

Université de Montréal

Étude des vésicules extracellulaires riches en micro-ARN sécrétées par les macrophages
sénescents

Par

Camille Laliberté

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en Biochimie, option Générale

Août 2021

© Camille Laliberté, 2021

Université de Montréal

Unité académique : Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Étude des vésicules extracellulaires riches en micro-ARN sécrétées par les macrophages sénescents

Présenté par

Camille Laliberté

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

Pascal Chartrand

Président-rapporteur

Gerardo Ferbeyre

Directeur de recherche

Thomas Duchaine

Membre du jury

Résumé

Le vieillissement est un phénomène impliquant l'inflammation chronique qui est associée à plusieurs pathologies du vieillissement dont la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, la fibrose pulmonaire idiopathique et le cancer. Par ailleurs, les cellules sénescents s'accumulent dans l'organisme vieillissant. Celles-ci présentent un important phénotype sécrétoire pro-inflammatoire appelé *senescence-associated secretory phenotype (SASP)*, lequel contribue aux maladies du vieillissement. Plusieurs études rapportent une sécrétion accrue de vésicules extracellulaires (VE) durant la sénescence. Les VE sont de petites particules qui transportent des lipides, des protéines et des microARN (miARN) entre les cellules. Nous avons proposé que les macrophages sénescents pourraient contribuer aux maladies du vieillissement en favorisant l'inflammation via leurs sécrétions de VE et de facteurs solubles. Nous avons créé un modèle *in vitro* de sénescence induite par l'oncogène Raf-1 dans les macrophages murins RAW 264.7. Le transcriptome des macrophages sénescents a révélé une forte signature pro-inflammatoire probablement régulée par NFκB. Nous avons montré que les macrophages sénescents sécrètent davantage de VE que les macrophages non sénescents, et que le contenu de ces VE est riche en protéines ribosomiques, en *Major vault protein* et en miARN pro-inflammatoires miR-21, miR-155 and miR-132. Les sécrétions des macrophages sénescents ont induit un arrêt de prolifération et une inflammation chez les fibroblastes IMR90, et cet effet pourrait potentiellement être causé par le SASP ou les miARN des VE. Nos résultats sont cohérents avec un effet pro-vieillessement des macrophages sénescents par propagation de l'inflammation. Le Navitoclax élimine préférentiellement les macrophages sénescents et pourrait potentiellement prévenir leurs effets néfastes.

Mots-clés : Sénescence cellulaire, macrophage, vésicule extracellulaire, microARN, inflammation, vieillissement

Abstract

Aging is a phenomenon that involves chronic inflammation, which is associated with many age-related pathologies including Alzheimer's disease, atherosclerosis, idiopathic pulmonary fibrosis and cancer. In addition, senescent cells accumulate in the organism with age. One hallmark of senescence is the senescence-associated secretory phenotype (SASP) which is an important secretion of pro-inflammatory factors. Thus, the SASP is thought to contribute to age-associated diseases. Recently, many studies have reported an increase in the secretion of extracellular vesicles (EVs) during senescence. EVs are small particles which carry and deliver lipids, proteins and microRNAs (miRNA) from one cell to another. We hypothesized that senescent macrophages could contribute to age-related pathologies by promoting inflammation through their secretions of EVs and soluble factors. Here, we established an *in vitro* model of senescence induced by Raf-1 oncogene in RAW 264.7 murine macrophages. The analysis of the transcriptome of senescent macrophages revealed an important inflammatory signature which is probably regulated by NFκB. Moreover, we showed that senescent macrophages secrete more EVs than non-senescent macrophages, and these EVs presented an enrichment for ribosomal proteins, Major vault protein and pro-inflammatory miR-21a, miR-155 and miR-132. Secretions of senescent macrophages induced a growth arrest and inflammation in IMR90 fibroblasts, which could potentially be caused by SASP or miRNAs found in EVs. Our results are consistent with a pro-aging effect of senescent macrophages mediated by the spreading of inflammation. Treatment with Navitoclax could potentially be used to eliminate senescent macrophages in order to prevent their deleterious effects.

Keywords : Cellular senescence, macrophage, extracellular vesicle, microRNA, inflammation, aging

Table des matières

Résumé	3
Abstract.....	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des sigles et abréviations	10
Remerciements.....	13
Chapitre 1 – Introduction	16
1.1 Sénescence cellulaire	17
1.1.1 Historique.....	17
1.1.2 Rôles biologiques de la sénescence.....	18
1.1.3 Induction de la sénescence.....	18
1.1.3.1 Dommages à l'ADN	19
1.1.3.2 Dysfonction des télomères	20
1.1.3.3 Activation d'oncogènes.....	21
1.1.4 Phénotypes et marqueurs de sénescence.....	22
1.1.5 Effets du SASP : les deux côtés de la médaille.....	23
1.1.6 Sénescence et maladies du vieillissement.....	24
1.1.7 Sénolytiques et sénomorphes	26
1.2 Macrophages.....	27
1.2.1 Les macrophages en bref.....	27
1.2.2 Polarisation des macrophages.....	27
1.2.3 Macrophages sénescents.....	28

1.3	Vésicules extracellulaires	29
1.3.1	Définition et historique	29
1.3.2	Classification.....	29
1.3.2.1	Microvésicules.....	29
1.3.2.2	Exosomes	29
1.3.3	Biogénèse des VE	30
1.3.3.1	Biogénèse des microvésicules	30
1.3.3.2	Biogénèse des exosomes	31
1.3.3.2.1	Transport des corps multivésiculaires et sécrétion des exosomes	32
1.3.4	VE et communication intercellulaire	33
1.3.4.1	Cargo des vésicules extracellulaires	33
1.3.4.1.1	Micro-ARN.....	34
1.3.4.2	Transport des vésicules extracellulaires dans l'organisme	35
1.3.4.3	Internalisation des vésicules extracellulaires par les cellules cibles	36
1.3.4.3.1	Amarrage à la cellule cible.....	36
1.3.4.3.2	Voies d'entrée dans la cellule cible	36
1.3.4.4	Effets des vésicules extracellulaires sur les cellules cibles.....	38
1.3.5	Vésicules extracellulaires et sénescence	39
1.3.5.1	Sécrétion des vésicules extracellulaires dans la sénescence	39
1.3.5.2	Cargo des vésicules extracellulaires associées à la sénescence.....	39
1.3.5.3	Effets des vésicules extracellulaires associées à la sénescence.....	39
1.3.6	Vésicules extracellulaires et macrophages.....	40
1.3.7	Techniques et marqueurs pour l'étude des VE	41
1.3.7.1	Séparation et concentration des vésicules extracellulaires	42

1.3.7.2	Quantification des vésicules extracellulaires	42
1.3.7.3	Marqueurs protéiques des vésicules extracellulaires	43
1.4	Hypothèse et objectifs	44
Chapitre 2 – Manuscrit		45
2.1	Abstract	46
2.2	Introduction.....	47
2.3	Materials and methods	50
2.4	Results	60
2.5	Discussion	65
2.6	References.....	68
2.7	Figure legends	78
2.8	Figures	82
Chapitre 3 – Discussion		89
Chapitre 4 – Conclusions et perspectives		105
Bibliographie.....		106

Liste des tableaux

Tableau 1 Primers for SYBR Green Real-Time qPCR	54
Tableau 2 Primers for reverse transcription and TaqMan Real-Time qPCR of miRNAs.....	55

Liste des figures

Figure 1. –	Les neuf caractéristiques propres au vieillissement.	17
Figure 2. –	Voies p53/p21 et p16 ^{INK4a} /Rb dans l'activation de la sénescence	19
Figure 3. –	Réponse aux dommages à l'ADN.....	20
Figure 4. –	Induction de la sénescence par les oncogènes RAS et RAF	21
Figure 5. –	Biogénèse des vésicules extracellulaires.....	30
Figure 6. –	Mode d'action des miARN.....	35
Figure 7. –	Voies d'entrée des vésicules extracellulaires dans la cellule cible.....	37
Figure 8. –	Raf hyper-activation induces cellular senescence in RAW 264.7 murine macrophages.....	82
Figure 9. –	Enrichment of inflammatory genes in the transcriptome of senescent macrophages.....	83
Figure 10. –	Senescent macrophages secrete more EVs carrying RNA binding proteins and exosome proteins.	84
Figure 11. –	EVs from senescent macrophages carry pro-inflammatory miRNAs.....	85
Figure 12. –	Secretions of senescent macrophages induce inflammation in IMR90.....	86
Figure 13. –	Navitoclax treatment kills senescent macrophages.....	87
Figure 14. –	Modèle proposé sur les macrophages sénescents et de leurs sécrétions.	101

Figure supplémentaire

Figure S1. –	Raf hyper-activation induces nuclear PML foci in RAW 264.7 murine macrophages.....	88
--------------	------------------------------------------------------------------------------------	----

Liste des sigles et abréviations

3'UTR	<i>three prime Untranslated Transcribed Region</i>
4-OHT	<i>4-Hydroxytamoxifen</i>
53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>
AGO	Argonaute
ALIX	<i>ALG-2-interacting protein X</i>
ARNm	ARN messenger
ARNpi	ARN interagissants avec Piwi
ARNr	ARN ribosomiaux
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
Atp1a1	<i>ATPase alpha-1 subunit</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein</i>
BCL-2	<i>B Cell Lymphoma 2</i>
Bcl2a1a	<i>B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a</i>
BCLXL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BrdU	Bromodésoxyuridine
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>
CCL3	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
CDK6	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>
CHK1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CST4	<i>Cystatin 4</i>
CXCL1	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>
CXCL5	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 5</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DiRE	<i>Distant Regulatory Elements</i>
DNA SCARS	<i>DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence</i>
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i>
Doa4	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4</i>
E2F	<i>E2 Factor</i>
Eef2	<i>Eukaryotic Elongation factor 2</i>
EphA2	<i>Ephrin type-A receptor 2</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>

ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
fNTA	<i>Fluorescent Nanoparticle Tracking analysis</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
hnRNP Q	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q</i>
hnRNPA2B1	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>
HP1	<i>heterochromatin protein 1</i>
HSP70	<i>70 kilodalton heat shock proteins</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFN-g	<i>Interferon gamma</i>
IFTM3	<i>Interferon-induced transmembrane protein 3</i>
IL13	<i>Interleukin 13</i>
IL1A	<i>Interleukin 1 alpha</i>
IL4	<i>Interleukin 4</i>
IL6	<i>Interleukin 6</i>
IL8	<i>Interleukin 8</i>
ISEV	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
Lgals3bp	<i>Galectin-3-binding protein</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	<i>Mitogen Associated Protein Kinase</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MΦ	Macrophage
miARN	micro-ARN
miRISC	<i>micro-RNA-induced silencing complex</i>
MISEV	<i>Minimal information for studies of extracellular vesicles</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MMP1	<i>Matrix metalloproteinase-1</i>
MMP3	<i>Matrix metalloproteinase-3</i>
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase-9</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MVB	<i>Multivesicular body</i>
Mvp	<i>Major vault protein</i>
NFKB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
OIS	<i>Oncogene Induced Senescence</i>
PDCD4	<i>Programmed cell death protein 4</i>
PPARα	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>

Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
RNAseq	<i>RNA sequencing</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
Rpl18	<i>60S ribosomal protein L18</i>
Rpl3	<i>60S ribosomal protein L3</i>
Rpl4	<i>60S ribosomal protein L4</i>
Rpl6	<i>60S ribosomal protein L6</i>
Rplp0	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>
Rplp2	<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>
Rps3	<i>40S ribosomal protein S3</i>
Rps9	<i>40S ribosomal protein S9</i>
SA-b-Gal	<i>Senescence-associated beta-galactosidase</i>
SAHF	<i>Senescence Associated Heterochromatin Foci</i>
SARD	<i>Senescence-associated ribogenesis defects</i>
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i>
Smad7	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 7</i>
SNARE	<i>Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor</i>
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>
STC1	<i>Stanniocalcin-1</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
TGF-b1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TOMM20	<i>Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20</i>
TRF1	<i>Telomeric repeat-binding factor 1</i>
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
VE	<i>Vésicule extracellulaire</i>

Remerciements

D'abord, un immense merci à mon directeur de recherche, Gerardo. Gerardo, vous m'avez accueillie dans votre équipe pour un stage il y a 3 ans déjà. Dès le début, je me suis sentie la bienvenue dans votre laboratoire, qui est un peu comme une famille. Vous savez définitivement comment bien vous entourer pour faire du labo un lieu de camaraderie. Vous avez su me transmettre votre passion pour les sciences. Votre esprit curieux et vos idées ont fortement enrichies ce projet. Je vous remercie d'avoir toujours posé un regard optimiste sur le projet de recherche tout au long de mon parcours.

Véronique, merci de m'avoir tout appris (ou presque) en labo! Tes conseils ont été indispensables à ce projet, et j'en suis très reconnaissante. J'ai toujours été impressionnée par ta façon de passer rapidement en mode solution lorsque les choses ne se passent pas comme prévu. Je vais garder précieusement cette attitude avec moi! Enfin, un immense merci pour m'avoir soutenue dans mes projets pour la suite! Je vais garder des très beaux souvenirs de tous les beaux moments passés ensembles!

Bianca, tu es arrivée au labo avec un grand désir d'apprendre et une bonne humeur vraiment contagieuse! Tu as su traverser les défis avec beaucoup de persévérance. Ce fut un réel bonheur de te montrer les ficelles du métier au début, puis de travailler en équipe avec toi ensuite. Ton aide au labo a été inestimable pour moi dans ces derniers mois. J'espère que ce travail pourra t'inspirer dans ta poursuite du projet!

Lian, ma *foodie* préférée! Nos mille et une conversations de recettes et restaurants m'ont beaucoup fait saliver! Merci aussi pour ton écoute, qui a été très précieuse pour moi. Le labo n'est vraiment plus pareil depuis ton départ! L'intrépide voyageuse que tu es m'a donné le goût de partir à l'aventure!

Marie-Camille, on se ressemble beaucoup je crois! J'ai plein de beaux souvenirs de moments passés ensembles. C'était très inspirant de te voir évoluer dans les dernières années. Tu t'es lancée de beaux et gros défis que tu as relevés avec brio! Tu entames maintenant un nouveau parcours dans lequel je suis certaine que tu excelleras. Tes étudiants seront chanceux de t'avoir!

Stéphane merci pour ton sens de l'humour! J'ai eu les meilleurs fous rires en ta compagnie! J'ai aussi adoré faire des qPCR en écoutant de la musique de Disney avec toi! Tu es un scientifique très impressionnant qui se démarque non seulement par sa curiosité mais surtout par son travail acharné! Je te souhaite tout le succès avec ton projet (et moins d'heures à l'animalerie)!

Ana, ta personnalité pétillante va beaucoup me manquer! Merci pour avoir organisé de nombreux événements avec le labo. Ces belles initiatives auront mis beaucoup de bonheur dans mon parcours! Je te souhaite un bon retour à la maison et plein de succès dans ce qui t'attend!

Seb, je suis très reconnaissante de l'aide que tu m'as apportée au labo. Tu es bien souvent venu à ma rescousse quand je me mettais les pieds dans les plats! J'ai aussi bien aimé jaser avec toi au bureau pendant beaucoup trop longtemps au lieu de travailler! Tu as toujours des histoires fascinantes à raconter! Tu es définitivement le plus Québécois de tous les Allemands, j'espère qu'un jour j'irai visiter la cabane à sucre!

Paloma, la douceur incarnée! C'était un bonheur de te côtoyer au labo et en dehors! Toi et Ricardo vous êtes d'excellents partenaires pour partir à l'aventure! J'attends toujours avec impatience la soirée BBQ brésilien dont on parle depuis si longtemps!

Tony, j'ai beaucoup aimé nos nombreuses discussions et débats philosophiques! Même si nous n'étions pas toujours d'accord, c'était des conversations très enrichissantes! J'admire aussi la détermination dont tu as fait preuve en changement complètement ton chemin de vie.

Jacob, j'ai été bien contente de traverser le stage et le début de la maîtrise à tes côtés. Ton grain de folie était presque aussi dynamisant que tes boissons énergisantes! Tu as travaillé si fort pour te rendre là où tu es maintenant, et je suis vraiment heureuse pour toi!

Rose, it has been a pleasure to get to know you in the last year, you're such a funny girl! Kudos to you for all the efforts you have put into learning French! I hope I haven't ruined it all with my teaching of improper language! Bonne chance pour la suite de ton projet!

Jordan, on ne s'est pas côtoyés très longtemps au labo, mais j'ai bien rigolé à chaque fois qu'on s'est parlé! Je te souhaite bon succès avec ton projet et beaucoup de plaisir au labo!

Guillaume, un rayon de soleil du sud de la France! Ta bonne humeur contagieuse au labo m'a souvent redonné le sourire. Tu es certainement la preuve qu'on peut avoir du succès en sciences tout en maintenant une vie bien équilibrée, et je trouve ça très inspirant!

Fred, merci de m'avoir initiée avec patience à l'art des Western Blots! Tu m'as dit un jour qu'il fallait avoir plus de courage que de peur pour pouvoir avancer. Quand les obstacles semblent infranchissables, je pense à cette devise et ça m'aide à me dépasser.

À ma famille, merci de m'avoir soutenue dans tous mes projets. Votre support durant mes études m'a aidé à avancer et à accomplir mes objectifs! À quand le voyage au soleil en famille dont on rêve depuis longtemps?

Gabriel, mon supporteur numéro 1! Merci d'avoir traversé cette aventure à mes côtés. Tu as su me botter gentiment le derrière quand j'en avais besoin! Après m'avoir entendu radoter sur la sénescence pendant trois ans, tu connais maintenant tout sur p52! Je suis de corvée de vaisselle pour un bon bout je crois!. J'ai bien hâte de voir ce que l'avenir nous réserve!

Je tiens également à remercier les Fonds de recherche du Québec en santé, les Instituts de recherche en santé du Canada et la Faculté des études supérieures et doctorales pour l'appui financier.

Chapitre 1 – Introduction

L'amélioration de l'hygiène et des conditions de vie ainsi que les progrès de la médecine ont eu comme effet d'allonger significativement l'espérance de vie (1). Ce faisant, la population mondiale vieillit et les systèmes de santé font face à une augmentation drastique des maladies associées à l'âge (2). Des pathologies telles que le diabète, les maladies cardiaques, les maladies neurodégénératives, la dégénérescence maculaire, l'ostéoporose et le cancer affectent le confort et l'autonomie des personnes âgées (3). Dans l'objectif d'améliorer la qualité de vie de nos aînés et d'atténuer l'engorgement des réseaux de santé, il faut développer des traitements pour retarder l'apparition ou atténuer les effets des maladies du vieillissement. Pour ce faire, la compréhension moléculaire des processus de vieillissement doit être améliorée. Dans les dernières années, neuf caractéristiques cellulaires et moléculaires propres au vieillissement ont été établies : instabilité génomique, attrition des télomères, altérations épigénétiques, perte de l'homéostasie protéique (protéostasie), détection des nutriments dérégulée, dysfonction mitochondriale, épuisement des cellules souches, communication cellulaire altérée et enfin la sénescence cellulaire (**Figure 1**) (4). Cette dernière s'impose comme un joueur clé du vieillissement et suscite l'intérêt de la communauté scientifique.

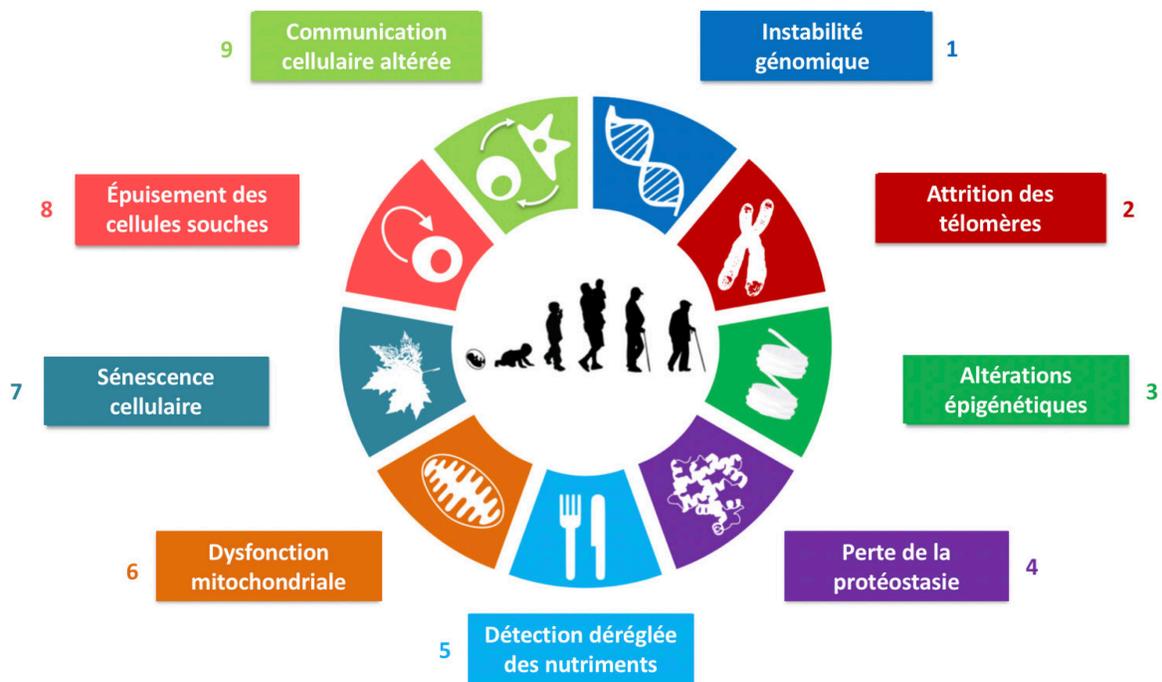


Figure 1. – Les neuf caractéristiques propres au vieillissement.

Les caractéristiques primaires (1 à 4) causent des dommages cellulaires. Les caractéristiques antagonistes (5 à 7) sont délétères lorsqu'exacerbés de manière chronique. Les caractéristiques intégratives (8 et 9) résultent des précédentes. Adapté de Lopez-Otin, Blasco et al. 2013 (4).

1.1 Sénescence cellulaire

1.1.1 Historique

Le concept de sénescence cellulaire émerge dans les années soixante, suite à l'observation du nombre limité de divisions des cellules cultivées *in vitro*. Alors que les scientifiques de l'époque attribuent ce phénomène à des problèmes technique tels que la contamination de la culture, Hayflick et Moorhead avancent que l'arrêt de la mitose après une cinquantaine de divisions cellulaires est le résultat du vieillissement des cellules. Ils nomment cet état sénescence cellulaire, en référence à la sénescence, soit le vieillissement inévitable de l'organisme (5). Le terme sénescence sera utilisé dans ce texte pour parler de sénescence cellulaire.

1.1.2 Rôles biologiques de la sénescence

Aujourd'hui, la sénescence est décrite comme un arrêt stable de la prolifération cellulaire qui survient en réponse à divers stress ou dommages et permet d'empêcher la propagation de cellules endommagées. En effet, dans un premier temps, l'induction de la sénescence permet l'arrêt du cycle cellulaire. Dans un deuxième temps, le système immunitaire est alerté par les sécrétions des cellules sénescents et élimine ces dernières. Ainsi, la sénescence constitue un mécanisme de suppression tumorale intrinsèque à la cellule et peut être considérée comme une alternative à l'apoptose (6).

De plus, la sénescence est impliquée dans des contextes physiologiques. Par exemple, durant le développement embryonnaire, l'induction de la sénescence programmée suivie de l'élimination des cellules sénescents est nécessaire pour le remodelage tissulaire (7). La sénescence joue aussi un rôle essentiel dans la cicatrisation des plaies (8).

La sénescence, lorsqu'activée de manière transitoire, constitue donc un mécanisme cellulaire bénéfique pour l'organisme. Nous verrons cependant que le maintien de la sénescence à long terme contribue à plusieurs pathologies associées au vieillissement de l'organisme (6).

1.1.3 Induction de la sénescence

La sénescence telle qu'observée par Hayflick et Moorhead correspond plus précisément à la sénescence répllicative, résultant du raccourcissement des télomères (9). Il existe cependant d'autres mécanismes pouvant enclencher la sénescence cellulaire. En effet, en réponse à divers stress, la cellule peut entrer en sénescence dite prématurée pour prévenir la propagation de cellules endommagées. Ces stress incluent entre autres l'activation d'oncogènes, l'accumulation de dommages à l'ADN, le stress oxydatif, et des dysfonctions mitochondriales. Ces signaux convergent généralement vers l'activation des voies de suppression tumorale p53/p21 et p16^{INK4a}/Rb, orchestrant l'arrêt du cycle cellulaire (10).

Le suppresseur tumoral p53 contrôle l'expression de gènes antiprolifératifs, dont p21, un inhibiteur de la kinase dépendante des cyclines 2 (CDK2) (11). En l'absence de p21, CDK2 activé par Cycline E phosphoryle la protéine du Rétinoblastome (Rb), et Rb phosphorylé ne peut lier les

facteurs de transcription *E2 Factor* (E2F). Les E2F permettent alors la transcription de gènes essentiels au passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (12). Lorsque p53 est actif et induit l'expression de p21, CDK2 ne peut être activé par Cycline E. Rb est alors hypophosphorylé et séquestre E2F, empêchant la transcription de ses gènes cibles. Le cycle cellulaire est alors arrêté en phase G1/S. De façon similaire, l'activation de p16^{INK4a} permet l'hypophosphorylation de Rb en inhibant le complexe CDK4/6-Cycline D (13) (**Figure 2**).

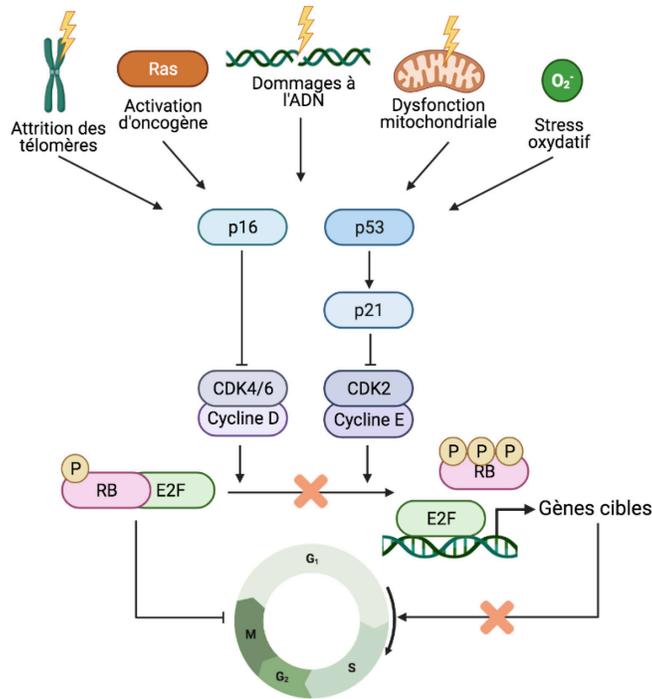


Figure 2. – Voies p53/p21 et p16^{INK4a}/Rb dans l'activation de la sénescence

Divers stress activent les voies p16/Rb et p53/p21, qui convergent ultimement vers la séquestration du facteur de transcription E2F et l'arrêt de transcription des gènes permettant la progression du cycle cellulaire. La prolifération cellulaire est alors inhibée. Figure préparée avec le logiciel BioRender.

1.1.3.1 Dommages à l'ADN

L'intégrité du génome est essentielle au fonctionnement de la cellule et de l'organisme. Cependant, des erreurs survenant lors de la réplication ou de transcription de l'ADN, ou l'exposition à des radiations ionisantes ou à certains agents chimiothérapeutiques peuvent causer

des lésions sur l'ADN (14). Ces lésions doivent être réparées pour éviter la prolifération de cellules dont le génome est abîmé.

La voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) agit comme un point de contrôle permettant de stopper le cycle cellulaire pour réparer les dommages à l'ADN. Les kinases *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) et *Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein* (ATR) sont recrutées et activées respectivement aux sites de cassures double-brin ou simple-brin de l'ADN. ATM et ATR activent ensuite par phosphorylation *Checkpoint Kinase 2* (CHK2) et *Checkpoint Kinase 1* (CHK1), ce qui converge ultimement vers l'activation de p53 pour bloquer la progression du cycle cellulaire (**Figure 3**). Si l'ADN n'est pas réparé adéquatement, alors la signalisation de la voie DDR perdure et la sénescence peut être enclenchée (15).

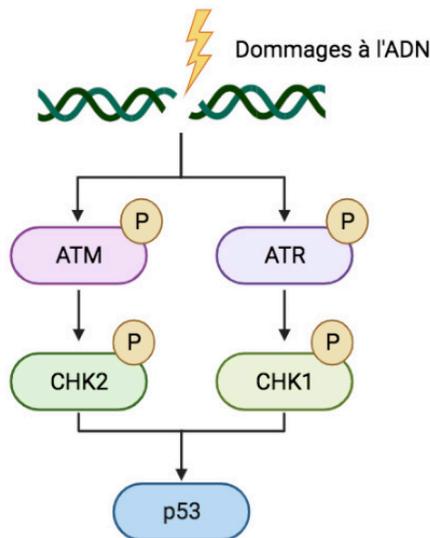


Figure 3. – Réponse aux dommages à l'ADN

Les dommages à l'ADN par cassures simple-brin et double-brin activent respectivement ATR et ATM. L'activation subséquente de CHK1 et CHK2 par ATM et ATR permet d'activer p53 pour induire l'arrêt du cycle cellulaire. Figure préparée avec le logiciel BioRender.

