est inactif.

Isolement d'ARN

Des coupes ont été effectuées sur les embryons au stade 51 (n=3) afin de prélever les pronéphros et une partie de la queue des animaux. Par la suite, l'ARN de ces coupes a été extrait avec le réactif TRIzol (Life Technologies, numéro de catalogue : 15596018) à l'aide de seringues (18 à 23 jauges), en suivant les instructions du fabricant. L'ARN a été quantifié par Nanodrop®.

La transcription inverse — Réaction en chaîne par polymérase (Rt-PCR) et séquençage d'ARN

La transcription inverse de l'ARN a été effectuée en utilisant 200 ng d'ARN. Les réactions ont été effectuées en utilisant SuperScript VILO™ (Life Technologies, numéro de catalogue : 11754-050) selon les directives du fabricant avec l'addition de 0,62 μ M d'oligo-dT17 au mélange. Une fois la réaction terminée, les mélanges ont été dilués à 1 : 8 dans de l'eau sans RNase pour un volume final de 160 μ l.

qPCR

Les réactions qPCR ont été effectuées avec 2 µL d'ADNc pour chaque réaction dans le *mastermix* [(1X *Standard Taq Reaction buffer* (New England Biolabs), 0,5 mM MgSO₄, 0,33X SYBR Green I (Life Technologies, numéro de catalogue : S7580), 0,2 mM mélange dNTP (Thermo Fisher Scientific, numéro de catalogue : 10 297 018), 0,5 unité d'ADN polymérase Hot Start Taq (New England Biolabs, numéro de catalogue : M0495S)]. La paire d'amorces pour chaque gène (amont et aval) a été ajoutée à une concentration finale de 0,25 µM. Toutes les amorces (Annexe 2, Tableau 3) ont été testées pour leur efficacité en utilisant le Cp et l'efficacité d'amplification spécifique pour chaque paire d'amorces. Le volume de chaque échantillon a été ajusté à 20 µL avec de l'eau sans RNase. L'amplification a été effectuée en utilisant un système Light Cycler 96 (Roche, numéro de catalogue : 05815916001) avec le programme suivant : dénaturation à 95 °C 6 min, quantification avec 50 cycles de 95 °C 20 s, 58 °C 20 s, 72 °C 30 s, fusion (95 °C pendant 60 s, 40 °C pendant 5s, 65 °C pendant 1s jusqu'à 98 °C par rampe à 0,07 °C/s). L'analyse a été effectuée à l'aide de Light Cycler 96 (version du logiciel 1.1.0.1320, Roche) et les Cps ont été calculés en utilisant l'analyse Abs Quant/2nd Derivative Max avec l'expression relative à GAPDH et actine.

Séquençage et analyses bio-informatiques

Le séquençage des coupes de pronéphros et de queue a été réalisé sur l'ARN purifié de trois animaux différents (n=3) par la plateforme Génomique de IRIC (Séquençage Nouvelle Génération) Identification du projet : DSP613.

Les résultats du séquençage ont été triés en fonction de leur valeur p et seuls les gènes avec une valeur p <0.05 et un FoldChange >1.3 ont été utilisés pour les analyses bio-informatiques DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), PANTHER (<http://pantherdb.org/>), DiRE (<https://dire.dcode.org/>), EnrichR (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) et CellAge (<https://genomics.senescence.info/index.php>). Pour l'analyse Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), toutes les données brutes ont été soumises. GSEA calcule un score d'enrichissement normalisé (NES) qui représente le degré auquel un ensemble de gènes est surreprésenté dans les gènes soumis. L'importance de la NES est affectée par le taux de fausses découvertes (valeur q). Le NES et la valeur q de chaque graphique sont inscrits sur celui-ci.

Analyse semi-quantitative de bêta-galactosidase associé à la sénescence (SaβG)

Une analyse semi-quantitative a été réalisée avec le logiciel FIJI (version 2.1.0 / 1.53c, <https://imagej.net/Fiji/Downloads>) en utilisant l'outil d'apprentissage pour la classification des pixels de microscopie Trainable Weka Segmentation (DOI: 10.1093/bioinformatics/btx180). Chaque image a d'abord été divisée en 3 groupes en utilisant 6 variables pour chaque groupe pour former l'algorithme de segmentation qui permet de différencier le signal positif bêta-gal, la zone de tissu et les noyaux. Ensuite, l'intensité des pixels pour le signal bêta-gal positif a été mesurée en prenant la valeur de la densité intégrée « Integrated density (IntDen) ». Pour chaque condition, une moyenne de la densité intégrée de chaque image (n=3) a été calculée.

Hybridation *in situ* à l'aide de la Tyramide Signal Amplification (TSA)

Jour 1 : Les embryons fixés et enveloppés de paraffine ont été coupés à une épaisseur de 10 microns à l'aide d'un microtome, déposés sur des lamelles et séchés pendant la nuit. Au moment de l'utilisation, les coupes ont été déparaffinées dans du toluène et réhydratées avec une concentration décroissante d'éthanol. Les coupes hydratées ont par la suite été traitées avec la protéinase K (Thermo Fisher Scientific, numéro de catalogue : 25 530 015) à 10 µg/mL diluée dans 0,1 M TrisHCl pH 7,5, 50 mM EDTA pH 8,0 dans PBS-T pendant 15 minutes à la température ambiante. Par la suite, les échantillons ont été fixés 5 minutes dans du PFA à 1 % dilué dans le PBS 0,7 X et rincés dans du PBS 0,7 X. Les échantillons fixés ont par la suite été traités 10 minutes à température ambiante avec 0,25 % d'anhydride acétique dilué dans 0,1 M de triéthanolamine. La préhybridation a été effectuée à 42 °C pendant 1 heure avec une solution d'hybridation [50 % formamide (Fisher Scientific, numéro de catalogue : BP227-100), 2X SSC, 1X Denhardt's, 0,5 % de pyrophosphate de sodium (Sigma Aldrich, numéro de catalogue : P8135), 0,5 % SDS, 25 µg/mL d'ADN de sperme de saumon (Thermo Fisher Scientific, numéro de catalogue : 15632011), 250 µg/mL d'ARNt de levure, 0,25 M de TrisHCl] avec 10 % de sulfate de dextrane. Une fois la préhybridation complétée, les coupes ont été incubées pendant la nuit à 42 °C avec la sonde, préalablement dénaturée à 80 °C pendant 5 min, diluée à 1 µg/mL dans la solution d'hybridation avec 10 % de sulfate de dextrane.

Jour 2 : Le jour suivant, les lames ont été rincées dans 2X SSC à 42 °C pendant 10 minutes pour ensuite être ré-incubées avec la solution d'hybridation à 42 °C pendant 30 minutes. Par la suite, les coupes sont lavées dans du SSC 2X à la température d'hybridation et SSC 0.2X à la température ambiante pendant 5 min avant d'être bloquées dans le sérum de mouton à 10 % (Sigma Aldrich, numéro de catalogue : S3772) dans du MAB-T (100 mM de NaCl, 100 mM d'anhydride maléique, 0,3 % de Triton X-100, pH 7,5) pendant une heure. Finalement, les coupes ont été incubées à 4 °C pendant la nuit avec l'anti-digoxigénine (Roche, numéro de catalogue : 11 093 274 910) à 0,002 µg/µL dilué dans une solution de blocage.

Jour 3 : Le lendemain, les lames ont été rincées 3 fois dans du MAB-T et incubées avec un anticorps anti-souris couplé à HRP (Biorad, numéro de catalogue : 170-6516) dilué à 1 : 400 dans une solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Par la suite, les coupes ont été rincées trois fois avec du MAB-T avant d'être incubées 8 minutes avec du Tyramide-CF640R (Biotium, numéro de catalogue : 92 175) dans 0,005 % H₂O₂ 0,7 X PBS. Enfin, les coupes ont été rincées 3 fois dans 0,7 X PBS. Le montage a été effectué avec le réactif Antifade ProLong® Gold avec DAPI (Thermo Fisher Scientific, numéro de catalogue : 36 931). Les photos ont été prises avec le microscope Zeiss Axio Imager M2 et les images ont été traitées avec coupes le logiciel Zen 2 Pro Blue Edition avec le module Tile. Les photos ont été enregistrées sous forme de fichiers TIF et puis importées dans Illustrator CS4 (Adobe) pour le montage des panneaux.

Immunofluorescence amplifiée avec Tyramide

Les coupes ont été déparaffinées et réhydratées comme pour l'hybridation *in situ* puis bloquées avec 2 % BSA dilué dans le TBS-T pendant 1 h à température ambiante. L'anticorps primaire a été dilué dans une solution de blocage (anti-p-Erk1/2, numéro de catalogue : 4370, Cell Signaling Technology) à 1/400 et incubé 4°C pendant la nuit. Le lendemain, l'anticorps secondaire couplé à la HRP (HRP anti-rabbit, numéro de catalogue : 170-6515, Bio-Rad) a été dilué à 1/800 dans la solution blocage et incubé à température ambiante pendant 45 min. Finalement, l'amplification de signal a été effectuée avec la Tyramide (Biotium, San Francisco Bay, CA, numéro de catalogue : 92175) diluée à 11,6 µM dans 0,0015 % H₂O₂ dans TBS 1X puis incubé à température ambiante pendant 8 min. Le montage a été effectué avec le réactif Antifade ProLong® Gold avec DAPI (Thermo Fisher Scientific, numéro de catalogue : 36 931). Les photos ont été prises avec le

microscope Zeiss Axio Imager M2 et les images ont été traitées avec coupes le logiciel Zen 2 Pro Blue Edition avec le module Tile. Les photos ont été enregistrées sous forme de fichiers TIF et puis importées dans Illustrator CS4 (Adobe) pour le montage des panneaux.

Coloration du cartilage avec le Victoria Blue

Les pattes régénérées ont été fixées dans la solution de Bouin (71 % d'acide picrique saturé, 24 % de solution de formaldéhyde (37 %), 5 % d'acide acétique glacial) pendant 24 h. Par la suite, elles ont été rincées pendant 2 heures avec 70 % d'EtOH (à deux reprises) et ensuite avec 2 % de NH₄OH jusqu'à l'obtention d'une solution jaune. Ensuite, les échantillons ont été blanchis avec 3 % de H₂O₂ pendant 30 minutes et incubés dans l'acide-alcool (70 % EtOH, 0,37 % HCL) pendant la nuit. Le lendemain, les échantillons ont été colorés dans 1 % de Victoria Blue dilué dans l'acide-alcool pendant 2 h, décolorés dans 70 % d'EtOH, déshydratés dans 95 % et 100 % d'EtOH, avant d'être conservés dans le salicylate de méthyle.

5 Résultats

Analyse globale des variations du transcriptome dans les cellules sénescences du pronéphros.

Afin de pouvoir caractériser la sénescence développementale et identifier les gènes et les voies importants pour ce type de sénescence, le transcriptome de deux conditions (présence et absence de sénescence) a été étudié. Concrètement, des axolotls (n=3) au stade où la sénescence a été démontrée comme étant la plus accentuée (stade 51) ont été fixés, et une section au niveau du pronéphros et de la queue a été coupée. L'ARN total de ces morceaux a été isolé et envoyé au séquençage en utilisant la version de transcriptome axolotl v3.0.0 comme référence.

Les résultats ont démontré 23 252 gènes, avec une variation d'expression dans les deux conditions. Ces gènes sont des gènes d'axolotl nommés à partir de la base de données de www.axolotl-omics.org. Comme les logiciels qui permettent l'analyse du séquençage d'ARN utilisent pour la plupart les gènes de souris ou d'humain et qu'aucun logiciel de conversion n'existe pour les gènes de l'axolotl, le nom de chacun des gènes a d'abord été manuellement converti à son équivalent chez l'humain. Par la suite, un total de 1 540 gènes avec un changement d'expression positif et une valeur de p ajustée avec la méthode de Benjamini-Hochberg supérieure à 0,05 ont été utilisés pour une analyse bio-informatique avec le système de classification « Protein **AN**alysis **TH**rough **E**volutionary **R**elationships » (Panther, version 15.0; <http://pantherdb.org/>) et la plateforme « Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery » (DAVID, version 6.8; <https://david.ncifcrf.gov/>).

Panther utilise les outils d'analyse d'enrichissement « Gene Ontology » (GO) afin de comparer les données soumises avec les termes GO (basé sur des preuves expérimentales publiées dans la littérature) et les classes en fonction de leur processus biologique, de leur fonction moléculaire et de leur compartiment cellulaire. Dans le cas des gènes significativement induits dans le pronéphros, selon le graphique des processus biologiques (Figure 6A), la plupart de ces gènes sont impliqués dans le processus cellulaire (268), plus spécifiquement dans les processus métaboliques (166), la régulation biologique (120), l'organisation des compartiments cellulaires (88), la localisation (79), la réponse à un stimulus (71) et le processus développemental (55). De

plus, ces gènes semblent surtout avoir des fonctions moléculaires de types catalytiques (178) et de liaison (150) (Figure 6B). Enfin, selon le graphique des compartiments cellulaires (Figure 6C), ces gènes se retrouvent surtout dans la membrane (152) et dans les organites (170), plus spécifiquement dans les vacuoles, le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et la mitochondrie (Annexe 2, Figure 15).

Pour sa part, DAVID utilise un algorithme pour mesurer la relation entre l'ensemble des données soumises et les termes d'annotations, en se basant sur le pourcentage de gènes présent dans l'ensemble des données soumises et impliqué dans une voie ou une annotation spécifique. Cette analyse ne prend en compte que l'expression du gène et non le niveau de son expression. Les résultats ont démontré que les gènes des cellules du pronéphros sont surtout regroupés dans la famille des protéines sécrétées (Valeur $p = 2.5E-19$), l'hémostasie cellulaire (Valeur $p = 5.9E-11$), la maladie de Huntington (Valeur $p = 3.3E-01$), la régulation négative de l'apoptose (Valeur $p = 8.9 E-02$), le contrôle de l'homéostasie redox (Valeur $p = 6.6E-04$), la réponse des protéines mal repliées médiée par ATF6 (Valeur $p = 04.4E-02$) et la voie de signalisation anti-inflammatoire de IL-10 (Valeur $p = 1.6E-01$) (Figure 6D).

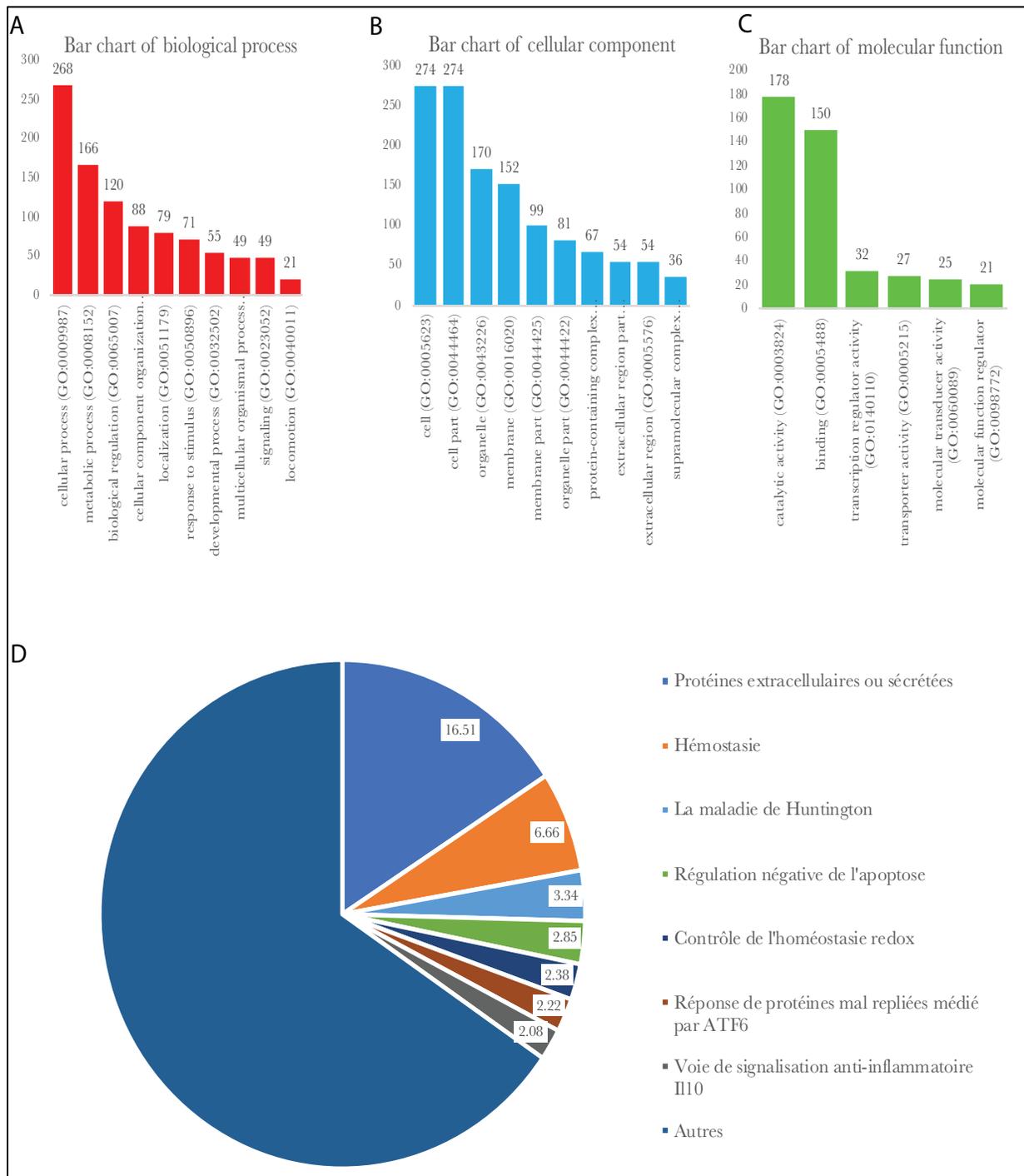


Figure 6- Analyse bio-informatique et classification des gènes significativement induits dans le pronéphros.

Les graphiques représentent **(A)** les processus biologiques, **(B)** les fonctions moléculaires et **(C)** la compartimentation cellulaire des gènes induits dans le pronéphros comparé à ceux de la queue, obtenus à partir de la base de données PANTHER. Le nom de chaque catégorie avec son identité GO est inscrit sur l'axe x et le nombre des gènes en y. Le nombre exact des gènes pour chaque catégorie est indiqué

en haut de chaque barre. **(D)** Les termes avec un score d'enrichissement >2 et une valeur de $p < 0,05$ représentent les gènes régulés à la hausse dans les cellules du pronéphros (sénescents) en comparaison avec ceux de la queue (non sénescents), obtenus à partir de la base de données DAVID. Le score d'enrichissement de chaque terme est indiqué sur le graphique.

Analyse « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) de la variation d'expression des gènes dans le pronéphros et la queue.

La variation d'expression de certains gènes peut avoir un impact majeur sur la régulation des voies et des fonctions cellulaires. Lorsque la variation d'expression est grande, le gène devient un gène clé pour le contrôle de cette voie et elle devient relativement facile à identifier. Par contre, bien que la variation d'expression de certains gènes ne soit pas énorme, son effet sur la régulation de la voie peut l'être. Ces gènes sont souvent sous-étudiés et sont caractérisés comme des gènes « secondaires » de la voie. La plateforme DAVID utilise des ensembles de gènes définis en provenance de Gene Ontology. Lorsqu'un gène connu pour une voie est induit, le logiciel déduit que cette voie est augmentée dans les données soumises. Au contraire, lorsqu'un gène inconnu pour cette voie est exprimé, il ne pourra pas identifier la voie. Ainsi, lorsqu'il est question d'une nouvelle étude dont les processus biologiques et les voies cellulaires sont inconnus, ce type d'analyse restreint l'information à ce qui est déjà connu. Le logiciel « Gene set enrichment analysis » (GSEA) contourne ce problème en utilisant des ensembles de gènes en provenance des « Molecular Signatures Database » (MSigDB). Les données soumises sont comparées avec la signature d'expression des ensembles de gènes en provenance des études précédentes. Ultiment, le logiciel propose les ensembles de gènes qui sont induits dans une condition et diminués dans l'autre.

Dans la présente étude, le logiciel GSEA a été utilisé pour comparer les données du transcriptome des cellules sénescents en provenance des pronéphros et des cellules non sénescents de la queue (Figure 7-8). Préalablement, l'équipe de Serrano avait démontré que le profil global d'expression génique de l'épithélium mésonéphrique sénescence de la souris en développement était différent des autres types de sénescence (répllicative, dommage à l'ADN et sénescence induite suite à un stress oncogénique). Pour confirmer ces résultats, les données du transcriptome du pronéphros et de la queue ont été comparées à l'ensemble de gènes sénescents

défini par Fridman et Tainsky (77 gènes). Effectivement, aucune similitude significative n'a pu être détectée entre la sénescence observée au cours du développement des pronéphros et les autres types de sénescences connues (Figure 7).

