

Université de Montréal

Le profil sécrétoire des macrophages sénescents est composé de vésicules extracellulaires
enrichies en oncomiR

Par

Bianca Bossé

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 2023

© Bianca Bossé, 2023

Université de Montréal

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

Ce mémoire intitulé

Le profil sécrétoire des macrophages sénescents est composé de vésicules extracellulaires enrichies en oncomiR

Présenté par

Bianca Bossé

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Alain Moreau

Président-rapporteur

Gerardo Ferbeyre

Directeur de recherche

Jean-François Cailhier

Membre du jury

Résumé

Le vieillissement est l'un premier facteur de risque pour plusieurs maladies telles que l'athérosclérose, la fibrose, l'Alzheimer, le diabète de type 2 et le cancer. L'accumulation de cellules sénescents avec l'âge contribue au développement de maladies liées à l'âge en induisant une inflammation chronique causée par le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Il y a également une augmentation de la sécrétion de vésicules extracellulaires (EV) lors de la sénescence. Les EV sont des structures à bicouche lipidique permettant le transport de molécules actives vers des cellules réceptrices. De plus, les EV participent aux effets pathologiques des cellules sénescents. Ainsi, nous proposons que les macrophages sénescents participent au développement de maladies liées à l'âge en induisant l'inflammation par l'action combinée des facteurs solubles du SASP et des EV. Tout d'abord, nous avons établi un modèle de macrophages sénescents induit par l'oncogène Raf-1. Une analyse transcriptionnelle de notre modèle a démontré un profil inflammatoire régulé par Nf-κB. La sécrétion d'EV est également augmentée par les macrophages sénescents. En outre, les EV dérivées de macrophages sénescents sont enrichies en miARN, tels que miR-21, miR-155 et miR-132, ainsi qu'en protéines ribosomiques, qu'en protéine Alix et qu'en protéine Mvp. Les sécrétions des macrophages sénescents induisent un échappement de la sénescence chez les cellules MEF, probablement par l'action combinée des molécules solubles du SASP et des EV. Nous concluons que les macrophages sénescents sécrètent des signaux prolifératifs et inflammatoires dans les cellules réceptrices, ce qui suggère leur rôle potentiel dans le développement de cancer. Le traitement avec le navitoclax élimine les macrophages sénescents et pourrait prévenir leurs effets pathologiques.

Mots-clés : Vieillissement, sénescence, macrophages, SASP, vésicules extracellulaires, micro-ARN, Alix, échappement de la sénescence.

Abstract

Aging is the first risk factor for several diseases such as atherosclerosis, fibrosis, Alzheimer's, type 2 diabetes and cancer. The accumulation of senescent cells with age contributes to development of age-related diseases by inducing chronic inflammation. This inflammation is induced by the senescence-associated secretory phenotype (SASP). During senescence, there is also an increase of extracellular vesicles (EV) secretion. EVs are lipid bilayer structures that allow the transport of active molecules to recipient cells. In addition, EVs participate in pathologic effects of senescent cells. Thus, we propose that senescent macrophages participate in development of age-related diseases by inducing inflammation through the combined effect of SASP soluble factors and EV. First, we established a model of senescent macrophages induced by the oncogene Raf-1. Transcriptional analysis of our model demonstrated an Nf- κ B-regulated inflammatory profile. EV secretion is also increased by senescent macrophages. Moreover, EVs derived from senescent macrophages are enriched in miRNA, such as miR-21, miR-155 and miR-132, as well as ribosomal proteins, Alix protein and Mvp protein. Secretion of senescent macrophages induce senescence escape in MEF cell, probably through the combined action of SASP soluble factor and EV. We conclude that senescent macrophages secrete proliferative and inflammatory signals in recipient cell, suggesting their potential role in cancer development. Treatment with navitoclax eliminates senescent macrophages and may prevent their pathological effects.

Keywords : Aging, senescence, macrophages, SASP, extracellular vesicles, miRNA, Alix, senescence escape

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.....	15
Chapitre 1 – Introduction.....	17
1.1 Le vieillissement.....	17
1.2 La sénescence cellulaire.....	19
1.2.1 Historique.....	19
1.2.2 Induction de la sénescence.....	19
1.2.2.1 L'érosion des télomères.....	19
1.2.2.2 Les dommages à l'ADN.....	20
1.2.2.3 Les oncogènes.....	20
1.2.2.3.1 La voie p53-p21.....	21
1.2.2.3.2 La voie p16-RB.....	21
1.2.3 Rôle biologique de la sénescence.....	23
1.2.4 Les marqueurs de sénescence.....	24
1.3 Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence.....	26
1.3.1 Effets physiologiques du SASP.....	26
1.3.2 Effets pathologiques du SASP.....	27

1.3.3	Sénolytique et sénomorphes	28
1.4	Les vésicules extracellulaires.....	30
1.4.1	Biogenèse des exosomes.....	30
1.4.1.1	Les voies indépendantes de l'ESCRT	31
1.4.1.2	La voie dépendante de l'ESCRT	32
1.4.2	Transport et excrétion des exosomes	33
1.4.3	Biogenèse des microvésicules	34
1.4.4	Les vésicules extracellulaires et la communication intercellulaire	35
1.4.4.1	Composition du cargo des EV.....	35
1.4.4.2	Tri sélectif des ARN aux EV	36
1.4.4.3	Les micro-ARN	37
1.4.4.3	Internalisation des EV par les cellules cibles	39
1.4.5	Les vésicules extracellulaires associées à la sénescence	40
1.4.5.1	Effets des vésicules extracellulaires associées à la sénescence.....	40
1.4.6	Les macrophages, la sénescence et les vésicules extracellulaires	41
1.4.7	Techniques et marqueurs pour l'étude des EV	43
1.4.7.1	Séparation et concentration des EV	43
1.4.7.2	Quantification des EV	44
1.4.7.3	Caractérisation protéique des EV	45
1.5	Hypothèses et objectifs.....	47
Chapitre 2 – Manuscrit.....		48
2.1	Abstract	49
2.2	Introduction.....	50
2.3	Materials and methods	53