1.1.3.2 Dysfonction des télomères

Comme mentionné plus haut, le raccourcissement des télomères peut induire la sénescence. Les télomères sont des courtes séquences répétitives d'ADN associées au complexe protéique

Shelterin. Les télomères protègent les extrémités des chromosomes. Étant donné que la machine de réplication de l'ADN est incapable de répliquer entièrement les terminaisons des chromosomes, les télomères raccourcissent graduellement à chaque cycle de synthèse de l'ADN. Éventuellement, les extrémités de l'ADN se retrouvent exposées, et sont détectées comme étant des cassures double-brin. La voie DDR est alors activée et peut induire l'entrée en sénescence comme expliqué plus haut (15).

1.1.3.3 Activation d'oncogènes

L'expression d'oncogènes peut aussi induire la sénescence cellulaire. On parle alors de sénescence induite par oncogène (OIS). En effet, l'activation d'oncogène provoque initialement une hyperprolifération cellulaire. Ceci inflige un stress assez important à la réplication de l'ADN pour mener à des cassures double-brin de l'ADN. La sénescence résulte alors de l'activation de la voie DDR (16, 17). L'hyperprolifération suite à l'activation d'oncogène pourrait entre autres être expliquée par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (18). Parmi les oncogènes pouvant induire la sénescence *in vivo* et *in vitro*, on compte entre autres *Rat Sarcoma* (Ras) et *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* (Raf), deux effecteurs de la voie des *Mitogen Associated Protein Kinases* (MAPK) qui permettent l'activation de *Extracellular signal Regulated Kinase* (ERK) 1 et 2 par une cascade de phosphorylation (**Figure 4**) (19, 20). La perte de suppresseur tumoral, dont *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN), peut également induire la sénescence (21).

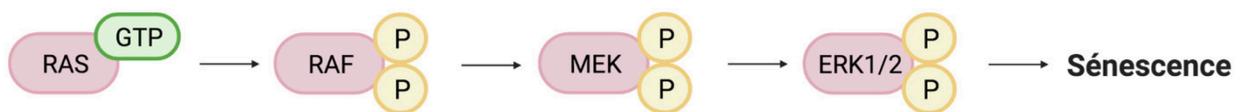


Figure 4. – Induction de la sénescence par les oncogènes RAS et RAF

Les oncogènes Ras et Raf font partie de la cascade de phosphorylation des MAPK, qui active ERK1 et ERK2. L'hyperactivation de cette voie peut induire la sénescence. Figure préparée avec le logiciel BioRender.

1.1.4 Phénotypes et marqueurs de sénescence

L'identification des cellules sénescents *in vitro* ou *in vivo* n'est pas une tâche simple. D'une part, aucun marqueur n'est spécifique à la sénescence, et d'autre part, les marqueurs peuvent varier selon le type de sénescence, le type cellulaire ou le tissu. Pour identifier les cellules sénescents, il est donc primordial d'employer un panel de marqueurs associés à différentes caractéristiques de la sénescence (22).

La sénescence se caractérise d'abord par un arrêt stable du cycle cellulaire. Contrairement aux cellules quiescentes, les cellules sénescents ne peuvent pas retrouver la capacité de se diviser lorsqu'exposées à des signaux de prolifération ou à des nutriments (23). L'arrêt de prolifération des cellules sénescents *in vitro* peut être mis en évidence par un simple essai d'incorporation du crystal violet (24). Des marqueurs moléculaires de la prolifération cellulaire comme l'antigène Ki-67 et l'incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU) sont aussi fréquemment employés (6). La diminution de phosphorylation de l'histone H3 à la sérine 10 permet également de confirmer l'arrêt du cycle cellulaire (25).

L'activation des voies p53/p21 et p16^{INK4a}/Rb durant la sénescence peut servir de marqueurs. L'induction de p16 est un des marqueurs de sénescence les plus utilisés (26). Cependant, p16 n'est pas toujours essentiel à la sénescence (27). Quant à p21, son expression n'est pas maintenue dans le temps durant la sénescence et son action serait surtout importante pour initier la sénescence (22).

L'induction de la sénescence est associée à des changements de la morphologie des cellules. Il est entre autres fréquent d'observer un élargissement important des cellules sénescents (28).

D'autre part, les cellules sénescents font preuve de résistance à l'apoptose dans certains modèles (29). Ce phénomène pourrait être causé par l'augmentation des niveaux des protéines anti-apoptotiques de la famille *B Cell Lymphoma 2* (Bcl-2) (30).

La présence de marques de dommages à l'ADN peut aussi servir de marqueur de sénescence. Par exemple, on retrouve aux sites de cassures double-brin sur l'ADN l'histone H2AX phosphorylée à

la sérine 139 (γ -H2AX) et *p53-binding protein 1* (53BP1). La présence de ces protéines peut être observée par immunofluorescence sous la forme de foyers nucléaires (31).

Un des marqueurs de sénescence les plus utilisés est l'augmentation de l'activité β -Galactosidase associée à la sénescence (SA- β -Gal) (32). Bien que la β -Galactosidase lysosomale présente une activité optimale à un pH de 4 à 4.5, il est possible de détecter l'activité de l'enzyme à un pH sous-optimal de 6 dans les cellules sénescents. Ce marqueur serait le reflet de la forte activité des lysosomes dans la sénescence (33). On détecte la SA- β -Gal par l'obtention d'un précipité bleu suite au clivage du X-Gal, un substrat artificiel de la β -Galactosidase (32).

La sénescence s'accompagne aussi de changements dans la structure de la chromatine qu'on appelle foyers d'hétérochromatine associée à la sénescence (SAHF). Ces patrons d'hétérochromatine contribuent à réprimer l'expression des gènes cibles d'E2F, et donc à empêcher la progression du cycle cellulaire (34). L'histone 3 méthylée à la lysine 9, l'histone macroH2A et la protéine *heterochromatin protein 1* (HP1) peuvent servir de marqueurs pour détecter les SAHF (35).

Les cellules sénescents expriment et sécrètent en abondance un ensemble de cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et protéases désigné sous le terme de *senescence-associated secretory phenotype* (SASP) (36). Les molécules clés du SASP incluent entre autres les facteurs pro-inflammatoires *Interleukin 6* (IL-6) et *Interleukin 8* (IL-8), les *Monocyte Chemoattractant Proteins* (MCP), ainsi que des protéases extracellulaires comme les métalloprotéases matricielles (MMP) et les Serpines (36). L'expression des gènes du SASP est régulée par des facteurs de transcription comme *Nuclear Factor kappa B* (NF- κ B) et *CCAAT/Enhancer Binding Protein* (C/EBP) ainsi que par remodelage de la chromatine (37).

1.1.5 Effets du SASP : les deux côtés de la médaille

Le SASP est fréquemment caractérisé de « lame à double tranchant » car il a à la fois des effets bénéfiques et néfastes pour l'organisme. D'abord, le SASP peut agir de manière autocrine pour renforcer l'arrêt de prolifération des cellules sénescents (36). Ensuite, le SASP permet le

recrutement de cellules immunitaires aux cellules endommagées et l'élimination de celles-ci, prévenant la transformation maligne (38). De plus, le SASP favorise la réparation tissulaire (39).

Par contre, les molécules bioactives du SASP peuvent avoir des effets pro-cancéreux. En effet, le SASP comprend des facteurs de croissance favorisant l'angiogenèse (40). Aussi, les protéases du SASP permettent de remodeler la matrice extracellulaire, favorisant ainsi l'invasion tumorale (41).

Par ailleurs, le SASP permet de propager la sénescence à d'autres cellules de manière paracrine – phénomène appelé sénescence paracrine – augmentant ainsi la charge de cellules sénescents dans l'organisme et amplifiant leurs effets dommageables, qui seront détaillés plus loin (42).

Le SASP devient surtout menaçant pour l'organisme lorsqu'il perdure dans le temps, c'est-à-dire quand l'inflammation chronique s'installe. L'inflammation chronique résulte de la présence prolongée de facteurs pro-inflammatoires en quantité moindre que lors d'une inflammation aiguë. Elle se caractérise par l'infiltration de cellules immunitaires dans les tissus ainsi que la fibrose et la nécrose des tissus affectés (43). L'inflammation chronique est une caractéristique importante du vieillissement, et ce phénomène est appelé *inflamm-aging* (44). La dysfonction tissulaire causée par l'inflammation chronique est associée à plusieurs maladies du vieillissement, comme la maladie d'Alzheimer, le diabète de type 2, l'athérosclérose, le cancer et bien d'autres (45, 46). Ainsi, en contribuant à l'inflammation chronique, le SASP aurait un rôle clé dans le vieillissement et ses maladies.

1.1.6 Sénescence et maladies du vieillissement

Avec l'âge une grande quantité de cellules sénescents s'accumule dans l'organisme chez l'humain, les primates et les rongeurs (32, 47-49). Une hypothèse pour expliquer cette accumulation serait qu'avec l'âge, le déclin du système immunitaire empêcherait l'élimination efficace des cellules sénescents (50). Il est également possible que l'accumulation de dommages et stress au cours de la vie augmente la fréquence de la sénescence avec l'âge (50).

Avec le vieillissement de l'organisme, on observe un déclin des fonctions de multiples tissus, et cela mène à diverses pathologies liées à l'âge, telles que les maladies neurodégénératives, l'ostéoporose, la sarcopénie, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, et le cancer (3).

De plus en plus d'évidences suggèrent que la sénescence cellulaire contribue à l'apparition et la progression de ces maladies. L'inflammation chronique causée par le SASP aurait un rôle important dans ce phénomène (43).

Dans les dernières années, le développement de modèle murins transgéniques permettant l'élimination des cellules sénescents *in vivo* ainsi que le développement de composés sénolytiques (tuant les cellules sénescents, voir **section 1.1.7**) ont permis d'étudier l'impact de la sénescence dans l'organisme.

Le modèle murin transgénique INK-ATTAC permet l'élimination des cellules sénescents grâce à l'activation conditionnelle d'un transgène suicide dans les cellules exprimant p16^{Ink4a}, un joueur clé de la sénescence. Le transgène code pour un fragment de la caspase 8 fusionné à un domaine de liaison à la molécule AP20187. Le transgène est sous le contrôle transcriptionnel du promoteur de p16, donc il est seulement exprimé dans les cellules exprimant p16, c'est-à-dire les cellules sénescents. L'injection d'AP20187 active la protéine de fusion par dimérisation. La caspase 8 activée induit alors l'apoptose de la cellule. À l'aide de ce modèle, il a été montré qu'éliminer les cellules sénescents dès un jeune âge augmente l'espérance de vie et retarde l'apparition de certaines pathologies liées à l'âge telles que la sarcopénie, les cataractes ou la perte de tissu adipeux (51). La déplétion des cellules sénescents chez les souris vieillissantes ne permet cependant pas de renverser les phénotypes associés au vieillissement déjà présents mais retarde la progression de ceux-ci (51). Le même groupe a aussi montré que l'activation du transgène suicide chez les souris INK-ATTAC vieillissantes rallonge la durée de vie et prévient entre autres le développement de cataractes, la dysfonction rénale et l'inflammation dans certains tissus (52).

L'accumulation d'hépatocytes sénescents entraîne la stéatose hépatique non alcoolique, caractérisée par l'accumulation de graisse au niveau du foie avec l'âge, et l'élimination des hépatocytes sénescents réduit significativement les dépôts de graisse au niveau du foie (53). Chez la souris, il a été montré que l'injection de cellules sénescents dans l'articulation du genou entraîne l'apparition de l'arthrose (54). Par ailleurs, l'élimination de ces cellules de façon pharmacologique ou génétique ralentit la progression de l'arthrose (55). La fibrose pulmonaire est associée à une accumulation importante des cellules sénescents, et le SASP semble responsable

de la maladie (56, 57). Dans le diabète de type 2 chez la souris, on observe une augmentation significative de cellules bêta du pancréas portant des marqueurs de sénescence (58). On retrouve également des astrocytes sénescents dans le cerveau atteint de la maladie de Parkinson, et l'élimination de ces cellules sénescents chez la souris protège contre l'apparition de la maladie (59).

Bref, ces travaux confirment la présence de cellules sénescents *in vivo* et leur accumulation avec l'âge. Leurs implications dans diverses pathologies suggèrent la pertinence de cibler les cellules sénescents pour prévenir ou traiter les maladies associées à l'âge. Cette stratégie est d'ailleurs utilisée par les sénolytiques, qui exploitent les particularités des cellules sénescents pour les éliminer.

1.1.7 Sénolytiques et sénomorphes

Les agents sénolytiques permettent d'éliminer spécifiquement les cellules sénescents par apoptose. Les composés sénolytiques de première génération ciblent diverses protéines impliquées dans les voies anti-apoptotiques/pro-survie qui sont surexprimées dans les cellules sénescents dont la famille BCL-2, p53 et la voie PI3K/AKT. Par exemple, le Navitoclax, aussi connu sous le nom ABT263, induit l'apoptose en ciblant les membres de la famille BCL-2 (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w) (30). La combinaison Dasatinib-Quercétine (D + Q) provoque l'apoptose des cellules sénescents en ciblant BCL-2, la voie PI3K/AKT et p53 (60). Une autre stratégie consiste à enrober des agents cytotoxiques à l'aide de galacto-oligosaccharide. L'enveloppe est hydrolysée par la SA- β -Gal, permettant ainsi de tuer spécifiquement les cellules sénescents (61). Une autre approche consiste à inhiber le SASP sans tuer les cellules sénescents : on parle alors d'agents sénomorphes plutôt que sénolytiques. Par exemple, Nutlin-3a, un antagoniste de MDM2, atténue le SASP (62).

1.2 Macrophages

1.2.1 Les macrophages en bref

Les macrophages sont des leucocytes capables de phagocytose qu'on retrouve dans tout l'organisme. Ils ont des fonctions dans l'immunité, l'homéostasie des organes, la cicatrisation et le développement. Dans les organes, les macrophages résidents agissent comme des sentinelles surveillant l'invasion par des pathogènes ou l'accumulation de divers débris. Selon l'organe de résidence, les macrophages portent divers noms et assurent des fonctions spécifiques. Par exemple, on retrouve les cellules de Kupffer dans le foie, les microglies dans le cerveau et les macrophages alvéolaires dans les poumons. Au besoin, les monocytes en circulation peuvent infiltrer les tissus en état d'inflammation et se différencier en macrophages (63, 64).

1.2.2 Polarisation des macrophages

Les macrophages sont considérés comme des cellules capables d'une grande plasticité en réponse aux signaux de leur environnement. Historiquement, les macrophages ont été classifiés en deux groupes selon leur phénotype d'activation. L'activation classique mène à la polarisation de type M1 des macrophages, associée à la réponse inflammatoire contre les pathogènes et sont donc aussi appelés macrophages tueurs (65, 66). L'activation alternative conduit au phénotype M2, aussi appelé bâtisseur et considéré anti-inflammatoire et important pour la réparation (66). Alors que l'état M1 peut être induit par la combinaison de lipopolysaccharide (LPS) et d'Interféron gamma (IFN- γ), l'activation de type M2 est stimulée par la combinaison de *Interleukin 4* (IL-4) et *Interleukin 13* (IL-13) (67). Dans les dernières années, la dualité M1 versus M2 des macrophages est critiquée pour représenter une version très simplifiée du large spectre de phénotypes adoptés par les macrophages selon leur microenvironnement (65-67).

De façon intéressante, les macrophages sont connus pour infiltrer les tumeurs et peuvent y favoriser la progression maligne en sécrétant entre autres des facteurs de croissance, des facteurs angiogéniques et des métalloprotéases (66). Ces macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont généralement considérés comme étant similaires au type M2, étant donné la ressemblance de leur phénotype à celui des macrophages M2 «bâtisseurs» (66). Comme les propriétés des TAM

rappellent l'effet pro-cancéreux des cellules sénescentes via le SASP, il est intéressant de se demander si les TAM ou une portion des macrophages appelés ainsi sont en réalité des macrophages sénescents (36).

1.2.3 Macrophages sénescents

Des liens entre les macrophages sénescents et les pathologies associées au vieillissement ont été établis à plusieurs reprises. Par exemple, la dégénérescence maculaire liée à l'âge implique le SASP pro-angiogénique des macrophages sénescents (68). Il a aussi été montré que des macrophages spumeux sénescents s'accumulent au sein de la plaque d'athérome (69). Ces macrophages sénescents favorisent la progression de l'athérosclérose en sécrétant des facteurs pro-inflammatoires et des métalloprotéases. Aussi, la sénescence des microglies, les macrophages spécialisés du système nerveux central, a été impliquée dans l'initiation et la progression des maladies neurodégénératives via l'agrégation des protéines tau (70).

Néanmoins, la sénescence des macrophages est peu étudiée en comparaison à la sénescence des fibroblastes par exemple. Pourtant, la sénescence des macrophages pourrait être plus pertinente que celle des fibroblastes dans le contexte *in vivo*. En effet, il a été montré qu'une large proportion des cellules portant les marqueurs de sénescence p16 et SA- β -Gal chez la souris sont des macrophages (71). La possible prépondérance des macrophages sénescents dans l'organisme et la diversité des systèmes affectés par ces cellules met en lumière l'importance d'investiguer davantage les mécanismes moléculaires conférant aux macrophages sénescents des propriétés pathologiques.

1.3 Vésicules extracellulaires

1.3.1 Définition et historique

Le terme vésicule extracellulaire (VE) désigne une famille de vésicules membranaires qui sont sécrétées par les cellules (72). Par le passé, les VE ont été considérées comme un moyen pour la cellule de se débarrasser de molécules indésirables (73) et aussi comme des débris produits par les cellules mortes (74). Il est maintenant accepté que les VE permettent d'échanger une grande variété de macromolécules avec d'autres cellules, constituant ainsi un moyen de communication intercellulaire (75).

1.3.2 Classification

Les VE forment une famille très hétérogène de vésicules. Par le passé, elles ont été nommées selon le type cellulaire dont elles proviennent, leur taille ou encore leur fonction. Il en a résulté un large éventail de termes pour décrire les VE : *platelet dust*, exosomes, microvésicules, microparticules, oncosomes, ectosomes, corps apoptotiques, migrasomes et autres. Il est maintenant recommandé de classer les VE en deux grandes familles : les microvésicules et les exosomes. Cette catégorisation s'appuie sur la biogénèse des VE, c'est-à-dire sur leur origine intracellulaire. (72)

1.3.2.1 Microvésicules

Les microvésicules sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule (**Figure 5**) (76). Leur diamètre varie de 50 nm à 1 µm, bien que certains sous-types de microvésicules sécrétées par les cellules cancéreuses puissent être plus grosses (72).

1.3.2.2 Exosomes

Durant la maturation des endosomes, il y a invagination de leur membrane vers l'intérieur, donnant naissance à des vésicules intraluminales (**Figure 5**). Ce processus forme un corps multivésiculaire contenant plusieurs vésicules qui deviendront des exosomes (77). Le corps multivésiculaire peut alors fusionner avec un lysosome et son contenu est dégradé (75). Alternativement, le corps multivésiculaire peut échapper aux lysosomes pour fusionner avec la membrane plasmique, libérant ainsi les exosomes dans l'espace extracellulaire (77). Les exosomes sont plus petits que les microvésicules, avec un diamètre variant de 50 à 150 nm (72).

1.3.3 Biogénèse des VE

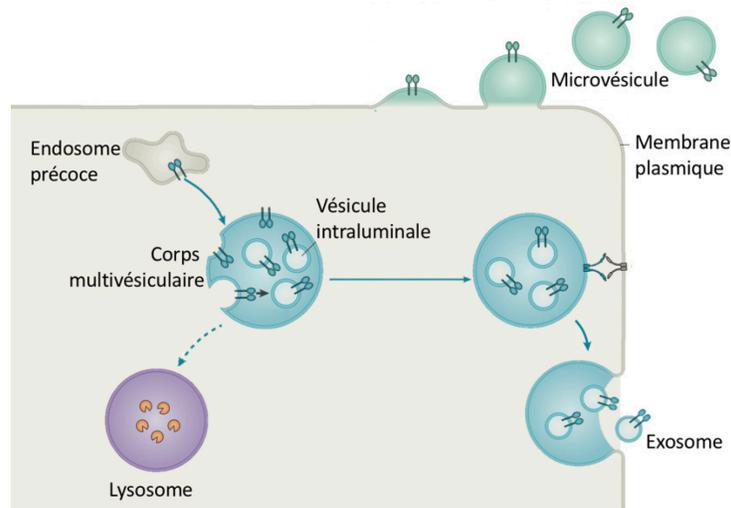


Figure 5. – Biogénèse des vésicules extracellulaires

L'invagination de la membrane d'un endosome forme des vésicules intraluminales à l'intérieur d'un corps multivésiculaire. La fusion du corps multivésiculaire à un lysosome mène à la dégradation de son contenu, alors que la fusion du corps multivésiculaire avec la membrane plasmique permet la sécrétion de vésicules appelées exosomes. La sécrétion de microvésicules survient par bourgeonnement de la membrane plasmique. Adapté de van Niel, D'Angelo et al. 2018 (72).

1.3.3.1 Biogénèse des microvésicules

Le bourgeonnement des microvésicules à partir de la membrane plasmique implique entre autres le réarrangement des lipides membranaires. Par exemple, les phospholipides sont distribués de manière asymétrique à la membrane plasmique, avec la phosphatidylsérine concentrée dans le feuillet interne de la membrane. Le maintien de l'asymétrie est contrôlé par des enzymes membranaires comme l'aminophospholipide translocase, la scramblase et la floppase. La redistribution des molécules de phosphatidylsérine au feuillet externe contribue au bourgeonnement de la membrane plasmique (78). Par ailleurs, la formation de radeaux lipidiques – des microdomaines membranaires riches en cholestérol - est importante pour la biogénèse des microvésicules (79).

La perturbation du cytosquelette est aussi impliquée dans le bourgeonnement des microvésicules. Par exemple, l'activation de la calpaïne permet de cliver des filaments de cytosquelette et ainsi de libérer la membrane plasmique du cytosquelette (78). Aussi, la formation d'anneau d'actine pourrait être impliquée dans la maturation des microvésicules. Cette réorganisation de l'actine serait le résultat de l'activation d'une voie de signalisation dépendante de *Ras homolog family member A* (RhoA) (80).

1.3.3.2 Biogénèse des exosomes

La biogénèse des exosomes implique l'enrichissement des molécules cargo à la membrane externe d'un endosome tardif, puis le bourgeonnement et la fission de cette membrane vers la lumière de l'endosome, formant ainsi un corps multivésiculaire contenant des exosomes (81).

La voie dépendante des complexes de tri endosomal nécessaires au transport (ESCRT) permet de cibler aux corps multivésiculaires les protéines membranaires marquées par l'ubiquitine. D'abord, le complexe ESCRT-0 permet d'assembler à la membrane endosomale un microdomaine riche en clathrine et en protéines ubiquitinées. ESCRT-0 recrute ensuite ESCRT-I, qui lui-même recrute ESCRT-II. Par la suite, ESCRT-II recrute ESCRT-III, qui dirige le bourgeonnement et la scission de la vésicule. Parallèlement, les ubiquitines sont retirées des protéines cargo par *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 4* (Doa4) (82).

La formation des exosomes peut s'effectuer par l'assemblage d'un complexe entre syndécane, l'adaptateur synténine, *ALG-2-interacting protein X* (ALIX) et ESCRT. Ce complexe permet le bourgeonnement à la membrane de l'endosome tardif. Le cargo est acheminé dans les exosomes en liant syndécane, un protéoglycane membranaire (83).

La composition lipidique des membranes joue aussi un rôle dans la biogénèse des exosomes. Par exemple, les molécules de sphingomyéline à la membrane endosomale peuvent être hydrolysées en céramides par la sphingomyélinase neutre de type 2. La forme en cône des céramides permet de courber la membrane et ainsi d'amorcer le bourgeonnement nécessaire à la formation des exosomes (84).

Les tétraspanines, des protéines membranaires qu'on retrouve dans les exosomes, pourraient aussi être impliquées dans la biogénèse des exosomes. Par exemple, la tétraspanine CD81 adopte une structure en forme de cône et présente une poche pour le cholestérol (85). Il est proposé que l'assemblage de plusieurs tétraspanines côniques à la membrane endosomale pourrait permettre le bourgeonnement de la membrane (72).

1.3.3.2.1 Transport des corps multivésiculaires et sécrétion des exosomes

Pour que les exosomes soient sécrétés, les corps multivésiculaires doivent d'abord échapper à la fusion avec les lysosomes (86). Ensuite, les corps multivésiculaires doivent migrer jusqu'à la membrane plasmique et s'y amarrer. Enfin, la fusion de la membrane externe du corps multivésiculaire avec la membrane plasmique permet de libérer les exosomes à l'extérieur de la cellule. Plusieurs acteurs moléculaires sont impliqués dans ces processus.

La petite GTPase Rab7 régule l'acheminement des corps multivésiculaires vers la membrane plasmique ou les lysosomes. En effet, Rab7 est nécessaire pour la sécrétion des exosomes, et la déplétion de Rab7 cause l'accumulation de vésicules intraluminales dans les corps multivésiculaires (83). Par contre, l'ubiquitination de Rab7 permet de recruter la machinerie nécessaire pour le transport rétrograde – vers l'extrémité négative des microtubules - des corps multivésiculaires jusqu'aux lysosomes (87, 88).

D'autres petites GTPases, les isoformes Rab27a et Rab27b, permettent la sécrétion des exosomes. Alors que seule Rab27b participe au transport des corps multivésiculaires vers la membrane plasmique, Rab27a et Rab27b permettent l'amarrage des corps multivésiculaires à la membrane plasmique (89).

L'organisation du cytosquelette est également importante pour la sécrétion des exosomes. Par exemple, les réseaux d'actine branchée au niveau du cortex cellulaire forment des sites d'amarrage près de la membrane plasmique pour les corps multivésiculaires. Ces réseaux d'actine branchée sont stabilisés par la protéine cortactine – une protéine de liaison à l'actine – et Rab27a (90).

La famille des *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor* (SNARE) contrôle la fusion membranaire dans de nombreux processus cellulaires, dont la fusion des corps

multivésiculaires avec la membrane plasmique (81). De façon générale, les SNARE complémentaires de deux membranes opposées forment une interaction similaire à une fermeture éclair qui permet de rapprocher suffisamment les deux membranes pour amorcer la fusion (91).

1.3.4 VE et communication intercellulaire

1.3.4.1 Cargo des vésicules extracellulaires

Dans le contexte des vésicules extracellulaires, le terme cargo désigne toutes les molécules qui composent la membrane des vésicules extracellulaires en plus de leur contenu luminal. Un large éventail de cargos se retrouve dans les vésicules extracellulaires.

La membrane des vésicules extracellulaires est composée d'une grande variété de lipides, dont le cholestérol, la sphingomyéline, la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine (92). La composition lipidique varie grandement selon le type de vésicules extracellulaires et le type cellulaire parental. Il semble toutefois que les microvésicules soient riches en céramide et en sphingomyéline et que les exosomes soient riches en glycolipide, en acides gras libre et en phosphatidylsérine dans plusieurs types cellulaires (93). En plus de contribuer à la structure des vésicules extracellulaires, les lipides peuvent participer à la signalisation intercellulaire (92).

Les vésicules extracellulaires transportent aussi des protéines. Plusieurs de ces protéines font partie de la machinerie de biogénèse des vésicules extracellulaires, comme ALIX et *Tumor susceptibility gene 101* (TSG101) (72). On y retrouve aussi, entre autres, des protéines chaperons, des enzymes, des protéines membranaires et des éléments du cytosquelette (72).

Les premiers acides nucléiques observés dans les vésicules extracellulaires ont été les ARN messagers (ARNm) et les micro-ARN (miARN) (94). Par la suite, une grande variété d'acides nucléiques ont été détectés dans les vésicules extracellulaires, dont plusieurs petits ARN non codants et de l'ADN double-brin (95, 96).

Il a aussi été montré que les vésicules extracellulaires contiennent divers métabolites. Par exemple, la coenzyme Q10 et la malonyl-coenzyme A ont été détectées dans les vésicules extracellulaires.

Le contenu en métabolites des vésicules extracellulaires serait le reflet du métabolome de leurs cellules parentales (97).

En plus de contenir une grande diversité de molécules, les vésicules extracellulaires peuvent transporter des organelles. Par exemple, des mitochondries entières ont été observées dans les vésicules extracellulaires (98).

Enfin, des facteurs comme le type cellulaire, l'état physiologique ou pathologique de la cellule ou encore les mécanismes de biogénèse contribuent à l'hétérogénéité du cargo des vésicules extracellulaires (99).

Plusieurs études montrent qu'au moins une partie du cargo des vésicules extracellulaires est empaquetée de manière régulée, suggérant un destin sécrétoire pour ces molécules (75). Par ailleurs, les vésicules extracellulaires peuvent livrer leur contenu à d'autres cellules et affecter de différentes façons les cellules qui les captent (100). Cela suggère que les vésicules extracellulaires sont un moyen de communication intercellulaire et non un simple moyen pour les cellules de se débarrasser de contenu indésirable.