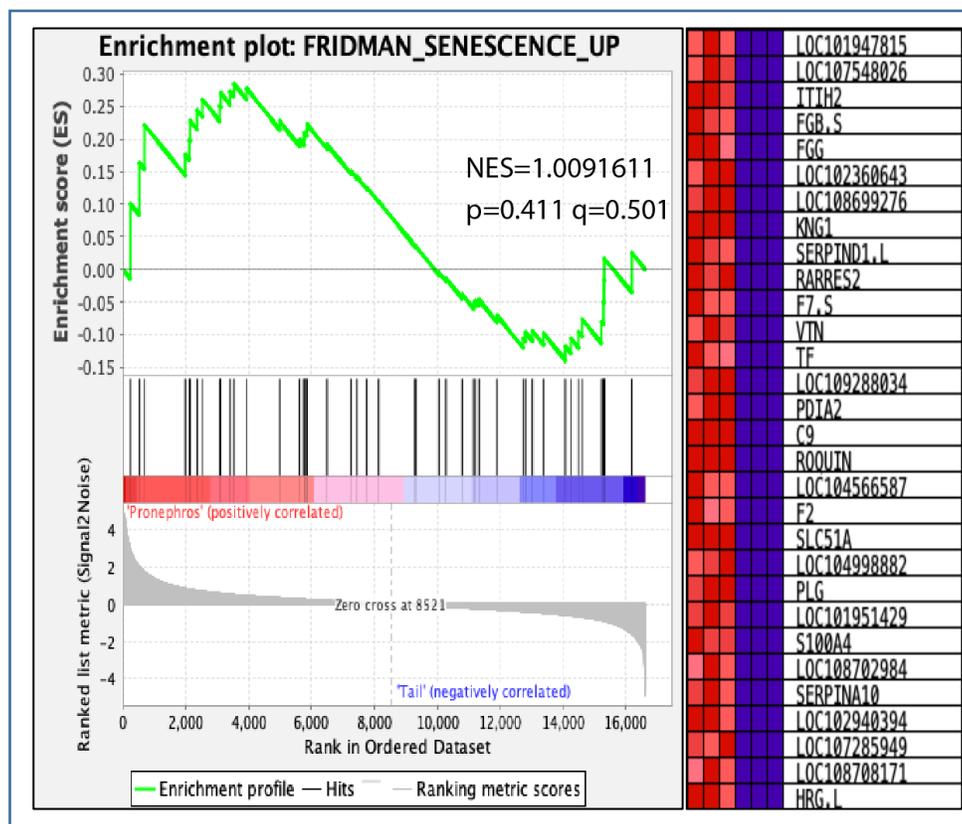


Figure 7- Analyse Fridman par « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) de gènes exprimés dans les cellules du pronéphros en comparaison avec les cellules de la queue.

Chaque barre verticale sur l'axe X représente un gène. Ces gènes sont soit enrichis dans le pronéphros (gauche) ou dans la queue (droite du graphique). Le graphique représente les scores d'enrichissement et les positions des gènes de l'ensemble, classés en rang. Les gènes ont été comparés à l'ensemble de gènes sénescents défini par Fridman et Tainsky. Le score d'enrichissement normalisé (NES), la valeur p et la valeur q sont indiqués sur le graphique.

Par la suite, le transcriptome des gènes exprimés dans le pronéphros avec ceux exprimés dans la queue a été comparé avec des ensembles de gènes qui représentent les différents états et processus biologiques connus chez l'humain (h. all. v7.2). Dans cette analyse, plusieurs ensembles de gènes ont été identifiés (Figure 8). Parmi ceux-ci, la voie TGF- β a été démontrée comme étant significativement élevée dans le pronéphros. Ce résultat concorde avec les analyses de Serrano,

qui a démontré un important rôle de TGF- β durant la sénescence développementale(238). De plus, tel que mentionné dans l'introduction, les cellules sénescents, malgré la perte de potentiel prolifératif, possèdent une activité métabolique très élevée et un taux remarquablement élevé du métabolisme du glucose par glycolyse(255). Cette induction soudaine, en partie responsable du dysfonctionnement de la mitochondrie, cause une altération bioénergétique et la régénération des espèces réactives de l'oxygène(256, 257). En accord avec cette affirmation, les deux voies, soit celle de la glycolyse et celle des espèces réactives de l'oxygène, sont significativement induites dans le pronéphros en comparaison avec la queue. Les trois autres ensembles de gènes significativement induits sont la signalisation par Ras, la voie IL-6/JAK/STAT3 et la réponse à un stress UV, trois voies indépendantes capables d'activer la sénescence (Figure 8).

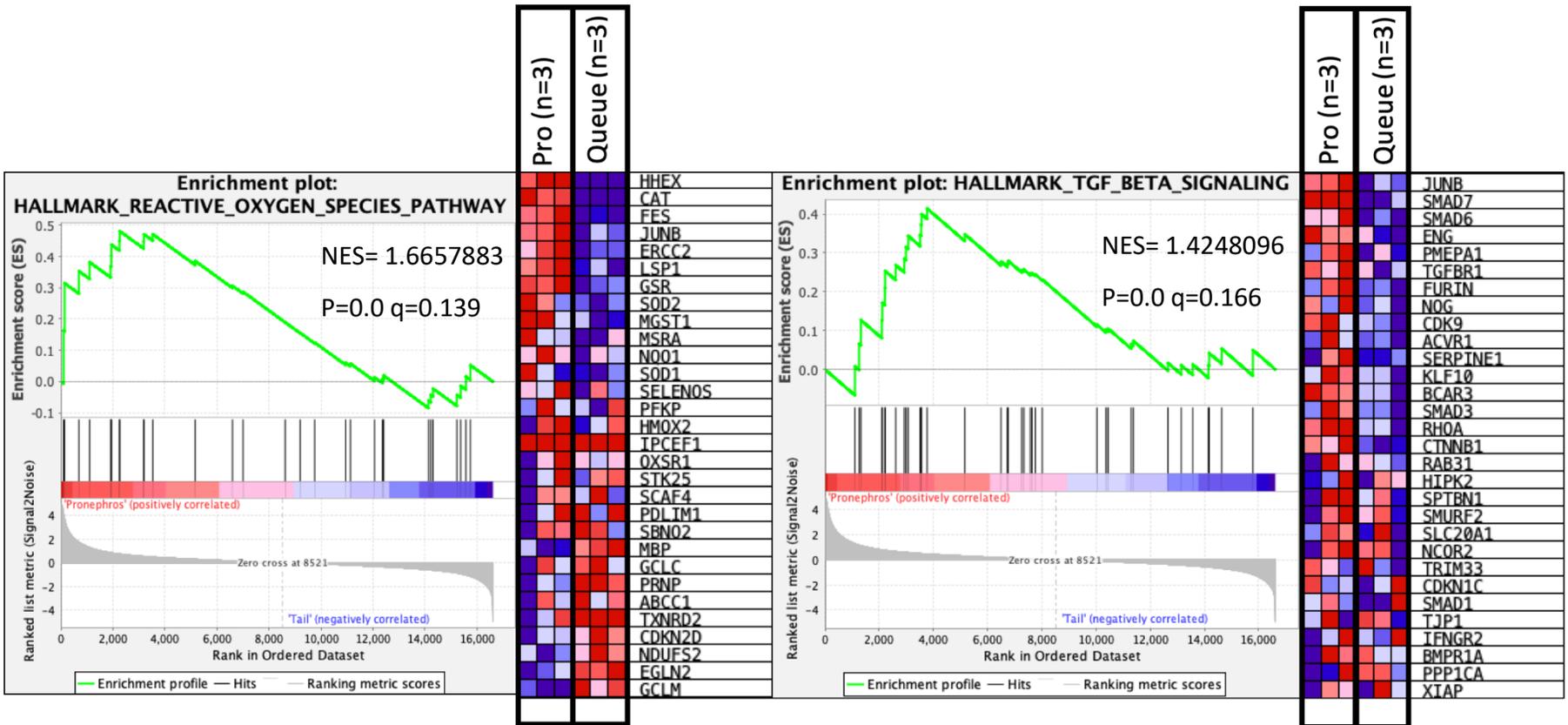


Figure 8 - Analyse « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) de gènes induits dans le pronephros (sénescents) en comparaison avec la queue (non-sénescents).

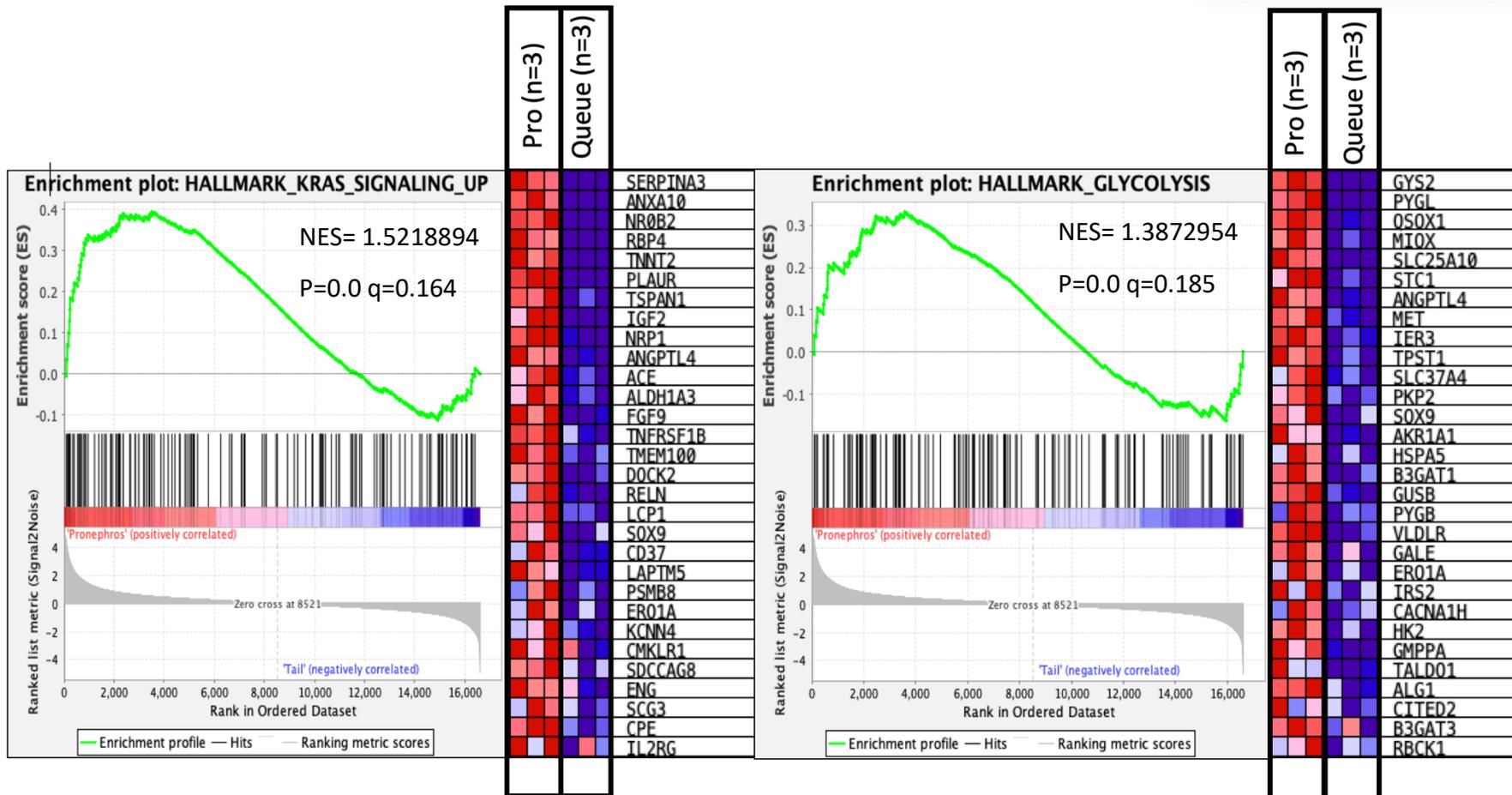


Figure 9- (suite1) - Analyse « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) de gènes induits dans le pronephros (sénescents) en comparaison avec la queue (non-sénescents).

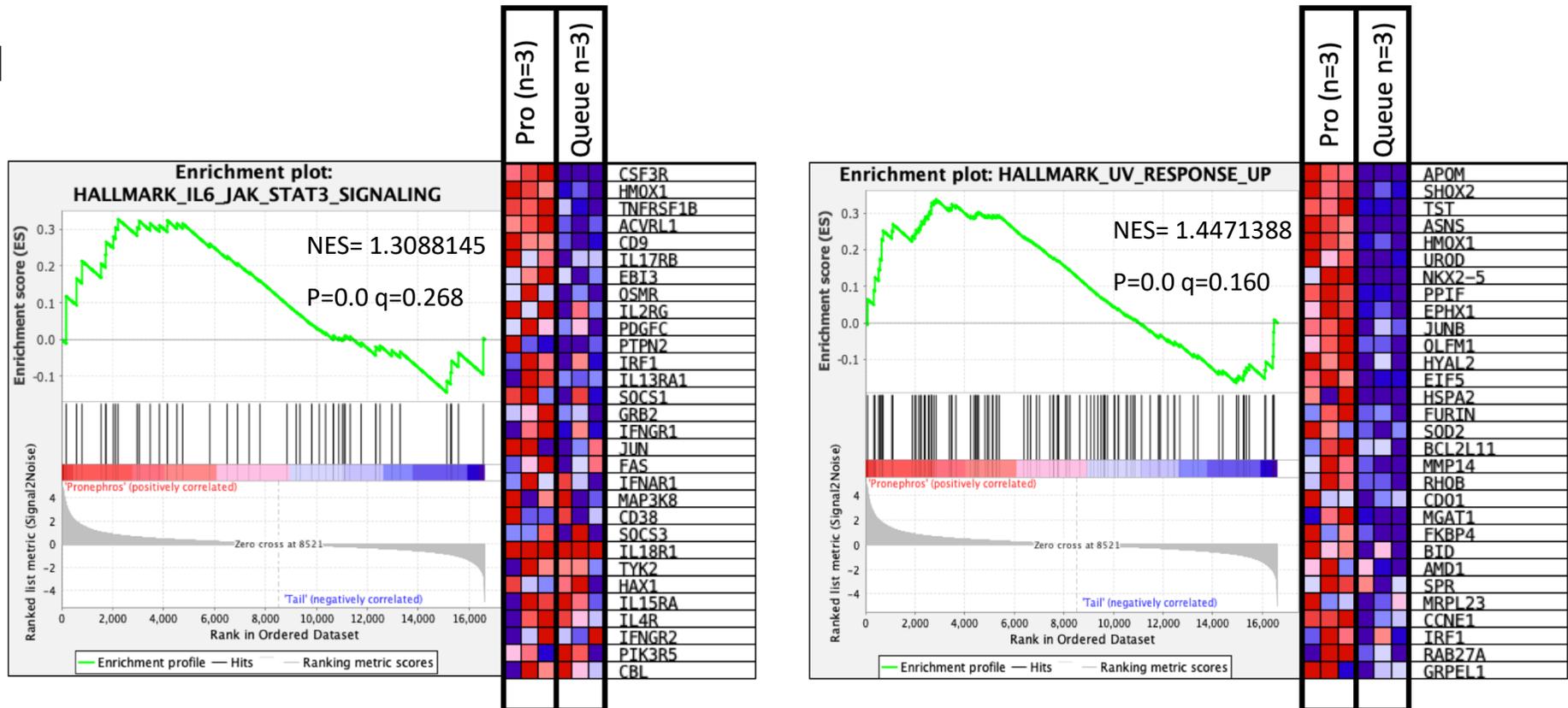


Figure 10- (suite 2) - Analyse « Gene Set Enrichment Analysis » (GSEA) de gènes induits dans le pronephros (sénescents) en comparaison avec la queue (non-sénescents).

Figure 8 (Suite 3)- Dans chaque panneau, le score d'enrichissement (ES) de l'ensemble de données est affiché sur l'axe des y. Sur l'axe des x, les barres verticales représentent un gène. Le gène est soit enrichi dans le pronéphros (gauche) ou dans la queue (droite). Le graphique représente les scores d'enrichissement et les positions des gènes de l'ensemble de gènes classés en rang. Le score d'enrichissement normalisé (NES), la valeur p et la valeur q sont indiqués sur le graphique. À droite de chaque graphique, le profil d'expression des 30 gènes les plus exprimés (rouge) dans le Pro (pronéphros sénéscent) ou dans la queue (non-sénéscente). Le nom MSigDB des ensembles de gènes est indiqué sur chaque graphique.

Identification des facteurs de transcription régulant la sénescence développementale

Afin d'identifier les facteurs de transcription qui pourraient réguler la variation d'expression des gènes observés dans le pronéphros, les plateformes « Identifying distant regulatory elements of co-expressed genes » (DiRE) (<https://dire.dcode.org/>) et « Enrichr » (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) ont été utilisées. L'analyse Enrichr a identifié 20 facteurs de transcription susceptibles de réguler les gènes induits dans le pronéphros (variation d'expression >1,3, valeur pAdj <0,05) comparé à la queue (Figure 9A). Sans surprise, parmi ces 20 facteurs, trois sont de la famille des protéines *forkhead box* (FOXO1, FOXA2 et FOXA1), des régulateurs de la voie TGF- β . Cela confirme le rôle important de la voie TGF- β dans la sénescence développementale. Deux membres de la famille des *Peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) sont également identifiés par cet algorithme. La famille des PPAR est impliquée dans plusieurs maladies telles que l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, l'infertilité et le cancer, et joue un rôle très important dans la régulation de la réponse inflammatoire(258). De façon intéressante, les deux membres qui sont exposés dans le résultat d'Enrichr, soit PPAR γ (ou PPAR γ) et PPAR α (PPAR α) sont uniques dans leur famille pour leurs activités anti-inflammatoires(258). Leurs inductions dans les pronéphros corrélaient avec les résultats antérieurs de notre laboratoire, qui démontraient que la sénescence développementale n'est pas liée à l'inflammation(240). De plus, la protéine PPAR γ peut également se lier sur les promoteurs de p16 et CEBP pour renforcer le caractère sénéscent(259).

Les facteurs de transcription clés de la sénescence, tels que B-Jun, CEBPE et GATA4, sont également identifiés par cet algorithme. La protéine B-Jun est un régulateur de p16 qui permet le maintien de l'état de sénescence et les protéines GATA4 et CEBP sont des régulateurs des SASP(114, 135, 260). La liste complète des facteurs de transcription triés en fonction de leur valeur p se retrouve dans l'annexe 2, tableau 1.

De la même façon, les gènes induits dans le pronéphros ont été introduits dans la base de données DiRE. Les résultats illustrés sont les 10 facteurs de transcription les plus susceptibles de réguler l'expression des gènes induits dans le pronéphros comparé à la queue (Figure 9B). Le premier de la liste est *Hepatocyte Nuclear Factor 4* (HNF4), un facteur de transcription très conservé de la famille des récepteurs nucléaires. Ce facteur de transcription est très étudié pour son rôle dans

le métabolisme et le cancer. Très récemment, HNF4 a été caractérisé comme un suppresseur de tumeur dans le cancer de la prostate, par son rôle dans la transactivation de p21 et la sénescence(261). Ainsi, l'induction de HNF4 dans les pronéphros concorde avec l'importance de la p21 durant la sénescence développementale, qui a précédemment été confirmée par les chercheurs Serrano et Keyes. D'autres facteurs de transcription, tels que TAL1, TAL1ALPHA4, MYOGNF1, LMO2COM et IPF1 ont été identifiés par cet algorithme (Figure 9B). Ces facteurs de transcription sont impliqués dans le développement embryonnaire. Bien qu'ils ne soient pas directement reliés à la sénescence, ils jouent un rôle important dans la différenciation de la cellule(262-265). Un phénomène qui, comme la sénescence, implique la reprogrammation du cycle cellulaire. De plus, tout comme pour l'analyse d'Enrichr, les différents GATA et le facteur de transcription CEBPB, impliqué dans la transcription des gènes liés à la sénescence, semblent également être responsables des gènes induits dans le pronéphros en développement. Similairement à l'analyse Enrichr, le régulateur de TGF- β , FOXA1 (également connu sous le nom HNF3ALPHA), a été identifié comme un facteur de transcription important pour la régulation des gènes induits dans le pronéphros. La liste complète des facteurs de transcription identifiés par la plateforme DiRE se retrouve en annexe 2, tableau 2.