2.4 Results	63
2.5 Discussion	68
2.6 References.....	71
2.7 Figure legends.....	81
2.8 Figures	85
Chapitre 3 – Discussion	92
Chapitre 4 – Conclusion et perspective	111
Références bibliographiques.....	112
Annexe 1.....	121
Annexe 2.....	122

Liste des tableaux

Table 1	Primers for SYBR Green Real-Time qPCR	57
Table 2	Primer for reverse transcription and TaqMan Real-Time qPCR of miRNAs	58

Liste des figures

Figure 1. – Les principales caractéristiques du vieillissement	18
Figure 2. – Mécanisme d'induction de la sénescence par la voie des MAPK	22
Figure 3. – Les rôles physiologiques et pathologiques de la sénescence	24
Figure 4. – Voies dépendantes et indépendantes de l'ESCRT de la biogenèse des exosomes ..	32
Figure 5. – Biogenèse des microvésicules	35
Figure 6. – La Biogenèse des miARN et leurs actions dans les cellules	38
Figure 7. – Raf hyper-activation induces cellular senescence in RAW 264.7 murine macrophages	85
Figure 8. – Enrichment of inflammatory genes in the transcriptome of senescent macrophages	86
Figure 9. – Senescent macrophages secrete more EVs carrying RNA binding proteins and exosome proteins.....	87
Figure 10. – EVs from senescent macrophages carry pro-inflammatory miRNAs	88
Figure 11. – Secretion of senescent macrophages induce an escape of senescence in mice embryonic fibroblasts.....	89
Figure 12. – Navitoclax treatment kills senescent macrophages	90
Figure 13. – Caractérisation des vésiculaires extracellulaires dérivées de macrophages.....	121
Figure 14. – Validation de l'effet du traitement au 4-hydroxitamixfène sur l'expression des miARN dans les macrophages et dans les EV.....	122
 Figure supplémentaire	
Figure S1. – Raf hyper-activation induces nuclear PML foci in RAW 264.7 murine macrophages	91

Liste des sigles et abréviations

3'UTR	<i>Région 3' non traduite</i>
4-OHT	<i>4-Hydroxytamoxifène</i>
ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
Ago	<i>Argonaute</i>
AKT	<i>Protéine kinase B</i>
ALB	<i>Abumine</i>
Alix	<i>Programmed cell death 6 interacting protein</i>
Anax2	<i>Annexine A2</i>
APO	<i>Apolipoprotein</i>
ARF6	<i>Facteur-ribosylation 6</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ARNm	<i>Acide ribonucléique messenger</i>
ARNnc	<i>non-coding RNA</i>
ARNpi	<i>ARN interagissant avec Piwi</i>
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
Atp1a1	<i>Sous-unité alpha-1 de l'ATPase</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
ATRIP	<i>ATR interacting 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>
Bsg	<i>Basigine</i>
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer binding protein</i>
CCF	<i>Cytoplasmic chromatine fragment</i>
Ccl2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
Cell	<i>Cellule</i>
Cell-sen	<i>Cellule sénescence</i>
cGas	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>
CHK1	<i>Kinase de point de contrôle 1</i>
CHK2	<i>Kinase de point de contrôle 2</i>
Ctrl	<i>Control</i>
Cxcl	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
DDR	<i>Réponse aux dommages à l'ADN</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
Dicer	<i>Dicer 1, ribonuclease III</i>
DiRE	<i>Distant regulatory elements</i>

DMNT1	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1</i>
DNA-SCARS	<i>DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence</i>
DSB	<i>Cassure double brin</i>
E2F	<i>E2 factor</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
Eef2	<i>Facteur d'élongation eucaryote 2</i>
Epha2	<i>Ephrin type-A receptor 2</i>
ER-	<i>Eostrogen receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>
ESCRT-0	<i>Endosomal sorting complexes required for transport 0</i>
ESCRT-I	<i>Endosomal sorting complexes required for transport 1</i>
ESCRT-II	<i>Endosomal sorting complexes required for transport 2</i>
ESCRT-III	<i>Endosomal sorting complexes required for transport 3</i>
EtOH	<i>Éthanol</i>
ETS2	<i>ETS proto-oncogene 2</i>
EV	<i>Vésicules extracellulaires</i>
EV-sen	<i>Vésicules extracellulaires dérivées de cellules sénescences</i>
Fgf-2	<i>Fibroblast growth factor-2</i>
fNTA	<i>Fluorescent-nanoparticule tracking analysis</i>
FOXO4	<i>Forkhead box 4</i>
FRET	<i>Forster resonance energy transfert</i>
FXR1	<i>Fragile-X mental retardation autosomal 1</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GREM1	<i>Gremlin 1</i>
GRO α	<i>Ligand de chimiokine 1</i>
GRP94	<i>Heat shock protein 90kDa beta member 1</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
Hnhnpc	<i>l'heterogenous nuclear ribonucleoproteins C</i>
hnRNP	<i>Heterogen nuclear ribonucleoprotein</i>
Hnrnpa2b1	<i>l'heterogenous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>
HSP70	<i>Heat shock protein 70kDa</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN γ	<i>Interféron gamma</i>
IGBP-7	<i>Insulin-like growth factor binding protein-7</i>
IL-6	<i>Interleukine 6</i>
IL-8	<i>Intereukine 8</i>
IL8RB	<i>Interleukin 8 receptor beta</i>
ILV	<i>Vésicules intraluminales</i>
ISEV	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>