1.3.4.1.1 *Micro-ARN*

Les miARN sont de courts ARN non-codants d'environ 22 nucléotides qui permettent de supprimer l'expression des gènes. Leur biogénèse nécessite plusieurs étapes de maturation suivant leur transcription. Le miARN mature est ensuite chargé sur la protéine Argonaute, et le complexe résultant est appelé *microRNA-induced silencing complex* (miRISC). miRISC utilise le miARN comme brin guide pour lier des ARNm par complémentarité de séquence, majoritairement dans la région *three prime Untranslated Transcribed Region* (3'UTR). La liaison de la cible mène soit à la dégradation de l'ARNm, soit à l'inhibition de sa traduction. Dans les deux cas, l'expression génique est empêchée (**Figure 6**) (101). La présence de miARN dans les vésicules extracellulaires est donc particulièrement intéressante car elle suggère qu'il existe des mécanismes de régulation épigénétique intercellulaire.

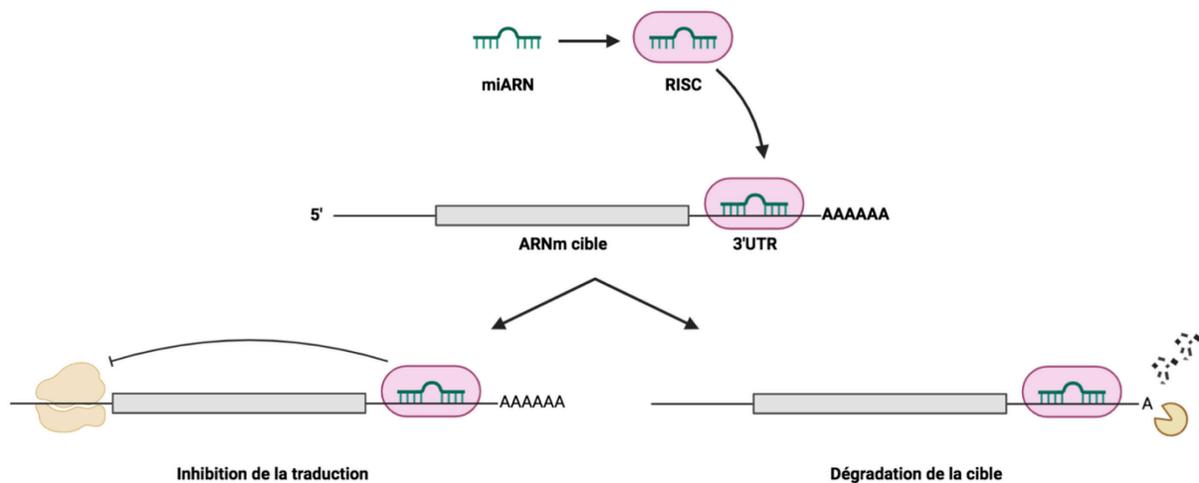


Figure 6. – Mode d'action des miARN

Le miARN mature est chargé sur la protéine Argonaute, formant ainsi le complexe miRISC. Le complexe miRISC utilise le miARN comme brin guide pour lier des ARNm par complémentarité de séquence. L'ARNm ainsi ciblé sera soit dégradé ou verra sa traduction inhibée. Dans les deux scénarios, la protéine encodée par l'ARNm n'est pas synthétisée. Figure préparée avec le logiciel BioRender.

1.3.4.2 Transport des vésicules extracellulaires dans l'organisme

Les vésicules extracellulaires peuvent agir de manière autocrine, tout comme le font les sécrétions solubles (102). De plus, l'action des vésicules extracellulaires peut être locale, par exemple en ciblant le microenvironnement de la cellule sécrétrice (103). Par ailleurs, les vésicules extracellulaires sont présentes dans la circulation sanguine, suggérant qu'elles permettent la communication endocrine (104). On retrouve aussi les vésicules extracellulaires dans d'autres fluides corporels, tels que la salive, le liquide cébrospinal et l'urine (105-107). Il a aussi été rapporté que les vésicules extracellulaires peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (108). En plus de permettre le transport de cargo sur de longues distances dans l'organisme, les vésicules extracellulaires peuvent être transmises d'un individu à un autre via le lait maternel (109).

1.3.4.3 Internalisation des vésicules extracellulaires par les cellules cibles

1.3.4.3.1 Amarrage à la cellule cible

Les vésicules extracellulaires sécrétées arrêtent leur circulation dans l'organisme en s'amarrant à une cellule cible. Si certaines études montrent que les vésicules extracellulaires lient préférentiellement certains types cellulaires (110, 111), d'autres études montrent qu'elles peuvent lier un large éventail de cibles, même entre différentes espèces (94, 112). Néanmoins, il semble que les protéines de surface, les lipides membranaires, et la matrice extracellulaire soient importants dans le processus d'amarrage des vésicules extracellulaires aux cellules cibles, et ces mêmes acteurs pourraient contribuer à la spécificité de liaison des vésicules extracellulaires (81).

Par exemple, les molécules de surface forment des interactions intégrines-*Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM) qui permettent la capture des exosomes (113). Les intégrines pourraient d'ailleurs être un déterminant de la spécificité pour les cellules cibles. Il a été montré que les exosomes ciblaient différents organes selon la combinaison d'intégrines présente à la surface des exosomes (114).

La matrice extracellulaire est également impliquée dans la capture des vésicules extracellulaires. Par exemple, la fibronectine, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, joue le rôle d'intermédiaire entre la cellule et les exosomes. En effet, la fibronectine se lie à l'héparane sulfate qui est présent à la fois à la surface des exosomes et de la cellule (115).

La composition lipidique des vésicules extracellulaires est aussi importante pour lier les cellules. Par exemple, la présence de phosphatidylsérine à la surface des vésicules extracellulaires faciliterait l'amarrage aux cellules cibles (113).

1.3.4.3.2 Voies d'entrée dans la cellule cible

Une fois immobilisée sur la cellule cible, une vésicule extracellulaire peut communiquer de trois façons. Elle peut initier une signalisation intracellulaire, être internalisée par endocytose ou fusionner avec la membrane plasmique (**Figure 7**).

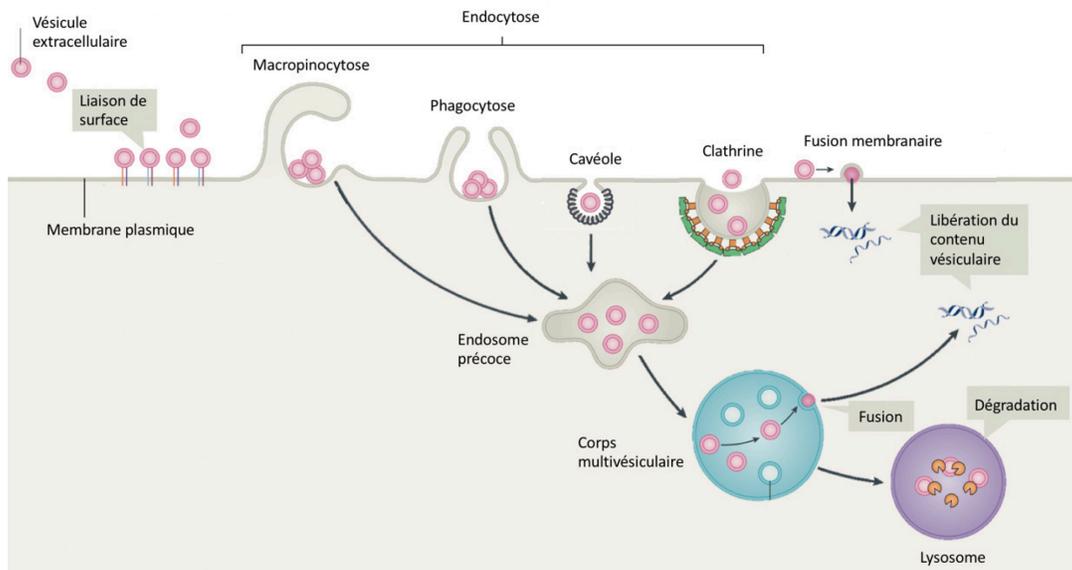


Figure 7. – Voies d’entrée des vésicules extracellulaires dans la cellule cible

Les vésicules extracellulaires peuvent lier un récepteur à la surface d’une cellule pour activer une signalisation intracellulaire. Les vésicules extracellulaires peuvent aussi pénétrer dans la cellule cible par endocytose ou par fusion à la membrane plasmique. L’endocytose d’une vésicule extracellulaire peut se faire par macropinocytose, par phagocytose, par endocytose de vésicules recouvertes de clathrines ou par endocytose par les cavéoles. Les vésicules internalisées par endocytose se retrouvent dans un corps multivésiculaire. La fusion du corps multivésiculaire avec le lysosome mène à la dégradation des vésicules. Alternativement, la vésicule internalisée dans le corps multivésiculaire peut libérer son contenu dans le cytoplasme en fusionnant avec la membrane du corps multivésiculaire. Adapté de van Niel, D’Angelo et al. 2018 (72).

D’abord, une vésicule extracellulaire liée à une cellule peut, sans y pénétrer, induire une signalisation intracellulaire. Par exemple, il a été montré que des exosomes portant un complexe majeur d’histocompatibilité de classe II (CMH II) pouvaient présenter des antigènes et induire une réponse dans les lymphocytes T (116).

Une autre possibilité est que la vésicule extracellulaire soit internalisée par différentes voies d’endocytose. Ces voies incluent la phagocytose, la macropinocytose, l’endocytose par vésicules recouvertes de clathrines et l’endocytose par les cavéoles (117-120). Les vésicules extracellulaires internalisées par endocytose se retrouvent éventuellement dans un corps multivésiculaire, et celui-ci peut fusionner avec un lysosome, menant à la dégradation des vésicules extracellulaires

internalisées (121). Alternativement, une vésicule à l'intérieur du corps multivésiculaire peut fusionner avec la membrane de ce dernier, et ainsi libérer son contenu dans le cytoplasme (122).

Le dernier scénario implique que la membrane de la vésicule extracellulaire fusionne directement avec la membrane plasmique (123). Ce processus est probablement moins fréquent que l'endocytose, mais il permet de libérer rapidement le contenu vésiculaire dans le cytoplasme sans risquer la dégradation par les lysosomes (124).

1.3.4.4 Effets des vésicules extracellulaires sur les cellules cibles

Les vésicules extracellulaires ont un large spectre d'effets sur leurs cellules cibles. Les VE participent à certaines fonctions physiologiques, mais elles sont aussi impliquées dans plusieurs processus pathologiques, dont la tumorigenèse.

Les VE auraient entre autres des fonctions bénéfiques au sein du système immunitaire et au niveau des processus de régénération. Par exemple, les exosomes participent à l'immunité adaptative en présentant des antigènes via le CMH II aux cellules T (116). De plus, suite à un infarctus, les VE sécrétées par les cellules progénitrices cardiaques protégeraient les cardiomyocytes de l'apoptose (125). Aussi, les cellules de Schwann sécrètent des VE qui favorisent la régénération axonale après une blessure du nerf sciatique (126).

Le rôle des VE dans la tumorigenèse est étudié abondamment. Il est proposé que les cellules moins malignes au sein d'une tumeur peuvent augmenter leurs capacités de prolifération, de survie et de migration en recevant les VE produites par les cellules cancéreuses plus agressives (127). Par exemple, chez la souris, la transmission de VE sécrétées par les cellules tumorales malignes à des cellules tumorales moins malignes rend ces dernières plus métastatiques (128). Par ailleurs, les VE des cellules cancéreuses peuvent influencer le microenvironnement tumoral. En effet, les exosomes dérivés d'adénocarcinome canalaire du pancréas augmentent les sécrétions pro-tumorales des macrophages associés à la tumeur (103). Aussi, les VE dérivées de carcinome pulmonaire de Lewis permettent l'amplification de la population de cellules myéloïdes suppressives, des cellules qui suppriment la réponse immunitaire anti-tumorale (129).

1.3.5 Vésicules extracellulaires et sénescence

1.3.5.1 Sécrétion des vésicules extracellulaires dans la sénescence

Plusieurs articles rapportent une sécrétion accrue de vésicules extracellulaires par les cellules sénescents. Le premier article publié à ce sujet rapporte que la sénescence induite par irradiation dans des cellules humaines de cancer de la prostate et la sénescence répliquative des fibroblastes humains normaux s'accompagnent d'une augmentation de la sécrétion d'exosomes (130). Plus récemment, il a été montré que les sécrétions de vésicules extracellulaires étaient augmentées dans la sénescence répliquative, dans la sénescence induite par oncogène, stress oxydatif, irradiation et chimiothérapie (131-136).

1.3.5.2 Cargo des vésicules extracellulaires associées à la sénescence

Le cargo protéique des vésicules extracellulaire est modifié dans la sénescence. Par exemple, il a été rapporté qu'il y avait un enrichissement de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire dans les vésicules extracellulaires de sénescence induite par chimiothérapie chez les cellules de cancer du sein (133). Il a aussi été montré que le cargo protéique des vésicules extracellulaires provenant des cellules sénescents était différent des protéines du SASP (136).

Aussi, plusieurs miARN sont enrichis dans les vésicules extracellulaires des cellules sénescents. Il a été montré que plus de 80% des miARN détectés dans les vésicules extracellulaires de vésicules de fibroblastes non-sénescents étaient présents en plus grande quantité dans les vésicules extracellulaires de cellules sénescents (134). Par ailleurs, alors que certains miARN enrichis dans les vésicules extracellulaires des cellules sénescents sont également surexprimés dans leurs cellules parentales, d'autres miARN sont sélectivement enrichis dans les vésicules mais pas dans la cellule sénescence d'origine (137). Le cargo en miARN des vésicules extracellulaires ne reflète donc pas nécessairement le répertoire de miARN intracellulaire de la cellule sénescence, suggérant la présence d'un mécanisme de ciblage spécifique de certains miARN durant la sénescence.

1.3.5.3 Effets des vésicules extracellulaires associées à la sénescence

En plus d'être sécrétées en grande quantité, les vésicules extracellulaires des cellules sénescents semblent avoir des effets pathologiques. Par exemple, les VE des fibroblastes sénescents favorisent

la prolifération de cellules de cancer du sein, de cancer de l'ovaire et de cancer de l'œsophage *in vitro* via le transfert de *Ephrin type-A receptor 2* (EphA2) (135). De plus, les VE riches en miR-31 isolées du plasma de personnes âgées inhibent la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes, diminuant ainsi la capacité de régénération des os (138). Les cellules endothéliales sénescents ont été identifiées comme source possible de ces VE, suggérant que les VE associées à la sénescence ont un rôle dans la diminution de régénération des os associées à l'âge (138).

Récemment, il a été montré que les VE des cellules sénescents étaient impliquées dans la propagation de la sénescence de manière paracrine. Dans cette étude, *Interferon-induced transmembrane protein 3* (IFITM3), enrichie dans les VE des cellules sénescents, seraient en partie responsable de cet effet (132). Qui plus est, les VE isolées du plasma des personnes âgées sont enrichies en IFITM3 par rapport aux VE des donneurs jeunes, suggérant un lien mécanistique entre les VE et le vieillissement chez l'humain (132). Les VE associées à la sénescence pourraient donc contribuer à propager la sénescence dans l'organisme et amplifier ses effets dommageables.

Les VE pourraient donc être considérées comme des membres du SASP participant aux effets néfastes des cellules sénescents dans l'organisme. Les VE ont cependant la particularité de livrer tout leur contenu à une seule cellule, alors que les sécrétions solubles sont plutôt diluées et dispersées dans le microenvironnement cellulaire ou dans la circulation. Par exemple, une seule VE peut transmettre tout un cocktail de miARN à une cellule cible. Les VE constituent donc potentiellement un mécanisme efficace pour réguler l'expression génique de manière paracrine.

1.3.6 Vésicules extracellulaires et macrophages

Les macrophages sont connus pour leur capacité à sécréter des facteurs solubles comme des cytokines (139). Cependant, leur capacité à communiquer avec leur environnement par le moyen de vésicules extracellulaires gagne de plus en plus d'intérêt.

Par exemple, les vésicules extracellulaires des macrophages participent à la polarisation M1/M2 d'autres macrophages. En effet, il a été observé que les macrophages naïfs exposés aux exosomes sécrétés par les macrophages de type M1 développent un phénotype M1 (140). À l'inverse, la différenciation vers un phénotype M2 est observée après le traitement avec des exosomes

provenant de macrophages M2 (140). Ainsi, les macrophages semblent utiliser les exosomes pour propager des signaux pro- et anti-inflammatoires.

Plusieurs études ont établi des liens entre les vésicules extracellulaires des macrophages et diverses pathologies. Par exemple, les exosomes provenant des macrophages du tissu adipeux transportent à courte et longue distance des miARN qui régulent la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose (141). Ces vésicules extracellulaires semblent ainsi jouer un rôle dans le diabète de type 2. Aussi, les vésicules extracellulaires sécrétées par les macrophages spumeux favoriseraient la progression de l'athérosclérose en empêchant la migration d'autres macrophages hors de la plaque athéromateuse (142). Également, les exosomes riches en long ARN non-codant provenant des macrophages de type M2 participent à la formation de cicatrices hypertrophiques, un type de cicatrisation pathologique (143).

De plus, les vésicules extracellulaires sécrétées par les macrophages associés aux tumeurs semblent contribuer à la progression tumorale par différents mécanismes. Par exemple, le transfert de miR-365 des TAM aux cellules d'adénocarcinome canalaire pancréatique via des exosomes induit la résistance à l'agent chimiothérapeutique Gemcitabine (144). Il a aussi été montré que les exosomes dérivés de TAM favorisent le développement de métastases dans le cancer colorectal via le transfert de miR-21 et miR-155 (145). Les vésicules extracellulaires des TAM pourraient aussi contribuer à créer un microenvironnement tumoral immunosuppresseur qui favorise la progression du cancer de l'ovaire (146).

1.3.7 Techniques et marqueurs pour l'étude des VE

Le domaine d'étude des vésicules extracellulaires est encore jeune et le développement des connaissances sur ce sujet est limité par certains défis techniques causés entre autres par la petite taille de ces particules et la difficulté d'en isoler en grande quantité. Par ailleurs, l'utilisation de techniques très variées entre les groupes recherche pour l'isolation et la caractérisation des vésicules extracellulaires a tendance à occasionner un manque de reproductibilité des données publiées. Le guide intitulé *Minimal information for studies of extracellular vesicles* (MISEV), rédigé par le groupe *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV), est une collaboration entre de nombreux experts du domaine visant à proposer des méthodes rigoureuses pour étudier les

vésicules extracellulaires (147). Certains points importants de ce document sont résumés ci-dessous pour faciliter la compréhension des résultats présentés dans ce mémoire.

1.3.7.1 Séparation et concentration des vésicules extracellulaires

Aucune méthode à ce jour ne permet l'isolation des vésicules extracellulaires avec à la fois un rendement et une spécificité élevés. Il est donc important de considérer lequel de ces deux facteurs est prioritaire dans le contexte de l'objectif expérimental. Parmi les méthodes offrant un rendement élevé mais une faible spécificité pour les vésicules extracellulaires, on retrouve entre autres la précipitation à l'aide de polymères et l'ultracentrifugation à très haute vitesse, qui peuvent faire précipiter d'autre matériel extracellulaire présent dans l'échantillon biologique. La chromatographie d'exclusion stérique et l'ultracentrifugation différentielle sont des exemples de méthodes au rendement et à la spécificité intermédiaires. On parle de spécificité élevée quand on purifie des sous-types de vésicules extracellulaires, par exemple selon leur taille (par filtration), selon leur densité (par centrifugation en gradient de densité) ou selon leurs molécules de surface (par isolation basée sur l'affinité ou par cytométrie en flux). Ces méthodes ont généralement un faible rendement. Deux ou plusieurs méthodes peuvent être combinées pour augmenter la spécificité de séparation des vésicules extracellulaires. Il est important de noter que les particules isolées ne devraient pas être désignées par les termes exosome ou microvésicule, à moins de montrer qu'elles proviennent bien respectivement des endosomes ou de la membrane plasmique. Le terme générique vésicule extracellulaire devrait alors être employé (147).

1.3.7.2 Quantification des vésicules extracellulaires

Le nombre de vésicules extracellulaires devrait être déterminé ou estimé, par exemple par analyse de suivi des nanoparticules (*Nanoparticle tracking analysis, NTA*) ou par cytométrie en flux. La cytométrie en flux et la technique NTA utilisent le principe de diffusion de lumière lorsqu'un laser rencontre une particule (vésicule extracellulaire) pour évaluer la taille et l'abondance des particules (148). Avec la cytométrie en flux, les vésicules extracellulaires en suspension défilent en flux devant un laser (148). L'appareil analyse une à une la diffusion de la lumière causée par chaque particule. La technique peut aussi être combinée à la fluorescence. La technique NTA permet de suivre et d'enregistrer les mouvement brownien des particules (vésicules extracellulaires) en

suspension exposées à un laser (148). Une caméra enregistre les déplacements de chaque particule à partir desquels il est possible de calculer la distribution des tailles des particules et leur concentration. Les vésicules extracellulaires peuvent aussi être marquées avec des fluorochromes pour leur analyse par NTA. Alternativement, la quantification des protéines totales dans les VE purifiées peut servir à estimer l'abondance des vésicules extracellulaires. Dans le même ordre d'idées, la quantification des lipides totaux ou des ARN totaux des VE purifiées peuvent être employées pour évaluer l'abondance des VE (147).

1.3.7.3 Marqueurs protéiques des vésicules extracellulaires

Dans le but de s'assurer de la présence de vésicules extracellulaires dans l'échantillon, ainsi que de l'absence de contaminants, différentes catégories de protéines devraient être analysées. La première catégorie vise à montrer la présence d'une bicouche lipidique et regroupe les protéines transmembranaires ou ancrées à la membrane. Les plus largement utilisées sont les tétraspanines CD9, CD63 et CD81. La deuxième catégorie a pour but de vérifier la présence de protéines cytosoliques qui auraient été intégrées dans les vésicules extracellulaires. Des exemples de telles protéines sont ALIX, *70 kilodalton heat shock proteins* (HSP70), Synténine, Actine, Tubuline, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH). La troisième catégorie vise à estimer la pureté des vésicules extracellulaires en analysant la présence de protéines qui sont fréquemment co-isolées avec les vésicules extracellulaires. Ce sont des protéines qu'on retrouve dans le sérum du milieu de culture cellulaire ou dans les fluides corporels, comme l'albumine et les apolipoprotéines. Facultativement, on peut confirmer l'absence de protéines provenant de compartiments cellulaires autres que l'endosome et la membrane plasmique, tels que le noyau (histones), les mitochondries (*Translocase Of Outer Mitochondrial Membrane 20* (TOMM20)) ou le réticulum endoplasmique (Calnexine) (147).

1.4 Hypothèse et objectifs

En résumé, la sénescence cellulaire est un acteur important du vieillissement et des maladies qui y sont associées. L'accumulation des cellules sénescents dans l'organisme avec l'âge en combinaison avec l'action pro-inflammatoire du SASP semble contribuer aux dysfonctions tissulaires associées à plusieurs pathologies du vieillissement. D'autre part, la sénescence s'accompagne d'une sécrétion accrue de vésicules extracellulaires et celles-ci ont été impliquées dans de nombreuses maladies dont le cancer et l'ostéoporose.

Par ailleurs, des travaux récents suggèrent qu'une grande partie des cellules sénescents *in vivo* sont des macrophages. De plus, les macrophages sénescents ont été impliqués dans l'athérosclérose et les maladies neurodégénératives. Pourtant, les macrophages sénescents sont peu étudiés, contrairement aux modèles classiques de sénescence chez les fibroblastes. La façon dont les macrophages sénescents participent aux dysfonctions tissulaires associées à l'âge doit être investiguée.

Nous proposons que les sécrétions solubles et vésiculaires des macrophages sénescents contribuent aux maladies associées au vieillissement en promouvant une inflammation chronique menant à diverses dysfonctions tissulaires, et en propageant la sénescence de façon paracrine, augmentant ainsi la charge de cellules sénescents dans l'organisme. La caractérisation plus détaillée de ces macrophages sénescents est donc importante.

L'objectif de ce mémoire est d'abord d'établir et de caractériser un nouveau modèle *in vitro* de sénescence chez les macrophages. Le second objectif est de faire la caractérisation des VE sécrétées par les macrophages sénescents.

Chapitre 2 – Manuscrit

The proinflammatory landscape of senescent macrophages includes both inflammatory cytokines and miRNA loaded extracellular vesicles

Camille Laliberté, Véronique Bourdeau, Bianca Bossé, Sébastien Igelmann, Lisbeth Carolina Aguilar, Marlene Oeffinger, Luc DesGroseillers and Gerardo Ferbeyre

Contributions : L'étudiante a planifié, réalisé et analysé la majorité des expériences, en plus d'avoir rédigé le manuscrit. Véronique Bourdeau a planifié et réalisé les expériences initiales démarrant le projet, et a fait certaines analyses bio-informatiques. Bianca Bossé a contribué à reproduire certaines expériences. Sebastian Igelmann a fait et analysé les expériences d'immunofluorescence. Lisbeth Carolina Aguilar a fait la spectrométrie de masse et l'analyse des données brutes de spectrométrie de masse. Marlene Oeffinger a supervisé les expériences de spectrométrie de masse. Luc DesGroseillers a initié et supervisé le projet. Gerardo Ferbeyre a conseillé les directions du projet en tant que directeur de recherche et a révisé le manuscrit.

Le manuscrit présenté ici est une ébauche d'article. Des expériences supplémentaires devront être réalisées avant la soumission pour publication dans la revue Aging Cell.

2.1 Abstract

Aging involves chronic inflammation, which is associated with many age-related pathologies including Alzheimer's disease, atherosclerosis, idiopathic pulmonary fibrosis and cancer. Senescent cells, which accumulate with age, exhibit a pro-inflammatory senescence-associated secretory phenotype (SASP). Thus, the SASP is thought to contribute to age-associated diseases. Recently, many studies have reported an increased secretion of extracellular vesicles (EVs) during senescence. EVs are small particles which carry biomolecules from one cell to another. We hypothesized that senescent macrophages could contribute to age-related pathologies by promoting inflammation through their secretions of EVs and soluble factors. Here, we established an *in vitro* model of senescence induced by Raf-1 oncogene in RAW 264.7 murine macrophages. The transcriptomic analysis of senescent macrophages revealed an important inflammatory signature regulated by NFkB. We observed an increased secretion of EVs in senescent macrophages, and these EVs presented an enrichment for ribosomal proteins, Major vault protein and pro-inflammatory miR-21a, miR-155 and miR-132. Secretions of senescent macrophages induced a growth arrest and inflammation in IMR90 fibroblasts, which could potentially be caused by SASP or miRNAs found in EVs. We conclude that senescent macrophages spread inflammation, suggesting a potential role for senescent macrophages in *inflamm-aging*. Treatment with Navitoclax could be used to eliminate senescent macrophages and prevent their deleterious effects.

2.2 Introduction

Cellular senescence is an important cellular mechanism underlying aging and age-related diseases (1). Senescence can be defined as a stable cell cycle arrest in response to endogenous or exogenous stress, such as telomere dysfunction, DNA damage, oncogene activation, oxidative stress, or mitochondrial dysfunction (2). These signals generally activate tumor suppressing pathways p53/p21 and p16/RB (2) preventing the proliferation of damaged cells (3). Senescent cells secrete pro-inflammatory molecules such as cytokines, chemokines, growth factors and proteases, and this phenomenon is called senescence-associated secretory phenotype (SASP) (4). The SASP is thought to alert the immune system which allows the elimination of damaged cells, thus preventing tumorigenesis (5). Ironically, some members of the SASP, like growth factors and proteases, contribute to angiogenesis and tumor invasion (6, 7). Another downside of the SASP is its ability to induce senescence in other cells in a paracrine fashion (8). Through this paracrine senescence, the SASP therefore contributes to increasing the burden of senescent cells in the organism.

Senescent cells accumulate in aging organisms (9-12) and are linked to age-related diseases such as pulmonary fibrosis (13, 14), type 2 diabetes, (15) and osteoarthritis (16-18). When senescent cells accumulate, the persistence of their secretions favors chronic inflammation, which is characterized by infiltration of immune cells in tissues together with fibrosis and necrosis of these tissues (19). Chronic inflammation is an important characteristic of aging, and this phenomenon has been termed *inflamm-aging* (20). Chronic inflammation has been linked with various aging-associated diseases, such as Alzheimer's disease, type 2 diabetes, atherosclerosis, and cancer among others (21, 22). Thus, by contributing to chronic inflammation, SASP could play a key role in aging and age-related diseases.

Interestingly, development of novel transgenic mouse models and senolytic compounds has made it possible to study the impact of depleting senescent cells from the organism. For example, the activation of a suicide gene in cells expressing the senescent marker p16 extends the healthy lifespan of old mice and prevents some age-related conditions like renal dysfunction, cataracts and tissue inflammation (23). Clearing senescent cells has also been shown to reduce non-alcoholic

fatty-liver disease, to slow down osteoarthritis and to protect against the onset of Parkinson's disease (17, 24, 25).

Some studies show that senescence in macrophages could play a role in the development of aging-associated diseases. For instance, angiogenic secretions of senescent macrophages could contribute to age related macular degeneration (26). Also, by secreting pro-inflammatory factors and metalloproteases, senescent macrophages that accumulate in the atheromatous plaque favor the progression of atherosclerosis (27). Senescence in microglia – specialized macrophages of the central nervous system – has been reported to participate in tau protein aggregation which contributes to neurodegenerative diseases (28). Intriguingly, it has been suggested that macrophages account for a large proportion of cells bearing senescent markers p16 and senescence-associated beta-Galactosidase in mouse (29). However, the biology of senescent macrophages is still poorly understood.