Finalement, les facteurs de transcription identifiés par les deux algorithmes (Enrich et DiRE) soit GATA1, PAX6, HNF4A, CEBPB, PPARG, FOXA1 et GATA2 ont été ciblés comme les facteurs clés de notre expérience. Une analyse STRING a été effectuée sur ces facteurs de transcription, afin de déterminer s'il pourrait potentiellement y avoir une interaction protéine-protéine entre eux (Figure 9C). Les résultats ont démontré que chacune de ces protéines pourrait interagir avec au

moins deux autres protéines de la liste. Les interactions les plus importantes sont celles des protéines CEBPB avec PPARG et de GATA1 avec GATA2 (Figure 9C).

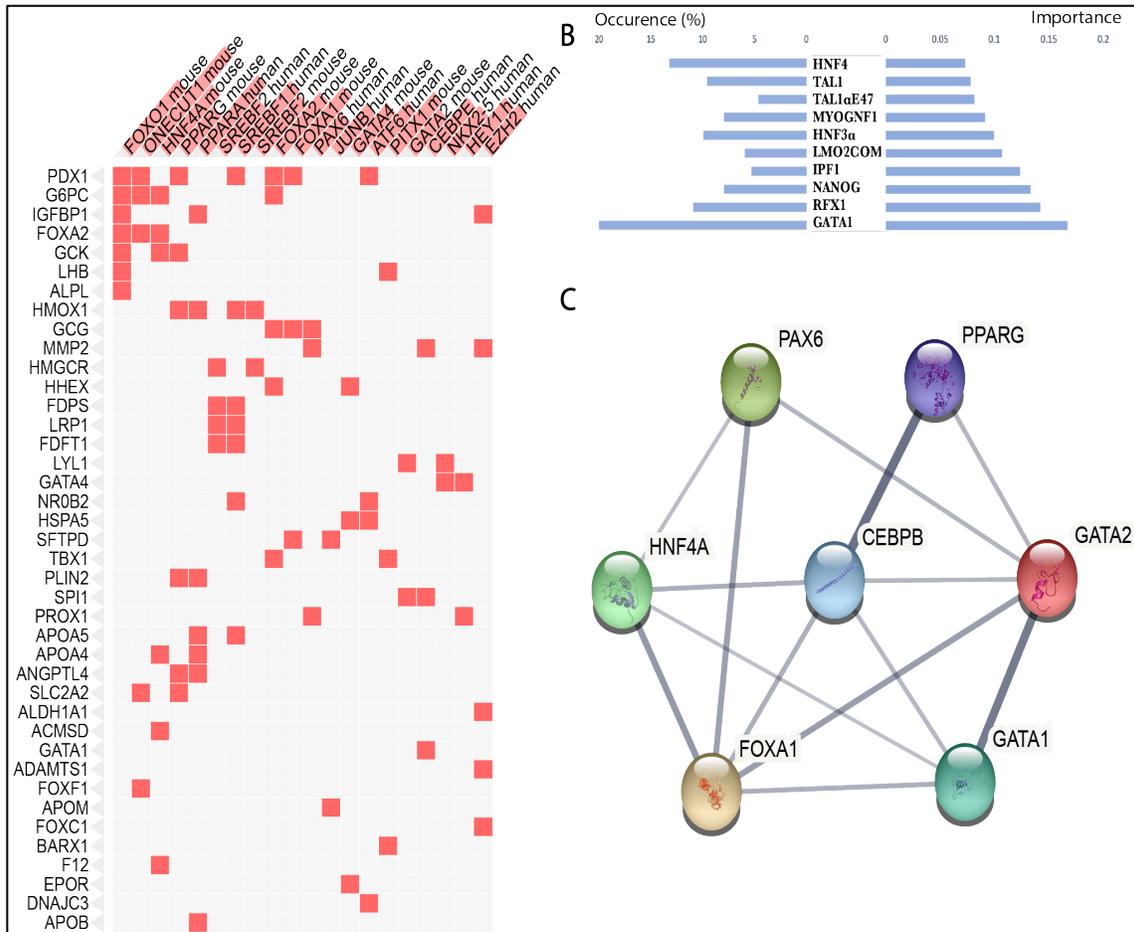


Figure 11- Identification des facteurs de transcription susceptibles d'être augmentés dans le pronéphros.

(A) Analyse EnrichR des gènes avec une variation d'expression significative ($>1,3$) et une valeur de p ajustée ($<0,05$), obtenues à partir du RNA-seq. Les 20 facteurs de transcription les plus significatifs sont représentés sur l'axe des x et les gènes soumis sur l'axe Y. Le profil d'expression représente les associations entre les gènes soumis et les facteurs de transcription. Les facteurs de transcription dans les colonnes de la matrice sont classés en fonction de leur valeur p . **(B)** Les facteurs de transcription associés au transcriptome des cellules du pronéphros obtenu à partir de l'algorithme DIRE. Le pourcentage de gènes cibles à partir de la liste soumise est indiqué à gauche de chaque facteur de transcription (occurrence). L'importance (droite) indique le produit de l'occurrence du facteur de transcription avec son poids dans la base de données. **(C)** L'outil STRING a été utilisé pour obtenir l'interaction protéine-protéine des facteurs de transcription identifiés par EnrichrR et DiRE. Le réseau contient 7 nœuds (protéines), 14 lignes (interactions), un score de confiance de $>0,400$ et une valeur p de $9,62 \times 10^{-11}$.

Identification des gènes connus pour avoir un rôle dans les autres types de sénescence.

Pour continuer, une analyse spécifique à la sénescence cellulaire a été effectuée sur les résultats de RNA-seq dans le but de retirer le maximum d'information sur la sénescence activée dans les pronéphros en développement. Pour ce faire, les données de RNA-seq ont été comparées aux données de « CellAge » (Version Build 20; <https://genomics.senescence.info/>), une base de données des gènes associés à la sénescence. Les résultats ont été triés en fonction des types cellulaires étudiés pour les cellules du rein embryonnaires et les cellules cancéreuses. Ensuite, chacun de ces gènes a été comparé aux données d'expression du séquençage et trié en fonction de sa signifiante. Les résultats ont démontré 20 gènes avec une expression significativement induits dans le pronéphros, en comparaison avec la queue (Figure 10A). La séquence de ces gènes a été blastée dans le génome de l'axolotl pour confirmer l'homologie. Par la suite, leur expression dans les pronéphros et dans la queue a été confirmée en qPCR. Pour confirmer le rôle de ces gènes dans la sénescence, une double confirmation a été effectuée en évaluant leur expression dans les fascicules olfactifs, un deuxième site qui exprime de la sénescence durant le développement embryonnaire de l'axolotl (stade 51). Les fascicules olfactifs n'ont pas été pris en compte dans les résultats de RNA-seq. Ainsi, si l'expression d'un gène est induite dans les pronéphros et les fascicules olfactifs par rapport à la queue, ce gène devient plus important à l'étude. D'abord, des amorces pour les dix premiers gènes (PEBP1, CKB, MVK, IGFBP1, SOX2, HSPA5, PROX1, LATS1, FOXM1 et CEBPB) ont été synthétisées. Parmi ces dix, six d'entre elles ont été montrées efficaces (PEBP1, MVK, IGFBP1, FOXM1, LATS1 et SOX2). Par la suite, une RT-qPCR pour ces gènes a été réalisée dans les fascicules olfactifs, les pronéphros et la queue de l'axolotl au stade 51. Parmi ces six gènes, PEBP1 et MVK sont les seuls dont l'expression est significativement augmentée tant dans le pronéphros que dans les fascicules olfactifs (Figure 10 B, C). Les autres gènes, FOXM1, SOX2 et LATS1, sont uniquement augmentés dans l'un des deux organes (Figure 10 E-G). Quant à IGFBP1, son expression dans les fascicules olfactifs est similaire à la queue et augmentée de façon non significative dans les pronéphros (Figure 10 D). En somme, cette analyse a permis de cibler deux gènes qui semblent être très importants dans la sénescence développementale, soit PEBP1 et MVK. La protéine « Creatine Kinase B » (CKB) est un enzyme cytoplasmique impliqué dans l'homéostasie énergétique. Les facteurs de transcription pouvant

se lier au promoteur de CKB sont AP-2, Max1, SRY, USF-1 et USF-2. Quant à la protéine « Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 » (PEBP1), également connue sous le nom de « Raf kinase inhibitor » (RKIP), elle est un inhibiteur de l'activité kinase de Raf-1. Elle agit non seulement au niveau de son activation, mais cause aussi la dissociation du complexe Raf-1/MEK en agissant comme un inhibiteur compétitif de la phosphorylation de MEK. Un des facteurs de transcription pouvant se lier au promoteur de PEBP1 est PPAR-gamma1 (PPARG), identifié comme étant un facteur de transcription susceptible d'être induit dans le pronéphros par les logiciels EnrichR et DiRE (Figure 9 A et B). Ensemble, ces résultats semblent suggérer l'important rôle du gène PEBP1 dans la sénescence développementale.

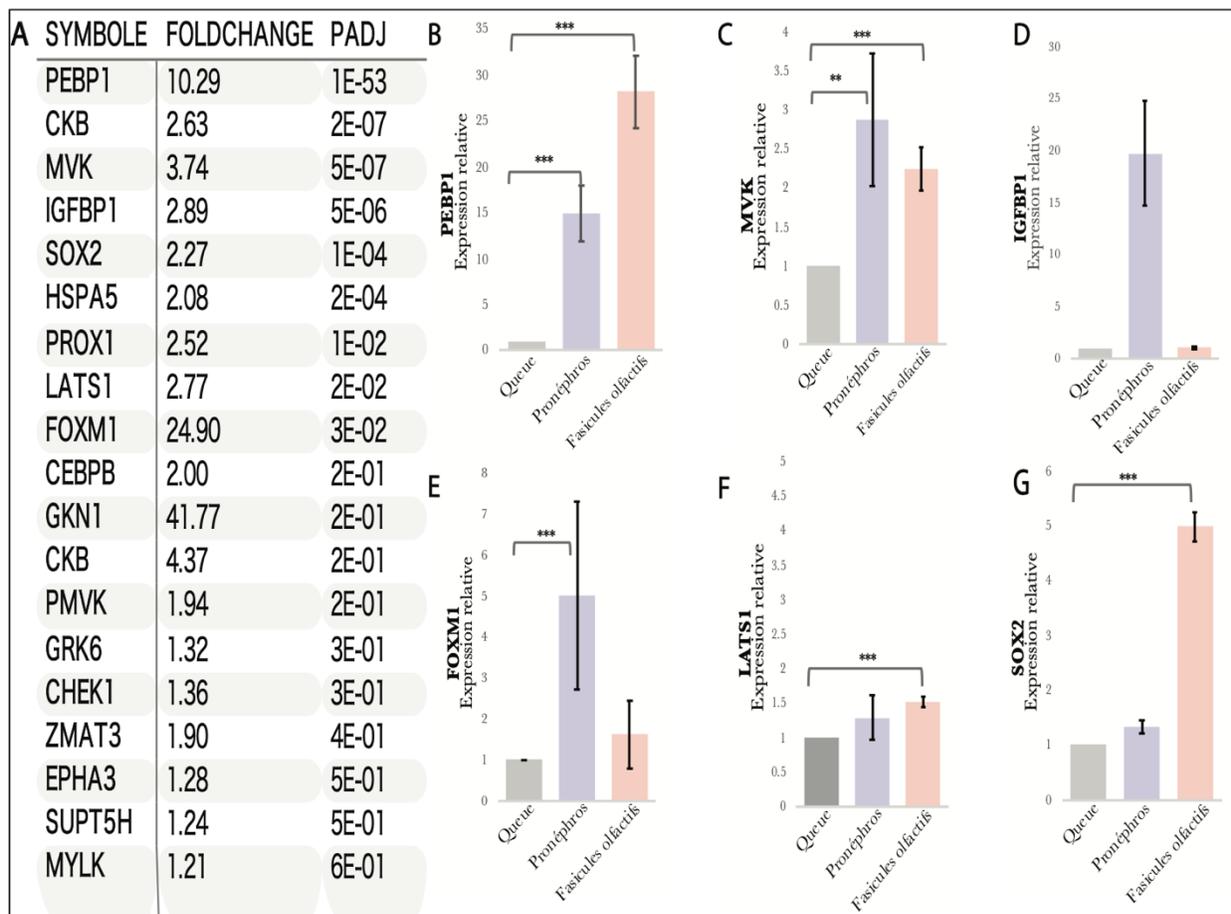


Figure 13- Identification des gènes connus dans la sénescence.

(A) Les gènes en commun du séquençage d'ARN et de la base des données CellAge. Les résultats ont été triés en fonction du type cellulaire pour les cellules cancéreuses et les cellules embryonnaires du rein. Le « FoldChange » représente la variation de l'expression du gène dans le pronéphros et la queue. PADJ représente la valeur de P ajustée avec la méthode de Benjamini-Hochberg, **(B-G)**

RT-qPCR des différents gènes du tableau en A dans la queue (barres grises), les pronéphros (barres mauves) et les fascicules olfactifs (barres roses). L'expression des gènes a été mesurée et relativisée sur la queue pour (B) PEBP1, (C) MVK, (D) IGFBP1, (E) FOXM1, (F) LATS1 et (G) SOX2. L'expression des gènes a été effectuée en utilisant GAPDH et α -ACTINE comme contrôle de chargement. Un test de Student bilatéral a été effectué pour comparer la queue avec le pronéphros.***
 $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. $N \geq 3$

Caractérisation spatiale de PEBP1 dans les fascicules olfactifs, les pronéphros et la queue

Des coupes transversales dans la zone rostrale (bouche/fosse nasale) et la zone troncal de l'axolotl au stade 50 et marquées au Sa β G avaient précédemment été obtenues par le technicien du laboratoire, Éric Villard (Figure 11 A, E). Les résultats ont démontré une expression spécifique de bêta-galactosidase liée à la sénescence dans les fascicules olfactifs et au point d'éclatement des dents (Figure 11 A) et dans certains tubules pronéphriques (E). Villiard et al avait également détecté les cellules en prolifération par un marquage au Bromodeoxyuridine (BrdU) dans ces tissus (Figure 11 B, F). Certes, les cellules en sénescence (Sa β G positive) n'incorporaient pas de BrdU (Figure 11 B, F), mais les cellules du côté externe des fascicules olfactifs incorporaient le BrdU (Figure 11 B). À partir de ces résultats, ceux de l'analyse de RNA-seq et de qPCR, je me suis intéressé à caractériser le patron d'expression de PEBP1 par la technique d'hybridation *in situ* sur des coupes transversales rostrale et troncal de l'axolotl au même stade. Les résultats ont démontré une expression du gène non seulement dans les fascicules olfactifs et les pronéphros (tel que j'avais déduit avec les analyses de RNA-seq et qPCR), mais aussi au point d'éclatement des dents (Figure 11 D, H, D', D'', H', H''). Ces résultats très surprenants ont confirmé que le gène PEBP1 a une forte probabilité d'avoir un rôle à jouer dans la sénescence développementale, puisque sur les trois sites qui expriment Sa β G, tous les trois expriment également de façon spécifique l'ARN messager de PEBP1. Au niveau des fascicules olfactifs, l'expression de PEBP1 ne semble pas chevaucher Sa β G. En effet, l'ARN messager de PEBP1 est répandu du côté externe des bulbes olfactifs, tandis que la sénescence est plutôt exprimée du côté des fosses nasales. Cette observation n'a pas pu être effectuée au niveau des pronéphros vu la forme tubulaire de ceux-ci. Chose certaine, le niveau de son expression n'est pas égal dans tous les tubules (Figure 11 H', H'').

Sachant qu'une des fonctions de PEBP1 est d'inhiber l'activité kinase de Raf-1, protéine impliquée dans la voie MAPK/ERK, je me suis intéressée à savoir si la voie MAPK/ERK est effectivement inhibée dans les sites PEBP1 positifs. Pour ce faire, une immunohistochimie pour la protéine phosphorylée de ERK1/2 (pERK1/2) a été réalisée sur les coupes de tissus de crâne et de tronc (Figure 11 C, G). Au niveau de la coupe rostrale, pERK1/2 était strictement exprimée dans les fascicules olfactifs à l'extrémité des fosses nasales (opposé de PEBP1) (Figure 11 C). Du côté de la coupe troncal, pERK1/2 était strictement exprimée au niveau des pronéphros. Similairement à l'expression de PEBP1, la voie MAPK/ERK n'était pas activée pour tous les tubules pronéphriques; certains étaient négatifs pour pERK1/2 (Figure 11 G). Ces données, combinées aux données de l'expression de l'ARN messager de PEBP1, laissent croire que ERK1/2 et PEBP1 sont exprimées de façon spatio-temporelle. Autrement dit, PEBP1 pourrait inhiber l'expression de ERK à un moment spécifique du développement de l'organe, soit juste avant l'activation de la sénescence.

Stade 51

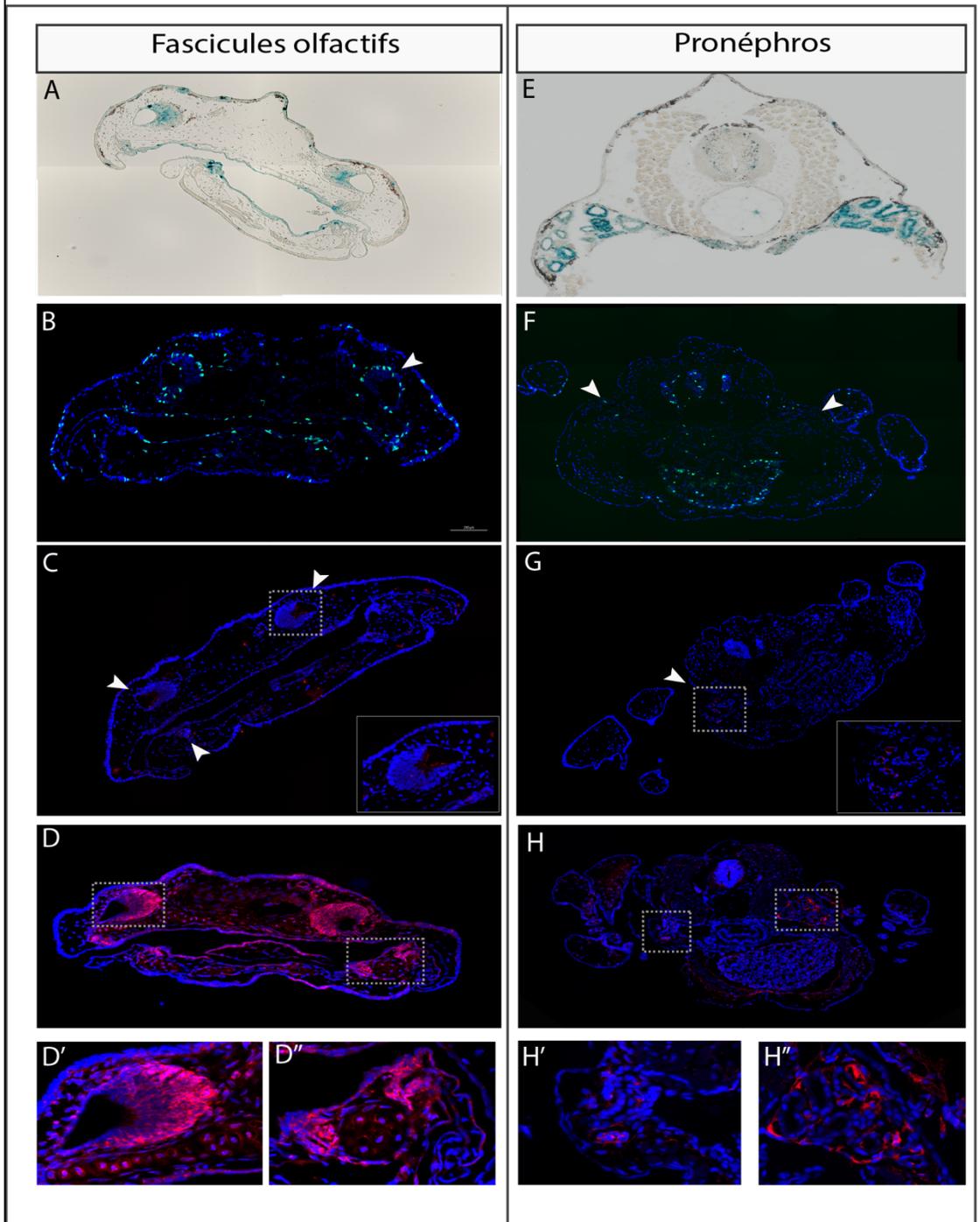


Figure 14- L'expression des différents marqueurs dans la zone rostrale (bouche/fosse nasale) et la zone troncale de l'axolotl au stade embryonnaire 51.