Lamp1	<i>Protéine membranaire associée au lysosome 1</i>
Lgals3bp	<i>Protéine de liaison à la galectine-3</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	<i>Membrane cofactor protein</i>
Mdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MEF-sen	<i>Mice embryonic fibroblast senescent</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
miARN	<i>micro-ARN</i>
miRISC	<i>MicroRNA-induced silencing complexe</i>
MISEV	<i>Minimal information for studies of extracellular vesicles</i>
MLC	<i>Myosin light-chain</i>
MLCK	<i>Myosin light-chain kinase</i>
MMP	<i>Métalloprotéinase matricielle</i>
MRE	<i>miRNA response element</i>
MS	<i>Spectrométrie de masse</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MVB	<i>Corps multivésiculaires</i>
Mvp	<i>Major vault protein</i>
Mφ	<i>Macrophage</i>
NEMO	<i>Nf-kappa-B essential modulator</i>
Nf-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
nSMase	<i>Neutral sphingomyelinase-2</i>
nt	<i>nucléotide</i>
OIS	<i>Oncogene induce senescence</i>
p16	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
p21	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p38α MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
p53	<i>Tumor protein 53</i>
Parp1	<i>Poly(ADP-ribose) polymérase 1</i>
Parp2	<i>Poly(ADP-ribose) polymérase 2</i>
pb	<i>paire de base</i>
Pi3k	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PI3P	<i>Phosphatidylinositol-3-phosphate</i>
PLD	<i>Phospholipase D</i>
Psm5	<i>Sous-unité alpha de type 5 du protéasome</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Rab	<i>Ras-associated binding</i>
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>

Rb	<i>Protéine du rétinoblastome</i>
RBP	<i>RNA binding protein</i>
Rhoa	<i>Ras homolog family member A</i>
RNAseq	<i>RNA sequencing</i>
ROCK	<i>Rho-associated kinase</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPA	<i>Replication protein A</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 acide ribosomal protein P0</i>
Rplp2	<i>60S acide ribosomal protein P2</i>
Rps9	<i>40S ribosomal protein S9</i>
Safb	<i>Scaffold-attachment factor B1</i>
SAHF	<i>oyer d'hétérochromatine associés à la sénescence</i>
SARD	<i>Senescence-associated ribogenesis defect</i>
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
Sa-β-gal	<i>Senescence associated beta-galactosidase</i>
Sen	<i>Sénescence</i>
SIRT1	<i>Silent mating type information regulator two homolog 1</i>
Slc1a5	<i>Transporteur d'acides aminés neutres B</i>
SNARE	<i>Snap receptor</i>
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>
SSB	<i>Cassure simple brin</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
STC-1	<i>Stanniocalcin</i>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
Syncrip	<i>synaptotagmin binding cytoplasmic RNA interacting protein</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i>
TEM	<i>Tétraspanine</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TRM	<i>Tissue-resident macrophages</i>
TSAP6	<i>Tumor suppressor-activated pathway 6</i>
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vps4	<i>Vacuolar protein sorting 4 homolog A</i>

À ma famille

Remerciements

Premièrement, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Gerardo Ferbeyre, pour m'avoir donné la merveilleuse opportunité de faire ma maîtrise dans son laboratoire. J'ai commencé ce projet lors de mon stage et vos conseils et vos idées m'ont toujours aidé lorsque j'étais dans une impasse. De plus, je me suis toujours senti bien dans votre laboratoire, car l'ambiance y est toujours agréable et la camaraderie y est maître!

J'aimerais également remercier mille fois Véronique pour m'avoir accompagné et conseillé au cours des deux dernières années. Je te remercie d'avoir répondu à mes innombrables questions et pour ta patience! Tu es un puits sans fond de connaissance et je suis très reconnaissante de t'avoir eu comme pilier.

Camille, tu as été présente au jour 1 de mon arrivée au laboratoire. Tu as été ma personne-ressource et mon mentor lors de mon stage au laboratoire. C'est toi qui m'as appris toutes les techniques et les connaissances de base pour ce projet. Pour tout ceci, merci!

Guillaume, nos chamailleries vont me manquer. Nos discussions et nos niaiseries m'ont beaucoup divertie au cours des deux dernières années et ont rendu le travail encore plus amusant. Je te souhaite de finir en beauté ton doctorat avec une belle publication. Maintenant, essaye juste de ne pas trop niaiser durant mon absence!

Stéphane et Jordan, malheureusement, comme pour les autres personnes du CHUM, je n'ai pas eu la chance de vous côtoyer au quotidien. Cependant, j'ai adoré parler avec vous de science. Vous êtes des personnes brillantes et nos discussions m'ont souvent permis d'explorer de nouvelles avenues dans mon projet. Je vous souhaite bonne chance dans votre nouveau travail.