In addition to soluble factors, senescent cells secrete large amounts of extracellular vesicles (EVs) (30-38). EVs are particles delimited by a lipid bilayer considered important players in intercellular communication as they deliver molecules from one cell to another (39-41). EVs transport a wide range of biological molecules, including proteins, lipids, nucleic acids, metabolites and even organelles such as mitochondria (42-46). Importantly, EVs are important carriers of miRNA which are able to elicit gene silencing in recipient cells (47). EVs are divided into two main categories: microvesicles and exosomes. Microvesicles are typically larger vesicles (50 nm to 1 μ m) and they bud directly from the plasma membrane (37, 48). Exosomes are smaller vesicles (50 -150 nm) that are formed in endosomes. Inward budding from the endosome membrane gives rise to intraluminal vesicles, and this organelle is called multivesicular body (MVB) (37, 49). When the MVB fuses with the plasma membrane, they release exosomes in the extracellular space (49).

Like soluble secretions, EVs affect the producing cell in an autocrine fashion or their local environment through paracrine signaling (50, 51). Interestingly, the presence of EVs in blood circulation suggest they can participate in endocrine signaling (52). They are also found in other bodily fluids such as saliva, cerebrospinal fluid, urine and breast milk (53-55). EVs from senescent cells seem to have pathological effects, like promoting cancer, decreasing bone regeneration

capacity and inducing paracrine senescence (32, 35, 56). It has been proposed that senescent-derived EVs are part of the SASP (57).

Here, we catalogued the transcriptome changes associated to senescence in macrophages as well as the RNA and protein content of their EV secretions. Together the secretory products of macrophages have the potential to spread inflammation and explain the pathological roles of these cells during aging and age-linked diseases.

2.3 Materials and methods

Cell culture

Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Wisent) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Gibco), 2 mM L-glutamine (Wisent) and 1 % penicillin G/streptomycin sulfate (Wisent). RAW 264.7 cells were obtained from ATCC and detached mechanically, whereas Phoenix cells (kind gift from Dr S.W. Lowe; Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York) were detached using trypsin (Wisent).

Viral-mediated gene transfer

Plasmids used were: MSCV hygro Δ Raf-1:ER and MSCV hygro ER (which obtained by subcloning BamHI / SnaBI from pBABE- Δ Raf-1:ER or pBABE-ER, gifts from S.W. Lowe, into MSCV hygro with modified multiple cloning sites) as well as MSCV Δ Raf-1:ER IRES tdTomato (obtained by subcloning the insert of MSCV hygro Δ Raf-1:ER with BamHI / XhoI into BglII / XhoI of MSCV-IRES_Tomato from Addgene, plasmid #107229). A day before transfections, Phoenix Ampho packaging cells were seeded to obtain approximately 50 % confluency in 10 cm plates. Transfections were done using calcium phosphate precipitation with 20 μ g plasmid DNA and 10 μ g of amphotropic accessory plasmid. To increase expression of transfected construction, transfected cells were treated with 10 mM sodium butyrate 24 h after transfection. Medium was replaced 8 hours later. The next day, culture medium containing viral particles was harvested and filtered (0.45 μ m), then supplemented with 10 % fresh medium and 4 μ g/mL polybrene. This medium full of viral particles was transferred on RAW 264.7 for infection. Fresh medium was added to transfected Phoenix cells which were incubated at 37 °C for 6 hours prior to repeating the infection protocol. Selection of infected RAW 264.7 cells was carried out according to the selectable gene of the plasmid used for viral-mediated gene transfer using either hygromycin B (70 μ g/mL, 10 days) or via sorting by FACS at IRIC cytometry platform on a BD FACSAria cell sorter for cells exhibiting high tdTomato signal.

Growth curve

Relative growth of RAW 264.7 cells was assessed by crystal violet retention assay. RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER or ER were seeded at a density of 10,000 cells/well in 12-well plate. Cells were treated with 4-hydroxytamoxifen (4-OHT, 100 nM) or vehicle (Ethanol) 24 hours after seeding (day 0). Media was changed and a fresh dose of either 4-OHT or Vehicle was added every 48 hours. Cells were fixed every 24 hours during 6 days. Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), then were fixed 10 minutes at room temperature with a glutaraldehyde solution (1 % in PBS). Cells were washed twice with PBS and stained with a crystal violet solution (0.3 % in PBS) for 30 min under agitation. Crystal violet in excess was removed by immersion washes in water 10 times. Once the plates were dry, the fixed crystal violet cell staining was dissolved with an acetic acid solution (10 % in distilled water) under agitation for 30 minutes and optical density was measured at 590 nm to evaluate relative growth.

Western blots

Cells and extracellular vesicles were collected in a Laemmli buffer containing Tris-HCl pH 8 (120 mM); glycerol (20% v/v) and sodium dodecyl sulfate (4% m/v). Total proteins were quantified with NanoDrop (absorbance at 280 nm). For kinetics of Δ Raf-1-ER activation, 20 μ g of protein extracts was loaded on bilayered SDS-PAGE with 15% acrylamide in lower half and 8.5% acrylamide in upper half of the gel under a 4% stacking layer. BLUeye Prestained Protein Ladder (FroggaBio) was used as a molecular ladder. Proteins were transferred on nitrocellulose membrane (Biorad). Primary antibodies used for immunoblotting were: Anti-Estrogen Receptor alpha (1:1000, clone F-10, sc-8002, Santa Cruz Biotechnology). Anti-p44-42 MAPK (Erk1/2) (1:1000, #9102, Cell Signaling Technology). Anti-Phospho-p44-42 MAPK (Erk1/2)^{Thr202/Tyr204} (1:1000, clone D13.14.4E, #4370, Cell Signaling Technology). Anti-Histone H3 (1:2000, ab1791, Abcam). Anti-Phospho-histone H3^{Ser10} (1:1000, #06-570, Millipore). Anti- α -Tubulin (1:10 000, clone B-5-1-2, T6074, Sigma). Secondary antibodies coupled to peroxidase (Biorad) and ECL detection reagent were used to reveal the signals.

Detection of senescence-associated- β -Galactosidase activity

Senescence-associated- β -Galactosidase (SA- β -Gal) staining was performed 72 hours post 4-OHT-induction of senescence in RAW 264.7 macrophages expressing Δ Raf-1:ER. Cells were washed twice with PBS at pH 5.5 and fixed 15 minutes at room temperature with a glutaraldehyde solution (0.5 % in PBS pH 5.5). Fixed cells were washed twice with a $MgCl_2$ solution (1 mM $MgCl_2$ in PBS pH 5.5). Cells were then incubated at 4°C overnight in a 0.2 μ m filtered X-Gal solution (1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, in PBS $MgCl_2$ at pH 5.5). Cells were further incubated at 37°C until development of blue coloration (approximately 2-6 hours). Percentage of blue cells was calculated by counting the number of blue cells from 100 cells in 3 different areas.

RNA extraction, cDNA synthesis and qPCR

Cells and extracellular vesicles were collected in 1 mL TRIzol (Invitrogen) to isolate total RNAs. RNAs were extracted by phase separation by adding 200 μ L of chloroform to 1 mL samples in TRIzol and centrifuging at 12,000 g for 15 minutes at 4°C. The upper aqueous phase was collected and incubated for 10 minutes at room temperature with 500 μ L of isopropanol. RNAs were precipitated by centrifuging at 12,000 g for 10 minutes at 4°C. RNA pellet was washed with 1 mL of 75% ethanol and centrifuged at 12,000 g for 5 minutes at 4°C. RNA pellet was left to dry prior to resuspension in RNase free water at 55°C for 20 minutes. Concentration and purity of total RNAs were measured with NanoDrop using absorbance at 260 nm.

To study messenger RNAs, reverse transcription of mRNAs was performed on 2 μ g of total RNAs with 4 μ L of 5X All-In-One RT MasterMix (abm) in a final volume of 20 μ L. (Program: 25°C, 5 min; 37°C, 5 min; 42°C, 60 min; 85°C, 5 min). Resulting cDNA were diluted 10 times with water and stored at -20°C. Reactions for qPCR were performed in technical triplicate using 1 μ L of diluted cDNA samples per 10 μ L reaction volume also containing: 0.25 μ M of each primer (synthesized by Biocorp), 0.2 mM dNTP (DD0056, BioBasic), 0.33X Syber Green I (S7563, Invitrogen), 0.25 U Jump Start Taq DNA polymerase (D9307, MilliporeSigma) in 1X reaction buffer (provided with the enzyme) enrich with 2.5 mM more of $MgCl_2$ (M1028, Sigma). The LightCycler 96 Real-Time PCR System (Roche Applied Science) was used to detect the amplification level and was programmed

to an initial step of six minutes at 95°C, followed by 50 cycles of 20 seconds at 95°C, 20 seconds at 58°C and 20 seconds at 72°C. A high resolution melting from 60°C to 98°C followed the amplifications. All reactions were run in triplicate and the average values were used for relative quantification of target genes using the $\Delta\Delta CT$ method. Relative mRNA expression was normalized over expression of two housekeeping genes: HMBS and TBP in human samples and B-Actin and Tbp in murine samples.

To study microRNAs, a polyadenylation step was performed prior to reverse-transcription. Polyadenylation was performed on 2 μg of total RNAs with E. coli Poly(A) Polymerase and its buffer (NEB) in a final volume of 10 μL . (Program: 37°C, 50 min; 65 °C, 20 min). Resulting polyadenylated RNA were reverse transcribed using OneScript Plus cDNA Synthesis kit (abm) and a universal reverse primer (58) containing the sequence for both a TaqMan probe and a reverse qPCR primer (Program: 70°C, 5 min; 25°C, 5 min; 37°C, 5 min; 42°C, 60 min; 85°C, 5 min). Resulting cDNA were diluted 10 times with water and stored at -20°C. Again, qPCR reactions were performed in technical triplicate using 1 μL of diluted cDNA samples per 10 μL reaction volume this time containing: 1.5 μM of each specific forward and universal reverse primers (synthetized by Biocorp), 0.2 mM dNTP (DD0056, BioBasic), 50 nM TaqMan Universal probe (synthetized by IDT), 0.25 U Jump Start Taq DNA polymerase (D9307, MilliporeSigma) in 1X reaction buffer (provided with the enzyme) enrich with 2.5 mM more of MgCl_2 (M1028, Sigma). The LightCycler 96 Real-Time PCR System (Roche Applied Science) was used to detect the amplification level and was programmed to an initial six minutes step at 95°C, followed by 45 cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average values were used for relative quantification of target genes using the $\Delta\Delta CT$ method. Relative miRNA expression was normalized over expression of two housekeeping genes: snRNA U6 and rRNA 5S.

Table 1 Primers for SYBR Green Real-Time qPCR

Specie	Gene	Forward primer	Reverse primer
Mus musculus	Ki67	agggtaactcgtggaaccaa	ttaacttcttggcgatacaaatgctc
	C2cd5	ggtaaagggttcttattcaggcaagg	ggcaagagattactgatagctgtgg
	Cntlh	ggaggaagagctgagcagcctaa	ccacagagaccatacaaatccttctgc
	Patzl	cagtgggcaaaccgtacatctg	tgcacctgcttgatgtgtccatt
	Trdmt1	ggttgcgagaggatggaacc	tgtgcagggatatgactttctcg
	Cdkn1a/p21	cacagctcagtgactggaa	accctagaccacaatgcag
	Pml	ccagcgtcctgccacagt	ggtgcgatatgcattcagtaactc
	Fam214b	cccaaggagcctgttttggga	tcgaaggagccttagcttcagg
	Tgfb1	gcaacatgtggaactctaccaga	acagccactcaggcgtatcag
	Pai-1	ttgtccagcgggacctagag	aagtccacctgtttaccatagtct
	Angptl2	ccctggaggttgactgtcatc	cgatgttccaaacccttgctt
	Tm4sf1	tgaagaggactgctgtggttgc	gggctcatagcacttgaccac
	Mcpt1	ggcacttctcttgccttctgga	catgtaaggacgggagtgtggtc
	Gm5483	gatctgccacaccagaaatcca	ggaggaaacaaccaccaccaac
	Tmem132b	tggggcccagcaaatcacct	tgcatccacagactccaacaca
	Itgb3	cgccatcatgcaggctacagt	cactagcaaatgggatgctgca
	Slc9a2	tgggcttctgtctgtttacc	ggtccggaaccagttaatcacc
	Upp1	acactctggaagccttctcgcg	gcacgtcttcttcttctgctgct
	Itga3	gggcttgggcaaagtctacatc	cctggcagtcagagtttctctc
	Tbp	gtttctgcggtcgcgtcatctt	tctgggttatcttcacacacatga
B-Actin	tctagcaccatgaagatcaagatc	ctgcttgctgatccacatctg	
Homo sapiens	TBP	gctggccatagtgatctttgc	cttcacacgccaagaacagtgga
	HMBS	aacggcaatgcggctgcaa	gggtaccacgcaatcac
	IL1A	cggttgagttaagccaatccatc	ggtgctgacctaggcttgatga
	IL8	ggcacaactttcagagacagca	ggcaaaactgcaccttcacaca
	IL6	ccaggagcccagctatgaactc	aaggcagcaggcaacaccag

Table 2 Primers for reverse transcription and TaqMan Real-Time qPCR of miRNAs

	Primer
mmu-miR-21a-5p forward primer	gtgccgtagcttatcagactgatgttga
mmu-miR-132-3p forward primer	gtgccgtaacagtctacagccatggctcg
mmu-miR-155-5p forward primer	gtgccgttaatgctaattgtgatag
mmu-5S rRNA forward primer	ctgggaataaccgggtgctgtag
mmu-U6 forward primer	cacgcaaattcgtgaagcgttccat
Universal real-time qPCR Reverse primer	ccagtctcagggtccgaggtattc
Universal reverse transcription primer	cgactcgatccagtctcagggtccgaggtattc gatcc taacctctcctcggtatcgagtcgcacttttttttttv

Immunofluorescence

RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER were seeded on coverslip in 6-well plates at a density of 250,000 cells/well and treated with 4-OHT (100 nM) or at a density of 125,000 cells/well and treated with Vehicle (EtOH). A second treatment was performed 48 hours after the first one. After the 72 hours in culture on coverslip, cells were rinsed once with PBS and fixed in a solution of 4% paraformaldehyde in PBS for 10 minutes at room temperature (RT). Two more washes in PBS followed and fixed cells then were kept at 4°C in PBS Azide until immunostaining. Cells were washed twice 5 min at RT with PBS 0.1 M Glycin to remove azide and then permeabilized with 0.1 M Glycine and 0.4% Triton X100 in PBS for 5 min at 4°C. Then, they were incubated 3 times for 15 min with 3% BSA in PBS. Primary antibody was diluted in 3% BSA in PBS. Primary antibody was added to coverslip and incubated in humidified chamber at 4°C overnight. Next day, the cells were washed 3 times with PBS 3% BSA for 10 min. Species specific Alexa-fluor conjugated secondary antibody (Life technologies) were diluted 1:1500 in 3% BSA in PBS and incubated for 1 hour at RT. Cells were then washed three times with PBS, excess PBS was removed and coverslips were mounted on glass slides with Vectashield with DAPI. Edges were sealed off with nail polish and mounted cells were kept for a minimum of 24h at 4°C. On day of confocal imaging coverslips were removed from the fridge at least 1 hour prior to imaging and put in microscope box to warm up to room temperature of the microscope. For further confocal microscope imaging the Zeiss LSM 800

with spectral analysis detector was used. All images were acquired sequentially. The data was acquired with a maximal airy unit of and processed using Zen software and ImageJ.

Primary antibodies used for immunofluorescence were: phospho-Ser 139 H2A.X (1:100, clone JBW-301, cat #05-636 Millipore), 53BP-1 (1:200, clone Ab-1, at # PC712 Calbiochem), Lamin B1 (1:450, cat # ab16048 Abcam), PML (1:300, produced by our laboratory against the peptide comprising amino acids 352–356 of human PML-IV, a region common to all PML isoforms).

RNAseq

RNAs from cells collected in TRIzol were extracted by phase separation with chloroform as described above. 600 μ L of upper aqueous phase was collected and incubated for 10 minutes at room temperature (RT) with 300 μ L isopropanol. This solution was loaded onto a RNeasy column (Qiagen Mini Kit #74106) and centrifuged at 12,000 rpm for 30 sec at RT. The column was centrifuged again at 12,000 rpm for 30 sec at RT after adding 700 μ L of RW1 Buffer to wash away non-RNA biomolecules. Residual salts were removed by washing twice with 500 μ L of RPE Buffer and centrifuging at 12,000 rpm for 30 sec at RT. Column was dried by centrifuging at 12,000 rpm for 2 min at RT. 50 μ L of RNase free water was incubated 2 min on the column before elution of RNAs by centrifuging at 12,000 rpm for 1 min at RT. RNAs were quantified with Qubit BR. 1000 ng of total RNA was used for library preparation. Quality of total RNA was assessed with the BioAnalyzer Nano (Agilent) and all samples had a RIN above 9.5. Library preparation was done with the KAPA mRNAseq Hyperprep kit (KAPA, Cat no. KK8581). Ligation was made with 64 nM final concentration of Illumina index and 9 PCR cycles was required to amplify cDNA libraries. Libraries were quantified by QuBit and BioAnalyzer DNA1000. All libraries were diluted to 10 nM and normalized by qPCR using the KAPA library quantification kit (KAPA; Cat no. KK4973). Libraries were pooled to equimolar concentration. Sequencing was performed with the Illumina Nextseq500 using the Nextseq High Output Kit (86 cycles) using 2.2 pM of the pooled libraries. Around 20 M single-end PF reads was generated per sample. Library preparation and sequencing was made at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform (IRIC).

Extracellular vesicles

Senescent and non-senescent macrophages were cultured in serum-free culture media 48 hours prior to extracellular vesicles harvest. EVs were separated from culture medium by polymer-based precipitation using ExoQuick-TC (SBI - System Biosciences, Palo Alto, CA) according to manufacturer's protocol. In short, culture medium was collected and centrifuged at 3000 g for 15 minutes to remove cellular debris. ExoQuick-TC reagent was added to the supernatant in a ratio of 1 mL to 5 mL of culture media. Samples were mixed by inversion and incubated at 4°C overnight. EVs were precipitated by centrifuging samples at 1500 g for 30 minutes and supernatant was removed. A centrifugation was performed at 1500 g for 5 minutes to remove residual liquid. EV pellet was resuspended either in TRIzol for RNA extraction or in Laemmli Buffer for western blots.

For fluorescent-Nanoparticle Tracking Analysis (fNTA), small RNAseq analysis and proteomics analysis, EVs were isolated at SBI from frozen conditioned media sent to them using ExoQuick-TC. The fNTA was performed by SBI by labeling EVs with the ExoGlow-NTA dye (SBI) to determine the abundance and size of EVs. For small RNAseq analysis, SBI isolated total RNA from EVs using the SeraMir Exosome RNA Purification Column kit (Cat #RA808A-1, SBI) according to their available protocols. For each sample, 1 µL of the final RNA eluate was used for measurement of small RNA concentration by Agilent Bioanalyzer Small RNA Assay using Bioanalyzer 2100 Expert instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Small RNA libraries were constructed with the CleanTag Small RNA Library Preparation Kit (TriLink, Cat# L-3206) according to the manufacturer's protocol. The final purified library was quantified with High Sensitivity DNA Reagents (Agilent Technologies, PO# G2933-85004) and High Sensitivity DNA Chips (Agilent Technologies, PO# 5067-4626). The libraries were pooled, and the 140 bp to 300 bp region was size selected on an 8% TBE gel (Invitrogen by Life Technologies, Ref# EC6215). The size selected library is quantified with High Sensitivity DNA 1000 Screen Tape (Agilent Technologies, PO # 5067-5584), High Sensitivity D1000 reagents (Agilent Technologies, PO# 5067-5585), and the TailorMix HT1 qPCR assay (SeqMatic, Cat# TM-505), followed by a NextSeq High Output single-end sequencing run at SR75 using NextSeq 500/550 High Output v2 kit (Cat #FC-404-2005, Illumina, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. NGS Library generation and sequencing were performed by System Biosciences.

Mass spectrometry

After purification, EVs were incubated with 0.017% NaDOC for 30 minutes on ice and precipitated overnight at 4°C in 6% TCA. After spinning for 60 minutes at max speed, the pellets were washed twice with ice-cold acetone and air dried. The samples were then reduced in urea and DTT, alkylated in iodoacetamide and then digested overnight at 37°C, 1 200 RPM with 260ng Trypsin (Promega V5111). The reaction was quenched in a final concentration of 0.71% formic acid and 4.57 mM TCEP. Tryptic digests were dried.

Prior to LC-MS/MS, protein digests were re-solubilized under agitation for 15 min in 10 µL of 0.2% formic acid. Desalting/cleanup of the digests was performed by using C18 ZipTip pipette tips (Millipore, Billerica, MA). Eluates were dried down in vacuum centrifuge and then re-solubilized under agitation for 15 min in 11 µL of 2%ACN / 1% formic acid. The LC column was a PicoFrit fused silica capillary column (15 cm x 75 µm i.d; New Objective, Woburn, MA), self-packed with C-18 reverse-phase material (Jupiter 5 µm particles, 300 Å pore size; Phenomenex, Torrance, CA) using a high pressure packing cell. This column was installed on the Easy-nLC II system (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) and coupled to the Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Scientific) through a Nanospray Flex Ion Source. The buffers used for chromatography were 0.2% formic acid (buffer A) and 100% acetonitrile/0.2% formic acid (buffer B). Peptides were loaded on-column at a flowrate of 600 nL/min and eluted with a 2 slope gradient at a flowrate of 250 nL/min. Solvent B first increased from 2 to 25% in 15 min and then from 25 to 80% B in 34 min.

Nanospray and S-lens voltages were set to 1.6 kV and 60 V, respectively. Capillary temperature was set to 250 °C. Full scan MS survey spectra (m/z 360-1560) in profile mode were acquired in the Orbitrap with a resolution of 120,000 with a target value at 1e6 and a maximum injection time of 50 ms. The 22 most intense peptide ions were fragmented in the HCD collision cell and analyzed in the linear ion trap with a target value at 2e4, a maximum injection time of 50 ms and a normalized collision energy at 28 V. Target ions selected for fragmentation were dynamically excluded for 15 sec after two MS2 events. For protein identification, the peak list files were generated with Proteome Discoverer (version 2.1) using the following parameters: minimum mass set to 500 Da, maximum mass set to 6000 Da, no grouping of MS/MS spectra, precursor charge set

to auto, and minimum number of fragment ions set to 5. Protein database searching was performed with Mascot 2.6 (Matrix Science) against the Refseq_Human database (February 2018). The mass tolerances for precursor and fragment ions were set to 10 ppm and 0.6 Da, respectively. Trypsin was used as the enzyme allowing for up to 1 missed cleavage. Cysteine carbamidomethylation was specified as a fixed modification, and methionine oxidation as variable modifications. Data interpretation was performed using Scaffold (version 4.11.1).

Coculture

RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER were seeded in 6-well plates at a density of 250,000 cells/well and treated with 4-OHT (100 nM) or at a density of 125,000 cells/well and treated with Vehicle (EtOH). Culture media was replaced 24 hours later with fresh media to remove 4-OHT. The same day, IMR90 fibroblasts were seeded at a density of 10,000 cells/well in 6-well plate inserts (Sarstedt). Inserts were placed above RAW 264.7 cells for coculture. Every 48 hours, inserts were transferred above new senescent or control macrophages prepared as mentioned above. After a total of 9 days in coculture with macrophages, IMR90 fibroblasts were fixed in 1% glutaraldehyde. Relative growth was assessed by a Crystal Violet retention assay as detailed above.

Conditioned medium transfer

Senescent and non-senescent macrophages were cultured in medium containing 5% FBS 48 hours prior to conditioned medium harvest. Conditioned medium was filtered (0.45 μ m) and supplemented with 10% v/v with fresh medium (DMEM with 5% FBS). Conditioned medium was transferred on IMR90 fibroblasts. A second treatment with freshly harvested conditioned medium was performed after 48 hours. IMR90 were collected in TRIzol four days after the first treatment.

Senolytic assay

RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER were seeded at a density of 20,000 cells/well in 12-well plate. Cells were treated with 4-OHT (100 nM) or vehicle (Ethanol) 24 hours after seeding. Media was changed and cells were treated with Navitoclax ABT263 (10 μ M) or vehicle (DMSO) 24 hours after 4-OHT treatment. Cells were fixed in 1% glutaraldehyde 48 hours following Navitoclax treatment. Viability was assessed by a Crystal Violet retention assay as detailed above.

2.4 Results

Hyperactive ERK signaling induces senescence in murine macrophages

In order to establish an *in vitro* model of senescence in macrophage, we used a retroviral vector that expresses a conditional allele of the oncoprotein Raf-1 called Δ RAF-1:ER in RAW264.7 mouse macrophages. This fusion protein consists of the kinase domain of Raf-1 fused with the ligand-binding domain of the estrogen receptor α (ER). Treatment with 4-hydroxytamoxifen (4-OHT), a ligand of ER, allows the activation of Raf-1 activity. This regulated system is used to induce oncogene-induced senescence by hyperactivating the Mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway. Of note hyperactive ERK characterizes senescence in cell culture in response to short telomeres (59, 60) and *in vivo* both during premature aging (61) or natural aging (62-65), making this model relevant to the accumulation of senescent cells seen in old organisms.

We first validated the induction of senescence in our model by a panel of senescence markers. In RAW 264.7 macrophages, Raf-1 activation leads to growth arrest (**Fig 8A**). This effect is not directly caused by 4-OHT, as RAW 264.7 cells expressing ER do not exhibit this growth arrest. By western blot, we confirmed that Δ Raf-1:ER is expressed in RAW264.7 cells (**Fig 8B**). Treatment with 4-OHT initially increases Δ Raf-1:ER expression, while the expression decreases after 4 days of treatment. As expected, treatment with 4-OHT increases the phosphorylation of Erk1/2 by activating the MAPK pathway (**Fig 8B**). This activation is however transient and is lost after 3-4 days of 4-OHT treatment, in agreement with Δ Raf-1:ER levels at the same time points. Moreover, Raf-1 activation is associated with a decrease in the levels of the mitosis marker phosphorylated Histone H3 (**Fig 8B**). We next investigated the levels of transcripts commonly used as senescence markers. *Cdkn1a* (p21), *Pml*, *Fam214b*, *Tgfb1*, *Pai-1*, *Angptl2* are significantly upregulated following treatment with 4-OHT, while *Ki67*, *C2cd5*, *Cntln*, *Patzl*, *Trdmt1* are downregulated by Raf-1 activation. (**Fig 8C-D**). We observed an accumulation of cells with senescence-associated β -Galactosidase (SA β -Gal) activity and cells displaying an enlarged morphology (**Fig 8E**). Raf-1 activation also increased the number of cells with Lamin B1 alterations (**Fig 8F-G**). Moreover, detection of 53BP-1 and γ -H2A.X foci indicated an increase of DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence (DNA-SCARS) in RAW 264.7 macrophages following treatment with 4-OHT (**Fig 8H-I**). An increase in

the number of nuclear PML foci was also detected in RAW 264.7 cells with activated Raf-1 (**Fig S1 A-B**). Together, these results suggest that activation of Raf-1 induces cellular senescence in RAW 264.7 macrophages by hyperactivating the MAPK pathway.

Enrichment of inflammatory genes in the transcriptome of senescent macrophages

To gain insight into gene expression of senescent macrophages, we compared the transcriptome of control (Ctrl) and senescent (Sen) macrophages (M Φ) by RNA sequencing (RNAseq). A volcano plot representations of this data highlights 1446 upregulated genes and 304 downregulated transcripts in Sen M Φ compared with Ctrl M Φ (**Fig 9A**). Some of the most highly enriched transcripts in Sen M Φ include *Itga3*, *Itgb3*, *Gm5483*, *Upp1*, *Slc9a2*, *Tm4sf1*, *Tmem132b* and *Mcpt1*. Distant regulatory elements (DiRE) algorithm predicted NF- κ B to be the most important transcription factor to explain the co-regulation of the top 100 most enriched transcripts in Sen M Φ (**Fig 9B**). To further investigate the particular signatures of senescent macrophages, we performed Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) with our RNAseq data (**Fig 9C**). We determined that genes found in *HALLMARK MYC TARGETS V1* and *HALLMARK E2F TARGETS* gene sets were downregulated in Sen M Φ . These two gene sets respectively encompasses a subgroup of genes regulated by MYC and genes encoding cell cycle related targets of E2F transcription factors. This supports a senescent cell-cycle arrest in Sen M Φ . Furthermore, there was an upregulation in Sen M Φ of genes found in the gene sets *HALLMARK INFLAMMATORY RESPONSE* and *HALLMARK TNFA SIGNALING VIA NFKB*. These categories are defined respectively as genes defining inflammatory response and genes regulated by NF- κ B in response to TNF, suggesting that Sen M Φ have an important pro-inflammatory SASP signature. Indeed, RNAseq revealed a wide range of cytokines upregulated in Sen M Φ (**Fig 9D**). Curiously, classic SASP markers, such as IL6 or IL8 were not identified as upregulated in Sen M Φ . To validate some of our RNAseq findings, we performed qPCR on Ctrl and Sen M Φ (**Fig 9E**). We found that *Itga3*, *Itgb3*, *Gm5483*, *Upp1*, *Slc9a2*, *Tm4sf1*, *Tmem132b* and *Mcpt1* were highly upregulated in Sen M Φ , reproducing the data from RNAseq. Together, these results suggest that inflammation is a strong hallmark of senescent macrophages

and NF- κ B could regulate the expression of this program. Moreover, the composition of the SASP of Sen M Φ might be distinct than the one from other senescent cell types.