(A, E) Coloration Sa β G (bleu) sur des coupes transversales rostrale (A) et troncale (E). (B, F) Coloration BrdU (vert) et DAPI (bleu) sur les coupes transversales rostrale (B) et troncale (F). (C, G) Coloration phospho-Erk1/2 (rouge) et DAPI (bleu) et sur des coupes transversales rostrale (C) et troncale (G). (D, H) Expression de la sonde PEBP1

(rouge) et coloration DAPPI (bleu) des coupes transversales rostrale (D) et troncale (H). **(D')** Agrandissement des fascicules nerveux olfactifs du panneau D. **(D'')** Agrandissement d'une dent du panneau D. **(H')** Agrandissement du pronéphros gauche du panneau H. **(H'')** Agrandissement du pronéphros droit du panneau H.

Effet des drogues Locostatin et SCH772984 sur le développement des pronéphros

Suite à cette étude, une approche pharmaceutique a été utilisée pour confirmer l'importance de la voie MAPK/ERK dans la sénescence développementale. Pour ce faire, la Locostatin a été utilisée pour inhiber l'interaction de PEBP1 avec Raf-1 kinase et SCH772984 a été utilisée pour inhiber l'activité la protéine ERK1/2 de façon spécifique. Le but de cette expérience était de déterminer l'effet de ces drogues sur l'activation de la sénescence et le développement du pronéphros. Étant donné que ces drogues n'avaient jamais été testées sur des embryons d'axolotls, des expériences avec plusieurs concentrations de Locostatin et de SCH772984 ont été réalisées afin de déterminer la toxicité des drogues. Au stade 40, les concentrations de Locostatin plus élevées que 50 μM étaient létales après 24 heures. À 10 et 25 μM , les animaux grandissaient au même rythme que les non-traités et n'avaient aucun symptôme de malaise. Parallèlement, les mêmes expériences ont été effectuées avec des concentrations de 1 μM et 5 μM de SCH772984. Dans les deux cas, les animaux se développaient naturellement et ne semblaient pas ressentir de malaise quelconque.

Par la suite, les animaux au stade 40 (début de la sénescence dans les pronéphros) ont été traités avec la Locostatin 10 μM et 25 μM et la SCH772984 à 1 et 5 μM . Tel qu'illustré sur la figure 12, il est possible de voir une diminution importante de l'activité de la Sa β G lorsque les animaux sont traités avec la Locostatin (10 μM et 25 μM) (Figure 12 A et B). De plus, selon le graphique de l'activité Sa β G en fonction des drogues, l'effet de la Locostatin 25 μM est plus important que la Locostatin 10 μM . En ce qui concerne l'inhibiteur de ERK 1/2, les animaux traités avec 1 μM de SCH772984 ont une activité de Sa β G plus élevée que les contrôles. À 5 μM , l'intensité de la Sa β G, mesurée avec l'outil d'apprentissage pour la classification des pixels Trainable Weka Segmentation, a montré une diminution de 0,7 fois en comparaison au contrôle DMSO. Ces

résultats, bien que primaires et non significatifs en raison du n trop bas, suggèrent quand même une tendance.

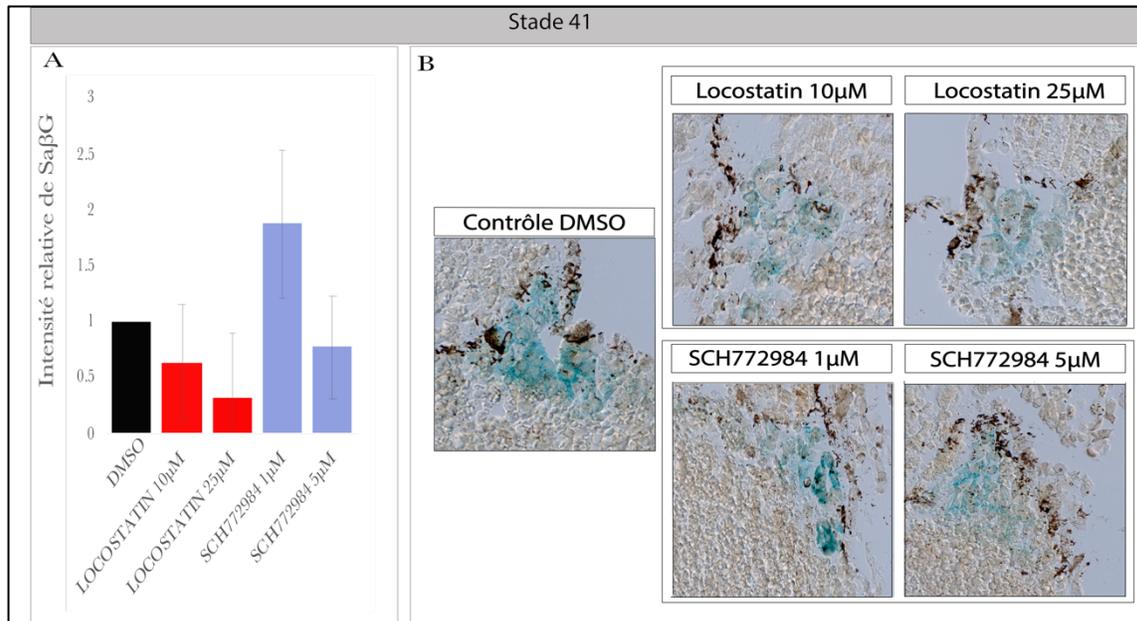


Figure 15- Effet des drogues Locostatin et SCH772984 sur l'intensité de SaβG.

(A) L'intensité de SaβG a été mesurée avec le « Classifier WEKA segmentation » du logiciel de traitement d'image FIJI pour chaque traitement. Les valeurs représentent la moyenne des valeurs obtenues pour les trois animaux testés. **(B)** Images représentatives des pronéphros d'axolotls au stade 51 marqué au SaβG suite aux différents traitements. Le nom et la concentration de chaque traitement sont inscrits sur le panneau. N=3

6 Discussion

Au début de sa découverte, la sénescence cellulaire était majoritairement étudiée dans le contexte du vieillissement. Les chercheurs s'étaient intéressés à trouver un moyen de contourner l'activation de la sénescence causée par le raccourcissement des télomères dans le but d'augmenter la durée de vie des organismes et de prévenir contre toutes les maladies liées au vieillissement, allant du cancer jusqu'aux troubles neurodégénératifs(200, 266, 267). Quelques années plus tard, des expériences effectuées au laboratoire ont confirmé que la sénescence pouvait également être activée suite à un stress cellulaire, y compris un stress oxydatif (H_2O_2), un dommage lié à l'ADN, l'expression d'un oncogène ou un dysfonctionnement mitochondrial. De plus, il a été démontré que la sénescence pouvait également être activée pour contrôler la prolifération cellulaire dans la guérison de la plaie et la régénération des membres chez les organismes qui possèdent le pouvoir de régénérer. Récemment, la découverte de la sénescence durant le développement embryonnaire de la souris et de l'axolotl a permis de confirmer que l'activation de la sénescence n'est pas liée à un stress ni au vieillissement. La sénescence est plutôt un processus cellulaire naturel, qui peut être activé de façon programmée ou non, et qui cause l'arrêt irréversible du cycle cellulaire. Les cellules sénescents, bien qu'elles ne se divisent plus, ne sont pas mortes puisqu'elles restent métaboliquement actives. Alors pourquoi la cellule décide-t-elle d'arrêter de répliquer, mais continue à réaliser l'ensemble des réactions chimiques qui lui permettent de répondre à un stimulus de son environnement ? En effet, le but ultime d'une cellule à entrer dans une phase de sénescence est de communiquer avec ses cellules avoisinantes, et ce, par la synthèse des protéines SASP et la sécrétion de celles-ci dans son environnement. Les cellules avoisinantes reçoivent le signal et répondent en conséquence. Dans le cas de la sénescence développementale, la sénescence est activée uniquement dans certains organes de l'organisme. Chez l'axolotl, ce processus est activé exclusivement au niveau des fascicules olfactifs qui contiennent des fibres nerveuses sensorielles liées à l'odorat, du pronéphros (premier stade du développement embryonnaire du rein) et au niveau des points d'éclatement des dents (sur la gencive)(240). Chez la souris, les sites en question sont la crête ectodermique apicale (AER), la

plaque de toit du cerveau postérieur, le mésonéphros (stade intermédiaire du développement embryonnaire du rein) et le sac endolymphatique(239). Dans le cas du poisson zébré, la sénescence est activée dans le sac vitellin (une structure transitoire qui permet à l'animal en développement de se nourrir jusqu'au début de son alimentation exogène) et l'intestin(240). Le point commun entre ces organes qui ont recours à la sénescence est que toutes ces structures nécessitent un changement morphologique au cours du développement. Logiquement, comme ces organes ont une fonction cruciale pour la survie de l'organisme, la transition morphologique devrait se faire graduellement pour ne pas perdre la fonction de l'organe; ce qui nous laisse à penser que la sénescence activée durant le développement a pour but d'assurer le changement structural des organes tout en les gardant fonctionnels. Concrètement, lorsqu'une cellule entre en phase de sénescence, elle active la synthèse des protéines qui compose les SASP. En fonction du message que la cellule veut donner, elle peut soit sécréter des facteurs de croissance (pour induire la prolifération cellulaire), soit d'autres éléments qui permettent l'entrée en phase de sénescence. Ces cellules nouvellement sénescents vont faire de même et sécréter d'autres molécules pour leurs propres cellules avoisinantes, et ainsi de suite. À la toute fin du processus, une réorganisation du tissu peut être observée. La beauté de ce processus est que lorsque les cellules sénescents ont transmis leur message et n'ont plus de fonction, elles sécrètent elles-mêmes des molécules pour attirer les macrophages et être phagocytées.

Bien que l'image globale du processus soit facile à comprendre, la base moléculaire de celui-ci l'est moins. En effet, dépendamment du type de stress utilisé pour induire la sénescence et de la lignée cellulaire utilisée, les voies et les protéines responsables à l'activation de celle-ci sont différentes. Pourtant, une fois activé, le comportement de la cellule (soit celui de la sortie du cycle cellulaire en G1, la sécrétion des SASP et leur élimination par les macrophages) reste le même. Ce qui démontre que malgré les différences génétiques entre les différents types de sénescence, les voies responsables de l'activation convergent vers un même phénomène.

Dans la présente étude, nous avons tenté de caractériser la sénescence développementale et avons réussi à mettre le doigt sur un processus très spécifique, soit l'inhibition de la voie MAPK/ERK par un inhibiteur puissant de Raf-1, PEBP1, dans les cellules à proximité des cellules sénescents.

Notre première tentative pour caractériser la sénescence développementale s'est arrêtée à l'analyse du transcriptome par des méthodes bio-informatiques. Les résultats ont démontré une induction des processus métaboliques, des protéines ligands et des protéines résidentes dans les vacuoles, le noyau et le réticulum endoplasmique. Ces résultats supportent l'activité métabolique connue des cellules sénescents. En effet, autant que les réactions de catabolismes (dégradation des macromolécules telles que le glucose et la production de l'ATP), les réactions anabolismes (production des macromolécules comme les protéines, lipides, acides nucléiques et glucides) sont importantes chez les cellules sénescents(268). Les réactions cataboliques permettent la régénération des ROS qui agissent en tant que messenger au noyau et les réactions anaboliques augmentent la synthèse d'ARN (dans le noyau), de protéines et de lipides (dans le réticulum endoplasmique) de la cellule. Des macromolécules qui sont ensuite entreposées dans des vacuoles et sont prêtes à être sécrétées (protéines) (268). D'où l'importance des trois composantes cellulaires : vacuoles, le noyau et le réticulum endoplasmique.

Par la suite, l'analyse DAVID a déterminé que la plupart des gènes induits dans le pronéphros sénescents sont catégorisés comme des protéines sécrétées. Ce qui est normal étant donné que le rôle principal des cellules sénescents est d'influencer le comportement des cellules avoisinantes par la sécrétion des facteurs sécrétoires : les SASP (114). Au deuxième rang se trouve l'ensemble des termes qui implique l'hémostase cellulaire, un processus qui bloque les saignements excessifs qui surviennent suite à une blessure. Dans la sénescence, l'hémostase est connue pour être activée par les SASP. L'étude bio-informatique des SASP a démontré que 5 des 25 voies biologiques induites dans les SASP sont impliquées dans l'hémostase cellulaire, la formation des caillots sanguins et la dissolution de caillots(269). Ces données mises ensemble avec les expériences d'induction de la sénescence par la chimiothérapie ont démontré une induction de la coagulation sanguine dans les cellules sénescents qui était due à une fonction plaquettaire modifiée(269). Dans le cas de notre étude, il n'est pas certain que l'induction de l'hémostase dans le pronéphros des axolotls en développement est due à la sénescence, ou si ce sont plutôt des traces d'un morceau de la rate, un organe situé à proximité des pronéphros et qui est responsable de l'entreposage des plaquettes sanguines, qui sont apparues dans nos données. D'autres analyses sont donc nécessaires pour confirmer ces résultats.

En troisième place, avec une petite différence entre leurs scores d'enrichissement, se trouvent en ordre d'importance l'ensemble des termes impliquant l'activation du complément, la maladie de Huntington et la régulation négative de l'apoptose. L'activation du complément fait référence à un ensemble de protéines qui jouent un rôle important dans l'immunité innée. Plus spécifiquement, elles permettent à l'hôte de se défendre contre plusieurs types de pathogènes et participent à l'élimination des cellules lorsque nécessaire. Son induction dans nos données de séquençage peut avoir un lien avec leurs sécrétions pour permettre l'attraction des cellules du système immunitaire lorsque les cellules sénescents doivent être éliminées. Par contre, étant donné que les analyses sont faites sur des animaux vivants en développement, il se peut également que les protéines du complément soient activées de façon indépendante à la sénescence cellulaire et que ce soit simplement un processus qui survient de façon naturelle dans le développement des animaux. Des études plus poussées sur les types de molécules sécrétées par les cellules sénescents en développement doivent être effectuées afin de confirmer le rôle des protéines du complément dans la sénescence.

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative qui implique l'expansion de la séquence CAG, qui code pour l'acide aminé de la glutamine, dans le gène *Huntingtin* (HTT)(270). La protéine modifiée de ce gène, la Huntingtin, est accumulée dans le neurone et, par un processus inconnu, cause la dégénération du neurone en question. Une étude génomique des cellules du striatum sur des souris *Knock-In* de Huntingtin a démontré que la protéine Huntingtin peut causer la diminution de l'expression des kinases activées en présence de stress et ainsi changer la dynamique de l'expression des gènes(270). Dans cette altération génomique, une induction de l'expression de la protéine p16, une reprogrammation des gènes cibles des facteurs de transcription FOXO et d'autres marqueurs de la sénescence ont pu être détectés(270, 271). Cette étude est parmi plusieurs autres études qui ont démontré l'implication de la sénescence dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives(270, 272). Le fait que cette voie fasse partie des termes qui représentent les gènes induits dans le pronéphros suggère que, malgré le fait que l'expression de p16 n'ait pas été détectée dans la sénescence développementale, une similarité pourrait être observée dans la sénescence développementale et la sénescence activée dans la maladie de Huntington.

La régulation négative de l'apoptose est une caractéristique majeure des cellules sénescents(273, 274). En effet, après son rôle important dans l'inhibition du cycle cellulaire, le deuxième rôle de la protéine p21 dans l'activation de la sénescence est de bloquer l'apoptose cellulaire p21 en bloquant l'activation des molécules proapoptotiques telles que la procaspase-3, la caspase-8 (165, 166, 275). Dans l'étude de la sénescence développementale, l'équipe de Serrano a démontré l'absence de l'apoptose par manque d'expression de la forme active de caspase 3 (C3A) dans les tubules mésonéphrique sénescents en voie d'élimination(238). Ils ont démontré que chez les souris sauvages, les cellules sénescents ne sont pas éliminées par apoptose, mais bien phagocytées par les macrophages résidents(238). Par contre, chez les souris dont la sénescence a été bloquée par un *Knock-out* de p21, les cellules qui devaient normalement être éliminées par sénescence ont commencé à exprimer C3A un jour plus tard que lorsqu'elles sont normalement éliminées par sénescence(238). Ceci dit, malgré le fait que l'apoptose soit inhibée par la sénescence, elle reste la voie compensatoire qui permet l'élimination des cellules en son absence. En se basant sur cette théorie, l'induction des voies qui mènent à la régulation négative de l'apoptose dans les cellules du pronéphros de l'axolotl en développement est logique.

Les autres termes identifiés par DAVID sont le contrôle de l'homéostasie redox, la réponse de protéine mal repliée médiée par ATF6 et la voie anti-inflammatoire médiée par IL-10. L'implication des voies de l'homéostasie redox et la réponse de protéine mal repliée médiée par ATF6 dans la sénescence développementale présentent des similarités avec les autres types de sénescence. En effet, ces voies n'ont pas directement un effet sur la façon dont la sénescence est activée, mais sont plutôt la conséquence d'une cellule sénescence. L'homéostasie redox, tel que nous allons voir un peu plus tard, agit comme un messager à partir de la mitochondrie jusqu'au noyau pour activer les gènes nécessaires à la sénescence cellulaire(276). Son rôle est plus direct dans les études de la sénescence liée à un dysfonctionnement mitochondrial, mais elle peut également agir de façon indirecte dans les autres types de sénescence(276). Quant à la voie de réponse protéine mal repliée médiée par ATF6, son identification était attendue puisque tel que discuté dans l'introduction, elle cause le changement morphologique associé à la sénescence(123). L'activation de la voie anti-inflammatoire de l'IL-10 dans le pronéphros sénescence tend à confirmer les données précédemment démontrées par notre laboratoire qui

indiquaient que la sénescence développementale n'est pas liée à l'inflammation : niveau relativement constant de l'interleukine pro-inflammatoire IL-6 et induction de l'interleukine anti-inflammatoire IL-10 dans le pronéphros sénescant démontré par qPCR (240). Ceci pourrait être expliqué par le fait que la sénescence développementale n'est pas activée par un stimulus externe qui envoie une alerte de danger à la cellule; elle est plutôt activée de façon naturelle dans des conditions saines.

Dans la deuxième partie des résultats, des analyses GSEA ont été effectuées afin de déterminer les différentes voies induites dans le pronéphros en comparaison avec la queue, cette fois en tenant compte des niveaux de variation (*foldchange*) de chaque gène. D'abord, aucune similitude statistiquement significative n'a pu être détectée entre le profil d'expression génique global du pronéphros sénescant et les signatures d'expression génique publiées (pour les autres types de sénescence). Cette analyse concorde avec les résultats de l'équipe de Serrano, qui n'a trouvé aucune similitude entre le génome des cellules de l'épithélium mésonéphrique sénescant de la souris en développement et les génomes des cellules sénescantes activées par un oncogène, le raccourcissement des télomères ou un dommage à l'ADN (238). Ainsi, nos données ont confirmé celles de Serrano et permettent d'affirmer que la sénescence développementale a un patron d'expression différent que les autres types de sénescence connus.

Malgré cette différence dans l'expression génique globale, l'analyse de GSEA a démontré une similitude entre les voies activées dans la sénescence développementale et les autres types de sénescence : l'induction des voies des espèces réactives de l'oxygène, TGF- β , Ras, glycolyse, IL-6/JAK/STAT3 et réponse aux UV. Ces voies sont connues pour permettre à la cellule de développer son caractère sénescant. Les voies réactives de l'oxygène (ROS), bien qu'elles puissent être la cause directe de la sénescence, peuvent également causer la biogenèse mitochondriale, la diminution mitophagique (dégradation des mitochondries par autophagie) et l'hyperfusion des mitochondries(277, 278). Ces caractéristiques ne sont pas restreintes à la sénescence activée par un dysfonctionnement mitochondrial, puisqu'elles sont typiques des autres types de sénescence (répllicative, induit par un stress ou par un élément oncogénique)(277, 279, 280). En effet, tel que discuté plus haut, dans la sénescence activée par un dysfonctionnement mitochondrial, les ROS générés servent de messenger de la mitochondrie au noyau. Elles causent des dommages à l'ADN

pour provoquer l'arrêt du cycle cellulaire(188, 189). Dans les autres types de sénescence, les ROS favorisent la biogenèse des mitochondries par l'activation de mTOR qui, en l'absence d'inflammation et en présence des facteurs de croissance, bloquent l'autophagie et promeuvent la synthèse protéique(190, 191). La synthèse excessive de protéines cause le dysfonctionnement mitochondrial, qui renforce la sortie du cycle cellulaire et la sénescence(190, 191). L'abondance des facteurs de croissance et l'absence d'inflammation sont des conditions dans lesquelles se trouvent les cellules de l'axolotl en développement, ce qui pourrait expliquer l'induction des voies ROS dans le pronéphros sénéscent.