Marie-Camille et Paloma, nous ne nous sommes pas beaucoup côtoyés également, mais le temps passé avec vous au camping et aux différentes célébrations du laboratoire m'a permis de voir les belles personnes calmes et gentilles que vous êtes. Je vous souhaite que du meilleur pour vos projets futurs.

Tony, j'ai toujours aimé parler de Marvel et débattre sur différents sujets avec toi. Je suis bien contente d'avoir la chance de continuer à te côtoyer lors du camping annuel du laboratoire et je te souhaite beaucoup de succès dans ton nouveau travail.

Pour conclure, j'aimerais remercier de tout mon cœur ma famille. Merci de m'avoir soutenu tout au long de mes études. Merci de m'avoir écouté et d'avoir montré de l'intérêt pour ma recherche malgré que vous ne compreniez rien. Sans vous, je ne serais jamais rendu où je suis aujourd'hui.
Merci!

Chapitre 1 – Introduction

Au cours du dernier siècle, la longévité humaine a grandement augmenté ; passant d'une espérance de vie à la naissance de 58 ans à 82 ans au Canada (1). Cette augmentation est due à plusieurs facteurs, dont la diminution de la mort infantile et le développement des technologies médicales (1, 2). L'augmentation de l'espérance de vie a mis en évidence l'incidence du vieillissement sur la santé humaine en permettant l'étude de maladies liées à l'âge. De plus, la population du Canada est majoritairement vieillissante. En effet, les aînés occupent un cinquième de la population canadienne et d'ici 2040, cela devrait atteindre un quart de la population (3). Ainsi, il est essentiel d'étudier les mécanismes menant au vieillissement cellulaire et de comprendre l'implication de ces cellules vieillissantes dans le développement des maladies liées à l'âge, et ce, dans le but de promouvoir le vieillissement en bonne santé de la population.

1.1 Le vieillissement

Le vieillissement cellulaire est un processus biologique inhérent et inévitable à la condition humaine. Il se définit par une dysfonction progressive, dépendante du temps, des fonctions cellulaires (4). Tout au long de notre vie, nos cellules vieillissent, meurent et se renouvellent. Cependant, plus nous avançons en âge, plus le vieillissement cellulaire se fait important et plus les processus d'homéostasie tissulaires défont. Le regroupement de ces deux facteurs entraîne l'accumulation de cellules vieillissantes, dites sénescents, qui contribuent au développement de maladies liées à l'âge (5). Ainsi, l'âge est un facteur de risque pour plusieurs maladies telles que le cancer, le diabète de type 2, l'Alzheimer, la démence, l'ostéoporose, la fibrose, etc (4).

Notre compréhension du processus de vieillissement cellulaire est partiellement élucidée. En effet, plusieurs caractéristiques cellulaires et moléculaires ont été définies, mais la chronologie des événements et la cause de ceux-ci sont encore mal comprises. Il y a neuf caractéristiques générales qui ont été identifiées pour définir le vieillissement. Elles peuvent être divisées en trois grandes catégories : primaire, antagoniste et intégratif (4, 6).

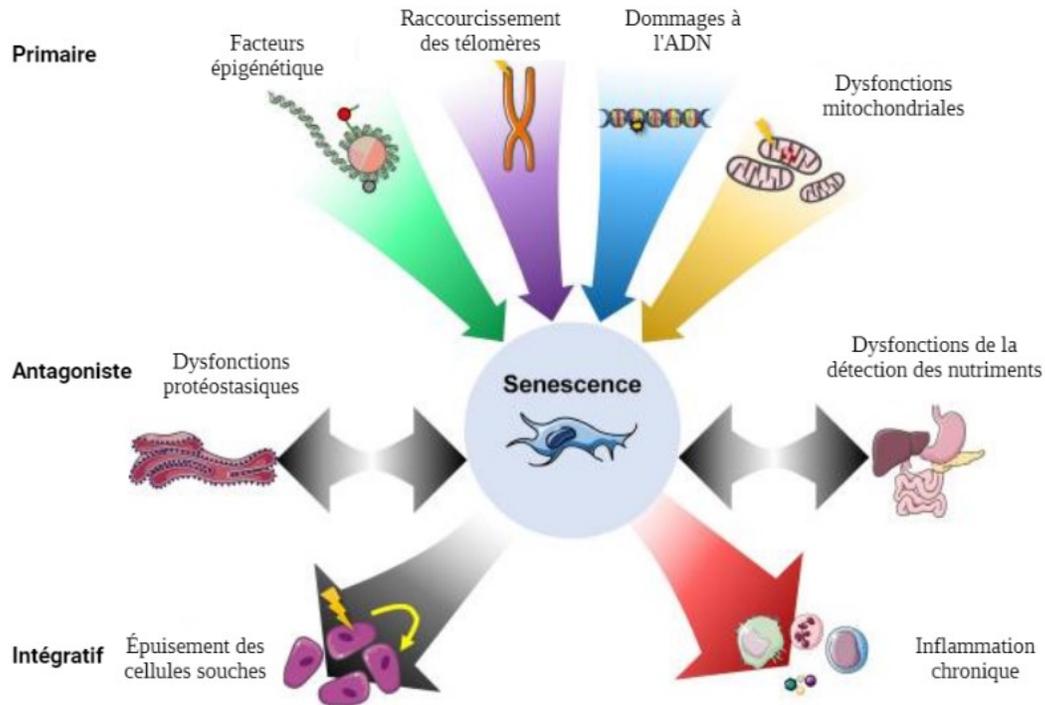


Figure 1. – Les principales caractéristiques du vieillissement

Les caractéristiques primaires sont les causes des dommages, les caractéristiques antagonistes sont la cause et la réponse des dommages et les caractéristiques intégratives sont les conséquences des réponses. Adapté avec Biorender de McHugh D, Gil J (6).