Senescent macrophages secrete more EVs carrying RNA binding proteins and exosome proteins

As growing evidence suggest that EVs are highly secreted by senescent cells, we investigated the EVs of Sen M Φ . Fluorescent Nanoparticle Tracking analysis (fNTA) revealed that Sen M Φ secrete more EVs than Ctrl M Φ , although the size of EVs are similar in both conditions (**Fig 10A**). The proteome of EVs secreted by Ctrl and Sen M Φ was analyzed by Mass Spectrometry (MS). A total of 124 proteins were identified in all EVs with a minimum of 10 Exclusive spectrum counts. A Gene Ontology (GO) analysis of these proteins highlighted GO term referring to EVs and exosomes (**Fig 10B**). Of these 124 proteins, 29 were enriched and 2 were depleted in EVs from Sen M Φ compared to those of Ctrl M Φ (**Fig 10C**). As expected, some proteins enriched in EVs from Sen M Φ were associated with the GO term Vesicle. However, more than half of enriched proteins in Sen M Φ EVs were labeled as Intracellular, Extracellular space and/or Ribosomal subunit, suggesting that some proteins found in Sen M Φ EVs are not typical in EVs and their targeting to EV compartments could be promoted in senescence. Moreover, proteins enriched in Sen M Φ EVs are annotated as positive regulators of assembly and secretion of exosomes. These proteins could be responsible for the abundant EV secretions of Sen M Φ (**Fig 10D**). Interestingly, proteins of the large ribosomal subunit were found to be enriched in Sen M Φ EVs. Proteins annotated as involved in protein binding and RNA binding could be involved in the selection of the particular cargo of Sen M Φ EVs.

EVs from senescent macrophages carry pro-inflammatory miRNAs

To investigate the RNA cargo of Sen M Φ EVs, a small RNAseq analysis was performed. RNAs of both Ctrl and Sen M Φ and their derived EVs were compared. First, we compared the types of small RNAs regulated in each condition (**Fig 11A**). The majority of enriched RNAs in Sen M Φ EVs compared with Ctrl M Φ EVs are mRNAs, antisense transcripts, miRNAs and ncRNAs. Interestingly, piRNAs are largely depleted from Sen M Φ EVs, although they are not downregulated in their producing cells.

This could suggest the existence of a mechanism to exclude piRNAs from EVs in senescence. We next focused our analysis on miRNA cargo of Sen MΦ EVs, since their potential to regulate gene expression in recipient cells. In Sen MΦ in comparison to Ctrl MΦ, there were 64 miRNAs identified as downregulated, that is almost twice more miRNAs than those upregulated (**Fig 11B**). However, in Sen MΦ EVs compared with Ctrl MΦ EVs, there were 95 miRNAs identified as enriched, which is roughly 5 times more than the number of depleted miRNAs. This means that Sen MΦ EVs carry a wide variety of miRNAs which do not reflect the miRNA expression change at the intracellular levels, suggesting a regulated incorporation of miRNAs inside EVs in senescence. Moreover, when comparing the number of reads mapped to miRNAs or other RNAs, we found that miRNAs represented 25% of total reads in Sen MΦ EVs, which is twice as much as in all other conditions (**Fig 11C**). This suggests that miRNAs represent a large portion of the RNA cargo in Sen MΦ EVs. Furthermore, this fraction goes up to almost 50% when considering only regulated RNAs in Sen MΦ EVs compared with Ctrl MΦ EVs. This could mean that senescence promotes the incorporation of miRNAs in EVs. Some of the most enriched miRNAs in Sen MΦ EVs were pro-inflammatory the miRNAs miR-132-3p, miR-21a-5p and miR-155-5p. QPCR confirmed the enrichment of miR-132-3p, miR-21a-5p and miR-155-5p in Sen MΦ EVs (**Fig 11D**). Overall, small RNAseq findings indicate that miRNAs are abundant in EVs of Sen MΦ, and some of these miRNAs have known pro-inflammatory functions that could affect recipient cells.

Secretions of senescent macrophages induce inflammation in IMR90

To investigate the potential effect of Sen MΦ secretion on other cells, we cocultured either Ctrl or Sen MΦ with IMR90 fibroblasts (**Fig 12A-B**). We observed by Crystal violet retention assay that the growth of IMR90 fibroblasts was impaired following 9 days of coculture with Sen MΦ. Moreover, treatment of IMR90 fibroblasts with conditioned medium from Sen MΦ lead to an important induction of pro-inflammatory cytokines IL1A, IL6 and IL8 (**Fig 12C**). Together, these results suggest that secretions of senescent macrophages inflict an important stress on fibroblasts. This effect could be the result of soluble SASP factors and/or EVs carrying pro-inflammatory miRNAs.

Navitoclax treatment kills senescent macrophages

Since secretions from senescent macrophages seem to promote an inflammatory phenotype in fibroblasts, we examined the possibility of killing senescent macrophages using the senolytic Navitoclax (ABT263). Navitoclax kills senescent cells by inhibiting anti-apoptotic BCL-2 family members. We evaluated cell abundance by crystal violet retention assay (**Fig 13**). As expected, Sen MΦ were less abundant than MΦ when treated with vehicle, due to senescence growth arrest. Navitoclax treatment did not significantly affect Ctrl MΦ in comparison with Vehicle treatment. However, Sen MΦ were less abundant following Navitoclax treatment compared to Vehicle treatment. These results suggest Navitoclax has a senolytic effect on Sen MΦ.

2.5 Discussion

Here, we studied the changes in the transcriptome of senescent macrophages. We also reported the RNA and protein cargo of EVs secreted by these senescent macrophages. Our results suggest that the secretions of senescent macrophages could spread pro-inflammatory signals to other cells, which could contribute to age-related diseases.

Our RNAseq data indicated an upregulation of more than 50 cytokines in senescent macrophages. We propose these cytokines as members of the SASP of senescent macrophages. Intriguingly, classic SASP markers Il-6 and Il-8 were not upregulated in our model of senescence. A recent study aiming to identify ubiquitous members of the SASP throughout different senescence models also observed that upregulation of Il-6 and Il-8 was not shared between all these models (36). Moreover, our senescent macrophages exhibit an upregulation of Stc1, which was identified as a ubiquitous SASP marker by the same study. Senescent macrophages also shared a part of the SASP signature in Ras-induced senescence: Cxck1, Mmp3 and Mmp9 (36). The SASP of senescent macrophages could be under the transcriptional control of NF- κ B, as suggested by our analysis with the algorithm DiRE.

Furthermore, our results showed an important increase in the secretions of EVs by senescent macrophages compared with non-senescent macrophages. This increased EV secretion in senescence is consistent with the observations of other groups (30-35). Interestingly, Alix (also named Pdcd6ip), which was found by mass spectrometry to be enriched in the EVs of senescent macrophages, could play a role in increasing EVs secretion in these cells. Indeed, Alix is important for the biogenesis of exosome and its depletion decreases EV secretion (66).

In addition, the cargo of EVs from senescent macrophages was different than the one of EVs from non-senescent macrophages. Among others, miR-21, miR-155, miR-132, ribosomal proteins and Major Vault Protein (Mvp) were enriched in EVs of senescent macrophages. Interestingly, classic EV markers tetraspanins Cd9, Cd63 and Cd81 were not detected by mass spectrometry in EVs from both non-senescent and senescent macrophages, suggesting that tetraspanins might not be EV markers in macrophages. A recent study also found that tetraspanins were not ubiquitous EV markers among different cell lines (43). Instead, the authors identified Syntenin-1 (also called

Sdcbp) as a broadly conserved EV marker. Indeed, Syntenin-1 was detected in EVs from our senescent and non-senescent macrophages.

Ribosomal proteins Rpl3, Rpl4, Rpl6, Rpl18, Rplp0, Rplp2, and Rps9 were enriched in EVs from senescent macrophages. This could be linked to the imbalance between ribosomal RNAs and ribosomal proteins that is observed in senescent cells and is named senescence-associated ribogenesis defects (SARD) (67, 68).

Furthermore, Mvp was only detected in EVs of senescent macrophages. Of interest, it has been reported that Mvp is upregulated in senescent cells and aging organs, and that its transcription is regulated by p53, a key player in senescence (69, 70). Moreover, it has been proposed that Mvp could reinforce the MAPK signaling cascade by acting as a scaffold for proteins of this pathway (71). Since Mvp is abundant in EVs of senescent macrophages, it could contribute to paracrine senescence by promoting MAPK signaling. In addition, Mvp could take part in the cargo selection of EVs in senescent macrophages. Indeed, Mvp has been shown to carry miR-193a to exosomes, suggesting it could potentially carry other miRNAs to EVs (72). Mvp could also contribute to the incorporation of ribosomal proteins in EVs since it has been reported to interact with ribosomes (73).

We observed an induction of inflammation in IMR90 fibroblasts that were exposed to secretions of senescent macrophages. Several miRNAs were enriched in EVs of senescent macrophages, including miR-21, miR-155 and miR-132. These miRNAs share common targets. PTEN is targeted by these 3 miRNAs, whereas miR-21 and miR-155 both target SOCS1 (74, 75). PTEN is an important tumor suppressor, and its depletion has been reported to induce inflammation (76-78). SOCS1 is a modulator of cytokines signaling and its depletion leads to chronic inflammation (79). SOCS1 could also act as a tumor suppressor in some contexts (79). This suggests that miR-21, miR-155 and miR-132 could act in synergy to repress these targets and therefore promote inflammation-related pathologies or cancer. It has been observed previously that miR-21 is enriched in EVs of senescent cells and in EVs of old mice (80). Besides, miR-21 has been linked to various age-related diseases, including non-alcoholic fatty liver disease (81), idiopathic pulmonary fibrosis (82), and lung cancer (47). Studies have established a role for miR-155 in Alzheimer's disease (83), insulin resistance (84),

atherosclerosis (85) and various cancers (86). Moreover, it has been shown that miR-155 could promote inflammation by generating reactive oxygen species (87). As for miR-132, it has been shown to contribute to non-alcoholic fatty liver disease (88), Alzheimer's disease (89), atherosclerosis (90) and pancreatic cancer (75).

In addition, the inflammation and growth arrest observed in IMR90 fibroblasts exposed to secretions of senescent macrophages are compatible with the induction of paracrine senescence, although additional senescent markers need to be analyzed. Interestingly, EVs secreted by senescent macrophages have the potential to induce paracrine senescence. It has been reported that miR-21 can induce paracrine senescence by targeting SIRT1 and inhibiting DNMT1 (91). Furthermore, miR-155 has been shown to promote telomere dysfunction, suggesting it could induce paracrine senescence (92).

Identifying ways to eliminate senescent macrophages is relevant since the potential of these cells to promote various disorders associated to aging. We observed a small senolytic effect of Navitoclax on senescent macrophages. Navitoclax inhibits anti-apoptotic BCL2 and BCLXL (93). Different anti-apoptotic proteins could be at play in senescent macrophages, rendering them less responsive to Navitoclax. Interestingly, our RNAseq data shows an important upregulation of anti-apoptotic Bcl2a1a in senescent macrophages, suggesting a potential target for senolysis (94).

Our observations need to be reproduced in models of senescence induced by other stimuli in order to determine which characteristics apply to senescent macrophages in general. Moreover, we have to assess if the effect of senescent macrophages on fibroblasts is due to EVs, soluble SASP or both. The effect of miR-21, miR-155 and miR-132 on their targets should be evaluated in fibroblasts receiving EVs from senescent macrophages. In conclusion, our results are consistent with a pro-aging effect of senescent macrophages, notably through secretion of EVs carrying miRNAs implicated in pro-inflammatory pathologies.

2.6 References

1. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
2. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1238-46.
3. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010;24(22):2463-79.
4. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99-118.
5. 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.
6. Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*. 2006;281(40):29568-74.
7. Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*. 2007;67(7):3117-26.
8. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):978-90.
9. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9363-7.
10. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science*. 2006;311(5765):1257.

11. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*. 2009;8(3):311-23.
12. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*. 2006;443(7110):453-7.
13. Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, et al. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(3):L391-401.
14. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun*. 2017;8:14532.
15. Sone H, Kagawa Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia*. 2005;48(1):58-67.
16. Xu M, Bradley EW, Weivoda MM, Hwang SM, Pirtskhalava T, Decklever T, et al. Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(6):780-5.
17. Jeon OH, Kim C, Laberge RM, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med*. 2017;23(6):775-81.
18. Jeon OH, Wilson DR, Clement CC, Rathod S, Cherry C, Powell B, et al. Senescence cell-associated extracellular vesicles serve as osteoarthritis disease and therapeutic markers. *JCI Insight*. 2019;4(7).
19. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):238-46.
20. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244-54.

21. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev.* 2007;128(1):83-91.
22. 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.
23. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature.* 2016;530(7589):184-9.
24. Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonja T, Tiniakos D, Wilson CL, Lahat A, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun.* 2017;8:15691.
25. Chinta SJ, Woods G, Demaria M, Rane A, Zou Y, McQuade A, et al. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep.* 2018;22(4):930-40.
26. Nakamura R, Sene A, Santeford A, Gdoura A, Kubota S, Zapata N, et al. IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis. *Nat Commun.* 2015;6:7847.
27. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science.* 2016;354(6311):472-7.
28. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature.* 2018;562(7728):578-82.
29. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, et al. Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and beta-galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging (Albany NY).* 2016;8(7):1294-315.
30. Lehmann BD, Paine MS, Brooks AM, McCubrey JA, Renegar RH, Wang R, et al. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(19):7864-71.

31. Riquelme JA, Takov K, Santiago-Fernández C, Rossello X, Lavandero S, Yellon DM, et al. Increased production of functional small extracellular vesicles in senescent endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2020;24(8):4871-6.
32. Borghesan M, Fafian-Labora J, Eleftheriadou O, Carpintero-Fernandez P, Paez-Ribes M, Vizcay-Barrena G, et al. Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3. *Cell Rep.* 2019;27(13):3956-71 e6.
33. Kavanagh EL, Lindsay S, Halasz M, Gubbins LC, Weiner-Gorzel K, Guang MHZ, et al. Protein and chemotherapy profiling of extracellular vesicles harvested from therapeutic induced senescent triple negative breast cancer cells. *Oncogenesis.* 2017;6(10):e388.
34. Terlecki-Zaniewicz L, Lammermann I, Latreille J, Bobbili MR, Pils V, Schosserer M, et al. Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging (Albany NY).* 2018;10(5):1103-32.
35. Takasugi M, Okada R, Takahashi A, Virya Chen D, Watanabe S, Hara E. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat Commun.* 2017;8:15729.
36. Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol.* 2020;18(1):e3000599.
37. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(4):213-28.
38. Takasugi M. Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging. *Aging Cell.* 2018;17(2).
39. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987;262(19):9412-20.

40. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43-51.
41. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-83.
42. Skotland T, Sagini K, Sandvig K, Llorente A. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;159:308-21.
43. Kugeratski FG, Hodge K, Lilla S, McAndrews KM, Zhou X, Hwang RF, et al. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat Cell Biol.* 2021;23(6):631-41.
44. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.
45. Altadill T, Campoy I, Lanau L, Gill K, Rigau M, Gil-Moreno A, et al. Enabling Metabolomics Based Biomarker Discovery Studies Using Molecular Phenotyping of Exosome-Like Vesicles. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151339.
46. Phinney DG, Di Giuseppe M, Njah J, Sala E, Shiva S, St Croix CM, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat Commun.* 2015;6:8472.
47. Zhang X, Li F, Tang Y, Ren Q, Xiao B, Wan Y, et al. miR-21a in exosomes from Lewis lung carcinoma cells accelerates tumor growth through targeting PDCD4 to enhance expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Oncogene.* 2020;39(40):6354-69.
48. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases.* 2017;8(4):220-32.
49. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol.* 1985;101(3):942-8.

50. Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Morishita M, Charoenviriyakul C, et al. Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. *Cancer Sci.* 2017;108(9):1803-10.
51. Linton SS, Abraham T, Liao J, Clawson GA, Butler PJ, Fox T, et al. Tumor-promoting effects of pancreatic cancer cell exosomes on THP-1-derived macrophages. *PLoS One.* 2018;13(11):e0206759.
52. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.* 2005;17(7):879-87.
53. Yagi Y, Ohkubo T, Kawaji H, Machida A, Miyata H, Goda S, et al. Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes. *Neurosci Lett.* 2017;636:48-57.
54. Musante L, Bontha SV, La Salvia S, Fernandez-Piñeros A, Lannigan J, Le TH, et al. Rigorous characterization of urinary extracellular vesicles (uEVs) in the low centrifugation pellet - a neglected source for uEVs. *Sci Rep.* 2020;10(1):3701.
55. Winck FV, Prado Ribeiro AC, Ramos Domingues R, Ling LY, Riaño-Pachón DM, Rivera C, et al. Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivary extracellular vesicles. *Sci Rep.* 2015;5:16305.
56. Weilner S, Schraml E, Wieser M, Messner P, Schneider K, Wassermann K, et al. Secreted microvesicular miR-31 inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Aging Cell.* 2016;15(4):744-54.
57. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases. *Mol Aspects Med.* 2018;60:92-103.
58. Luo X, Zhang J, Wang H, Du Y, Yang L, Zheng F, et al. PolyA RT-PCR-based quantification of microRNA by using universal TaqMan probe. *Biotechnol Lett.* 2012;34(4):627-33.

59. Kim HS, Song MC, Kwak IH, Park TJ, Lim IK. Constitutive induction of p-Erk1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence. *J Biol Chem*. 2003;278(39):37497-510.
60. Deschênes-Simard X, Gaumont-Leclerc MF, Bourdeau V, Lessard F, Moiseeva O, Forest V, et al. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev*. 2013;27(8):900-15.
61. Mass E, Jacome-Galarza CE, Blank T, Lazarov T, Durham BH, Ozkaya N, et al. A somatic mutation in erythro-myeloid progenitors causes neurodegenerative disease. *Nature*. 2017;549(7672):389-93.
62. Slack C, Alic N, Foley A, Cabecinha M, Hoddinott MP, Partridge L. The Ras-Erk-ETS-Signaling Pathway Is a Drug Target for Longevity. *Cell*. 2015;162(1):72-83.
63. Lanna A, Gomes DC, Muller-Durovic B, McDonnell T, Escors D, Gilroy DW, et al. A sestrin-dependent Erk-Jnk-p38 MAPK activation complex inhibits immunity during aging. *Nat Immunol*. 2017;18(3):354-63.
64. Sun L, Zhang J, Chen W, Chen Y, Zhang X, Yang M, et al. Attenuation of epigenetic regulator SMARCA4 and ERK-ETS signaling suppresses aging-related dopaminergic degeneration. *Aging Cell*. 2020;19(9):e13210.
65. Lin Z, Miao J, Zhang T, He M, Wang Z, Feng X, et al. JUNB-FBXO21-ERK axis promotes cartilage degeneration in osteoarthritis by inhibiting autophagy. *Aging Cell*. 2021;20(2):e13306.
66. Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun*. 2017;8:15287.
67. Lessard F, Igelmann S, Trahan C, Huot G, Saint-Germain E, Mignacca L, et al. Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol*. 2018;20(7):789-99.
68. Lessard F, Brakier-Gingras L, Ferbeyre G. Ribosomal Proteins Control Tumor Suppressor Pathways in Response to Nucleolar Stress. *Bioessays*. 2019;41(3):e1800183.

69. Ryu SJ, An HJ, Oh YS, Choi HR, Ha MK, Park SC. On the role of major vault protein in the resistance of senescent human diploid fibroblasts to apoptosis. *Cell Death Differ.* 2008;15(11):1673-80.
70. An HJ, Ryu SJ, Kim SY, Choi HR, Chung JH, Park SC. Age associated high level of major vault protein is p53 dependent. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(5):289-95.
71. Kolli S, Zito CI, Mossink MH, Wiemer EA, Bennett AM. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29374-85.
72. Teng Y, Ren Y, Hu X, Mu J, Samykutty A, Zhuang X, et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun.* 2017;8:14448.
73. Hamill DR, Suprenant KA. Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. *Dev Biol.* 1997;190(1):117-28.
74. Xue X, Liu Y, Wang Y, Meng M, Wang K, Zang X, et al. MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN. *Oncotarget.* 2016;7(51):84508-19.
75. Zhang H, Liu A, Feng X, Tian L, Bo W, Wang H, et al. MiR-132 promotes the proliferation, invasion and migration of human pancreatic carcinoma by inhibition of the tumor suppressor gene PTEN. *Prog Biophys Mol Biol.* 2019;148:65-72.
76. Worby CA, Dixon JE. PTEN. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:641-69.
77. White ES, Atrasz RG, Hu B, Phan SH, Stambolic V, Mak TW, et al. Negative regulation of myofibroblast differentiation by PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on chromosome 10). *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(1):112-21.
78. Li XF, Chen X, Bao J, Xu L, Zhang L, Huang C, et al. PTEN negatively regulates the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines of fibroblast-like synoviocytes in adjuvant-induced arthritis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):3687-96.

79. Davey GM, Heath WR, Starr R. SOCS1: a potent and multifaceted regulator of cytokines and cell-mediated inflammation. *Tissue Antigens*. 2006;67(1):1-9.
80. Alibhai FJ, Lim F, Yeganeh A, DiStefano PV, Binesh-Marvasti T, Belfiore A, et al. Cellular senescence contributes to age-dependent changes in circulating extracellular vesicle cargo and function. *Aging Cell*. 2020:e13103.
81. Loyer X, Paradis V, Hénique C, Vion AC, Colnot N, Guerin CL, et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR α expression. *Gut*. 2016;65(11):1882-94.
82. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*. 2010;207(8):1589-97.
83. Lukiw WJ, Alexandrov PN, Zhao Y, Hill JM, Bhattacharjee S. Spreading of Alzheimer's disease inflammatory signaling through soluble micro-RNA. *Neuroreport*. 2012;23(10):621-6.
84. Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, Dong Y, Birmingham A, Seo JB, et al. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. *Cell*. 2017;171(2):372-84 e12.
85. Yang Y, Yang L, Liang X, Zhu G. MicroRNA-155 Promotes Atherosclerosis Inflammation via Targeting SOCS1. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(4):1371-81.
86. Bayraktar R, Van Roosbroeck K. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(1):33-44.
87. Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Obora K, Mori T, Fukuda K. miR-155 induces ROS generation through downregulation of antioxidation-related genes in mesenchymal stem cells. *Aging Cell*. 2017;16(6):1369-80.
88. Hanin G, Yayon N, Tzur Y, Haviv R, Bennett ER, Udi S, et al. miRNA-132 induces hepatic steatosis and hyperlipidaemia by synergistic multitarget suppression. *Gut*. 2018;67(6):1124-34.
89. Hadar A, Milanesi E, Walczak M, Puzianowska-Kuźnicka M, Kuźnicki J, Squassina A, et al. SIRT1, miR-132 and miR-212 link human longevity to Alzheimer's Disease. *Sci Rep*. 2018;8(1):8465.

90. Zhang L, Huang D, Wang Q, Shen D, Wang Y, Chen B, et al. MiR-132 inhibits expression of SIRT1 and induces pro-inflammatory processes of vascular endothelial inflammation through blockade of the SREBP-1c metabolic pathway. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2014;28(4):303-11.
91. Mensa E, Guescini M, Giuliani A, Bacalini MG, Ramini D, Corleone G, et al. Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells. *J Extracell Vesicles.* 2020;9(1):1725285.
92. Dinami R, Ercolani C, Petti E, Piazza S, Ciani Y, Sestito R, et al. miR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. *Cancer Res.* 2014;74(15):4145-56.
93. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 2008;68(9):3421-8.
94. Champa D, Russo MA, Liao XH, Refetoff S, Ghossein RA, Di Cristofano A. Obatoclox overcomes resistance to cell death in aggressive thyroid carcinomas by countering Bcl2a1 and Mcl1 overexpression. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(5):755-67.

2.7 Figure legends

Fig 8. Raf hyper-activation induces cellular senescence in RAW 264.7 murine macrophages

A) Growth curve of RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER or ER treated every 48 hours with vehicle (Ethanol) or 4-hydroxytamoxifen (4-OHT, 100 nM). Relative growth was assessed by crystal violet retention assay. Each point represents mean of a technical triplicate and error bars correspond to standard deviation. Experiment was performed 3 times (Graph corresponds to one representative biological replicate). **B)** Western blots showing levels of Δ Raf-1:ER (with ER- α antibody), phospho-ERK and phospho-histone H3. Protein extracts were obtained from RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER treated as in **A**. Tubulin was used as loading control. Experiment was performed 3 times (the figure corresponds to one representative biological replicate). **C)** and **D)** QPCR of markers which are upregulated in senescence (**C**) and downregulated in senescence (**D**). QPCR was performed on total RNA extract from RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER and treated as in **A**. RNA levels were normalized over Tbp and β -Actin. Experiment was performed 3 times. Error bars represent standard deviation. * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01 ; *** p-value < 0.001 using Student's t-Test. **E)** Senescence-associated β -Galactosidase staining of RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER treated as in **A**. Staining was performed 72 hours post-induction. **F)** Immunofluorescence (IF) staining of Lamin B1 with DAPI staining performed on RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER and treated with Vehicle or 4-OHT. **G)** Quantification of IF from **F** showing percentage of cells with Lamin B1 alterations. **H)** Immunofluorescence (IF) staining of γ -H2AX, 53BP-1 and DAPI staining performed on RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER and treated as in **F**. **I)** Quantification of IF from **G** showing number of cells with DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence (DNA-SCARS). For all IF, experiments were performed 3 times. **** p-value < 0.0001 using Mann-Whitney U Test.

Fig 9. Enrichment of inflammatory genes in the transcriptome of senescent macrophages

A) Volcano plot of the RNA sequencing (RNAseq) results comparing senescent and control macrophages. RNAseq was performed on 3 independent samples of both control and senescent macrophages. Upregulated and downregulated genes in senescent macrophages are reported as red dots and blue dots, respectively. Gray dots represent unregulated genes. Gene expression is considered regulated when its transcript levels change by two-fold with a p-value ≤ 0.01 . **B)** DiRE analysis obtained from top 95 upregulated genes in senescent macrophages according to RNAseq results. The 10 most important transcription factors as identified by the software DiRE (Distant Regulatory Elements of Co-regulated genes). Occurrence refers to the fraction of regulatory elements containing the binding site for the indicated transcription factor. **C)** Hallmark signatures found by analyzing the regulated genes from RNAseq results with Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software. Sen M Φ : Senescent macrophages, Ctrl M Φ : Control macrophages, NES: normalized enrichment score. **D)** Heatmap indicating upregulated cytokines in Sen M Φ from RNAseq results. **E)** QPCR validation of upregulated transcripts in Sen M Φ found in **A**. Dotted line represent RNA levels of Ctrl M Φ . RNA levels were normalized over Tbp and β -Actin. Experiment was performed 3 times. Error bars represent standard deviation. * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01 ; *** p-value < 0.001 using Student's t-Test.

Fig 10. Senescent macrophages secrete more EVs carrying RNA binding proteins and exosome proteins

A) Quantification of abundance and size of EVs derived from Ctrl and Sen M Φ by Fluorescent Nanoparticle tracking analysis (FNPA). EVs were separated from culture medium by polymer-based precipitation using Exo-Quick-TC. Mean of EV size distribution is indicated to the right. **B)** GO Term analysis of all 124 proteins identified by Mass Spectrometry (MS) in EVs derived from Ctrl and Sen M Φ . MS data was analyzed with Exclusive spectrum counts (ESC) ≥ 10 . BP: Biological Process, CC: Cellular component. **C)** STRING analysis of 31 proteins identified as regulated in Sen M Φ EVs by MS as in **B**. Proteins are considered regulated when Fold Change $\geq |1.5|$ and p-value ≤ 0.05 . Associated GO Cellular Components are indicated in color. **D)** GO Term analysis of the 31 proteins from **C**. MF: Molecular function.

Fig 11. EVs from senescent macrophages carry pro-inflammatory miRNAs

A) Distribution of RNAs species identified as upregulated (UP) or downregulated (DOWN) with Fold Change $\geq |2|$ and p-adjusted ≤ 0.005) in an analysis of small RNAseq of samples of Ctrl and Sen M Φ and their secreted EVs. RefSeq refers to mRNA, and RefSeq antisense refers to the antisense transcripts of a coding sequence. **B)** Proportion of UP and DOWN total RNAs and miRNAs identified by small RNAseq as regulated in Sen M Φ vs Ctrl M Φ and in Sen M Φ EVs vs Ctrl M Φ EVs. Fold Change $\geq |2|$ and p-adjusted ≤ 0.005 . **C)** Proportion of reads belonging to miRNAs or to other RNA species in all of the small RNAseq data or in the subgroup of reads from RNAs found regulated between the EVs from Sen M Φ compared to EVs from Ctrl M Φ using Fold Change $\geq |2|$ and p-adjusted ≤ 0.005 . **D)** QPCR validation for some miRNAs enriched in EVs Sen M Φ as identified by small RNAseq. RNA levels were normalized over snRNA U6 and rRNA 5S. Experiment was performed 2 times. Error bars represent standard deviation. * p-value < 0.05 ; ** p-value < 0.01 ; *** p-value < 0.001 using Student's t-Test.