L'importance de la voie TGF- β dans la sénescence développementale avait déjà été démontrée par Serrano (238). Notre analyse de GSEA semble indiquer que c'est plus spécifiquement la voie des TGF- β non-canoniques qui semblent être activée durant la sénescence développementale. En effet, la famille des cytokines TGF- β contient plus de 30 membres dont *bone morphogenetic proteins* (BMPs), activine, et nodal qui contrôlent de nombreux processus physiologiques, tels que la formation de la matrice extracellulaire, la cicatrisation, la réponse à l'inflammation et le développement embryonnaire(281). Dans la voie canonique, le ligand TGF- β active les récepteurs membranaires de type I ou II qui, à leur tour, vont phosphoryler des médiateurs intracellulaires (SMAD2 et SMAD3). Ces derniers vont former des complexes ensemble ou avec d'autres protéines pour activer leurs gènes cibles(282). Les voies non-SMAD (non canoniques) de TGF- β comprennent diverses branches des voies MAP kinase (MAPK), des voies de signalisation GTPase de type Rho et des voies phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT, ainsi que l'activation post-traductionnelle des protéines p38 et MAPK(283, 284). Jusqu'à aujourd'hui, les effets de la voie TGF- β sur le cycle cellulaire impliquaient l'activation de SMAD3, qui se lie au promoteur de c-Myc et bloque sa transcription(285). Quelques études ont également démontré que TGF- β était elle-même capable d'activer les inhibiteurs du cycle cellulaire p21, p27, p16 et p15 et de permettre la sortie à la phase G1(285, 286). Toutefois, à l'exception de p21, ces protéines ne semblent pas être impliquées dans la sénescence développementale(238). Notre analyse de GSEA a démontré une induction des inhibiteurs de SMAD (SMAD6 et SMAD7) dans le pronéphros. Cela voudrait dire que la voie canonique est inhibée et que c'est potentiellement la voie non canonique qui serait induite dans le pronéphros sénéscent, et ce, même si les marqueurs de la voie non canonique (P38 et

MAPK) ne sont pas détectés dans le profil d'expression. En effet, ces protéines sont plutôt activées de façon post-traductionnelle et leur expression devrait être évaluée par des techniques telles que l'immunobuvardage de type Western Blot.

De façon intéressante, l'analyse GSEA a également permis de détecter une induction de la voie IL-6/JAK/STAT3. Tel que mentionné dans l'introduction, STAT3 est un facteur de transcription et un transducteur de signal qui est activé suite à sa phosphorylation par Janus tyrosine kinases (JAK) en réponse aux hormones de croissance (GH), les cytokines de la famille IL-6 ou le G-CSF(287). Une fois activée, STAT3 se déplace dans le noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles dont TGF β 1 et TNFRSF1B (287, 288). Ce dernier est un gène responsable de l'activation transcriptionnelle des inhibiteurs du cycle cellulaire et de l'apoptose qui, selon le profil d'expression, est également induit dans le pronéphros sénescents (288). Il pourrait être responsable de l'expression de la protéine p21, vu que les autres inhibiteurs ne sont pas exprimés. Ainsi, notre supposition est que l'induction de la voie IL-6/JAK/STAT3 pourrait permettre l'activation de la voie TGF- β , qui, tel que supposé plus haut, permet l'inhibition du cycle cellulaire par une voie non canonique. En définitive, l'analyse GSEA confirme l'importance de la voie non canonique de TGF- β dans la sénescence développementale.

Deux autres voies (KRAS et la réponse aux UV) sont également significativement enrichies dans les cellules du pronéphros en comparaison avec la queue de l'axolotl en développement. Ces voies sont connues comme des stimulateurs de la sénescence *in vitro* (152, 289). En effet, comme nous l'avons aussi mentionné dans l'introduction, la surexpression de Ras et le traitement des cellules aux UV sont des techniques couramment utilisées en laboratoire pour étudier la sénescence. Leur identification dans notre analyse présume des ressemblances entre elles et la sénescence développementale. Cette supposition va à l'encontre de nos attentes, car ces deux stimuli sont connus pour activer la sénescence de façon dépendante à la réponse des dommages à l'ADN. Étant donné que les cellules embryonnaires sont à l'abri des facteurs exogènes causant des dommages à l'ADN, on s'attendrait à ce que cette voie ne soit pas activée durant le développement embryonnaire de l'organisme.

Dans le cas de la voie KRAS, le profil d'expression démontre qu'un des gènes avec une variation d'expression évidente dans le pronéphros comparé à la queue est le SERPINA3. Un gène surtout étudié dans les maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer et la maladie d'Huntington(290). Une analyse plus approfondie pourrait être faite pour comparer la sénescence développementale avec les voies causant l'élimination des cellules dans les maladies neurodégénératives. Finalement, le dernier graphique de l'analyse GSEA démontre une induction de la glycolyse dans le pronéphros de l'axolotl en développement. Celle-ci, en accord avec les analyses bio-informatiques présentées dans la première partie, démontre l'importance du métabolisme dans le pronéphros en développement. En définitive, malgré le fait que les études effectuées sur la sénescence développementale semblent démontrer un patron d'expression des gènes différent des autres types de sénescence, l'analyse de GSEA pointe les similitudes entre elles.

La troisième partie des résultats est axée sur l'identification des gènes induits dans le pronéphros et qui pourraient être impliqués dans la sénescence développementale. D'abord, par des analyses bio-informatiques indépendantes, nous avons détecté les facteurs de transcription clé de la sénescence développementale : PAX6, PPARG, GATA2, GATA1, CEBPB, FOXA1 et HNFA1.

Un des gènes cibles de PPARG, PEBP1, a été identifié par CellAge comme un gène connu de la sénescence. PEBP1 est un membre de la superfamille des protéines liées à phosphatidylethanolamine (PEBP), des protéines hautement conservées à travers l'évolution(291). Ces protéines ont été identifiées dans une grande variété d'organismes, y compris les bactéries, les levures, les nématodes, les plantes, la drosophile et les mammifères(291). Globalement, les PEBP sont impliquées dans plusieurs processus biologiques dont le cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation cellulaire et la motilité, mais leur fonction moléculaire exacte dans ces processus est, encore à ce jour, inconnu(291). Chez l'*Homo Sapiens*, trois formes de PEBP sont identifiées : PEBP1, PEBP2 et PEBP4. Les plus étudiées sont PEBP1 et PEBP4, compte tenu de leur rôle important dans le développement de plusieurs types de cancer(291). Ces deux isoformes ont des rôles paradoxaux : PEBP1 a une fonction de suppression tumorale, tandis que PEBP4 est un oncogène(291). Notamment, la perte d'expression de PEBP1 a été démontrée dans une grande variété de cancers, dont : sein, prostate, cerveau, poumon, foie, colorectal, endométrial,

œsophagien, gastrique, rénal, pancréatique, nasopharyngien, et mélanome(291). Autre que le cancer, PEBP1 est également impliqué dans la maladie d'Alzheimer, la néphropathie diabétique et le déficit olfactif(291).

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de PEBP1 est détectée dans les agrégats intracellulaires qui causent les maladies neurodégénératives(291). Dans la néphropathie diabétique, les rats atteints ont démontré une expression réduite de PEBP1 qui corrèle avec une induction du facteur de transcription NF- κ B (291). Dans le cas de la déficience olfactive, il a été démontré que les souris *Knock-out* de PEBP1 développent un déficit de l'olfaction et une perte d'odorat dès les premiers mois de leur développement. Malgré le fait que l'importance de PEBP1 ait été détectée dans ces trois maladies, ses effets moléculaires restent à ce jour inconnus et très peu étudié(291).

PEBP1 est également impliquée dans de nombreux processus cellulaires, dont la transduction du signal, l'inflammation, le cycle cellulaire, la prolifération, l'adhésion, la différenciation, l'apoptose, l'autophagie et le point de contrôle du fuseau mitotique en régulant plusieurs voies de signalisation, y compris les voies de signalisation MAP kinase (MAPK), NF- κ B, PI3K/Akt, mTOR, p38, Notch, Wnt et glycogène synthase kinase-3 (GSK-3)(291). Souvent, son intervention implique l'inhibition des différentes kinases de ces voies(291). Dans la voie MAPK, PEBP1 peut inhiber la voie en se liant soit directement à Raf-1 ou à MEK, soit à MEK et ERK pour dissocier Raf-1 de MEK(291, 292). Dans nos analyses, tout comme l'expression de ERK 1/2, l'expression de PEBP1 a été détectée avec une spécificité spatio-temporelle dans les organes qui expriment la sénescence développementale. Cela nous mène à la supposition que les tubules pronéphriques qui expriment ERK pourraient être en phase de présénescence, ce qui nécessite l'inhibition par PEBP1 pour permettre la sortie du cycle cellulaire et l'entrée dans la phase sénescence. Cette supposition n'a pas été confirmée dans la présente étude. Pour valider, un marquage pour la protéine ERK devrait se faire sur une coupe successive à celle utilisée pour l'hybridation *in situ* de PEBP1. La superposition de ces images pourrait démontrer l'expression unique des deux protéines.

Dans la voie NF- κ B, PEBP1 inhibe l'activité kinase de *NF- κ B inducing kinase* (NIK), *transforming growth factor beta-activated kinase 1* (TAK1) et l'inhibiteur de kappaB (IKB)(291). Dans la

présente étude, la voie NF- κ B n'a pas été détectée par les analyses bio-informatiques. Plus tôt dans l'introduction, nous avons parlé de l'effet de la voie de signalisation de NF- κ B pour l'activation des SASP dans les types de sénescence connus avant la sénescence développementale : activée par un stimulus exogène ou un dommage à l'ADN. Il se peut que la voie NF- κ B n'ait pas de rôle dans l'activation des SASP durant la sénescence développementale, ou que l'inhibition de NF- κ B soit contre-réglée par une autre protéine. Nos analyses ne permettent pas de confirmer le rôle de PEBP1 dans la voie NF- κ B durant la sénescence développementale. Des analyses plus approfondies devraient être effectuées.

Quant à la voie PI3K/AKT, PEBP1 est un régulateur général de la voie. Dans les cellules cancéreuses, la diminution d'expression de PEBP1 cause une augmentation de l'activité de AKT, une prolifération cellulaire incontrôlée et une résistance à la radiation(291). Ce fait nous porte à croire que le contraire pourrait être vrai : l'induction de la PEBP1 pourrait diminuer l'activité de AKT et bloquer ou diminuer la prolifération cellulaire. Cette information est compatible avec nos données combinées avec celles de l'équipe de Serrano, qui démontrent une augmentation de l'expression de PEBP1 dans les organes en sénescence en corrélation avec une diminution de l'expression de AKT (238). De plus, Serrano a démontré que l'inhibiteur pharmaceutique de PI3K (CNIO-PI3Ki) augmentait le niveau de SA β G dans les sites sénescents de la souris en développement(238). Est-ce par une induction de la protéine PEBP1 ? Pour répondre à cette question, une étude d'immunohistochimie pour l'expression de AKT phosphorylé devrait être effectuée sur les échantillons de pronéphros ou des fascicules olfactifs de l'axolotl traités à la Locostatin.

Moléculairement parlant, AKT est un inhibiteur des facteurs de transcription de la famille des FOXO(293). Sachant que nos analyses des facteurs de transcription ont démontré une induction de la famille des FOXO dans les cellules sénescents du pronéphros, il est logique d'observer une diminution de l'activité de AKT dans les zones sénescents (294). Somme toute, nos résultats semblent démontrer une corrélation entre l'expression de PEBP1 et l'inhibition de la voie PI3K/AKT observée dans la sénescence développementale.

Dans la voie GSK-3, l'expression de PEBP1 augmente simultanément avec l'expression de la protéine antitumorale glyco-gène synthase kinase-3 (GSK3)(291). Les études ont montré que PEBP1 permet l'activation constante des protéines GSK3 pour bloquer la progression de la tumeur et l'activation de la cycline D1(291). Cette voie n'a pas été détectée par nos analyses bio-informatiques, et les données brutes du séquençage d'ARN des coupes du pronéphros comparé à la queue ne démontrent aucune variation dans l'expression transcriptomique de GSKA et GSKB. Ceci pourrait être dû à la technique utilisée (la voie GSK pourrait être induite dans la queue de façon naturelle, ce qui masquerait son induction dans le pronéphros), ou au fait que la voie GSK ne joue effectivement pas de rôle dans la sénescence développementale. Pour confirmer, des analyses plus poussées devraient être effectuées.

En définitive, PEBP1 peut également inhiber l'IL-6, JAK1 et l'activation de STAT3 par une interaction physique(291). En effet, les études avec les cellules en provenance du cancer de l'estomac ont démontré que PEBP1 agit comme un inhibiteur de la métastase en bloquant l'activité de STAT3 et de cycline D1(291). De façon surprenante, cette information contredit notre analyse GSEA, qui démontre une induction de la voie IL-6/JAK/STAT3 dans le pronéphros, où PEBP1 est exprimée. La contradiction peut être expliquée d'une part par l'absence d'inflammation (IL-6) dans la sénescence développementale (induction transcriptomique de IL-10 et expression constante de IL-6 dans les sites sénescents en comparaison avec les sites non sénescents). D'autre part, par la dépendance de IL-6 et STAT3 sur la transcription de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, qui, une fois transcrite, peut s'auto-activer par une signalisation autocrine et paracrine (295). Sachant cela, on peut émettre la supposition que soit la voie IL-6/JAK/STAT3 est activée à un moment spécifique durant la sénescence pour permettre la transcription de IL-10 avant d'être inhibée par PEBP1 ou elle est activée par une cytokine autre que IL-6, tels que IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, ou Leptin(296). Des expériences d'inhibition par de petits ARN en épingle à cheveux (ARNsh) pour permettre l'identification des cytokines en question.

Ces exemples démontrent que la protéine PEBP1 peut passer par plusieurs voies pour inhiber l'activité des kinases et bloquer la prolifération cellulaire non désirée. Toutefois, peu d'études ont été faites sur la conséquence de l'inhibition de ces voies sur l'état de la cellule. Qu'arrive-t-il à la

cellule lorsque PEBP1 inhibe les voies de la prolifération cellulaire ? Quelle est la conséquence de son activation sur l'état de la cellule ? Mon hypothèse est que PEBP1 peut jouer un rôle dans l'activation de la sénescence et la sortie de la cellule en phase G1. Pour démontrer cela, une suggestion serait de créer des souris PEBP1^{-/-} et regarder l'activité de bêta-galactosidase associé à la sénescence dans les mésonéphros et le sac de l'oreille interne au E14.5, stade où l'activité de Sa β G a été démontrée par l'équipe de Serrano(238). De cette manière, en regardant l'activité des protéines clés de chaque voie, il serait également possible d'identifier les voies qui sont normalement inhibées par PEBP1.

Les résultats de RNA seq des pronéphros sénescents de l'axolotl en développement, en comparaison avec la queue non sénescence, ont démontré une augmentation de l'expression de PEBP1 de 10 fois dans le pronéphros, en comparaison avec la queue. Cette induction, également confirmée par qPCR avec l'ADN complémentaire des sections de pronéphros, a également été observée sur l'ADN complémentaire d'un deuxième site sénescence de l'axolotl en développement, soit les fascicules olfactifs. Par la suite, l'expression spécifique et exclusive de PEBP1 non seulement au niveau de ces deux organes, mais également au niveau du troisième site de sénescence, soit le point d'éclatement des dents, a été démontrée par hybridation *in situ*. Ce qui suggère fortement que PEBP1 a un rôle important à jouer dans la sénescence développementale. Dans le présent projet, nous avons poussé l'analyse en traitant des embryons d'axolotl avec un inhibiteur pharmacologique de PEBP1, la Locostatin, pour observer son effet sur la sénescence. Les résultats ont démontré une tendance dans l'activité bêta galactosidase acide liée à la sénescence. La diminution de Sa β G pourrait être expliquée par le fait qu'en bloquant PEBP1, l'activité de ERK est maintenue, ce qui empêcherait les cellules à entrer dans la phase de sénescence. Pour confirmer cette hypothèse, l'activité des protéines impliquées dans la voie de ERK devrait être analysée sur les animaux traités à la Locostatin. De façon plus intéressante, les animaux au stade 41 traités à la Locostatin 25 μ M pendant 48 heures avaient un phénotype différent des contrôles, et se différenciaient par une tuméfaction qui causait leur mort (données non présentées). À première vue, nous avons pensé que la dose utilisée était létale pour les animaux de ce stade, mais en prenant du recul, on peut penser que les animaux ont présenté des symptômes d'insuffisance rénale, laquelle causait la rétention d'eau et l'allure gonflée des

animaux. Des analyses histologiques pourraient permettre la comparaison morphologique des pronéphros chez animaux non traités et chez ceux traités avec la Locostatin.

Les effets de la Locostatin sur la sénescence ont été étudiés en utilisant un seul marqueur de sénescence, soit la SaβG. Bien que celui-ci soit l'indicateur de la sénescence très utilisé, son niveau d'expression seul ne peut pas être considéré comme étant représentatif de la sénescence. Souvent, l'expression des régulateurs du cycle cellulaire tels que p16, p21 ou p53 est utilisée pour détecter l'état sénéscent des cellules(114). Dans la présente étude, nous n'avons pas pu utiliser ces marqueurs puisque l'homologue de la protéine p21 n'existe pas chez l'axolotl et que les études préliminaires ont démontré que les inhibiteurs p16 et p53 ne sont pas exprimés dans la sénescence développementale(238). Les autres marqueurs utilisés pour les autres types de sénescence ne peuvent pas non plus être utilisés dans le cas de la sénescence développementale, puisque ces marqueurs détectent des dommages de l'ADN tels que γ-H 2A-X, 53BP1 ou ATM, un phénomène qui semble être absent dans la sénescence développementale(297). En effet, nos données (inactivation de l'inflammation et de la voie DDR) dans le pronéphros semblent démontrer que la sénescence durant le développement survient de façon naturelle suite à la réception d'un message en provenance de son environnement, ce qui rend son ADN intact et l'utilisation de ces marqueurs impertinents. Or, pour simplifier l'étude de la sénescence chez l'axolotl, une signature transcriptionnelle de la sénescence activée durant le développement spécifique à cet organisme devrait être générée. Pour se faire, une séquençage d'ARN pour être effectuée sur le pronéphros de l'axolotl au stade 51 (quand la sénescence est remarquablement plus induite) et comparée avec le transcrit du pronéphros d'un autre animal, au même stade, traité avec un sénolytique.

Une autre limite expérimentale à considérer lors de l'analyse des résultats est que les résultats du RNA seq et de qPCR sont obtenus à partir des coupes de pronéphros et de queue, soit des tissus différents. Certains gènes peuvent ne pas être exprimés dans un tissu non parce qu'ils sont spécifiques à la sénescence, mais plutôt à l'organe en question. Il est très difficile de contourner ce problème quand on fait l'expérience sur un animal vivant en développement, puisqu'à aucun moment on n'aurait pu comparer le pronéphros non sénéscent avec le pronéphros sénéscent. Lorsque la sénescence est arrêtée dans le pronéphros, l'animal a tellement évolué et l'organe est

tellement différent qu'il n'est pas cohérent de faire la comparaison. La solution pourrait être le triage des cellules marqué au SA β G (BLUE) avec celles qui ne sont pas bleues par la technique *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS), puis effectuer le séquençage d'ARN sur ces deux groupes de cellules. Une alternative serait de tout simplement d'utiliser la technique de single-cell RNA-seq sur les cellules du pronéphros. Toutefois, le désavantage de ces techniques est que le pronéphros est un organe très hétérogène, composé de plusieurs types cellulaires et l'utilisation de ces techniques pourrait causer à la comparaison erronée de différents types cellulaire et ainsi ne pas être plus révélatrice.

De plus, les coupes ont été effectuées à l'aide des ciseaux dans la région où le pronéphros était visible. Ceci dit, il se peut qu'en faisant les coupes, des morceaux d'autres organes tels que la rate ou le foie aient également été prélevés. Pour contourner ce problème, les pronéphros auraient pu être coupés par laser-capture microdissection (LCM) pour augmenter la spécificité des résultats ou simplement comparer le transcriptome des deux sites sénescents, soit les fascicules olfactifs et les pronéphros, avec un site non sénescents comme la queue. De cette façon, on s'assure que les gènes induits dans le pronéphros et les fascicules olfactifs et qui ne sont pas exprimés dans le site non sénescents sont fort probablement spécifiques à la sénescence développementale.