La sénescence agit comme un pivot entre le début et la progression du vieillissement. Les caractéristiques primaires et antagonistes induisent la sénescence et la sénescence induit les caractéristiques antagonistes et intégratives (6). Ainsi, la sénescence est au cœur du processus de vieillissement cellulaire, ce qui en fait un élément clé d'étude pour comprendre le vieillissement et développer des thérapies contre les maladies liées à l'âge.

1.2 La sénescence cellulaire

1.2.1 Historique

La sénescence a été décrite pour la première en 1961 par L. Hayflick et P.S. Moorhead lors de l'étude de fibroblastes diploïdes humains en culture. Ils ont remarqué que les cellules somatiques ont un nombre défini de divisions cellulaires, nommé la limite d'Hayflick, avant d'entrer dans un état non prolifératif. Cet état est nommé sénescence cellulaire et il a d'abord été attribué au vieillissement (7). D'ailleurs, le mot sénescence provient du verbe latin *senescer* qui signifie vieillir (8). Pour le reste du texte, le terme sénescence sera employé pour parler de la sénescence cellulaire.

Dans les années 1990, la sénescence observée par Hayflick a été associée au raccourcissement des télomères et nommée la sénescence réplivative (9). Depuis, plusieurs types de sénescence ont été observés et ils ont été définis par leur méthode d'induction.

1.2.2 Induction de la sénescence

La sénescence est décrite comme un arrêt stable et irréversible du cycle cellulaire. Elle peut être induite par plusieurs stress intrinsèques ou extrinsèques à la cellule tels que les dommages à l'ADN, le raccourcissement des télomères, le stress oxydatif, les dysfonctions mitochondriales, les UV et les oncogènes (10). De plus, l'induction de la sénescence dépend du type, de la durée et de l'intensité du stimulus. En effet, un stimulus dont la durée et l'intensité sont trop faibles mènera à la quiescence. Au contraire, une durée et une intensité de stimulus trop forte induiront l'apoptose. Les régulateurs clés de ces destins cellulaires sont les protéines p53 et RB. L'activation de ses protéines par les différents stress induit l'arrêt stable du cycle cellulaire (10, 11).

1.2.2.1 L'érosion des télomères

La sénescence réplivative est typiquement associée à l'érosion des télomères. Les télomères sont des séquences de six nucléotides répétés retrouvées aux extrémités des chromosomes pour protéger l'intégrité de l'ADN. L'érosion des télomères est causée par le problème de fin de réplication de l'ADN polymérase. En effet, à chaque cycle de réplication, un fragment de 30 à 100 paires de bases (pb) n'est pas synthétisé en région 3' du brin complémentaire (12). Ainsi, les

télomères raccourcissent au fil des réplifications et atteignent leur longueur minimale critique. Ceci représente la limite d'Hayflick (13). La structure télomérique compromise active la réponse aux dommages à l'ADN (DDR).

1.2.2.2 Les dommages à l'ADN

Lorsqu'une cellule subit un dommage à l'ADN ou un stress répliatif, la voie de signalisation DDR est activée. Plusieurs facteurs génotoxiques peuvent induire un dommage à l'ADN tel que les UV de la lumière du soleil, les rayons ionisants, la radiothérapie et les chimiothérapies. Ces facteurs peuvent induire une cassure simple brin (SSB) ou double brin (DSB) sur l'ADN par oxydation ou alkylation des bases par exemple. Ces cassures de l'ADN activent la voie DDR qui est médiée par la famille des protéines kinase de type phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) telles que ATM et ATR (14).

Lorsqu'une cassure est repérée, les protéines médiatrices PARP1/PARP2 catalysent l'ajout d'une chaîne de poly(ADP-ribose) sur les protéines permettant le recrutement d'ATM. ATR, quant à elle, est recruté avec son partenaire ATRIP sur les régions d'ADN contenant des RPA (14).

Les protéines kinases ATR/ATRIP et/ou ATM vont phosphoryler, respectivement, les protéines effectrices CHK1 et CHK2. Les protéines kinase CHK1 et CHK2 activent, par phosphorylation, le facteur de transcription p53 qui induit la sénescence suite à l'arrêt du cycle cellulaire (15).

1.2.2.3 Les oncogènes

La réponse aux dommages à l'ADN (DDR) est la principale voie d'induction de la sénescence. La DDR peut être induite par des dommages à l'ADN, le raccourcissement des télomères, mais également par l'activation d'oncogènes. Un oncogène est un gène impliqué dans la réplification et la croissance cellulaire et qui est souvent muté dans un cancer pour promouvoir une prolifération excessive. Plusieurs oncogènes sont reconnus pour induire la sénescence chez les mammifères tels que RAS et RAF qui sont des protéines de la voie des MAP Kinase (MAPK) (16, 17). Cela se nomme la sénescence induite par des oncogènes (OIS). La voie des MAPK est l'une des cascades de signalisation canonique la mieux étudiée dans le domaine de la sénescence. L'induction de la sénescence par la cascade Ras-Raf-MEK se fait en deux phases (18).