Fig 12. Secretions of senescent macrophages induce inflammation in IMR90

A) Relative growth of IMR90 fibroblasts following 9 days of coculture with Ctrl M Φ and Sen M Φ . Relative growth of IMR90 was determined by Crystal Violet retention assay. **B)** Quantification of **A**. Crystal Violet was quantified by spectrophotometry (detection at 590 nm) after dissolution with 10% acetic acid. Experiment was performed 4 times. Error bars represent standard deviation. * p-value < 0.05 using Student's t-Test. **C)** QPCR of the levels of interleukins mRNAs in IMR90 fibroblasts. IMR90 fibroblasts were treated twice with conditioned medium (CM) from either Ctrl M Φ or Sen M Φ at 48 hours interval. Data normalized over TBP and HMBS. Experiment was performed 3 times. Error bars represent standard deviation. * p-value ≤ 0.05 ; ** p-value < 0.01 using Student's t-Test.

Fig 13. Navitoclax treatment kills senescent macrophages

Viability of Ctrl MΦ and Sen MΦ following treatment with 10 μM of Navitoclax (ABT263) senolytic or vehicle. Viability was determined by Crystal Violet retention assay. Experiment was performed 3 times. Error bars represent standard deviation. * p-value ≤ 0.05 ; *** p-value < 0.001 using ANOVA.

Fig S1. Raf hyper-activation induces nuclear PML foci in RAW 264.7 murine macrophages

A) Immunofluorescence (IF) staining of nuclear PML foci and DAPI staining performed on RAW 264.7 cells expressing ΔRaf-1:ER and treated with Vehicle or 4-OHT. **B)** Quantification of IF from **A** showing percentage the number of nuclear PML foci per cell. Experiments was performed 3 times. **** p-value < 0.0001 using Mann-Whitney U Test.

2.8 Figures

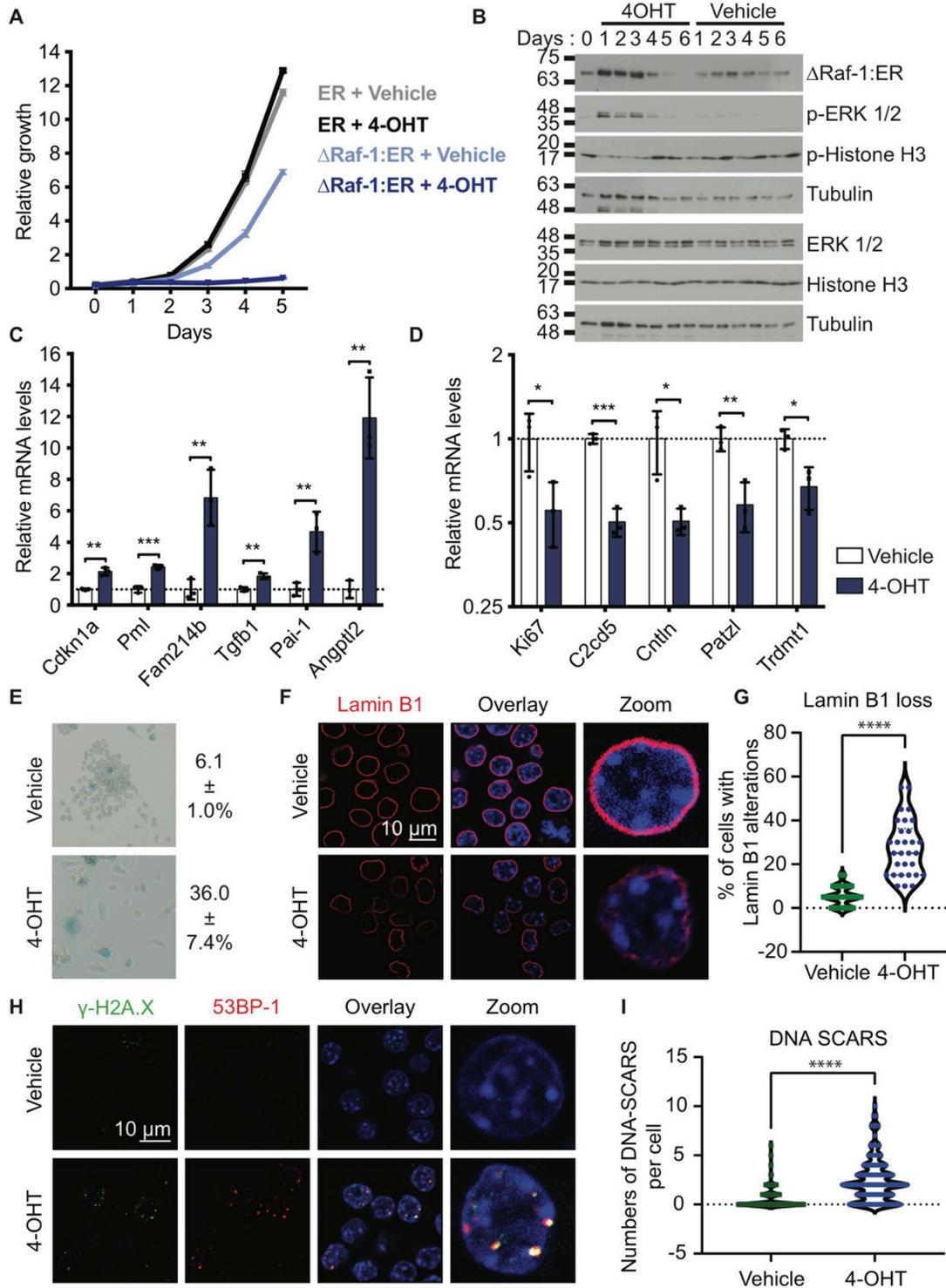


Figure 8. — Raf hyper-activation induces cellular senescence in RAW 264.7 murine macrophages

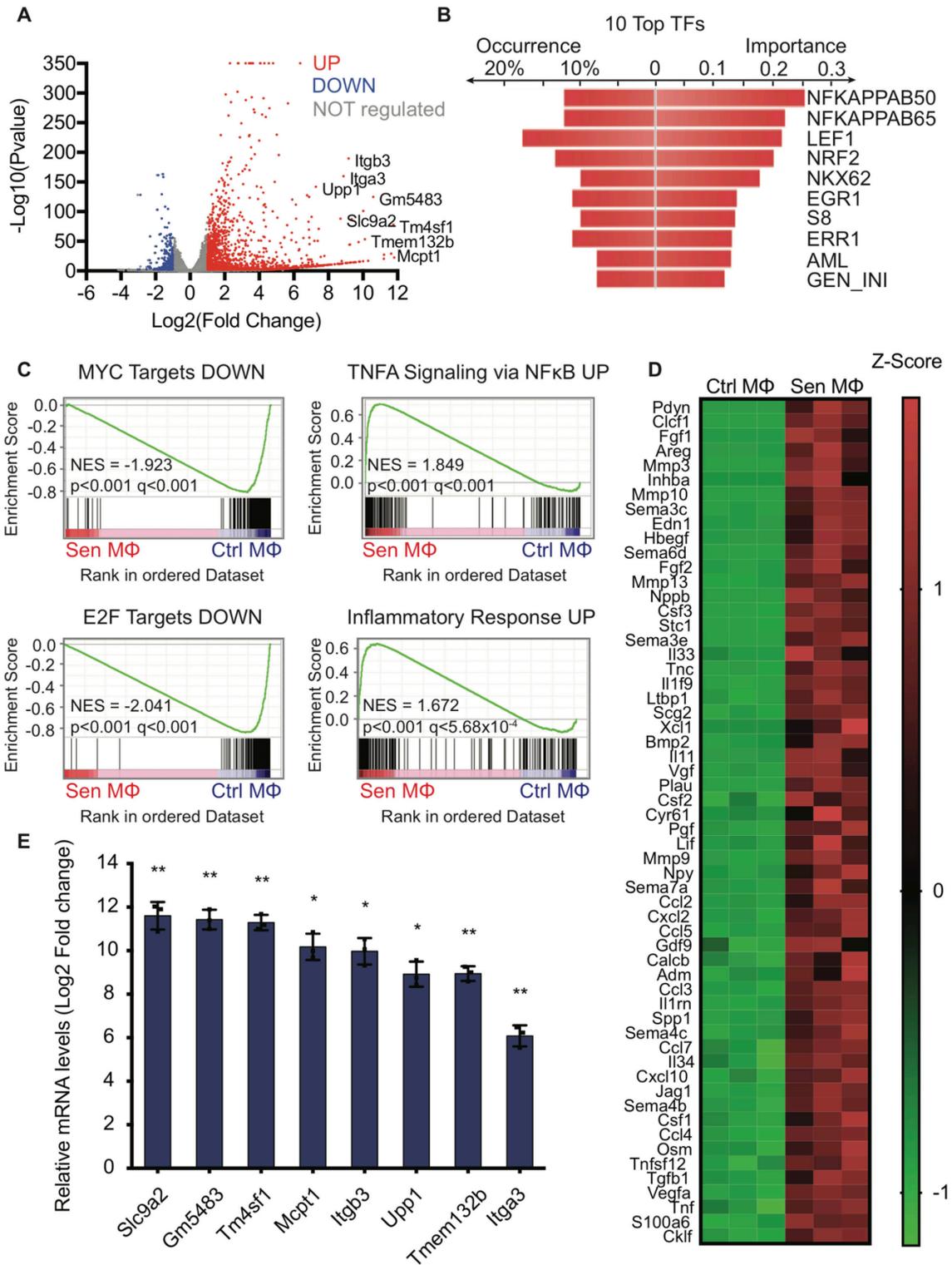


Figure 9. – Enrichment of inflammatory genes in the transcriptome of senescent macrophages

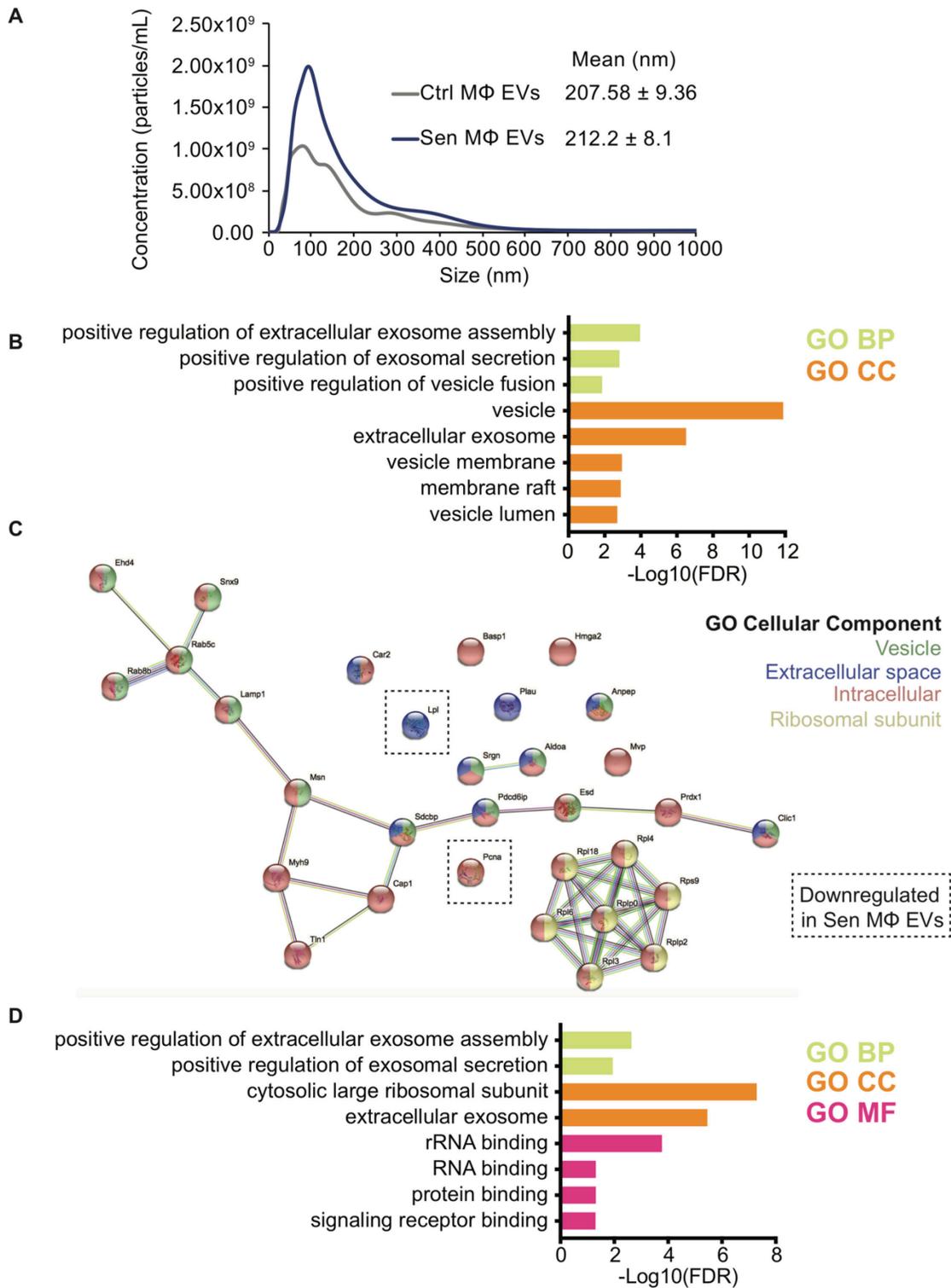


Figure 10. – Senescent macrophages secrete more EVs carrying RNA binding proteins and exosome proteins

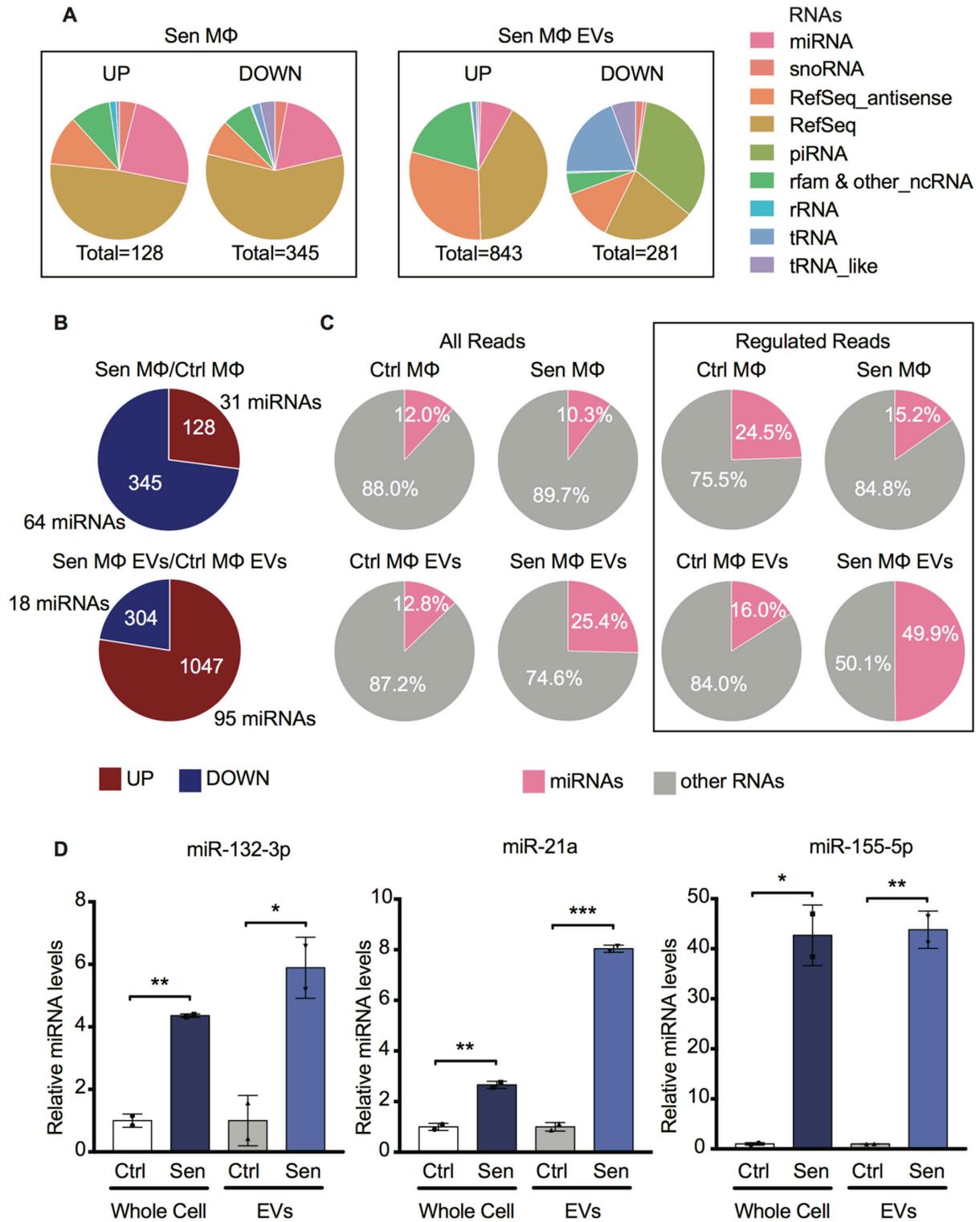


Figure 11. – EVs from senescent macrophages carry pro-inflammatory miRNAs

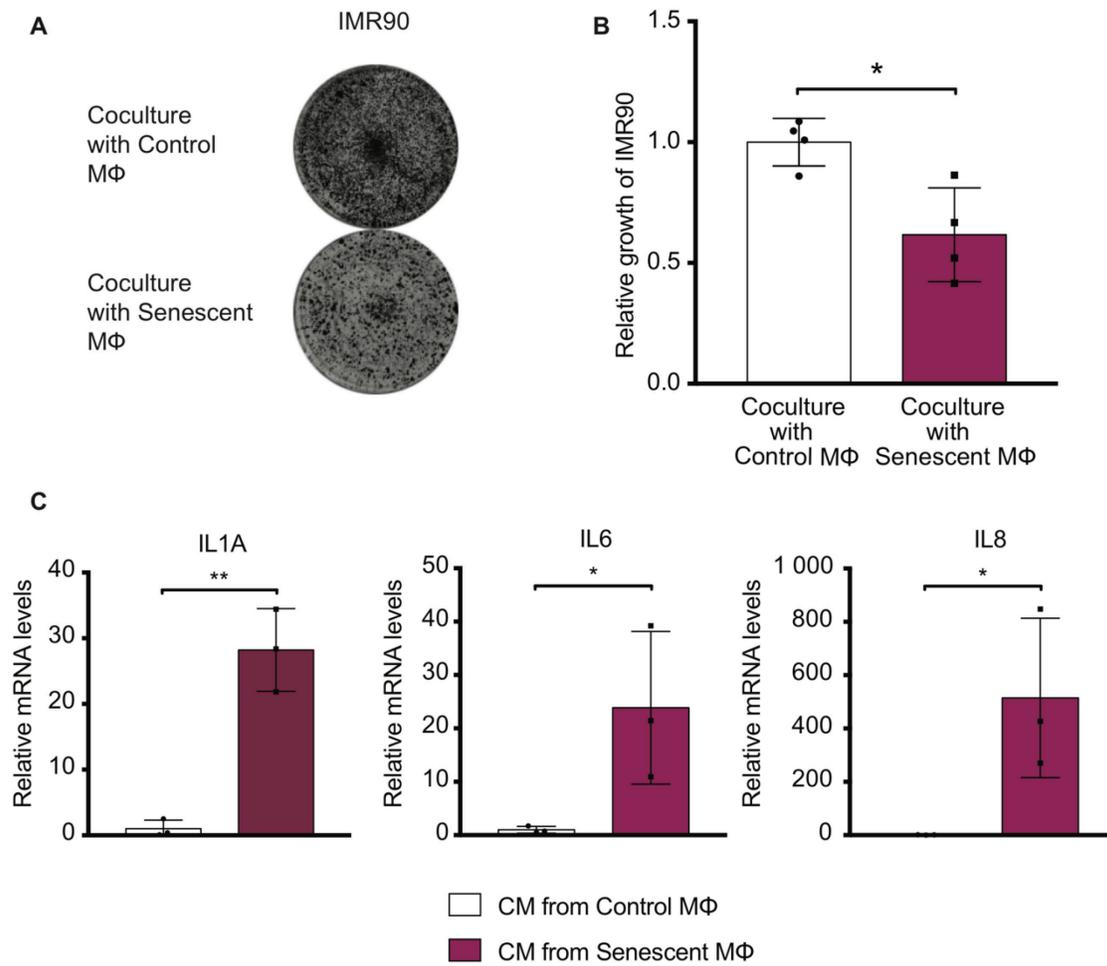


Figure 12. – Secretions of senescent macrophages induce inflammation in IMR90

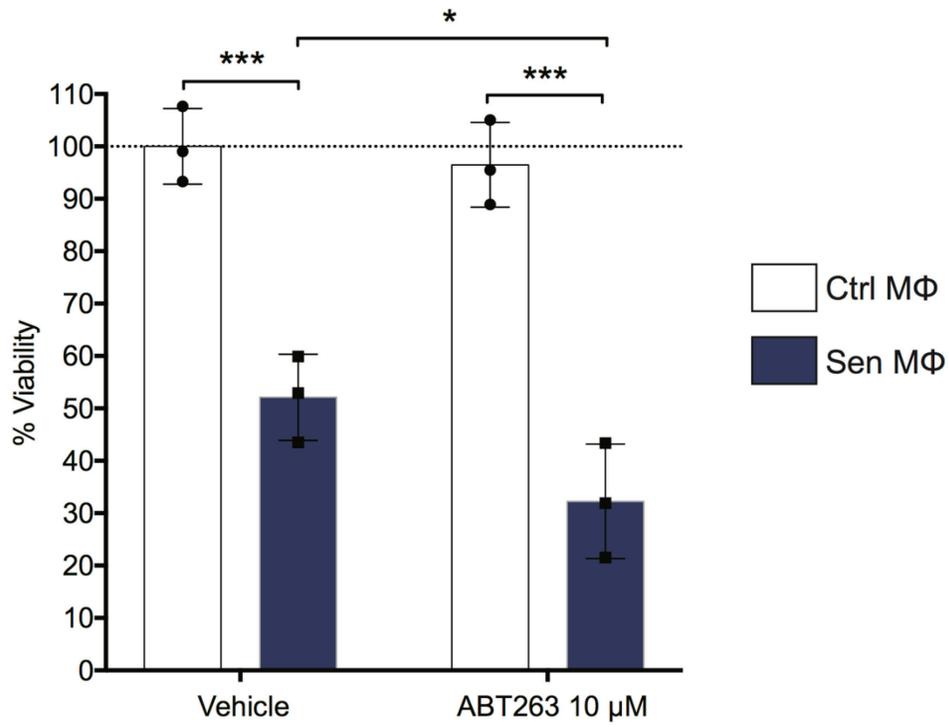


Figure 13. – Navitoclax treatment kills senescent macrophages

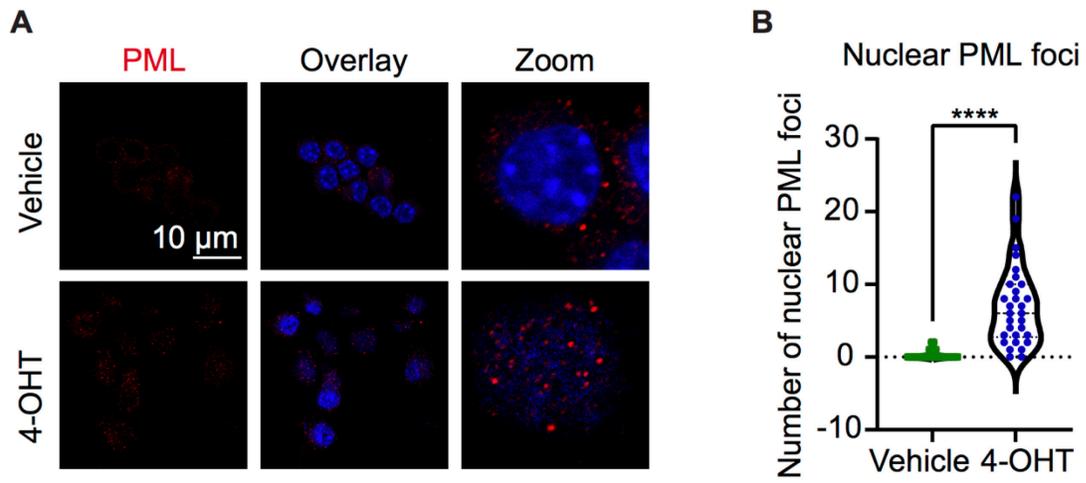


Figure S1. – Raf hyper-activation induces nuclear PML foci in RAW 264.7 murine macrophages

Chapitre 3 – Discussion

Dans ce travail, nous avons créé un modèle de sénescence *in vitro* chez les macrophages murins RAW 264.7 par activation conditionnelle de l'oncogène Raf-1. Nous avons montré que le transcriptome de ces macrophages sénescents présente une forte signature pro-inflammatoire. En plus, nous avons observé que la sécrétion de VE était augmentée et que leur contenu en petits ARN et en protéines était modifié durant la sénescence des macrophages. Nous avons rapporté entre autres un enrichissement pour les miARN miR-21, miR-155 et miR-132 et pour les protéines *Major vault protein* (Mvp) et plusieurs protéines ribosomiques. De plus, les sécrétions des macrophages sénescents induisent une inflammation et un ralentissement de la prolifération des fibroblastes IMR90. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que le composé sénolytique Navitoclax puisse partiellement éliminer les macrophages sénescents.

La sénescence des macrophages et leur SASP

Peu d'études se sont penchées jusqu'à présent sur la sénescence des macrophages. Par conséquent, peu d'informations sont disponibles sur les caractéristiques de ces cellules. Nos travaux ont permis de répertorier les changements induits par la sénescence Raf-1 dans les macrophages. Grâce à l'expérience de RNAseq, il a été possible d'étudier les changements dans le transcriptome des macrophages induits pour la sénescence. Nous avons ainsi identifié une cinquantaine de cytokines dont l'expression est augmentée chez les macrophages sénescents. Nous proposons que ces cytokines soient associées au SASP des macrophages sénescents. Curieusement, l'expression de certains facteurs clés du SASP, comme IL6 et IL8 n'est pas augmentée dans notre modèle de macrophages sénescents (37). D'ailleurs, une étude comparative du SASP de divers types de sénescence a permis d'identifier *Matrix metalloproteinase-1* (MMP1), *Stanniocalcin-1* (STC1) et *C-X-C Motif Chemokine Ligand 1* (CXCL1) comme facteurs communs du SASP, mais pas IL6 et IL8 (136). De ces trois facteurs, seul Stc1 est surexprimé dans nos macrophages sénescents. La même étude montre que le SASP de la sénescence induite par Ras se caractérise par cinq molécules du SASP : *Matrix metalloproteinase-9* (MMP9), *Matrix metalloproteinase-3* (MMP3), *Chemokine (C-C motif) ligand 3* (CCL3), *Cystatin 4* (CST4) et *C-X-C Motif Chemokine Ligand 5* (CXCL5). L'expression de Mmp9, Mmp3, Ccl3 est

également augmentée dans notre modèle de sénescence induite par Raf-1, suggérant que le SASP des macrophages sénescents partagent une partie de la signature Ras. Toujours selon le même article, il est souligné que les Serpines sont d'importants biomarqueurs du vieillissement dans le plasma, et que plusieurs Serpines sont sécrétées dans divers modèles de sénescence. Six Serpines, dont Serpine1 sont surexprimées dans nos macrophages sénescents. L'étude comparative met en lumière l'hétérogénéité du SASP dans la sénescence induite par différents stress chez les fibroblastes et les cellules épithéliales. Notre travail a permis d'établir la signature particulière du SASP des macrophages sénescents à l'échelle transcriptionnelle. Nos résultats devront éventuellement être validés au niveau protéique. Par ailleurs, l'expression des molécules du SASP est généralement contrôlée par NF- κ B et C/EBP (37). Notre analyse avec l'outil bio-informatique *Distant Regulatory Elements* (DiRE) suggère que le SASP des macrophages serait davantage sous le contrôle transcriptionnel de NF- κ B.

Augmentation de la sécrétion des VE dans la sénescence des macrophages

Nos résultats montrent que les macrophages sénescents sécrètent davantage de VE que les macrophages non sénescents. Par ailleurs, la petite taille des vésicules sécrétées et l'annotation des protéines enrichies dans les VE des macrophages sénescents suggèrent que ces vésicules sont des exosomes, bien que l'origine intracellulaire de ces vésicules n'ait pas été étudiée. L'augmentation de la sécrétion de VE durant la sénescence a été rapportée par plusieurs groupes (130-135). Différents mécanismes pourraient expliquer cette abondance de sécrétion vésiculaire.

Par exemple, les données de protéomique indiquent qu'Alix (aussi appelé Pdcd6ip) est enrichi dans les VE des macrophages sénescents. Alix est une protéine qui participe à la biogénèse des exosomes, et il a été montré que sa déplétion diminue la sécrétion de VE (149). Alix pourrait ainsi contribuer à la biogénèse des VE dans la sénescence des macrophages. Selon les données de RNAseq, l'ARNm d'Alix est 1,3 fois plus abondant dans les macrophages sénescents que dans les macrophages non-sénescents (valeur de p ajustée : $1,83 \times 10^{-10}$). L'analyse de l'abondance relative d'Alix au niveau protéique dans les macrophages n'a pas été effectuée. Il est donc incertain si la faible augmentation de l'ARNm d'Alix dans la sénescence des macrophages est suffisante pour expliquer la promotion de sécrétion des vésicules extracellulaires. Il se pourrait que d'autres

mécanismes – expliqués ci-dessous – agissent en synergie avec Alix pour stimuler la sécrétion de vésicules extracellulaires.