7 Conclusion et perspective

Depuis le début de sa découverte, la sénescence a surtout été étudiée dans le contexte du vieillissement ou dans des conditions où un dommage à l'ADN a été induit à la cellule. Graduellement, il a été démontré qu'en fonction du type cellulaire et des conditions dans lesquelles se trouve la cellule, celle-ci peut passer par différentes voies pour arrêter sa réplication et la sortie en phase G1 de façon permanente. Ces études, en parallèle avec la découverte de l'hétérogénéité des SASP, ont permis de confirmer que les cellules sénescents peuvent ne pas avoir le même transcriptome, ce qui rend les rend très complexes à étudier. Autrement dit, pour un même type cellulaire et dépendamment du stress soumis, la cellule peut soit entrer en sénescence par l'activation directe des inhibiteurs du cycle cellulaire, ou soit par exemple passer à travers une étape de la réponse au dommage de l'ADN (DDR) pour finalement activer les différents inhibiteurs du cycle cellulaire. De façon générale, les différentes protéines activées causaient la phosphorylation de la protéine p53 et ainsi l'activation de la protéine p21, qui vont empêcher la phosphorylation de la protéine Rb et l'inactivation de E2F. Une fois en phase sénescence, les cellules peuvent sécréter différentes composantes de SASPs pour modifier le contenu génétique de leurs cellules avoisinantes. Habituellement, les SASP sécrétées sont de type inflammatoire ce qui, dans le meilleur des scénarios, attire les cellules du système immunitaire et cause leur élimination. Lorsque les cellules du système immunitaire ne sont pas capables d'éliminer les cellules sénescents, ces dernières continuent à sécréter des cytokines pro-inflammatoires, de façon à causer différentes maladies chroniques inflammatoires. Ces connaissances obtenues à travers les années ont suscité l'intérêt des chercheurs pour trouver une façon d'éliminer les cellules sénescents accumulées durant le vieillissement et pour ainsi prévenir les maladies chroniques, augmenter l'espérance de vie des organismes ou combattre le cancer.

Très récemment, des équipes de recherche indépendantes ont découvert la présence de cellules sénescents dans certains organes des organismes en développement. Parmi elles, notre laboratoire a démontré l'activation de la sénescence dans les fascicules olfactifs, les reins primitifs

et les gencives au point d'éclatement des dents de l'axolotl en développement. Cette découverte a mené à une nouvelle philosophie : la sénescence peut également survenir bien avant le vieillissement, de façon naturelle, en absence de stress. Notre laboratoire a également démontré que la sénescence qui survient durant le développement n'est pas liée à l'inflammation(240). Les autres chercheurs de leur côté ont démontré que le contenu génétique des cellules sénescents durant le développement est complètement différent des autres types de sénescence connus jusqu'aujourd'hui, puisqu'il ne dépend pas des inhibiteurs du cycle cellulaire et que l'activation de la protéine p21 est effectuée de façon indépendante à la protéine p53. Dans la présente étude, nous avons identifié un gène potentiellement important pour la sénescence développementale, soit PEBP1. Ce gène, qui est souvent étudié dans les maladies neurodégénératives, la néphropathie diabétique et le déficit de l'olfaction, est connu pour son activité inhibitrice de la voie des MAPK. Chez l'axolotl en développement, son expression est exclusive aux tissus où l'activité de SA β G est observée. Plus spécifiquement, tout comme l'activité de SA β G et la protéine ERK, l'expression de l'ARN messager de PEBP1 est spatio-temporelle. Elle est exprimée dans certains tubules à certaines étapes de la sénescence, ce qui mène à la supposition que ERK, activée dans la phase présénescence, est bloquée par PEBP1 pour permettre à la cellule d'entrer dans en phase sénescence.

Mais que peut être l'importance de la sénescence durant le développement embryonnaire ? En observant les organes qui expriment de la sénescence durant le développement embryonnaire de l'axolotl, nous pouvons émettre la supposition que la sénescence pourrait être la cause du remodelage de l'organe en transition. Par exemple, chez la salamandre, le pronéphros doit passer à travers deux autres organes transitoires avant de devenir le rein mature. Mais pourquoi pas passer par un processus qui permettrait l'élimination des cellules de façon plus efficace, telle que l'apoptose ? En effet, les cellules en transition ne peuvent pas mourir instantanément puisque la mort soudaine de plusieurs cellules en même temps pourrait causer l'insuffisance de l'organe en question et, potentiellement, la mort de l'organisme. De plus, les cellules sénescents, même si elles ne se répliquent pas, sont métaboliquement actives et peuvent répondre aux besoins de l'organisme tout en étant en voie d'élimination. Enfin, la sécrétion des SASP pourrait permettre aux cellules de communiquer entre elles pour déterminer l'état dans laquelle chacune devrait

être pour permettre la formation de l'organe. Dans ce cas-là, est-ce qu'on pourrait penser que la sénescence qui survient durant le développement pourrait avoir le même rôle que la sénescence qui survient durant la régénération de la patte chez les salamandres, tel que démontré par l'équipe de Yun(232)? Dans l'affirmative, on pourrait penser que l'activation de la sénescence dans les reins matures pourrait permettre la régénération dans les insuffisances rénales, une maladie qui, au Canada, atteint à approximativement 4 millions de personnes par année dont 75% sont attente d'un don d'organe(298).

L'implication de la protéine PEBP1 dans la sénescence développementale est une découverte qui pourrait permettre l'identification d'une nouvelle voie impliquée dans la sénescence. Or, la détermination de la connexion entre cette protéine, qui est impliquée dans plusieurs maladies liées à l'âge et qui régule plusieurs voies cellulaires, et la sénescence pourrait être la pièce manquante de notre puzzle pour former une image complète de la sénescence.

8 Références bibliographiques

1. Karp G. Cell and molecular biology : concepts and experiments. Hoboken, NJ: John Wiley; 2010.
2. Arneson D, Zhang G, Ying Z, Zhuang Y, Byun HR, Ahn IS, et al. Single cell molecular alterations reveal target cells and pathways of concussive brain injury. *Nat Commun.* 2018;9(1):3894.
3. Skelly DA, Squiers GT, McLellan MA, Bolisetty MT, Robson P, Rosenthal NA, et al. Single-Cell Transcriptional Profiling Reveals Cellular Diversity and Intercommunication in the Mouse Heart. *Cell Rep.* 2018;22(3):600-10.
4. Wu H, Malone AF, Donnelly EL, Kirita Y, Uchimura K, Ramakrishnan SM, et al. Single-Cell Transcriptomics of a Human Kidney Allograft Biopsy Specimen Defines a Diverse Inflammatory Response. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(8):2069-80.
5. Cohen M, Giladi A, Gorki AD, Solodkin DG, Zada M, Hladik A, et al. Lung Single-Cell Signaling Interaction Map Reveals Basophil Role in Macrophage Imprinting. *Cell.* 2018;175(4):1031-44.e18.
6. Hu Y, Wang X, Hu B, Mao Y, Chen Y, Yan L, et al. Dissecting the transcriptome landscape of the human fetal neural retina and retinal pigment epithelium by single-cell RNA-seq analysis. *PLoS Biol.* 2019;17(7):e3000365.
7. Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation; research in biological diversity.* 2006;74(7):365-81.
8. Zhou X, Franklin RA, Adler M, Jacox JB, Bailis W, Shyer JA, et al. Circuit Design Features of a Stable Two-Cell System. *Cell.* 2018;172(4):744-57.e17.
9. Inman JL, Robertson C, Mott JD, Bissell MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development.* 2015;142(6):1028-42.
10. Strazdis JR, MacKay VL. Induction of yeast mating pheromone a-factor by α cells. *Nature.* 1983;305(5934):543-5.
11. Yuzwa SA, Yang G, Borrett MJ, Clarke G, Cancino GI, Zahr SK, et al. Proneurogenic Ligands Defined by Modeling Developing Cortex Growth Factor Communication Networks. *Neuron.* 2016;91(5):988-1004.
12. Li G, Tian L, Goodyer W, Kort EJ, Buikema JW, Xu A, et al. Single cell expression analysis reveals anatomical and cell cycle-dependent transcriptional shifts during heart development. *Development.* 2019;146(12).
13. Graff JM, Bansal A, Melton DA. Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. *Cell.* 1996;85(4):479-87.
14. Basler K, Hafen E. Receptor tyrosine kinases mediate cell-cell interactions during Drosophila development. *Prog Growth Factor Res.* 1990;2(1):15-27.
15. Carter-Su C, Schwartz J, Argetsinger LS. Growth hormone signaling pathways. *Growth Horm IGF Res.* 2016;28:11-5.
16. Lomri A, Marie PJ. Changes in cytoskeletal proteins in response to parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D in human osteoblastic cells. *Bone Miner.* 1990;10(1):1-12.

17. Novakova Z, Hubackova S, Kosar M, Janderova-Rossmeislova L, Dobrovolna J, Vasicova P, et al. Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence. *Oncogene*. 2010;29(2):273-84.
18. Roy S, Gatién S. Regeneration in axolotls: a model to aim for! *Experimental Gerontology*. 2008;43(11):968-73.
19. Uzman A. *Molecular biology of the cell* (4th ed.): Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. Biochemistry and Molecular Biology Education. 2003;31(4):212-4.
20. Strasburger E. Die Controversen der indirecten Kerntheilung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 1883;23(1):246-304.
21. McBeath E, Fujiwara K. Microtubule detachment from the microtubule-organizing center as a key event in the complete turnover of microtubules in cells. *Eur J Cell Biol*. 1990;52(1):1-16.
22. Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, Shevchenko A, Mann M, Nasmyth K. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*. 1998;93(6):1067-76.
23. Jost E, Johnson RT. Nuclear lamina assembly, synthesis and disaggregation during the cell cycle in synchronized HeLa cells. *J Cell Sci*. 1981;47:25-53.
24. Darlington CD, Hall AD. The external mechanics of the chromosomes I—The scope of enquiry. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences*. 1936;121(823):264-73.
25. Danforth CH. Recent advances in cytology. By C. D. Darlington. Second edition. Philadelphia. P. Blakiston's son and Co., 1937. xvi + 671 pp. *The Anatomical Record*. 1937;69(1):123-6.
26. Muller HJ. The Evolution of Genetic Systems. *Nature*. 1939;144(3650):648-50.
27. Inoué S, Ritter H, Jr. Dynamics of mitotic spindle organization and function. *Soc Gen Physiol Ser*. 1975;30:3-30.
28. Fujiwara K, Pollard TD. Fluorescent antibody localization of myosin in the cytoplasm, cleavage furrow, and mitotic spindle of human cells. *Journal of Cell Biology*. 1976;71(3):848-75.
29. Mabuchi I, Okuno M. The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *Journal of Cell Biology*. 1977;74(1):251-63.
30. Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*: Oxford University Press; 2016.
31. Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*. 1994;79(4):551-5.
32. Johnson RT, Rao PN. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*. 1970;226(5247):717-22.
33. GM C. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd Edition: Sinauer Associates, Incorporated; 2000.
34. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989;246(4930):629-34.
35. Beach D, Durkacz B, Nurse P. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature*. 1982;300(5894):706-9.
36. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 1983;33(2):389-96.

37. Nurse P, Thuriaux P. REGULATORY GENES CONTROLLING MITOSIS IN THE FISSION YEAST &SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE&. Genetics. 1980;96(3):627.
38. Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Gen Genet. 1976;146(2):167-78.
39. Reed SI, Ferguson J, Groppe JC. Preliminary characterization of the transcriptional and translational products of the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle gene CDC28. Mol Cell Biol. 1982;2(4):412.
40. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature. 1990;344(6266):503-8.
41. Draetta G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. Trends Biochem Sci. 1990;15(10):378-83.
42. Elledge SJ, Spottswood MR. A new human p34 protein kinase, CDK2, identified by complementation of a cdc28 mutation in *Saccharomyces cerevisiae*, is a homolog of *Xenopus* Eg1. EMBO J. 1991;10(9):2653-9.
43. Minshull J, Pines J, Golsteyn R, Standart N, Mackie S, Colman A, et al. The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. J Cell Sci Suppl. 1989;12:77-97.
44. Aftab A, Khan R, Shah W, Azhar M, Unar A, Jafar Hussain HM, et al. Computational analysis of Cyclin D1 gene SNPs and association with breast cancer. Biosci Rep. 2021;41(1).
45. Zhou Y, Geng Y, Zhang Y, Zhou Y, Chu C, Sharma S, et al. The requirement for cyclin E in c-Myc overexpressing breast cancers. Cell Cycle. 2020;19(20):2589-99.
46. Alsfook A. Small molecule inhibitors of cyclin-dependent kinase 9 for cancer therapy. J Enzyme Inhib Med Chem. 2021;36(1):693-706.
47. O'Leary B, Finn RS, Turner NC. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. Nat Rev Clin Oncol. 2016;13(7):417-30.
48. Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. J Mol Biol. 1999;287(5):821-8.
49. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, et al. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. Int J Mol Sci. 2020;21(6):1960.
50. Hunt T. Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. Semin Cell Biol. 1991;2(4):213-22.
51. Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. Bioessays. 1995;17(6):471-80.
52. Kaplan DL. The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes: Springer International Publishing; 2016.
53. Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E. Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. Curr Biol. 2006;16(12):1171-82.
54. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, et al. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK-J3}/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. Cell. 1992;71(2):323-34.
55. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. Genes Dev. 1993;7(5):812-21.

56. Fitzgerald-Hayes M, Reichsman F. DNA and Biotechnology: Elsevier Science; 2009.
57. Liang C, Weinreich M, Stillman B. ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell*. 1995;81(5):667-76.
58. Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*. 1989;246(4930):603-8.
59. Giordano A, Whyte P, Harlow E, Franza BR, Beach D, Draetta G. A 60 kd cdc2-associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells. *Cell*. 1989;58(5):981-90.
60. Pagano M, Draetta G, Jansen-Dürr P. Association of cdk2 kinase with the transcription factor E2F during S phase. *Science*. 1992;255(5048):1144-7.
61. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J*. 1992;11(3):961-71.
62. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J*. 1992;11(3):961-71.
63. Fisher D, Krasinska L, Coudreuse D, Novák B. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 20):4703-11.
64. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 1990;344(6266):503-8.
65. Paweletz N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(1):72-5.
66. Musacchio A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr Biol*. 2015;25(20):R1002-18.
67. Siede W, Friedberg AS, Friedberg EC. RAD9-dependent G1 arrest defines a second checkpoint for damaged DNA in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):7985-9.
68. Rudner AD, Murray AW. The spindle assembly checkpoint. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(6):773-80.
69. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(4):1286-90.
70. Fernández-Terán MA, Hinchliffe JR, Ros MA. Birth and death of cells in limb development: A mapping study. *Developmental Dynamics*. 2006;235(9):2521-37.
71. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
72. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *Bmj*. 2001;322(7301):1536-8.
73. Hinchliffe J. Cell death in embryogenesis. *Biology and pathology of cell death*. 1981:35–78.
74. Oppenheim RW. Cell Death During Development of the Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*. 1991;14(1):453-501.
75. Strange R, Li F, Saurer S, Burkhardt A, Friis RR. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development*. 1992;115(1):49.
76. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000;407(6805):784-8.
77. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*. 2003;171(9):4672-9.

78. Haanen C, Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflamm.* 1995;4(1):5-15.
79. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell death and differentiation.* 2017;24(8):1380-9.
80. Hague A, Paraskeva C. Apoptosis and disease: a matter of cell fate. *Cell Death & Differentiation.* 2004;11(12):1366-72.
81. Hetz C, Glimcher L. The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology. *Trends Cell Biol.* 2008;18(1):38-44.
82. Csipo I, Montel AH, Hobbs JA, Morse PA, Brahmi Z. Effect of Fas+ and Fas- Target Cells on the Ability of NK Cells to Repeatedly Fragment DNA and Trigger Lysis via the Fas Lytic Pathway. *Apoptosis.* 1998;3(2):105-14.
83. Levine B, Yoshimori T, Deretic V. *Autophagy in Infection and Immunity: Springer Berlin Heidelberg;* 2009.
84. Syntichaki P, Tavernarakis N. Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep.* 2002;3(7):604-9.
85. Lehmanmckeeman L. Biochemical and Molecular Basis of Toxicity. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. 2013:15-38.
86. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J.* 1995;307 (Pt 1)(Pt 1):93-8.
87. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585-621.
88. Hayat MA. *Tumor Dormancy, Quiescence, and Senescence, Volume 1.* éd. 1 ed. **Dordrecht (DOR): Springer;** 2013.
89. Campisi J, Robert L. Cell senescence: role in aging and age-related diseases. *Interdiscip Top Gerontol.* 2014;39:45-61.
90. Ovadya Y, Krizhanovsky V. Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies. *Biogerontology.* 2014;15(6):627-42.
91. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell.* 2008;134(4):657-67.
92. Prattichizzo F, Bonafè M, Olivieri F, Franceschi C. Senescence associated macrophages and "macroph-aging": are they pieces of the same puzzle? *Aging (Albany NY).* 2016;8(12):3159-60.
93. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature.* 2007;445(7128):656-60.
94. Binet F, Cagnone G, Crespo-Garcia S, Hata M, Neault M, Dejda A, et al. Neutrophil extracellular traps target senescent vasculature for tissue remodeling in retinopathy. *Science.* 2020;369(6506).
95. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.* 2015;21(12):1424-35.
96. Gomes MJ, Martinez PF, Pagan LU, Damatto RL, Cezar MDM, Lima ARR, et al. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget.* 2017;8(12):20428-40.
97. Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial Cell Senescence in Human Atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(13):1541-4.

98. Anderson R, Lagnado A, Maggiorani D, Walaszczyk A, Dookun E, Chapman J, et al. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *EMBO J*. 2019;38(5).
99. Shimizu I, Minamino T. Cellular senescence in cardiac diseases. *Journal of Cardiology*. 2019;74(4):313-9.
100. Gude NA, Broughton KM, Firouzi F, Sussman MA. Cardiac ageing: extrinsic and intrinsic factors in cellular renewal and senescence. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):523-42.
101. Farr JN, Fraser DG, Wang H, Jaehn K, Ogrodnik MB, Weivoda MM, et al. Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment. *J Bone Miner Res*. 2016;31(11):1920-9.
102. Mishima K, Handa JT, Aotaki-Keen A, Luty GA, Morse LS, Hjelmeland LM. Senescence-associated beta-galactosidase histochemistry for the primate eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1999;40(7):1590-3.
103. Kozlowski MR. RPE cell senescence: A key contributor to age-related macular degeneration. *Medical Hypotheses*. 2012;78(4):505-10.
104. Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, et al. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Sci Transl Med*. 2014;6(231):231ra47-ra47.
105. Sturmlechner I, Durik M, Sieben CJ, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in renal ageing and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2017;13(2):77-89.
106. Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, et al. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(9):e45069-e.
107. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757-72.
108. Song P, An J, Zou M-H. Immune Clearance of Senescent Cells to Combat Ageing and Chronic Diseases. *Cells*. 2020;9(3):671.
109. Prata LGPL, Ovsyannikova IG, Tchkonina T, Kirkland JL. Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Semin Immunol*. 2018;40:101275-.
110. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonina T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011;479(7372):232-6.
111. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):704-7.
112. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*. 1994;54(5):1169-74.
113. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993;75(4):805-16.
114. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):436-53.
115. Campisi J. Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell*. 1996;84(4):497-500.
116. Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*. 1990;249(4973):1129-33.
117. Hoare M, Narita M. NOTCH and the 2 SASPs of senescence. *Cell Cycle*. 2017;16(3):239-40.
118. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(7):397-408.

119. Hwang ES, Yoon G, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66(15):2503-24.
120. Yang HS, Hinds PW. Increased ezrin expression and activation by CDK5 coincident with acquisition of the senescent phenotype. *Mol Cell*. 2003;11(5):1163-76.
121. Li Z, Chen X, Xie Y, Shi S, Feng Z, Fu B, et al. Expression and significance of integrin-linked kinase in cultured cells, normal tissue, and diseased tissue of aging rat kidneys. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(10):984-96.
122. Mamuya FA, Cano-Peñalver JL, Li W, Rodriguez Puyol D, Rodriguez Puyol M, Brown D, et al. ILK and cytoskeletal architecture: an important determinant of AQP2 recycling and subsequent entry into the exocytotic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;311(6):F1346-f57.
123. Druelle C, Drullion C, Deslé J, Martin N, Saas L, Cormenier J, et al. ATF6 α regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget*. 2016;7(42):67699-715.
124. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(2):89-102.
125. Juers DH, Matthews BW, Huber RE. LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Sci*. 2012;21(12):1792-807.
126. Childs BG, Bussian TJ, Baker DJ. Cellular Identification and Quantification of Senescence-Associated β -Galactosidase Activity In Vivo. *Methods Mol Biol*. 2019;1896:31-8.
127. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(20):9363-7.
128. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000;113 (Pt 20):3613-22.
129. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*. 2000;113 (Pt 20):3613-22.
130. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006;5(2):187-95.
131. Hoare M, Ito Y, Kang T-W, Weekes MP, Matheson NJ, Patten DA, et al. NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nat Cell Biol*. 2016;18(9):979-92.
132. Morreau H, Bonten E, Zhou XY, D'Azzo A. Organization of the gene encoding human lysosomal beta-galactosidase. *DNA Cell Biol*. 1991;10(7):495-504.
133. Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, van der Horst GT, d'Azzo A. Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein. *J Biol Chem*. 1989;264(34):20655-63.
134. van der Spoel A, Bonten E, d'Azzo A. Processing of lysosomal beta-galactosidase. The C-terminal precursor fragment is an essential domain of the mature enzyme. *J Biol Chem*. 2000;275(14):10035-40.
135. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*. 2012;130(8):1715-25.