La première phase est l'hyperprolifération. Lorsque la protéine du rétinoblastome (RB) est déphosphorylée, elle lie le facteur de transcription E2F. Cela forme un complexe qui réprime l'expression des gènes cibles de E2F qui est essentielle à la progression du cycle cellulaire (19). Ainsi, lors de l'activation constitutive de Ras, les protéines de la voie de signalisation des MAPK sont activées par phosphorylation et mènent à l'hyperphosphorylation de RB. RB hyperphosphorylé se détache de E2F. Cela permet la transcription de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et, de façon subséquente, à l'augmentation de la synthèse d'ADN. L'augmentation de la synthèse d'ADN impose un stress réplicatif à la cellule qui engendre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de dommages à l'ADN (18).

La deuxième phase est l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de la sénescence. Les dommages à l'ADN sont détectés et les protéines ATM/ATR sont recrutées pour activer la voie des DDR. Cette voie de signalisation mène ultimement à la phosphorylation de p53 et à l'arrêt du cycle cellulaire par l'action de p21 et p16 (18).

1.2.2.3.1 La voie p53-p21

La protéine p53 connue sous le nom de « gardien du génome » est un facteur de transcription impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire. Il joue un rôle central en permettant l'activation de plusieurs programmes tels que la réparation de l'ADN, l'apoptose et la sénescence (20).

Lorsque la voie des DDR active par phosphorylation p53, celui-ci induit la transcription de gènes inhibiteurs des kinases tels que p21. La protéine p21 se lie à la cycline E – CDK2/4 ce qui inhibe la phosphorylation de RB et promeut l'arrêt du cycle cellulaire par séquestration de E2F. De plus, p21 joue également un rôle dans la résistance des cellules sénescents à l'apoptose (20). Cela fait de p21 un élément clé pour l'initiation de la sénescence.

1.2.2.3.2 La voie p16-RB

La voie p16/RB permet également l'arrêt du cycle cellulaire par l'action de p16 sur les cyclines-CDK lors de l'induction de la sénescence par des oncogènes. Alors que la voie p53/p21 est reconnue pour initier la sénescence, la voie p16/RB est reconnue pour maintenir le phénotype en empêchant le contournement de la sénescence (21). Ainsi, ces deux voies seraient complémentaires. D'autre part, des études démontrent que la voie p16/RB serait une voie

alternative pour l'initiation de la sénescence lorsque les cellules ont une déficience dans la voie p53/p21 (10).

Le changement d'expression entre la protéine p21 et p16, au cours de la sénescence, peut s'expliquer par l'épigénétique. En effet, lors de l'induction de la sénescence par la voie des MAPK, le facteur de transcription E2F1 augmente la transcription du gène de l'ADN méthyle transférase 1 (DMNT1) lors de la phase hyperproliférative. DMNT1 réprime l'expression du gène p16^{INK4a} en ajoutant des groupements méthyles sur son promoteur. Ainsi, lorsque p21 induit l'arrêt du cycle cellulaire, le complexe répressif RB-E2F1 est formé. Cela diminue l'expression de DMNT1 et augmente l'expression de p16^{INK4a} suite à la déméthylation de son promoteur (22). De plus, la formation de ROS, produite par la phase hyperproliférative, augmente également l'expression de p16 suite à l'activation du facteur de transcription ETS2 par la protéine p38α MAPK (23, 24).