Par exemple, l'activation de la voie de synthèse des céramides durant la sénescence pourrait expliquer l'abondance des sécrétions vésiculaires des macrophages sénescents. En effet, la conversion des molécules de sphingomyéline en céramides par la sphingomyélinase neutre de type 2 permet le bourgeonnement de la membrane des endosomes pour former les exosomes (84). Il a été observé que l'induction de la sénescence par dommages à l'ADN ou par activation d'oncogènes était corrélée avec la surexpression de la sphingomyélinase neutre de type 2 et la sécrétion de VE (150).

La sécrétion de VE dans la sénescence pourrait aussi être le résultat des dysfonctions lysosomiales, un marqueur de la sénescence (151). Il a été observé que le rétablissement de l'activité des lysosomes par inhibition d'ATM dans les cellules sénescents permet de diminuer les sécrétions de VE (152). En effet, les corps multivésiculaires ont deux destins potentiels : la dégradation de leur contenu par fusion avec les lysosomes ou la sécrétion de leurs exosomes par fusion à la membrane plasmique. La voie de sécrétion pourrait être favorisée lorsque les lysosomes sont dysfonctionnels.

De plus, les protéines de la famille des Rab pourraient réguler la sécrétion des VE dans les macrophages sénescents. En effet, les protéines de la famille Rab sont connues pour leur fonction dans diverses étapes du transport vésiculaire intracellulaire (153). Rab5c et Rab8b, enrichis dans les VE des macrophages sénescents pourraient ainsi contribuer à la biogénèse des VE, bien que cette fonction spécifique ne leur soit pas habituellement attribuée. Aussi, il a été observé que Rab27b, une protéine importante pour la sécrétion des exosomes, est surexprimée de manière dépendante de p53 durant la sénescence (89, 154). Comme Rab27b joue son rôle à l'extérieur des exosomes, il n'a pas été possible d'observer sa présence dans les VE des macrophages dans notre expérience de protéomique. Pour mieux comprendre le rôle des Rab dans la biogénèse des exosomes, il pourrait donc être intéressant de diminuer l'expression de différentes Rab dans les macrophages sénescents et d'évaluer l'impact sur les sécrétions de VE.

Le cargo des VE des macrophages sénescents et ses effets potentiels sur les cellules cibles

Nos travaux ont permis de conclure que le cargo des VE des macrophages sénescents est différent de celui des VE de macrophages non sénescents. Notamment, les VE des macrophages sénescents sont enrichis en miARN (dont miR-21, miR-155 et miR-132), en protéines ribosomiques et autres protéines dont Mvp, Aussi, la famille des ARN interagissant avec Piwi (ARNpi) est fortement exclues des VE des macrophages sénescents.

Absence de certains marqueurs classiques des VE

Parmi toutes les protéines identifiées par la spectrométrie de masse dans les VE des macrophages contrôles et sénescents, certains marqueurs classiques des VE brillent par leur absence. En effet, Cd9, Cd63 et Cd81, des tétraspanines considérées comme des marqueurs des VE, n'ont pas été détectées dans les VE par spectrométrie de masse (81). Pourtant, il semble bien que les protéines détectées appartiennent aux VE, comme le révèle l'analyse par *Gene Ontology*. Il se pourrait que les tétraspanines soient présentes dans les VE des macrophages, mais en quantité inférieure à la limite de détection de la technique. En revanche, il se peut aussi ces protéines ne soient pas impliquées dans la biogénèse des VE chez les macrophages. Ce résultat met en évidence l'hétérogénéité du cargo des VE et le besoin de collecter davantage de données sur les VE isolées de différents types cellulaires et dans différents contextes physiopathologiques.

À ce sujet, une étude récente a comparé le cargo protéique des exosomes issus de 14 lignées cellulaires différentes (155). Les résultats de cette étude montrent que 22 protéines sont présentes de manière ubiquitaires et en quantité abondante dans les exosomes des 14 origines distinctes. De ces protéines, Syntenin-1 (aussi appelé Sdcbp) est la plus abondante dans les exosomes. Dans notre étude, six de ces protéines ont été détectées par spectrométrie de masse dans les VE des macrophages : *ATPase alpha-1 subunit* (Atp1a1), *Eukaryotic Elongation factor 2*, (Eef2), *Gapdh*, *Galectin-3-binding protein* (Lgals3bp), *Alix* (Pdcd6ip) et *Syntenin-1* (Sdcbp). Alix est la seule protéine enrichie dans les VE des macrophages sénescents, en comparaison aux VE des macrophages non-sénescents. Curieusement, les 22 protéines identifiées n'incluent pas les tétraspanines CD9, CD63 et CD81, et leur présence dans les exosomes semble très hétérogène.

Bref, il semble que les marqueurs «classiques» des exosomes doivent être réévalués et que dans le contexte des macrophages RAW264.7, les tétraspanines ne soient pas des biomarqueurs des VE.

Exclusion des ARNpi

L'expérience de small RNAseq a révélé que les ARN interagissant avec Piwi (ARNpi) sont fortement exclus des VE des macrophages sénescents par rapport aux VE des macrophages contrôles. En effet, 94 ARNpi sont enrichis dans les VE des macrophages non sénescents alors qu'aucun ARNpi n'est enrichi dans les VE des macrophages sénescents. Curieusement, aucun ARNpi n'est régulé au niveau intracellulaire durant la sénescence des macrophages.

Les ARNpi sont de courts ARN non codants qui, en complexe avec les protéines Piwi, permettent la répression de l'expression des éléments transposables du génome par méthylation de l'ADN, la modification d'histone et la dégradation des ARN transcrits (156). Dans ce système, les ARNpi servent de brin guide pour reconnaître les éléments transposables et leurs ARN (157). Les éléments transposables de l'ADN ont la capacité de se déplacer dans le génome par des mécanismes dits «copier-coller» ou «couper-coller» (157). Ces déplacements induisent des cassures double-brin et des mutations dans l'ADN, causant une grande instabilité génomique (157). La voie Piwi-ARNpi est donc considérée comme un gardien de l'intégrité du génome. Ainsi, l'absence d'activité Piwi-ARNpi est associée à une mobilité élevée des éléments transposables et par conséquent au vieillissement (158). D'ailleurs, les éléments transposables sont très mobiles durant la sénescence (159, 160). En revanche, l'activité des éléments transposables est réprimée par le système Piwi-ARNpi entre autres dans les cellules cancéreuses, leur permettant ainsi préserver l'intégrité de leur génome et donc de maintenir leur potentiel prolifératif (158).

Comme les macrophages RAW264.7 sont des cellules cancéreuses, il n'est donc pas étonnant que les VE des macrophages contrôles contiennent plusieurs ARNpi alors qu'aucun ARNpi n'est détecté dans les VE des macrophages sénescents. Toutefois, il doit exister un mécanisme de tri très puissant pour permettre l'incorporation des ARNpi dans les VE car les niveaux intracellulaires d'ARNpi sont inchangés entre les macrophages contrôles et sénescents. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour comprendre la signification de ces résultats. Entre autres,

il serait intéressant d'étudier si les niveaux d'ARNpi dans les macrophages et leurs VE sont corrélés avec les niveaux d'expression des protéine Piwi.

Enrichissement des protéines ribosomiques

Nos résultats montrent que les protéines ribosomiques, et particulièrement les protéines de la grande sous-unité ribosomique, sont enrichies dans les VE des macrophages sénescents. On y retrouve six protéines de la grande sous-unité, *60S ribosomal protein L3* (Rpl3), *60S ribosomal protein L4* (Rpl4), *60S ribosomal protein L6* (Rpl6), *60S ribosomal protein L18* (Rpl18), *60S acidic ribosomal protein P0* (Rplp0), *60S acidic ribosomal protein P2* (Rplp2), et *40S ribosomal protein S9* (Rps9) faisant partie de la petite sous-unité. Il est intéressant de relever qu'une caractéristique des cellules sénescents est la présence de défauts de biogénèse des ribosomes, aussi appelés *senescence-associated ribogenesis defects* (SARD) (161). En effet, un déséquilibre entre la production des ARN ribosomiaux (ARNr) et des protéines ribosomiques durant la sénescence mène à l'accumulation de protéines ribosomiques libres dans la cellule (162). Il est donc possible que l'enrichissement de protéines ribosomiques dans les VE des macrophages sénescents soit le reflet des SARD. Par ailleurs, il a déjà été observé que des stress importants comme la privation d'oxygène ou de glucose dans les astrocytes menaient à l'enrichissement des protéines ribosomiques Rplp0 et *40S ribosomal protein S3* (Rps3) dans les exosomes (163).

Enrichissement de Mvp

Nos données de protéomique indiquent que Mvp est retrouvé uniquement dans les VE des macrophages sénescents, et pas dans les VE des macrophages non sénescents. Mvp est surexprimé chez les cellules sénescents *in vitro* et dans différents organes vieillissants (164). La transcription de Mvp serait entre autres contrôlée par p53, un joueur important dans l'induction de la sénescence (165). D'autre part, Mvp interagit avec Erk activé, et il a été proposé que Mvp agisse comme une protéine d'échafaudage qui faciliterait la signalisation de la cascade des MAPK, voie qui est hyperactive dans notre modèle de macrophages sénescents (166). Nous n'avons pas déterminé si Mvp était exprimé au niveau intracellulaire dans les macrophages sénescents. Si c'était le cas, Mvp pourrait donc renforcer la signalisation Erk dans les macrophages sénescents.

En plus, la sécrétion de Mvp via les VE des macrophages sénescents pourrait contribuer à établir ou renforcer une sénescence paracrine dépendante de la signalisation Erk.

Par ailleurs, Mvp pourrait jouer un rôle dans la résistance à l'apoptose associée aux cellules sénescents. La résistance à l'apoptose des cellules sénescents est expliquée entre autres par l'action anti-apoptotique de Bcl-2 dont les niveaux sont élevés chez les cellules sénescents (29). De façon intéressante, Mvp peut lier et potentiellement activer l'ubiquitine ligase Cop1, et Cop1 est important dans le mécanisme de dégradation de c-Jun par le protéasome (167, 168). Il a été observé qu'en réprimant c-Jun, Mvp augmente l'expression de Bcl-2 dans les cellules sénescents (164). De la même manière, la déplétion de Mvp par ARN interférant dans les cellules sénescents permet de diminuer les niveaux de Bcl-2 et de sensibiliser les cellules sénescents à l'apoptose. De surcroît, les macrophages sénescents et leurs VE sont riches en miR-155, qui empêche la transcription de c-Jun en inhibant sa traduction (169). L'enrichissement de Mvp et de miR-155 dans les VE des macrophages sénescents suggère que ces deux molécules pourraient agir en synergie dans les cellules receveuses pour empêcher l'expression de c-Jun et conséquemment, maintenir élevés les niveaux de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Les sécrétions des macrophages sénescents pourraient avoir le potentiel de transférer un phénotype de résistance à l'apoptose de manière paracrine. Cela pourrait contribuer à la sénescence paracrine ou encore favoriser la résistance des cellules tumorales à différentes chimiothérapies.

Enrichissement de miR-21, miR-155 et miR-132

Nous avons observé un enrichissement de plusieurs miARN dans les VE des macrophages sénescents, dont miR-21a-5p, miR-155-5p et miR-132-3p. De plus, les expériences de coculture et de transfert de milieu conditionné ont montré que l'exposition des fibroblastes IMR90 aux sécrétions des macrophages sénescents provoquait une inflammation. Ces observations sont compatibles avec l'induction de différentes pathologies inflammatoires dans les fibroblastes en réponse aux sécrétions des macrophages sénescents. Les miARN transportés par les VE, miR-21a-5p, miR-155-5p et miR-132-3p, pourraient être responsable de ce phénomène.

Il est intéressant de noter que miR-21 et miR-155 ont comme cible commune *Suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1) (170). De plus, PTEN est une cible partagée par miR-21, miR-155 et

miR-132 (170, 171). SOCS1 est un modulateur de la signalisation des cytokines dont la déplétion est associée à l'inflammation chronique (172). SOCS1 peut également jouer le rôle de suppresseur tumoral dans certains contextes (172). PTEN est aussi un important suppresseur tumoral (173). Par ailleurs, PTEN semble aussi jouer un rôle dans l'inflammation, étant donné que sa déplétion est associée à différentes pathologies inflammatoires comme la fibrose pulmonaire et l'arthrite rhumatoïde (174, 175). Les miARN miR-21, miR-155 et miR-132 pourraient donc agir en synergie pour diminuer l'expression de PTEN ou SOCS1 dans les cellules ciblées par les VE des macrophages sénescents et ainsi favoriser l'inflammation ou encore la transformation maligne. MiR-21 et miR-155 sont d'ailleurs considérés comme des inflamma-miARN, c'est-à-dire des miARN qui régulent les voies de signalisation inflammatoires (176).

MiR-21

En accord avec nos résultats, il a été montré que miR-21 est enrichi dans les VE dans un modèle murin de sénescence induite par irradiation (177). La même étude a montré que miR-21 était également plus abondant dans les VE de souris âgées que dans les VE de souris jeunes. Il a aussi été rapporté que miR-21 est surreprésenté dans les VE des cellules endothéliales sénescentes (137). Dans cette étude, les VE des cellules sénescentes semblent propager la sénescence de manière paracrine à des cellules endothéliales. Cet effet est dépendant de miR-21, qui inhibe *DNA methyltransferase 1* (DNMT1) et *Sirtuin 1* (SIRT1), des protéines impliquées respectivement dans la méthylation de l'ADN et la longévité. Également, miR-21 est surexprimé dans le foie chez les patients et les souris atteints de stéatose hépatique non alcoolique (178). Dans cette étude, l'inhibition de miR-21 chez la souris permet de réduire l'inflammation et la fibrose du foie en rétablissant l'expression de *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α). De surcroît, miR-21 est surexprimé dans les poumons durant fibrose pulmonaire idiopathique, chez l'humain et la souris (179). Les mêmes auteurs ont observé que l'inhibition de miR-21 permettait d'atténuer la fibrose chez la souris. En effet, en ciblant *Mothers against decapentaplegic homolog 7* (Smad7), miR-21 renforcerait la signalisation *Transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1), un médiateur de la fibrose pulmonaire. En plus, il a été montré que miR-21 favorisait la fibrose cardiaque en ciblant *Programmed cell death protein 4* (PDCD4) (180). Finalement, le rôle pro-tumoral de miR-21 a été maintes fois rapporté. Par exemple, les VE riches en miR-21 dérivées du cancer du poumon

favorisent la progression tumorale (129). Aussi, miR-21 contenu dans les VE des macrophages associés aux tumeurs contribue à la progression du cancer de l'ovaire (146).

MiR-155

Il a été montré que miR-155 pouvait favoriser l'inflammation en générant des ROS (181). En effet, dans les cellules mésenchymateuses de souris âgées, miR-155 cible le facteur de transcription C/ebp β , empêchant ainsi l'expression de gènes antioxydants, et ce faisant, provoque l'accumulation des ROS. Par ailleurs, il a été montré que miR-155 participait aux dysfonctions des télomères. En effet, miR-155 réprime l'expression de *Telomeric repeat-binding factor 1* (TRF1), une protéine du complexe Shelterin dont le rôle est de protéger les télomères (182). Comme les dysfonctions des télomères peuvent induire la sénescence, les VE des macrophages sénescents pourraient favoriser la sénescence paracrine en réprimant TRF1 dans les cellules receveuses. De plus, un enrichissement de miR-155 dans le liquide cébrospinal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a aussi été rapporté, suggérant une possible sécrétion miR-155 dans des VE (183). Le même article suggère que la sécrétion de miR-155 favoriserait la maladie d'Alzheimer en propageant l'inflammation dans le cerveau, entre autres en ciblant le facteur H. D'autre part, il a été montré que les macrophages pro-inflammatoires du tissu adipeux chez les souris obèses sécrètent des VE riches en miR-155 (141). Ces sécrétions favoriseraient la résistance à l'insuline réprimant l'expression *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) via miR-155. MiR-155 serait impliqué dans la progression de l'athérosclérose. Il a en effet été montré que les macrophages stimulés avec les lipoprotéines de basse densité expriment fortement miR-155, qui réprime l'expression de SOCS1 (184). Il en résulte alors une inflammation qui favorise la progression de l'athérosclérose. Enfin, les liens entre miR-155 et le cancer ont été établis à de nombreuses reprises. Notamment, miR-155 agit en favorisant la prolifération, l'invasion, la migration et la survie de différents types de cancer et cible entre autres SOCS1, BCL2 et PTEN (185).

MiR-132

Il a été rapporté que miR-132 est surexprimé au niveau du foie chez les patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique et que ce miARN provoque la maladie lorsque surexprimé chez la souris (186). Une autre étude a montré que miR-132 était surexprimé chez les patients atteints

de la maladie d'Alzheimer, alors que sa cible SIRT1 était sous-exprimée par rapport à des patients sains du même âge, suggérant un effet délétère de miR-132 dans la maladie d'Alzheimer (187). MiR-132 serait aussi impliqué dans l'athérosclérose. En effet, en ciblant SIRT1, miR-132 affecterait le métabolisme des lipides et favoriserait l'inflammation dans les cellules endothéliales, deux caractéristiques de l'athérosclérose (188). De plus, il a été montré que miR-132 agit comme un oncogène dans le cancer du pancréas. En effet, en réprimant le suppresseur tumoral PTEN, miR-132 favorise la progression tumorale dans le contexte du cancer pancréatique (171).

Cargo favorisant la sénescence paracrine

Nos résultats ont montré que les sécrétions des macrophages sénescents pouvaient induire un ralentissement de la croissance et une inflammation dans les fibroblastes IMR90. Ces deux phénotypes sont des caractéristiques de la sénescence. Il est donc possible que les sécrétions des macrophages sénescents soit capable d'induire la sénescence paracrine dans leur environnement. Davantage de marqueurs de sénescence devraient être analysés dans les fibroblastes pour appuyer cette hypothèse. Des études ont montré que les sécrétions solubles du SASP pouvaient induire la sénescence paracrine (42). D'autres groupes ont montré que la sénescence paracrine pouvait être induite par les VE des cellules sénescents (132, 137, 189). Dans notre étude, nous n'avons pas exploré les effets des sécrétions solubles et vésiculaires de manière séparée. Il est toutefois possible le SASP et les VE coopèrent pour induire le phénotype observé dans les fibroblastes. Les miARN sécrétés par les macrophages sénescents pourraient d'ailleurs induire la sénescence paracrine. Il a déjà été rapporté que miR-21 pouvait contribuer à la sénescence paracrine en ciblant SIRT1 et DNMT1 (137). De plus, le rôle de miR-155 dans la fragilisation des télomères pourrait lui permettre d'induire la sénescence paracrine (182). Enfin, SIRT1, une cible de miR-21 et miR132, joue un rôle dans l'inhibition de la sénescence (190). Il se pourrait donc que miR-21 et miR-132 puissent induire la sénescence paracrine en réprimant l'expression de SIRT1.

Sélection du cargo des VE des macrophages sénescents

Nos résultats suggèrent que le répertoire de miARN des VE des macrophages sénescents ne soit pas le reflet identique du répertoire intracellulaire de miARN. Cela suggère qu'un mécanisme

régule l'incorporation de ces miARN dans les VE des macrophages sénescents. Les protéines contenues dans les VE pourraient jouer ce rôle en transportant les miARN.

Mvp serait un candidat idéal pour la sélection du cargo des VE durant la sénescence des macrophages. À ce sujet, il a été rapporté que l'interaction entre Mvp et miR-193a permettait l'incorporation de ce miARN dans les exosomes (191). Bien qu'il n'ait pas été déterminé si cette interaction était directe ou indirecte, il est possible que Mvp puisse interagir avec d'autres miARN pour les cibler aux VE. En plus, Mvp pourrait participer au transport des protéines ribosomales dans les VE. En effet, il a déjà été observé que Mvp interagissait avec les ribosomes, ce qui suggère que l'interaction avec les protéines ribosomales est possible (192). Comme Mvp se déplace entre le noyau et le cytoplasme, il est possible qu'il agisse comme une navette pour transporter les protéines ribosomales jusqu'aux VE (168). On retrouve habituellement Mvp au sein d'un complexe ribonucléoprotéique en forme de tonneau appelé voûte. Une voûte est constituée entre autres de 96 copies de Mvp, qui constituent la majorité de la masse de la voûte, et de petits ARN, les ARN de voûtes (168). Il n'est donc pas exclu que d'autres petits ARN se trouvent au centre de la voûte et puissent être transportés jusqu'aux VE. Toutefois, vu la taille importante de ces voûtes par rapport à la taille des VE, il est probable que Mvp soit sous forme monomérique dans les VE.

Plus largement, d'autres mécanismes ont été identifiés dans la littérature pour l'incorporation des miARN dans les VE. Par exemple, il a été montré que les ARNm les plus enrichis dans les VE des cellules primaires humaines de glioblastome multiforme et de mélanome présentaient une région conservée dite *zipcode*. Cette séquence comporte un site de liaison à miR-1289 et permet l'acheminement aux VE (193). Aussi, *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q* (hnRNP Q) peut transporter des miARN aux VE en interagissant avec une courte séquence CCGU dans la région 3' de certains miARN (194). De plus, la protéine HuR peut lier spécifiquement certains miARN et ce faisant, les déloger du complexe RISC pour les transporter aux corps multivésiculaires (195). Enfin, la sumoylation de *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1* (hnRNPA2B1) lui permet de lier de courts motifs dans certains miARN et de les cibler aux VE (196).

Étant donné l'abondance des miARN observée dans les VE, il serait raisonnable de s'attendre à y retrouver aussi les protéines Argonautes (Ago) qui lient les miARN pour former le complexe miRISC

(101). Quelques études ont confirmé la présence d'Ago dans les VE (197). Par contre, parmi la multitude de publications sur les vésicules extracellulaires et leurs miARN, rares sont les études qui rapportent si ces miARN sont liés à Ago ou non à l'intérieur des VE. Dans notre étude, les protéines Argonautes n'ont pas été détectées dans les VE des macrophages sénescents et non-sénescents par spectrométrie de masse. Il pourrait s'agir d'un manque de sensibilité de la technique. Alternativement, il est possible que les miARN soient liés à d'autres protéines dans les VE, comme Mvp tel que rapporté plus haut. D'ailleurs, il a été rapporté que l'hyperactivation de la voie des MAPK inhibait la localisation d'Ago2 aux corps multivésiculaires, résultant en la déplétion d'Ago2 dans les exosomes (198). Il est donc possible que dans la sénescence induite par Raf, d'autres protéines qu'Ago2 soient favorisées pour le transport des miARN aux VE.

Les VE comme biomarqueurs du vieillissement

Nous avons vu dans l'introduction que la sénescence contribuait à diverses pathologies du vieillissement. Dans un objectif de prévention de ces maladies, la détection des cellules sénescents chez les patients est donc un enjeu important. En considérant : 1) que les cellules sénescents s'accumulent dans l'organisme avec l'âge (46); 2) que la sécrétion de VE est augmentée en général dans la sénescence (199) et 3) que les VE circulent dans les fluides corporels, dont le sang (104), les VE issus des cellules sénescents feraient de bons biomarqueurs non-invasifs du fardeau de cellules sénescents à l'échelle systémique. Pour ce faire, il est essentiel de déterminer ce qui constitue le cargo spécifique aux VE des cellules sénescents. Nos travaux suggèrent que ce cargo pourrait inclure des miARN dont miR-21, miR-155, miR-132, et des protéines telles que Mvp et des protéines ribosomiques.

Élimination des macrophages sénescents par sénolytiques

Une des caractéristiques des cellules sénescents est leur résistance à l'apoptose grâce à l'accumulation de protéines anti-apoptotiques (200). Les sénolytiques exploitent cette propriété en inhibant les protéines anti-apoptotiques. Par exemple, Navitoclax, aussi connu sous le nom d'ABT263, cible BCL2 et *B-cell lymphoma-extra large* (BCLXL) (201). Nous avons observé un faible effet sénolytique du Navitoclax sur les macrophages sénescents. Il se pourrait que la résistance à l'apoptose des macrophages implique d'autres voies anti-apoptotiques, ce qui les rendrait moins

sensibles au Navitoclax. Nos données de RNAseq montrent que *B cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a* (Bcl2a1a), aussi anti-apoptotique, est augmenté plus de 10 fois au niveau de l'ARNm dans les macrophages sénescents (202). Bien que nous n'ayons pas déterminé si cet enrichissement se reflétait aussi au niveau protéique, il semble que Bcl2a1a pourrait être une cible intéressante pour la sénolyse des macrophages sénescents.

La **figure 14** illustre le modèle proposé pour expliquer l'ensemble des résultats obtenus dans ce projet. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour valider ce modèle.

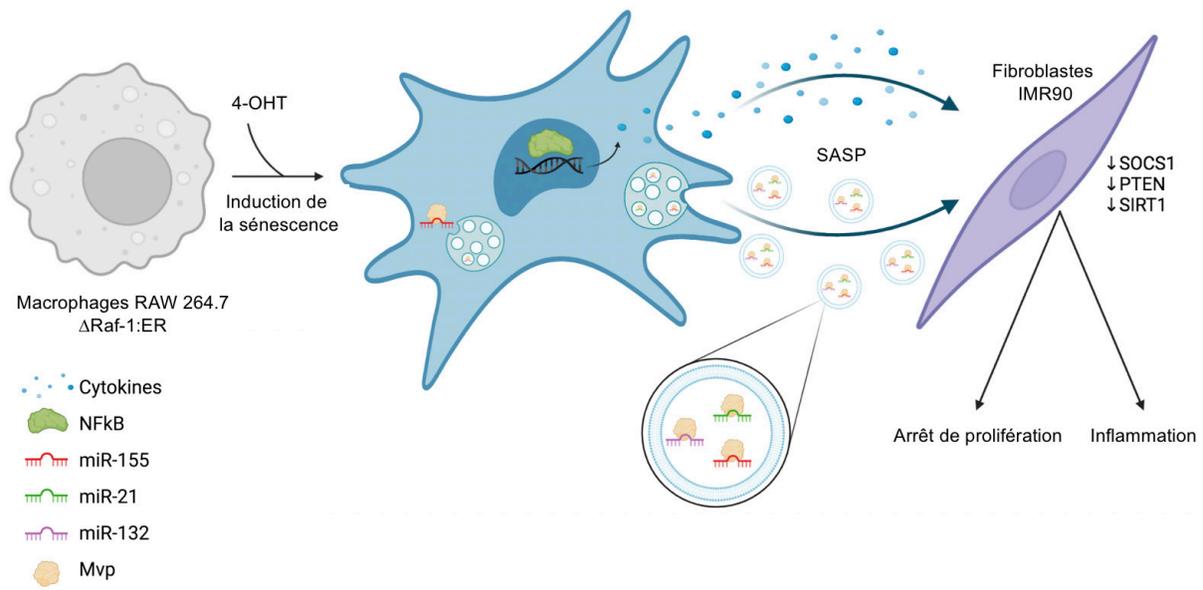


Figure 14. – Modèle proposé sur les macrophages sénescents et de leurs sécrétions.

L'hyperactivation de Raf dans les macrophages RAW264.7 induit la sénescence. Le SASP des macrophages sénescents, sous le contrôle transcriptionnel de NF κ B, est riche en cytokines pro-inflammatoires. Le SASP des macrophages sénescents comprend aussi des vésicules extracellulaires en grande quantité. Ces VE contiennent des miARN inflammatoires (miR-155, miR-21 et miR-132) potentiellement transportés par Mvp. L'action paracrine des sécrétions des macrophages sénescents induit un phénotype similaire à la sénescence dans les fibroblastes IMR90. Ce phénotype pourrait être le résultat des cytokines sécrétées par les macrophages sénescents et de la diminution de SOCS1, PTEN et SIRT1 dans les fibroblastes par l'action des miARN contenus dans les VE. Figure préparée avec le logiciel BioRender.

Les limites de nos résultats

Nous avons présenté dans ce travail les caractéristiques d'un nouveau modèle *in vitro* de sénescence induite par oncogène chez les macrophages. Pour déterminer si ces observations s'appliquent à la sénescence des macrophages de manière générale, il serait important de reproduire les expériences clés de ce projet avec des modèles de sénescence répllicative, ou encore sénescence induite par irradiation ou stress oxydatif dans les macrophages.