136. Velicescu M, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Tsai YC, Nguyen CT, Jones PA. Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62(8):2378-84.
137. So A-Y, Jung J-W, Lee S, Kim H-S, Kang K-S. DNA methyltransferase controls stem cell aging by regulating BMI1 and EZH2 through microRNAs. *PLoS One.* 2011;6(5):e19503-e.
138. Agger K, Cloos PA, Rudkjaer L, Williams K, Andersen G, Christensen J, et al. The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev.* 2009;23(10):1171-6.
139. Wang X, Feng Y, Pan L, Wang Y, Xu X, Lu J, et al. The proximal GC-rich region of p16INK4a gene promoter plays a role in its transcriptional regulation. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2007;301(1):259-66.
140. Passegué E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J.* 2000;19(12):2969-79.
141. Zhu D, Xu G, Ghandhi S, Hubbard K. Modulation of the expression of p16INK4a and p14ARF by hnRNP A1 and A2 RNA binding proteins: implications for cellular senescence. *J Cell Physiol.* 2002;193(1):19-25.
142. Al-Khalaf HH, Aboussekhra A. p16INK4A Positively Regulates p21WAF1 Expression by suppressing AUF1-dependent mRNA decay. *PLoS One.* 2013;8(7):e70133.
143. Ben-Saadon R, Fajerman I, Ziv T, Hellman U, Schwartz AL, Ciechanover A. The tumor suppressor protein p16(INK4a) and the human papillomavirus oncoprotein-58 E7 are naturally occurring lysine-less proteins that are degraded by the ubiquitin system. Direct evidence for ubiquitination at the N-terminal residue. *J Biol Chem.* 2004;279(40):41414-21.
144. McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Peters G. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Current Biology.* 1998;8(6):351-4.
145. Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, Massagué J. TGF β influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol.* 2001;3(4):400-8.
146. Sandhu C, Garbe J, Bhattacharya N, Daksis J, Pan CH, Yaswen P, et al. Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 1997;17(5):2458-67.
147. Aesoy R, Gradin K, Aasrud KS, Hoivik EA, Ruas JL, Poellinger L, et al. Regulation of CDKN2B expression by interaction of Arnt with Miz-1 - a basis for functional integration between the HIF and Myc gene regulatory pathways. *Molecular Cancer.* 2014;13(1):54.
148. Feng XH, Lin X, Derynck R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J.* 2000;19(19):5178-93.
149. Anerillas C, Abdelmohsen K, Gorospe M. Regulation of senescence traits by MAPKs. *Geroscience.* 2020;42(2):397-408.
150. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research.* 2002;12(1):9-18.
151. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research.* 2012;66(2):105-43.
152. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997;88(5):593-602.

153. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* 1998;12(19):2997-3007.
154. Bartkova J, Rezaei N, Lontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 2006;444(7119):633-7.
155. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 2006;444(7119):638-42.
156. Mallette FA, Gaumont-Leclerc M-F, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* 2007;21(1):43-8.
157. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9):a011189-a.
158. Minamino T, Miyauchi H, Tateno K, Kunieda T, Komuro I. Akt-induced cellular senescence: implication for human disease. *Cell Cycle.* 2004;3(4):449-51.
159. Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair.* 2016;42:63-71.
160. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology.* 2018;28(6):436-53.
161. Jung Y-S, Qian Y, Chen X. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal.* 2010;22(7):1003-12.
162. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell.* 1995;6(4):387-400.
163. Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules.* 2020;10(3):420.
164. Chen QM, Liu J, Merrett JB. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *The Biochemical journal.* 2000;347(Pt 2):543-51.
165. Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.* 2002;179(1):1-14.
166. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(6):400-14.
167. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* 1999;246(2):280-9.
168. Xu H, Wang Z, Jin S, Hao H, Zheng L, Zhou B, et al. Dux4 induces cell cycle arrest at G1 phase through upregulation of p21 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(1):235-40.
169. Jung P, Mennis A, Mayr D, Hermeking H. AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(39):15046-51.
170. Elston R, Inman GJ. Crosstalk between p53 and TGF- β Signalling. *J Signal Transduct.* 2012;2012:294097.
171. Slee EA, Lu X. The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage. *Toxicol Lett.* 2003;139(2-3):81-7.

172. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013;5 Suppl 5(Suppl 5):S479-90.
173. Hammerman PS, Lawrence MS, Voet D, Jing R, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012;489(7417):519-25.
174. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511(7511):543-50.
175. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 2005;436(7051):720-4.
176. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* 1998;12(19):3008-19.
177. Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene.* 1998;16(9):1113-23.
178. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1378(2):F115-77.
179. Hsu J, Sage J. Novel functions for the transcription factor E2F4 in development and disease. *Cell Cycle.* 2016;15(23):3183-90.
180. Aksoy O, Chicas A, Zeng T, Zhao Z, McCurrach M, Wang X, et al. The atypical E2F family member E2F7 couples the p53 and RB pathways during cellular senescence. *Genes Dev.* 2012;26(14):1546-57.
181. Hernandez-Segura A, de Jong TV, Melov S, Guryev V, Campisi J, Demaria M. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol.* 2017;27(17):2652-60.e4.
182. Davalos AR, Coppe J-P, Campisi J, Desprez P-Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(2):273-83.
183. Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118.
184. Toso A, Revandkar A, Di Mitri D, Guccini I, Proietti M, Sarti M, et al. Enhancing Chemotherapy Efficacy in Pten-Deficient Prostate Tumors by Activating the Senescence-Associated Antitumor Immunity. *Cell Reports.* 2014;9(1):75-89.
185. Saint-Germain E, Lopes-Paciencia S, Rowell M-C, Ferbeyre G, Fernández Ruiz A, Kalegari P. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine.* 2019;117:15-22.
186. Hayakawa T, Iwai M, Aoki S, Takimoto K, Maruyama M, Maruyama W, et al. SIRT1 suppresses the senescence-associated secretory phenotype through epigenetic gene regulation. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116480-e.
187. Takahashi A, Imai Y, Yamakoshi K, Kuninaka S, Ohtani N, Yoshimoto S, et al. DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C(Cdh1) in senescent cells. *Mol Cell.* 2012;45(1):123-31.
188. Chen H, Ruiz PD, McKimpson WM, Novikov L, Kitsis RN, Gamble MJ. MacroH2A1 and ATM Play Opposing Roles in Paracrine Senescence and the Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Molecular cell.* 2015;59(5):719-31.

189. Laberge R-M, Sun Y, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol.* 2015;17(8):1049-61.
190. Herranz N, Gallage S, Mellone M, Wuestefeld T, Klotz S, Hanley CJ, et al. mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat Cell Biol.* 2015;17(9):1205-17.
191. Alimbetov D, Davis T, Brook AJ, Cox LS, Faragher RG, Nurgozhin T, et al. Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology.* 2016;17(2):305-15.
192. Burzynski LC, Humphry M, Bennett MR, Clarke MC. Interleukin-1 α Activity in Necrotic Endothelial Cells Is Controlled by Caspase-1 Cleavage of Interleukin-1 Receptor-2: IMPLICATIONS FOR ALLOGRAFT REJECTION. *J Biol Chem.* 2015;290(41):25188-96.
193. Teo YV, Rattanavirotkul N, Olova N, Salzano A, Quintanilla A, Tarrats N, et al. Notch Signaling Mediates Secondary Senescence. *Cell reports.* 2019;27(4):997-1007.e5.
194. Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Fripiat C, Mazarati JB, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(3):361-73.
195. Wieder T, Brenner E, Braumüller H, Bischof O, Röcken M. Cytokine-induced senescence for cancer surveillance. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(2):357-65.
196. Matos L, Gouveia A, Almeida H. Copper ability to induce premature senescence in human fibroblasts. *Age (Dordr).* 2012;34(4):783-94.
197. Welford SM, Giaccia AJ. Hypoxia and senescence: the impact of oxygenation on tumor suppression. *Mol Cancer Res.* 2011;9(5):538-44.
198. Toussaint O, Raes M, Remacle J. Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. *Mech Ageing Dev.* 1991;61(1):45-64.
199. Duan J, Duan J, Zhang Z, Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2005;37(7):1407-20.
200. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(20):1536-46.
201. Wu PC, Wang Q, Grobman L, Chu E, Wu DY. Accelerated cellular senescence in solid tumor therapy. *Exp Oncol.* 2012;34(3):298-305.
202. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer.* 2008;8(7):512-22.
203. Liu K, Zheng M, Lu R, Du J, Zhao Q, Li Z, et al. The role of CDC25C in cell cycle regulation and clinical cancer therapy: a systematic review. *Cancer Cell Int.* 2020;20:213-.
204. Sørensen CS, Syljuåsen RG, Falck J, Schroeder T, Rönstrand L, Khanna KK, et al. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell.* 2003;3(3):247-58.
205. Mallette FA, Gaumont-Leclerc MF, Ferbeyre G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* 2007;21(1):43-8.
206. Dimauro T, David G. Ras-induced senescence and its physiological relevance in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10(8):869-76.

207. Alimonti A, Nardella C, Chen Z, Clohessy JG, Carracedo A, Trotman LC, et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(3):681-93.
208. Voncken JW, Niessen H, Neufeld B, Rennefahrt U, Dahlmans V, Kubben N, et al. MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5178-87.
209. Lodish H BA, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology* [En ligne]. New York (NY): W. H. Freeman; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21528/>.
210. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(6):711-23.
211. Guha M, Avadhani NG. Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. *Mitochondrion*. 2013;13(6):577-91.
212. Imai S-i, Guarente L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends in cell biology*. 2014;24(8):464-71.
213. Wiley Christopher D, Velarde Michael C, Lecot P, Liu S, Sarnoski Ethan A, Freund A, et al. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*. 2016;23(2):303-14.
214. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell*. 2012;23(11):2066-75.
215. Davalos AR, Kawahara M, Malhotra GK, Schaum N, Huang J, Ved U, et al. p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *Journal of Cell Biology*. 2013;201(4):613-29.
216. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(9):729-40.
217. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine*. 2016;8(1):69.
218. Jiang H, Ju Z, Rudolph KL. Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriatr*. 2007;40(5):314-24.
219. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*. 2003;426(6963):194-8.
220. Kang TW, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*. 2011;479(7374):547-51.
221. Dodig S, Čepelak I, Pavić I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochem Med (Zagreb)*. 2019;29(3):030501-.
222. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(7):482-96.
223. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 2011;479(7372):232-6.
224. Roos CM, Zhang B, Palmer AK, Ogrodnik MB, Pirtskhalava T, Thalji NM, et al. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*. 2016;15(5):973-7.

225. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, et al. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature medicine*. 2018;24(8):1246-56.
226. Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonja T, Tiniakos D, Wilson CL, Lahat A, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature Communications*. 2017;8(1):15691.
227. He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. *Cell*. 2017;169(6):1000-11.
228. Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg*. 2004;187(5a):65s-70s.
229. Telgenhoff D, Shroot B. Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. *Cell Death Differ*. 2005;12(7):695-8.
230. Jun J-I, Lau LF. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging*. 2010;2(9):627-31.
231. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011;192(4):547-56.
232. Yun MH, Davaapil H, Brockes JP. Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *Elife*. 2015;4.
233. Abnave P, Ghigo E. Role of the immune system in regeneration and its dynamic interplay with adult stem cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2019;87:160-8.
234. Mosteiro L, Pantoja C, Alcazar N, Marión RM, Chondronasiou D, Rovira M, et al. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science*. 2016;354(6315):aaf4445.
235. Ritschka B, Storer M, Mas A, Heinzmann F, Ortells MC, Morton JP, et al. The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev*. 2017;31(2):172-83.
236. Govindan J, Iovine MK. Dynamic remodeling of the extra cellular matrix during zebrafish fin regeneration. *Gene Expression Patterns*. 2015;19(1):21-9.
237. Yu Q, Yun MH. Interconnection Between Cellular Senescence, Regeneration and Ageing in Salamanders. In: Muñoz-Espin D, Demaria M, editors. *Senolytics in Disease, Ageing and Longevity*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 43-62.
238. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*. 2013;155(5):1104-18.
239. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*. 2013;155(5):1119-30.
240. Villiard É, Denis J-F, Hashemi FS, Igelmann S, Ferbeyre G, Roy S. Senescence gives insights into the morphogenetic evolution of amniotes. *Biology Open*. 2017;6(6):bio.025809.
241. Rhinn M, Ritschka B, Keyes WM. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development*. 2019;146(20):dev151837.
242. Shahrier Amin MD, Bonsib SM. 1 - Nonneoplastic Diseases of the Kidney. In: Cheng L, MacLennan GT, Bostwick DG, editors. *Urologic Surgical Pathology (Fourth Edition)*. Philadelphia: Elsevier; 2020. p. 1-82.e12.
243. Ekdale EG. Form and function of the mammalian inner ear. *J Anat*. 2016;228(2):324-37.
244. Roy S, Gatién S. Regeneration in axolotls: a model to aim for! *Exp Gerontol*. 2008;43(11):968-73.

245. Repesh LA, Oberpriller JC. Scanning electron microscopy of epidermal cell migration in wound healing during limb regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Am J Anat*. 1978;151(4):539-55.
246. Gardiner DM, Endo T, Bryant SV. The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13(5):345-52.
247. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81.
248. Tassava RA, Mescher AL. The roles of injury, nerves, and the wound epidermis during the initiation of amphibian limb regeneration. *Differentiation*. 1975;4(1):23-4.
249. Gardiner DM, Muneoka K, Bryant SV. The migration of dermal cells during blastema formation in axolotls. *Dev Biol*. 1986;118(2):488-93.
250. Muneoka K, Fox WF, Bryant SV. Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls. *Dev Biol*. 1986;116(1):256-60.
251. Odelberg SJ. Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anat Rec B New Anat*. 2005;287(1):25-35.
252. Schreckenber GM, Jacobson AG. Normal stages of development of the axolotl. *Ambystoma mexicanum*. *Dev Biol*. 1975;42(2):391-400.
253. Armstrong JB, Malacinski GM. *Developmental Biology of the Axolotl*: Oxford University Press; 1989.
254. Harrison RG. *Organization and development of the embryo*. New Haven: Yale University Press; 1969.
255. James EL, Michalek RD, Pitiyage GN, de Castro AM, Vignola KS, Jones J, 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*. 2015;14(4):1854-71.
256. Sabbatinelli J, Prattichizzo F, Olivieri F, Procopio AD, Rippo MR, Giuliani A. Where Metabolism Meets Senescence: Focus on Endothelial Cells. *Frontiers in Physiology*. 2019;10(1523).
257. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D. ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:3565127.
258. Youssef J, Badr M. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Inflammation Control. *J Biomed Biotechnol*. 2004;2004(3):156-66.
259. Gan Q, Huang J, Zhou R, Niu J, Zhu X, Wang J, et al. PPAR γ accelerates cellular senescence by inducing p16^{INK4} expression in human diploid fibroblasts. *Journal of Cell Science*. 2008;121(13):2235-45.
260. Martínez-Zamudio RI, Roux P-F, de Freitas JANLF, Robinson L, Doré G, Sun B, et al. AP-1 imprints a reversible transcriptional programme of senescent cells. *Nat Cell Biol*. 2020;22(7):842-55.
261. Wang Z, Li Y, Wu D, Yu S, Wang Y, Leung Chan F. Nuclear receptor HNF4 α performs a tumor suppressor function in prostate cancer via its induction of p21-driven cellular senescence. *Oncogene*. 2020;39(7):1572-89.
262. Vagapova ER, Spirin PV, Lebedev TD, Prassolov VS. The Role of TAL1 in Hematopoiesis and Leukemogenesis. *Acta Naturae*. 2018;10(1):15-23.

263. Valdez MR, Richardson JA, Klein WH, Olson EN. Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4. *Dev Biol.* 2000;219(2):287-98.
264. Cleveland SM, Smith S, Tripathi R, Mathias EM, Goodings C, Elliott N, et al. Lmo2 induces hematopoietic stem cell-like features in T-cell progenitor cells prior to leukemia. *Stem Cells.* 2013;31(5):882-94.
265. Lee J, Kim SC, Kim SJ, Lee H, Jung EJ, Jung SH, et al. Differentiation of human adipose tissue-derived stem cells into aggregates of insulin-producing cells through the overexpression of pancreatic and duodenal homeobox gene-1. *Cell Transplant.* 2013;22(6):1053-60.
266. Martínez-Cué C, Rueda N. Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:16-.
267. Zhang P, Kishimoto Y, Grammatikakis I, Gottimukkala K, Cutler RG, Zhang S, et al. Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci.* 2019;22(5):719-28.
268. Kwon SM, Hong SM, Lee YK, Min S, Yoon G. Metabolic features and regulation in cell senescence. *BMB Rep.* 2019;52(1):5-12.
269. Wiley CD, Liu S, Limbad C, Zawadzka AM, Beck J, Demaria M, et al. SILAC Analysis Reveals Increased Secretion of Hemostasis-Related Factors by Senescent Cells. *Cell reports.* 2019;28(13):3329-37.e5.
270. Bigan E, Sasidharan Nair S, Lejeune FX, Fragnaud H, Parmentier F, Mégret L, et al. Genetic cooperativity in multi-layer networks implicates cell survival and senescence in the striatum of Huntington's disease mice synchronous to symptoms. *Bioinformatics.* 2020;36(1):186-96.
271. Voisin J, Farina F, Naphade S, Fontaine M, Tshilenge K-T, Galicia Aguirre C, et al. FOXO3 targets are reprogrammed as Huntington's disease neural cells and striatal neurons face senescence with p16(INK4a) increase. *Aging cell.* 2020;19(11):e13226-e.
272. Machiela E, Southwell AL. Biological Aging and the Cellular Pathogenesis of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis.* 2020;9(2):115-28.
273. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* 1995;55(11):2284-92.
274. Ryu SJ, Oh YS, Park SC. Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ.* 2007;14(5):1020-8.
275. Xu SQ, El-Deiry WS. p21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269(1):179-90.
276. James EL, Michalek RD, Pitiyage GN, de Castro AM, Vignola KS, Jones J, 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. *Journal of Proteome Research.* 2015;14(4):1854-71.
277. Chapman J, Fielder E, Passos JF. Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Lett.* 2019;593(13):1566-79.
278. Korolchuk VI, Miwa S, Carroll B, von Zglinicki T. Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine.* 2017;21:7-13.
279. Wang Y, Shen J, Chen Y, Liu H, Zhou H, Bai Z, et al. PINK1 protects against oxidative stress induced senescence of human nucleus pulposus cells via regulating mitophagy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(2):406-14.

280. Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschênes-Simard X, Ferbeyre G. Mitochondrial Dysfunction Contributes to Oncogene-Induced Senescence. *Mol Cell Biol*. 2009;29(16):4495.
281. Wrana JL. Signaling by the TGF β superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(10):a011197-a.
282. Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, et al. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J*. 1997;16(17):5353-62.
283. Wang W, Zhou G, Hu MC, Yao Z, Tan TH. Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J Biol Chem*. 1997;272(36):22771-5.
284. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*. 2009;19(1):128-39.
285. Zhang Y, Alexander PB, Wang X-F. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(4):a022145.
286. Robson CN, Gnanapragasam V, Byrne RL, Collins AT, Neal DE. Transforming growth factor-beta1 up-regulates p15, p21 and p27 and blocks cell cycling in G1 in human prostate epithelium. *J Endocrinol*. 1999;160(2):257-66.
287. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(4):234-48.
288. Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology*. 2008;47(6):2059-67.
289. Lewis DA, Yi Q, Travers JB, Spandau DF. UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53. *Mol Biol Cell*. 2008;19(4):1346-53.
290. Vanni S, Moda F, Zattoni M, Bistaffa E, De Cecco E, Rossi M, et al. Differential overexpression of SERPINA3 in human prion diseases. *Scientific Reports*. 2017;7(1):15637.
291. Françoise Schoentgen SJ. PEBP1/RKIP: from multiple functions to a common role in cellular processes. Paris, France: HAL-02879224; 2018.
292. Noh HS, Hah Y-S, Zada S, Ha JH, Sim G, Hwang JS, et al. PEBP1, a RAF kinase inhibitory protein, negatively regulates starvation-induced autophagy by direct interaction with LC3. *Autophagy*. 2016;12(11):2183-96.
293. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(11):1978-86.
294. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813(11):1978-86.
295. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23-63.
296. Bousoik E, Montazeri Aliabadi H. "Do We Know Jack" About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Frontiers in Oncology*. 2018;8(287).
297. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*. 2010;24(4):679-86.
298. Canadian Organ Replacement. Facing the facts [En ligne]. Montréal: Kidney foundation; 2020 [cited 2020 28 Déc]. Available from: <https://kidney.ca/KFOC/media/images/PDFs/Facing-the-Facts-2020.pdf>.