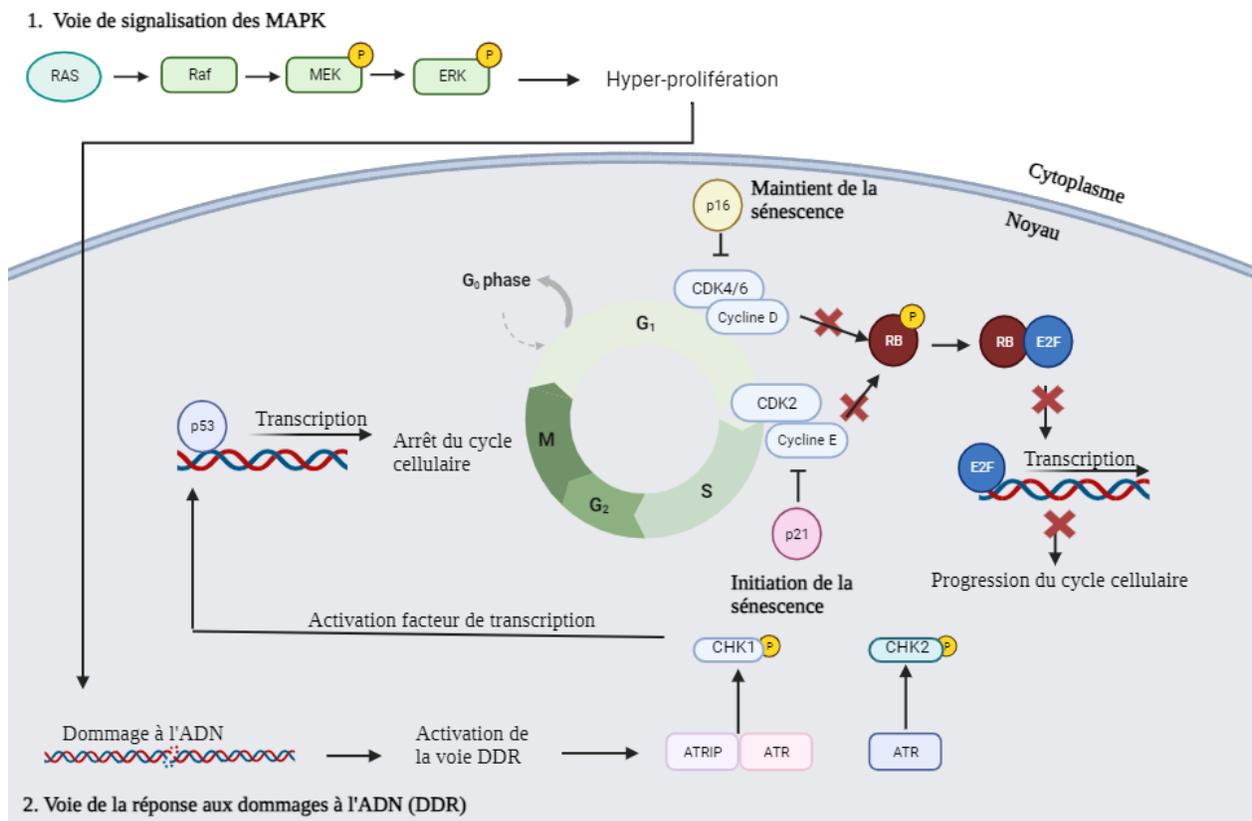


Figure 2. – Mécanisme d'induction de la sénescence par la voie des MAPK (créé avec *biorender*)

Donc, l'induction de la sénescence est un processus complexe. Il implique un arrêt stable du cycle cellulaire par les protéines p53 et RB suite à un stress important et néfaste pour la cellule. Ainsi, la sénescence est un important mécanisme de suppression des tumeurs. Cependant, l'effet des cellules sénescents est très varié et peut être aussi positif que négatif.

1.2.3 Rôle biologique de la sénescence

La sénescence est souvent considérée comme une arme à double tranchant dû à ses effets antagonistes. Ainsi, il est naturel de s'interroger de sa nécessité pour l'organisme.

La théorie évolutionniste de la pléiotropie antagoniste explique l'émergence d'un tel mécanisme. Un gène pléiotrope est caractérisé par la formation d'un phénotype opposé simultanément, ou en fonction du temps. La sénescence est un programme pléiotrope à cause de ses effets opposés selon l'âge de l'organisme. Les gènes qui augmentent les chances de reproduction sont souvent favorisés sur les gènes de survie, lors de la sélection naturelle, car la majorité des organismes meurt de causes extrinsèques dans un milieu naturel. Donc, la sénescence aurait été sélectionnée par l'évolution, car il prolonge la période reproductive, et ce ,malgré ses effets délétères lors du vieillissement (25).

En effet, la sénescence joue un rôle physiologique crucial lors du processus de reproduction et lors de l'augmentation de la période reproductive. Premièrement, la sénescence est impliquée dans le développement embryonnaire en permettant le remodelage de certaines structures chez les mammifères tels que les mésonéphros (26). De plus, la sénescence permet de réduire la fibrose lors de la cicatrisation et de prévenir la formation de cancer à un jeune âge (27).

L'effet positif de la sénescence dépend de son élimination par le système immunitaire suite à son recrutement par les sécrétions pro-inflammatoires des cellules sénescents (10). Nous verrons que ces sécrétions contribuent autant aux effets négatifs qu'aux effets positifs de la sénescence. Cependant, les effets négatifs, dont l'implication de la sénescence dans le développement de maladies liées à l'âge, sont majoritairement étudiés par les chercheurs.

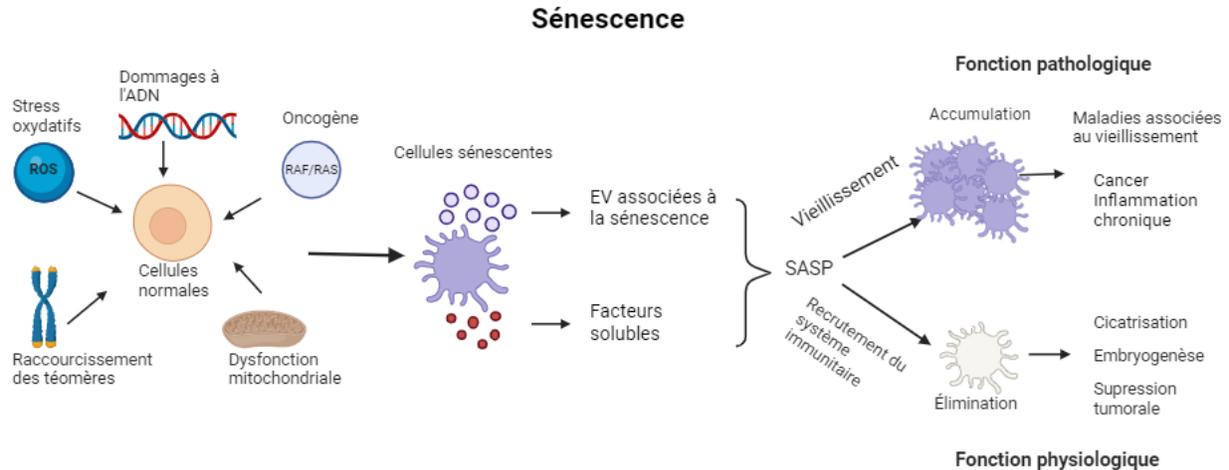


Figure 3. – Les rôles physiologiques et pathologiques de la sénescence (créé avec biorender)

1.2.4 Les marqueurs de sénescence

L'identification de cellules sénescents se fait par plusieurs marqueurs. En effet, il est essentiel de savoir différencier une cellule quiescente, qui est dans un état d'arrêt prolifératif réversible en phase G0 du cycle cellulaire, d'une cellule sénescence qui est dans un état d'arrêt prolifératif stable habituellement en phase G1/S. Ainsi, les marqueurs de l'arrêt du cycle cellulaire tels que la phosphorylation de p53, la déphosphorylation de RB et l'expression de p21 et p16 sont utilisés pour l'identification des cellules sénescents. Cependant, ce ne sont pas des marqueurs spécifiques, car les cellules quiescentes peuvent également en exprimer certains (28).