Une limite de notre analyse par RNAseq est que celle-ci prend en compte l'ensemble de la population de cellules. Par contre, nos résultats suggèrent qu'une portion des macrophages traités avec 4-OHT ne sont pas sénescents. Par exemple, seulement 36% des macrophages traités avec 4-OHT présentent une activité SA- β -Gal, suggérant qu'environ le tiers des macrophages sont réellement sénescents. Cela soulève la possibilité que les données de RNAseq ne reflètent pas vraiment une signature de sénescence, mais plutôt une signature de Raf. Toutefois, il est important de ne pas oublier qu'il n'existe aucun marqueur cellulaire universel et spécifique à la sénescence. Il faut considérer un panel de marqueurs pour caractériser le phénotype de sénescence. La courbe de croissance et la morphologie élargie des cellules suggèrent plutôt que la majorité des macrophages sont sénescents suite au traitement avec 4-OHT. Il est possible que le traitement avec 4-OHT donne lieu à une population hétérogène de cellules dans lesquelles les marqueurs de sénescence ne sont pas distribués uniformément. Par exemple, nous aurions pu étudier par immunofluorescence si les altérations de LaminB1, les DNA-SCARS et les foyers de PML étaient présents dans les mêmes cellules qui présentent une activité SA- β -Gal augmentée. Aussi, il est possible que le moment choisi (3 jours post-traitement 4-OHT) ne soit pas optimal pour la détection de l'activité SA- β -Gal. En effet, il a été rapporté que, bien que détectable à jour 3 post induction, l'activité SA- β -Gal était maximale après 5-6 jours d'induction de la sénescence par Raf-ER (203). Bref, la proportion observée de macrophages avec activité SA- β -Gal sous-évalue probablement la proportion de macrophages sénescents. Par ailleurs, les signatures observées par GSEA (diminution des cibles de MYC, diminution des cibles de E2F, réponse inflammatoire et augmentation de la signalisation NF κ B) sont plus cohérentes avec la sénescence qu'avec une signalisation Raf. Il est donc raisonnable de penser que les données de RNAseq reflètent davantage la sénescence des macrophages. Une expérience de séquençage d'ARN de cellule unique (*Single*

cell RNAseq) permettrait de distinguer le transcriptome des sous-population de macrophages traités avec 4-OHT.

Dans le même ordre d'idées, les résultats de RNAseq montrent un large déséquilibre entre le nombre de transcrits en augmentation (1446) et le nombre de transcrits diminués (304) dans les macrophages sénescents. Ce déséquilibre pourrait être le résultat du seuil utilisé pour filtrer les résultats. En effet, nous avons inclus comme différentiellement régulés les transcrits avec un *fold change* $\geq |2|$ et une valeur de p ajustée de 0,01. En éliminant le seuil sur le *fold change*, on obtient 3210 transcrits significativement augmentés et 2500 transcrits significativement diminués dans la sénescence, ce qui est plus équilibré. Il semble donc que la majorité des gènes sous-régulés dans la sénescence des macrophages est faiblement réprimée alors que les gènes surexprimés dans la sénescence des macrophages le sont fortement. Aussi, la population de macrophages traités avec 4-OHT n'est pas complètement sénescence, c'est-à-dire qu'une certaine proportion de macrophages continue de proliférer. Dans un contexte de population hétérogène, la diminution d'expression de certains gènes causée par la sénescence est probablement en partie masquée par les cellules non sénescences.

Selon les recommandations MISEV, notre caractérisation des VE des macrophages est incomplète. En effet, il faudrait obtenir des images par microscopie électronique en transmission pour mettre en évidence la structure vésiculaire des VE isolées. Il faudrait aussi vérifier la présence de protéines membranaires et luminales des VE, en plus de montrer l'absence de protéines du milieu de culture ou provenant d'autres organelles.

Les mécanismes responsables des phénotype d'inflammation et d'arrêt ou de ralentissement de prolifération observés dans les IMR90 exposés aux sécrétions des macrophages sénescents n'ont été explorés. Les résultats ont montré un enrichissement pour certains miARN, dont miR-155-5p, miR-21a-5p et miR-132-3p dans les VE des macrophages sénescents. La discussion a mis en lumière plusieurs cibles communes de ces miARN dont certaines (entre autres Socs1, Pten et Sirt1) pourraient expliquer les résultats observés. Il serait donc important d'étudier l'effet des sécrétions des macrophages sénescents sur le niveau de ces cibles. On pourrait aussi étudier si la déplétion

de ces cibles par shARN dans les IMR90 reproduit le phénotype obtenu par traitements avec les sécrétions des macrophages sénescents.

Nous n'avons pas déterminé si les effets observés chez les fibroblastes étaient causés par les VE des macrophages sénescents ou par leurs sécrétions solubles. Il serait donc intéressant de déterminer si le phénotype des fibroblastes peut être reproduit lorsqu'on inhibe la sécrétion des VE dans les macrophages ou en traitant les fibroblastes avec des VE purifiés.

Par ailleurs, nous avons observé que les macrophages sénescents semblaient sensibles au Navitoclax, bien que l'effet soit léger. Il faudrait explorer les mécanismes de cette action sénolytique du Navitoclax sur les macrophages sénescents.

Chapitre 4 – Conclusions et perspectives

En conclusion, nos travaux contribuent à élargir les connaissances sur la sénescence des macrophages. Par ailleurs, nos résultats sont compatibles avec un effet pro-vieillessement des macrophages sénescents. En effet, les VE sécrétées par ces macrophages sénescents sont riches en miARN impliqués dans des signalisations pro-inflammatoires ayant le potentiel de promouvoir de nombreuses maladies du vieillissement.

Pour la suite de ce projet, il sera nécessaire d'approfondir l'impact des sécrétions des macrophages sénescents sur leur environnement. Il serait intéressant de déterminer si les miARN contenus dans les VE des macrophages sénescents sont fonctionnels une fois transférés dans les cellules cibles. Pour ce faire, un système rapporteur portant un site de liaison pour miR-21, miR-155 ou miR-132 pourrait être utilisé. Enfin, il faudrait identifier les cibles de ces miARN dans les cellules cibles et déterminer si celles-ci sont en effet réprimées quand les cellules sont traitées avec les VE des macrophages sénescents. Enfin, il serait pertinent d'étudier les mécanismes permettant l'incorporation des miARN aux VE des macrophages sénescents. Nous avons émis l'hypothèse que Mvp pourrait être impliqué dans ce processus. Les niveaux de miR-21, miR-155 et miR-132 dans les VE pourraient être évalués en réponse à la déplétion de Mvp dans les macrophages sénescents.

Bibliographie

1. Qian M, Liu B. Pharmaceutical Intervention of Aging. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1086:235-54.
2. Newgard CB, Sharpless NE. Coming of age: molecular drivers of aging and therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013;123(3):946-50.
3. Tchkonja T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2013;123(3):966-72.
4. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
5. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961;25:585-621.
6. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(7):482-96.
7. Munoz-Espin D, Canamero M, Maraver A, Gomez-Lopez G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell.* 2013;155(5):1104-18.
8. Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol.* 2010;12(7):676-85.
9. Campisi J. Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell.* 1996;84(4):497-500.
10. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1238-46.

11. Zuckerman V, Wolyniec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol.* 2009;219(1):3-15.
12. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):729-40.
13. Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest.* 2004;51(3-4):146-53.
14. Mehta A, Haber JE. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(9):a016428.
15. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009;461(7267):1071-8.
16. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008;319(5868):1352-5.
17. 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.
18. Ogrunc M, Di Micco R, Liontos M, Bombardelli L, Mione M, Fumagalli M, et al. Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death Differ.* 2014;21(6):998-1012.
19. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene.* 2008;27(20):2801-9.
20. Zou J, Lei T, Guo P, Yu J, Xu Q, Luo Y, et al. Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence (Review). *Mol Med Rep.* 2019;19(2):759-70.

21. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005;436(7051):725-30.
22. Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(7):397-408.
23. Terzi MY, Izmirli M, Gogebakan B. The cell fate: senescence or quiescence. *Mol Biol Rep*. 2016;43(11):1213-20.
24. Ferbeyre G, de Stanchina E, Querido E, Baptiste N, Prives C, Lowe SW. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev*. 2000;14(16):2015-27.
25. Prigent C, Dimitrov S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 18):3677-85.
26. Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*. 2004;114(9):1299-307.
27. Olsen CL, Gardie B, Yaswen P, Stampfer MR. Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion. *Oncogene*. 2002;21(41):6328-39.
28. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010;24(22):2463-79.
29. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res*. 1995;55(11):2284-92.

30. Zhu Y, Tchkonina T, Fuhrmann-Stroissnigg H, Dai HM, Ling YY, Stout MB, et al. Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*. 2016;15(3):428-35.
31. 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.
32. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(20):9363-7.
33. 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.
34. Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003;113(6):703-16.
35. Adams PD. Remodeling chromatin for senescence. *Aging Cell*. 2007;6(4):425-7.
36. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99-118.
37. Lopes-Paciencia S, Saint-Germain E, Rowell MC, Ruiz AF, Kalegari P, Ferbeyre G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*. 2019;117:15-22.
38. 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.

39. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*. 2014;31(6):722-33.
40. Coppe JP, Kauser K, Campisi J, Beausejour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*. 2006;281(40):29568-74.
41. Liu D, Hornsby PJ. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res*. 2007;67(7):3117-26.
42. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):978-90.
43. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):238-46.
44. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244-54.
45. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(1):83-91.
46. 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.
47. Herbig U, Ferreira M, Condel L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science*. 2006;311(5765):1257.

48. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*. 2009;8(3):311-23.
49. Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*. 2006;443(7110):453-7.
50. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685-705.
51. 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.
52. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016;530(7589):184-9.
53. Ogrodnik M, Miwa S, Tchkonia T, Tiniakos D, Wilson CL, Lahat A, et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat Commun*. 2017;8:15691.
54. Xu M, Bradley EW, Weivoda MM, Hwang SM, Pirtskhalava T, Decklever T, et al. Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017;72(6):780-5.
55. Jeon OH, Kim C, Laberge RM, Demaria M, Rathod S, Vasserot AP, et al. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat Med*. 2017;23(6):775-81.
56. Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, et al. Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(3):L391-401.

57. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun.* 2017;8:14532.
58. Sone H, Kagawa Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia.* 2005;48(1):58-67.
59. Chinta SJ, Woods G, Demaria M, Rane A, Zou Y, McQuade A, et al. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep.* 2018;22(4):930-40.
60. Paez-Ribes M, González-Gualda E, Doherty GJ, Muñoz-Espín D. Targeting senescent cells in translational medicine. *EMBO Mol Med.* 2019;11(12):e10234.
61. Muñoz-Espín D, Rovira M, Galiana I, Giménez C, Lozano-Torres B, Paez-Ribes M, et al. A versatile drug delivery system targeting senescent cells. *EMBO Mol Med.* 2018;10(9).
62. Wiley CD, Schaum N, Alimirah F, Lopez-Dominguez JA, Orjalo AV, Scott G, et al. Small-molecule MDM2 antagonists attenuate the senescence-associated secretory phenotype. *Sci Rep.* 2018;8(1):2410.
63. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 2013;496(7446):445-55.
64. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(12):731-44.
65. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:541-66.
66. Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, et al. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res.* 2018;2018:8917804.

67. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.
68. Nakamura R, Sene A, Santeford A, Gdoura A, Kubota S, Zapata N, et al. IL10-driven STAT3 signalling in senescent macrophages promotes pathological eye angiogenesis. *Nat Commun.* 2015;6:7847.
69. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science.* 2016;354(6311):472-7.
70. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature.* 2018;562(7728):578-82.
71. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, et al. Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and beta-galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging (Albany NY).* 2016;8(7):1294-315.
72. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(4):213-28.
73. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987;262(19):9412-20.
74. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43-51.
75. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-83.

76. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*. 2017;8(4):220-32.
77. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol*. 1985;101(3):942-8.
78. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007;21(3):157-71.
79. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005;106(5):1604-11.
80. Li B, Antonyak MA, Zhang J, Cerione RA. RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene*. 2012;31(45):4740-9.
81. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9-17.
82. Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. The ESCRT pathway. *Dev Cell*. 2011;21(1):77-91.
83. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(7):677-85.
84. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244-7.

85. Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, Seegar TCM, Dror RO, Kruse AC, et al. Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell*. 2016;167(4):1041-51.e11.
86. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ, et al. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis*. 2011;42(3):360-7.
87. Song P, Trajkovic K, Tsunemi T, Krainc D. Parkin Modulates Endosomal Organization and Function of the Endo-Lysosomal Pathway. *J Neurosci*. 2016;36(8):2425-37.
88. Rocha N, Kuijl C, van der Kant R, Janssen L, Houben D, Janssen H, et al. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol*. 2009;185(7):1209-25.
89. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):19-30; sup pp 1-13.
90. Sinha S, Hoshino D, Hong NH, Kirkbride KC, Grega-Larson NE, Seiki M, et al. Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *J Cell Biol*. 2016;214(2):197-213.
91. Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(9):631-43.
92. Skotland T, Sagini K, Sandvig K, Llorente A. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:308-21.

93. Haraszti RA, Didiot MC, Sapp E, Leszyk J, Shaffer SA, Rockwell HE, et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:32570.
94. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-9.
95. Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, t Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(18):9272-85.
96. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res*. 2014;24(6):766-9.
97. Altadill T, Campoy I, Lanau L, Gill K, Rigau M, Gil-Moreno A, et al. Enabling Metabolomics Based Biomarker Discovery Studies Using Molecular Phenotyping of Exosome-Like Vesicles. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151339.
98. Phinney DG, Di Giuseppe M, Njah J, Sala E, Shiva S, St Croix CM, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat Commun*. 2015;6:8472.
99. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:41-51.
100. Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;35:69-77.

101. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):21-37.
102. Matsumoto A, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Morishita M, Charoenviriyakul C, et al. Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. *Cancer Sci.* 2017;108(9):1803-10.
103. Linton SS, Abraham T, Liao J, Clawson GA, Butler PJ, Fox T, et al. Tumor-promoting effects of pancreatic cancer cell exosomes on THP-1-derived macrophages. *PLoS One.* 2018;13(11):e0206759.
104. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.* 2005;17(7):879-87.
105. Yagi Y, Ohkubo T, Kawaji H, Machida A, Miyata H, Goda S, et al. Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes. *Neurosci Lett.* 2017;636:48-57.
106. Musante L, Bontha SV, La Salvia S, Fernandez-Piñeros A, Lannigan J, Le TH, et al. Rigorous characterization of urinary extracellular vesicles (uEVs) in the low centrifugation pellet - a neglected source for uEVs. *Sci Rep.* 2020;10(1):3701.
107. Winck FV, Prado Ribeiro AC, Ramos Domingues R, Ling LY, Riaño-Pachón DM, Rivera C, et al. Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivary extracellular vesicles. *Sci Rep.* 2015;5:16305.
108. Matsumoto J, Stewart T, Sheng L, Li N, Bullock K, Song N, et al. Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5(1):71.

109. Kupsco A, Prada D, Valvi D, Hu L, Petersen MS, Coull B, et al. Human milk extracellular vesicle miRNA expression and associations with maternal characteristics in a population-based cohort from the Faroe Islands. *Sci Rep.* 2021;11(1):5840.
110. Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, et al. Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 3):447-58.
111. Chivet M, Javalet C, Laulagnier K, Blot B, Hemming FJ, Sadoul R. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:24722.
112. Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y, Rikitake Y. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer.* 2018;18(1):47.
113. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood.* 2004;104(10):3257-66.
114. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015;527(7578):329-35.
115. Purushothaman A, Bandari SK, Liu J, Mobley JA, Brown EE, Sanderson RD. Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *J Biol Chem.* 2016;291(4):1652-63.
116. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* 1996;183(3):1161-72.
117. Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic.* 2010;11(5):675-87.

118. Nakase I, Kobayashi NB, Takatani-Nakase T, Yoshida T. Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Sci Rep.* 2015;5:10300.
119. Tian T, Zhu YL, Zhou YY, Liang GF, Wang YY, Hu FH, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem.* 2014;289(32):22258-67.
120. Nanbo A, Kawanishi E, Yoshida R, Yoshiyama H. Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J Virol.* 2013;87(18):10334-47.
121. Tian T, Wang Y, Wang H, Zhu Z, Xiao Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem.* 2010;111(2):488-96.
122. Bissig C, Gruenberg J. ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol.* 2014;24(1):19-25.
123. Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem.* 2009;284(49):34211-22.
124. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles.* 2014;3.
125. Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2014;103(4):530-41.
126. Lopez-Verrilli MA, Picou F, Court FA. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system. *Glia.* 2013;61(11):1795-806.

127. Latifkar A, Hur YH, Sanchez JC, Cerione RA, Antonyak MA. New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *J Cell Sci.* 2019;132(13).
128. Zomer A, Maynard C, Verweij FJ, Kamermans A, Schafer R, Beerling E, et al. In Vivo imaging reveals extracellular vesicle-mediated phenocopying of metastatic behavior. *Cell.* 2015;161(5):1046-57.
129. Zhang X, Li F, Tang Y, Ren Q, Xiao B, Wan Y, et al. miR-21a in exosomes from Lewis lung carcinoma cells accelerates tumor growth through targeting PDCD4 to enhance expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Oncogene.* 2020;39(40):6354-69.
130. Lehmann BD, Paine MS, Brooks AM, McCubrey JA, Renegar RH, Wang R, et al. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(19):7864-71.
131. Riquelme JA, Takov K, Santiago-Fernández C, Rossello X, Lavandero S, Yellon DM, et al. Increased production of functional small extracellular vesicles in senescent endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2020;24(8):4871-6.
132. Borghesan M, Fafian-Labora J, Eleftheriadou O, Carpintero-Fernandez P, Paez-Ribes M, Vizcay-Barrena G, et al. Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3. *Cell Rep.* 2019;27(13):3956-71 e6.
133. Kavanagh EL, Lindsay S, Halasz M, Gubbins LC, Weiner-Gorzel K, Guang MHZ, et al. Protein and chemotherapy profiling of extracellular vesicles harvested from therapeutic induced senescent triple negative breast cancer cells. *Oncogenesis.* 2017;6(10):e388.
134. Terlecki-Zaniewicz L, Lammermann I, Latreille J, Bobbili MR, Pils V, Schosserer M, et al. Small extracellular vesicles and their miRNA cargo are anti-apoptotic members of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging (Albany NY).* 2018;10(5):1103-32.

135. Takasugi M, Okada R, Takahashi A, Virya Chen D, Watanabe S, Hara E. Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nat Commun.* 2017;8:15729.
136. Basisty N, Kale A, Jeon OH, Kuehnemann C, Payne T, Rao C, et al. A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol.* 2020;18(1):e3000599.
137. Mensa E, Guescini M, Giuliani A, Bacalini MG, Ramini D, Corleone G, et al. Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells. *J Extracell Vesicles.* 2020;9(1):1725285.
138. Weilner S, Schraml E, Wieser M, Messner P, Schneider K, Wassermann K, et al. Secreted microvesicular miR-31 inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Aging Cell.* 2016;15(4):744-54.
139. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5:491.
140. Cheng L, Wang Y, Huang L. Exosomes from M1-Polarized Macrophages Potentiate the Cancer Vaccine by Creating a Pro-inflammatory Microenvironment in the Lymph Node. *Mol Ther.* 2017;25(7):1665-75.
141. Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, Dong Y, Birmingham A, Seo JB, et al. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate In Vivo and In Vitro Insulin Sensitivity. *Cell.* 2017;171(2):372-84 e12.
142. Nguyen MA, Karunakaran D, Geoffrion M, Cheng HS, Tandoc K, Perisic Matic L, et al. Extracellular Vesicles Secreted by Atherogenic Macrophages Transfer MicroRNA to Inhibit Cell Migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(1):49-63.

143. Chen J, Zhou R, Liang Y, Fu X, Wang D, Wang C. Blockade of lncRNA-ASLNCS5088-enriched exosome generation in M2 macrophages by GW4869 dampens the effect of M2 macrophages on orchestrating fibroblast activation. *FASEB J.* 2019:fj201901610.
144. Binenbaum Y, Fridman E, Yaari Z, Milman N, Schroeder A, Ben David G, et al. Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2018;78(18):5287-99.
145. Lan J, Sun L, Xu F, Liu L, Hu F, Song D, et al. M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Cell Migration and Invasion in Colon Cancer. *Cancer Res.* 2019;79(1):146-58.
146. Zhou J, Li X, Wu X, Zhang T, Zhu Q, Wang X, et al. Exosomes Released from Tumor-Associated Macrophages Transfer miRNAs That Induce a Treg/Th17 Cell Imbalance in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(12):1578-92.
147. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1):1535750.
148. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6).
149. Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, et al. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun.* 2017;8:15287.
150. Hitomi K, Okada R, Loo TM, Miyata K, Nakamura AJ, Takahashi A. DNA Damage Regulates Senescence-Associated Extracellular Vesicle Release via the Ceramide Pathway to Prevent Excessive Inflammatory Responses. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).

151. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, et al. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 2019;179(4):813-27.
152. Choi EJ, Kil IS, Cho EG. Extracellular Vesicles Derived from Senescent Fibroblasts Attenuate the Dermal Effect on Keratinocyte Differentiation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3).
153. Bhui T, Roy JK. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp Cell Res*. 2014;328(1):1-19.
154. Fujii M, Kawai Y, Endoh M, Hossain MN, Nakabayashi K, Ayusawa D. Expression of RAB27B is up-regulated in senescent human cells. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(7):639-42.
155. Kugeratski FG, Hodge K, Lilla S, McAndrews KM, Zhou X, Hwang RF, et al. Quantitative proteomics identifies the core proteome of exosomes with syntenin-1 as the highest abundant protein and a putative universal biomarker. *Nat Cell Biol*. 2021;23(6):631-41.
156. Huang X, Wong G. An old weapon with a new function: PIWI-interacting RNAs in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener*. 2021;10(1):9.
157. Lenart P, Novak J, Bienertova-Vasku J. PIWI-piRNA pathway: Setting the pace of aging by reducing DNA damage. *Mech Ageing Dev*. 2018;173:29-38.
158. Sturm Á, Perczel A, Ivics Z, Vellai T. The Piwi-piRNA pathway: road to immortality. *Aging Cell*. 2017;16(5):906-11.
159. De Cecco M, Criscione SW, Peckham EJ, Hillenmeyer S, Hamm EA, Manivannan J, et al. Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell*. 2013;12(2):247-56.

160. Van Meter M, Kashyap M, Rezazadeh S, Geneva AJ, Morello TD, Seluanov A, et al. SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat Commun.* 2014;5:5011.
161. Lessard F, Brakier-Gingras L, Ferbeyre G. Ribosomal Proteins Control Tumor Suppressor Pathways in Response to Nucleolar Stress. *Bioessays.* 2019;41(3):e1800183.
162. Lessard F, Igelmann S, Trahan C, Huot G, Saint-Germain E, Mignacca L, et al. Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol.* 2018;20(7):789-99.
163. Guitart K, Loers G, Buck F, Bork U, Schachner M, Kleene R. Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia.* 2016;64(6):896-910.
164. Ryu SJ, An HJ, Oh YS, Choi HR, Ha MK, Park SC. On the role of major vault protein in the resistance of senescent human diploid fibroblasts to apoptosis. *Cell Death Differ.* 2008;15(11):1673-80.
165. An HJ, Ryu SJ, Kim SY, Choi HR, Chung JH, Park SC. Age associated high level of major vault protein is p53 dependent. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(5):289-95.
166. Kolli S, Zito CI, Mossink MH, Wiemer EA, Bennett AM. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29374-85.
167. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhang Z, Dornan D, Arnott D, Deshaies RJ, et al. Human De-tiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science.* 2004;303(5662):1371-4.

168. Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L, Micksche M. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(1):43-61.
169. Song J, Liu P, Yang Z, Li L, Su H, Lu N, et al. MiR-155 negatively regulates c-Jun expression at the post-transcriptional level in human dermal fibroblasts in vitro: implications in UVA irradiation-induced photoaging. *Cell Physiol Biochem.* 2012;29(3-4):331-40.
170. Xue X, Liu Y, Wang Y, Meng M, Wang K, Zang X, et al. MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating SOCS1, SOCS6, and PTEN. *Oncotarget.* 2016;7(51):84508-19.
171. Zhang H, Liu A, Feng X, Tian L, Bo W, Wang H, et al. MiR-132 promotes the proliferation, invasion and migration of human pancreatic carcinoma by inhibition of the tumor suppressor gene PTEN. *Prog Biophys Mol Biol.* 2019;148:65-72.
172. Davey GM, Heath WR, Starr R. SOCS1: a potent and multifaceted regulator of cytokines and cell-mediated inflammation. *Tissue Antigens.* 2006;67(1):1-9.
173. Worby CA, Dixon JE. PTEN. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:641-69.
174. White ES, Atrasz RG, Hu B, Phan SH, Stambolic V, Mak TW, et al. Negative regulation of myofibroblast differentiation by PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on chromosome 10). *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(1):112-21.
175. Li XF, Chen X, Bao J, Xu L, Zhang L, Huang C, et al. PTEN negatively regulates the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines of fibroblast-like synoviocytes in adjuvant-induced arthritis. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):3687-96.
176. Olivieri F, Albertini MC, Orciani M, Ceka A, Cricca M, Procopio AD, et al. DNA damage response (DDR) and senescence: shuttled inflamma-miRNAs on the stage of inflamm-aging. *Oncotarget.* 2015;6(34):35509-21.

177. Alibhai FJ, Lim F, Yeganeh A, DiStefano PV, Binesh-Marvasti T, Belfiore A, et al. Cellular senescence contributes to age-dependent changes in circulating extracellular vesicle cargo and function. *Aging Cell*. 2020:e13103.
178. Loyer X, Paradis V, Hénique C, Vion AC, Colnot N, Guerin CL, et al. Liver microRNA-21 is overexpressed in non-alcoholic steatohepatitis and contributes to the disease in experimental models by inhibiting PPAR α expression. *Gut*. 2016;65(11):1882-94.
179. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, et al. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med*. 2010;207(8):1589-97.
180. Watanabe K, Narumi T, Watanabe T, Otaki Y, Takahashi T, Aono T, et al. The association between microRNA-21 and hypertension-induced cardiac remodeling. *PLoS One*. 2020;15(2):e0226053.
181. Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Obora K, Mori T, Fukuda K. miR-155 induces ROS generation through downregulation of antioxidation-related genes in mesenchymal stem cells. *Aging Cell*. 2017;16(6):1369-80.
182. Dinami R, Ercolani C, Petti E, Piazza S, Ciani Y, Sestito R, et al. miR-155 drives telomere fragility in human breast cancer by targeting TRF1. *Cancer Res*. 2014;74(15):4145-56.
183. Lukiw WJ, Alexandrov PN, Zhao Y, Hill JM, Bhattacharjee S. Spreading of Alzheimer's disease inflammatory signaling through soluble micro-RNA. *Neuroreport*. 2012;23(10):621-6.
184. Yang Y, Yang L, Liang X, Zhu G. MicroRNA-155 Promotes Atherosclerosis Inflammation via Targeting SOCS1. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(4):1371-81.
185. Bayraktar R, Van Roosbroeck K. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(1):33-44.

186. Hanin G, Yayon N, Tzur Y, Haviv R, Bennett ER, Udi S, et al. miRNA-132 induces hepatic steatosis and hyperlipidaemia by synergistic multitarget suppression. *Gut*. 2018;67(6):1124-34.
187. Hadar A, Milanesi E, Walczak M, Puzianowska-Kuźnicka M, Kuźnicki J, Squassina A, et al. SIRT1, miR-132 and miR-212 link human longevity to Alzheimer's Disease. *Sci Rep*. 2018;8(1):8465.
188. Zhang L, Huang D, Wang Q, Shen D, Wang Y, Chen B, et al. MiR-132 inhibits expression of SIRT1 and induces pro-inflammatory processes of vascular endothelial inflammation through blockade of the SREBP-1c metabolic pathway. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2014;28(4):303-11.
189. Jeon OH, Wilson DR, Clement CC, Rathod S, Cherry C, Powell B, et al. Senescence cell-associated extracellular vesicles serve as osteoarthritis disease and therapeutic markers. *JCI Insight*. 2019;4(7).
190. Sung JY, Kim SG, Kim JR, Choi HC. SIRT1 suppresses cellular senescence and inflammatory cytokine release in human dermal fibroblasts by promoting the deacetylation of NF- κ B and activating autophagy. *Exp Gerontol*. 2021;150:111394.
191. Teng Y, Ren Y, Hu X, Mu J, Samykutty A, Zhuang X, et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun*. 2017;8:14448.
192. Hamill DR, Suprenant KA. Characterization of the sea urchin major vault protein: a possible role for vault ribonucleoprotein particles in nucleocytoplasmic transport. *Dev Biol*. 1997;190(1):117-28.
193. Bolukbasi MF, Mizrak A, Ozdener GB, Madlener S, Ströbel T, Erkan EP, et al. miR-1289 and "Zipcode"-like Sequence Enrich mRNAs in Microvesicles. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012;1(2):e10.
194. Santangelo L, Giurato G, Cicchini C, Montaldo C, Mancone C, Tarallo R, et al. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep*. 2016;17(3):799-808.

195. Mukherjee K, Ghoshal B, Ghosh S, Chakrabarty Y, Shwetha S, Das S, et al. Reversible HuR-microRNA binding controls extracellular export of miR-122 and augments stress response. *EMBO Rep.* 2016;17(8):1184-203.
196. Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Cabo F, Perez-Hernandez D, Vazquez J, Martin-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun.* 2013;4:2980.
197. Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2014;26(5):707-21.
198. McKenzie AJ, Hoshino D, Hong NH, Cha DJ, Franklin JL, Coffey RJ, et al. KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Rep.* 2016;15(5):978-87.
199. Wallis R, Mizen H, Bishop CL. The bright and dark side of extracellular vesicles in the senescence-associated secretory phenotype. *Mech Ageing Dev.* 2020;189:111263.
200. Kirkland JL, Tchkonja T, Zhu Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD. The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J Am Geriatr Soc.* 2017;65(10):2297-301.
201. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 2008;68(9):3421-8.
202. Champa D, Russo MA, Liao XH, Refetoff S, Ghossein RA, Di Cristofano A. Obatoclox overcomes resistance to cell death in aggressive thyroid carcinomas by countering Bcl2a1 and Mcl1 overexpression. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(5):755-67.
203. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* 1998;12(19):2997-3007.