299. Denis JF, Lévesque M, Tran SD, Camarda AJ, Roy S. Axolotl as a Model to Study Scarless Wound Healing in Vertebrates: Role of the Transforming Growth Factor Beta Signaling Pathway. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013;2(5):250-60.
300. Takeo M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(1):a023267-a.
301. Illingworth CM. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *J Pediatr Surg*. 1974;9(6):853-58.
302. Chen Y, Love NR, Amaya E. Tadpole tail regeneration in *Xenopus*. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(3):617-23.

9 Annexe 1 : Effet de Locostatin sur la régénération de la patte de l'axolotl

Présentation

L'avancée médicale sur la médecine régénératrice a pris beaucoup d'ampleur durant les dernières années. En effet, la découverte du potentiel régénératif des cellules souches embryonnaires a été une percée qui a donné beaucoup d'espoir à la thérapie cellulaire. L'administration de ces cellules chez l'humain peut faciliter le combat contre les infections et réparer des blessures ou des organes défectueux. Toutefois, ce superpouvoir fait l'objet de plusieurs controverses et d'enjeux éthiques. Ainsi, l'utilisation des modèles animaux qui se régénèrent de façon naturelle pour comprendre les événements de signalisation cellulaire qui sont absents chez l'humain est une façon de contourner les questions éthiques et de répondre aux besoins de la thérapie régénérative.

Le pouvoir régénératif est inégalement distribué dans le règne animal. Il existe plusieurs modèles qui possèdent la capacité (limitée ou complète) de régénérer. Chez les invertébrés, le ver planaire, l'hydre, le criquet, le concombre de mer, les échinodermes et le lancelet ont un certain pouvoir de régénération(299). Chez les vertébrés, les humains sont constamment en train de régénérer (ou plutôt renouveler) leurs cellules sanguines et les cellules de leur peau(300). Toutefois, la régénération d'un organe complexe est un privilège que tous les organismes ne possèdent pas. Certains organismes ne sont aptes à régénérer que certains organes ou tissus; d'autres perdent complètement ce pouvoir à l'âge adulte. Ceci est dû à une diminution des cellules souches totipotentes et à une diminution de la plasticité cellulaire au fil de leur vie. Chez l'humain, le pouvoir de régénération se limite à certains organes, et ce jusqu'à un certain âge(301). Si on ampute le doigt d'un jeune adulte à la dernière phalange, celui-ci a le pouvoir de régénérer son doigt de façon spectaculaire(301). De façon plus surprenante, l'humain est également apte à régénérer une partie de son foie et de ses canaux biliaires. Cette régénération est de type compensatoire (hypertrophie compensatoire), où la fonction et la masse sont régénérées, mais

la morphologie de l'organe est perdue. Cela démontre qu'il existe des imperfections dans la façon dont l'organisme essaye de régénérer.

Un autre exemple de vertébré avec un potentiel de régénération limité est le xénope (grenouille). Cet organisme est capable de régénérer ses membres seulement à l'état larvaire (têtard). Il perd cette capacité lorsqu'il passe de têtard à grenouille adulte(302).

Les amphibiens, plus précisément les axolotls, ont un pouvoir de régénération fascinant(299). Ils sont capables de régénérer parfaitement et sans cicatrisation la plupart des parties de leur corps, tels que les membres inférieurs et postérieurs, la queue, le cerveau, le cœur et les poumons, et ce tout au long de leur vie(299) (Figure 13). Bien que ce ne soit pas un mammifère, la physiologie de cet animal est très proche de celle de l'humain.

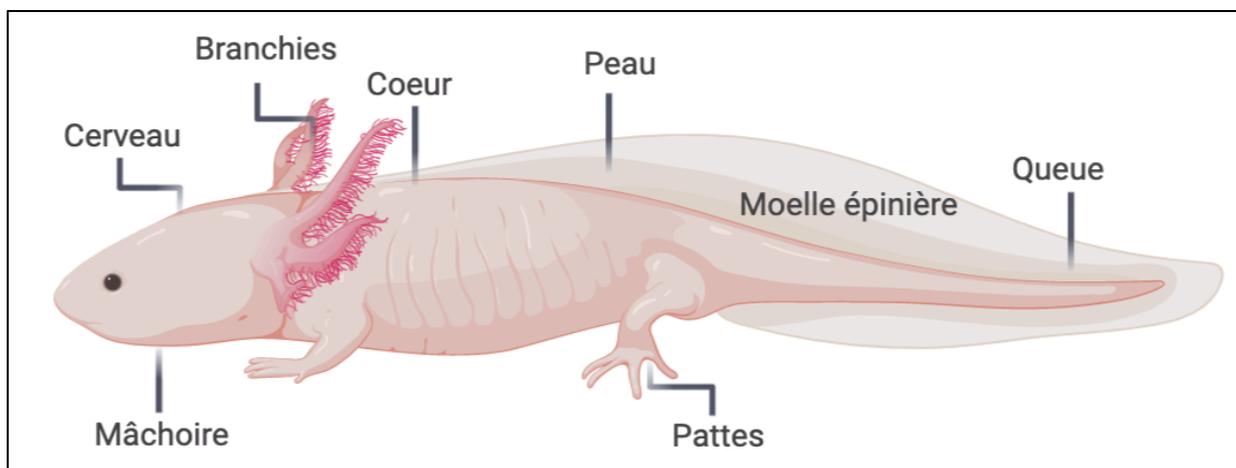


Figure 16- Les différentes parties de l'axolotl adulte avec le potentiel de régénérer.

Pour toute raison qui soit accidentelle ou nature, le cerveau, les branchies, le cœur, la peau, la moelle épinière, la queue, la mâchoire et les pattes d'axolotl régénèrent lorsque nécessaire.

Tel que mentionné dans l'introduction, la sénescence cellulaire joue également un rôle dans la régénération des membres de la salamandre. En effet, les études ont démontré la présence de sénescence dans les tissus normaux et en régénération de la salamandre *in vivo*. Plus spécifiquement, une induction de l'activité de Sa β G et une diminution de l'incorporation de BrdU avaient été détectées dans les membres en régénération au niveau du plan d'amputation (au

niveau du cartilage et du muscle) et dans le blastème (où se trouvent les fibroblastes, les cellules de type monocyte et les glandes épidermiques). L'expression de Sa β G, en plus d'être spatiospécifique, est spécifique aux étapes intermédiaires de la régénération (mi-blastème et palette). Dans l'étude sur la sénescence développementale, nous avons identifié PEBP1 comme un gène important pour l'activation de la sénescence et le développement du pronéphros. Notre hypothèse est que PEBP1 est impliqué dans l'inhibition de la voie MAPK/ERK sur les cellules à proximité des cellules sénescents. Sachant que l'axolotl est l'un des rares organismes capables de régénérer parfaitement leurs membres, nous avons voulu savoir si l'inhibition de PEBP1 par la Locostatin avait également un effet sur la régénération des membres.

Résultats

La Locostatin aux concentrations 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M n'a aucun effet sur la régénération de la patte de l'axolotl

Comme la Locostatin n'a jamais été utilisée chez des animaux de 4-5 cm, différentes concentrations de Locostatin ont été testées, soit 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M, diluées dans 5 ml de 20 % de la solution Holtfreter pour chaque animal. Les solutions ont été changées quotidiennement à la même heure et tous les traitements ont été commencés au moment de l'amputation. Les images ont été prises lorsque les animaux-contrôle (DMSO) atteignaient une étape spécifique de la régénération. La taille de chaque animal a été mesurée avant le premier traitement et après le dernier, afin de s'assurer que la drogue n'avait pas d'effet sur le développement de l'animal. Les résultats n'ont démontré aucun effet de la Locostatin à ces concentrations sur la régénération de la patte de l'axolotl. En effet, les pattes-contrôle se sont régénérées en même temps que celles des animaux traités (Figure 14). La Locostatin aux concentrations 1 μ M, 5 μ M et 10 μ M n'a non seulement pas eu d'effet inhibiteur sur la régénération, mais elle n'a pas non plus retardé celle-ci. En somme, ces résultats ne sont pas suffisants pour confirmer ou infirmer l'effet de la Locostatin sur la régénération. D'autres tests avec des concentrations de Locostatin plus élevées que 10 μ M, en parallèle avec des tests d'histologie et d'hybridation *in situ* pour des marqueurs de sénescence, devraient être effectués, mais par manque de ressource et de temps, cette expérience a été abandonnée.

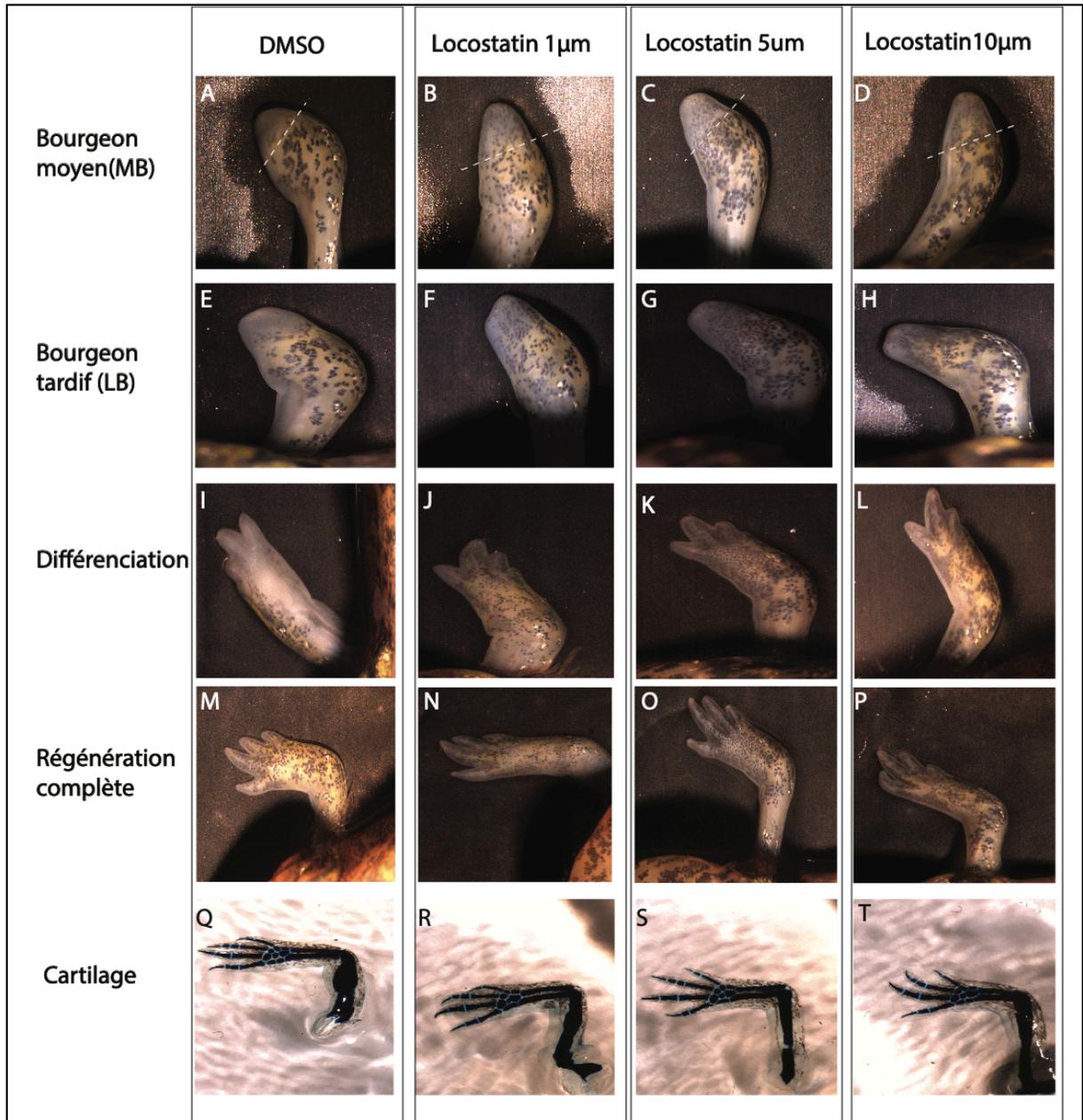


Figure 17- Effets de la Locostatin sur la régénération de la patte de l'axolotl.

(A,E,I,M,Q) Images de membres régénérés traités avec DMSO (Contrôle) (B,F,J,N,R) Locostatin à 1µM (C,G,K,O,S) 5 µM et (D,H,L,P) 10 µM. Les membres sont à l'étape (A-D) bourgeon moyen (*Medium bud*), (E-H) bourgeon tardif (*Late Bud*) et (I-L) différenciation. (M-P) La régénération est est complétée. (Q-T) Coloration au bleu Victoria pour le cartilage. Les lignes pointées représentent le site d'amputation. Les photos ont été prises sur un stéréoscope Leica MZ16F avec une caméra Lumenara Inifinity2. N=3

10 Annexe 2 : Résultats complémentaires

L'analyse globale des variations du transcriptome dans les cellules sénescents du pronéphros par PANTHER, présentée à la section résultats (Figure 1), a démontré 152 gènes qui codent pour des protéines membranaires et 170 pour des protéines spécifiques aux organites (Figure 1 C). Une analyse plus poussée a été réalisée afin de savoir de quels organites il est question. Les résultats ont démontré que la plupart des protéines sont spécifiques aux vacuoles (55), au noyau (52), au réticulum endoplasmique (32), à l'appareil de Golgi (15) et à la mitochondrie (12).

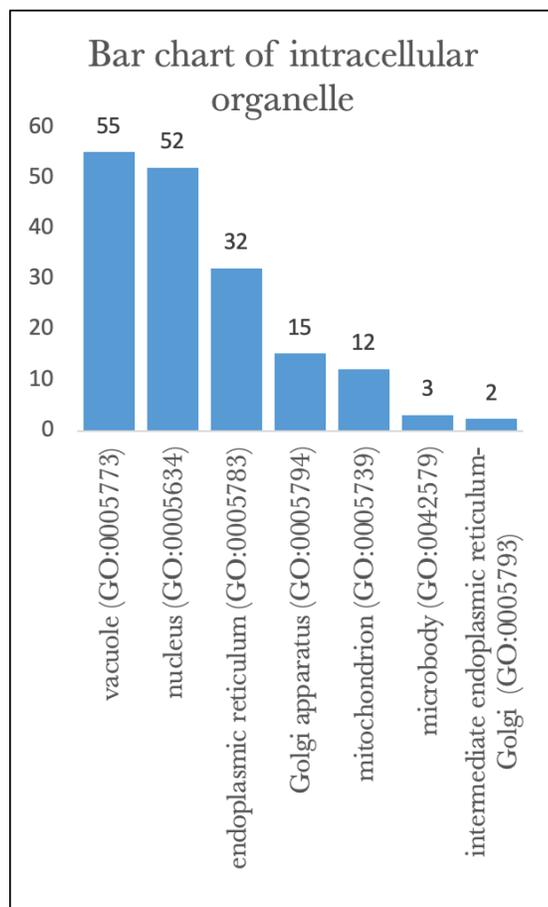


Figure 18- Analyse PANTHER de la classification compartimentale des gènes significativement induits dans le pronéphros.

Le graphique démontre le nombre de gènes identifiés pour chaque compartiment cellulaire. Le nom de chaque compartiment avec son identité GO est inscrit sur l'axe x et le nombre des gènes en y, avec le nombre exact en haut de chaque barre.

Tableau 1 - Liste complète des facteurs de transcription significative identifiés par EnrichR.

	Nom	Valeur p	Risques relatifs	Résultats combinés
1	ONECUT1	0.00007627	8.97	85.08
8	PPARA	0.001182	3.31	22.33
10	FOXO1	0.001751	2.93	18.6
7	SREBF1	0.002018	3.72	23.1
9	HNF4	0.002834	3.19	18.72
3	FOXA1	0.0035	5.74	32.48
16	FOXA2	0.005626	2.87	14.88
2	PITX1	0.005747	7.18	37.04
6	SREBF2	0.007373	4.79	23.5
4	CEBPB	0.009538	6.15	28.63
5	HEY1	0.009538	6.15	28.63
13	SREBF2	0.01045	3.59	16.37
12	ATF6	0.01333	4.1	17.71
17	GATA4	0.01581	3.26	13.53
14	JUNB	0.0172	3.83	15.56
30	EZH2	0.01925	2.51	9.93
11	NKX2-5	0.02061	4.79	18.58
34	PPARG	0.02128	2.3	8.84
15	GATA2	0.02794	4.31	15.41
25	PAX6	0.03646	3.92	12.97
26	SOX17	0.03646	3.92	12.97
31	SMARCA4	0.03915	3.02	9.79
47	GATA1	0.04285	2.02	6.35
32	AR	0.05698	3.31	9.49
33	FLI1	0.05698	3.31	9.49

Tableau 2 - Liste des 50 premiers facteurs de transcription significative identifiés par DiRE.

#	Facteur de transcription	Occurrence (%)	Importance
1	HNF4	23.84	0.16689
2	TAL1	10.93	0.14205
3	TAL1ALPHA E47	7.95	0.13311
4	MYOGNF1	5.3	0.12351
5	HNF3ALPHA	5.96	0.10691
6	LMO2COM	9.93	0.09959
7	IPF1	7.95	0.09139
8	NANOG	4.64	0.08142
9	RFX1	9.6	0.07802
10	GATA1	13.25	0.07285
11	NKX25	8.28	0.07036
12	TCF11	3.97	0.06954
13	PBX1	9.6	0.06722
14	GATA2	8.28	0.06416
15	DR1	6.95	0.05911
16	MEF2	8.28	0.05795
17	GATA6	3.31	0.0507
18	PPARG	8.61	0.04735
19	STAT1	7.28	0.04473
20	TCF4	5.96	0.04172
21	HNF4_DR1	7.28	0.04007
22	E47	5.63	0.0394
23	MOVOB	3.64	0.03801
24	LFA1	5.96	0.03725
25	POU3F2	4.3	0.03659
26	RFX	6.62	0.03642
27	LEF1	12.58	0.03618
28	oct1	8.94	0.03576
29	HNF1	9.93	0.03477
30	HOXA4	4.97	0.03384
31	PEBP	2.65	0.03344
32	HEN1	3.97	0.03228
33	SP3	4.97	0.03166
34	LRF	4.64	0.03127
35	DBP	5.3	0.03113
36	NFKB	6.95	0.03042
37	MSX1	3.64	0.02959
38	HP1SITEFACTOR	3.31	0.02905
39	NGFIC	3.31	0.02815
40	NF1	6.95	0.02781
41	OTX	4.3	0.0269
42	ETS	6.29	0.02612
43	HOXA3	2.65	0.02583
44	PAX2	3.64	0.02436
45	TATA	5.96	0.02384
46	TEF1	5.63	0.02252
47	RSRFC4	4.64	0.02202
48	XVENT1	2.98	0.02041
49	ZIC1	2.32	0.02028
50	STAT3	5.3	0.0197

Tableau 3 - Liste et séquence des amorces RT-qPCR et la synthèse des sondes.

Gène	Séquence de l'amorce sense	Séquence de l'amorce anti-sense
RT-qPCR		
GAPDH	TTGTCCTACGTGTGCTGTCTGT	TCACACAGTGCCAAGATAAGTGTT
a-Actine		
PEBP1	TGATGACTCTGTACCAAAGC	CGTGTCCCTGTACAAATCTA
MVK	CCCAGTATTGGAAGAACTGT	CAGTTTGCTGTGTAGTCCAT
IGFBP1	TGACAGTACAGGAGTGAAGG	G TTCAGCAGTATTACGTCCA
FOXM1	GCACTAACTCCTCCAAAAGT	ATGATCACTATCCTCGGACT
LATS1	AGAGCCCTAACTCTCAACAC	GCGGAGTGATACTCCTTACT
SOX2	AGATAGCGTCTGACTTTTCC	GATATTCCAGAGGACCAAAC
Sonde		
PEBP1	GGCCAATCAAGTGCATGAG	(Promoteur T7)AACAGGCAGGCAGATTTGGAA