Donc, le premier marqueur à regarder est le changement morphologique. Les cellules sénescents deviennent plates et élargies avec une enveloppe nucléaire irrégulière. L'enveloppe nucléaire est composée, entre autres, de lamine nucléaire dont la lamine B1. L'activation de la voie p53/p21 instaure une instabilité de l'ARNm de la lamine B1 ce qui entraîne la perte de la protéine et une irrégularité de la lamine nucléaire lors de la sénescence (29).

La détection de foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) est également un marqueur de la sénescence induite par des oncogènes tels que H-RAS^{G12V} et BRAF^{V600E}. Les SAHF sont des foyers d'hétérochromatines facultatives qui se distinguent de l'hétérochromatine constitutive par l'absence de centromères, de télomères et d'autres régions spécifiques. Ils sont type cellulaire et induction spécifique. La présence de SAHF est souvent associée à l'augmentation

de l'expression de la voie p16/RB. Les SAHF se forment aux promoteurs des gènes cibles de E2F1. De plus, leur formation permettrait de diminuer le signal de la voie DDR ce qui empêche l'induction de l'apoptose et favorise la sénescence. Donc, la présence de SAHF est associée à la stabilité de la sénescence et de l'arrêt du cycle cellulaire. Ils sont également impliqués dans l'effet suppresseur de tumeur de la sénescence, car leur perturbation mène à la transformation maligne des cellules (30).

Un marqueur typique de la sénescence *in vivo* et *in vitro* est la β -galactosidase associée à la sénescence (Sa β G) (31). L'essai de Sa β G se base sur l'augmentation de la masse lysosomale des cellules sénescents. La β -galactosidase lysosomale fonctionne à un pH optimal de 4-4.5. Le test cytochimique consiste à détecter la dégradation du substrat artificiel de la β -galactosidase (X-Gal) à un pH sous-optimal de 6. Lorsque le X-Gal est clivé, il y a formation d'un précipité bleu qui colore les cellules et permet leur dénombrement. Ainsi, la détection de l'activité lysosomale est seulement due à l'augmentation de leur masse lors de la sénescence (32).

De plus, les cellules sénescents subissent un changement métabolique important accompagné d'une augmentation de leur sécrétion et de changements dans leur sécrétome. Ce phénomène est nommé le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) et la détection des molécules qui le compose est un excellent marqueur de la sénescence. Le SASP contient plusieurs molécules solubles telles que des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des protéases, des lipides bioactifs et des métalloprotéases matricielles. La composition du SASP dépend du type cellulaire, de la durée de la sénescence, de l'environnement et du type d'induction. Ainsi, il est difficile de définir une molécule dite « marqueur universel » du SASP. Cependant, les interleukines IL-6 et IL-8 dépendantes de l'activation du facteur de transcription NF- κ B sont les mieux conservées et exprimées (10).

1.3 Le phénotype sécrétoire associé à la sénescence

Les cellules sénescents, malgré leur arrêt prolifératif, restent métaboliquement actives et subissent un changement d'expression génique important qui se caractérise par une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires. Ces protéines inflammatoires font partie d'un ensemble de molécules solubles et insolubles sécrétées dans le milieu extracellulaire des cellules sénescents et nommé le phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) (33).

L'induction du SASP peut être indépendante de l'arrêt du cycle cellulaire et peut apparaître plusieurs jours après l'induction de la sénescence (34). Le facteur de transcription Nf- κ B est le principal activateur du SASP et son induction peut être dépendante et indépendante de la voie des DDR. L'activation de la voie NF- κ B-C/EBP β est dépendante de l'action d'une protéine de réponse aux dommages à l'ADN : ATM, et de la protéine modulatrice essentielle à NF- κ B : NEMO. Lors d'un dommage à l'ADN, il peut y avoir formation de ROS. Les ROS peuvent activer NF- κ B par l'action de la voie des DDR ou par la voie de l'interféron β suite à l'inhibition de sirtuin-1 et de l'activation de p38MAPK et de TGF- β 1 (35).

La composition du SASP dépend du type cellulaire, du type de stimulus, de la durée de sécrétion et de l'intensité du signal (6). Il n'est pas seulement régulé au niveau de la transcription, mais également au niveau de la traduction, de la stabilité des ARNm et de la sécrétion. En effet, le SASP a des effets autocrines qui permet un rétrocontrôle positif sur les cellules sénescents (34). En plus de ses effets autocrines, le SASP a des effets paracrines sur les cellules du micro-environnement. Cette capacité des cellules sénescents augmente leur champ d'action et complexifie leur implication dans l'organisme (33).

1.3.1 Effets physiologiques du SASP

Dans un organisme sain, le SASP a pour effet principal de favoriser la clairance des cellules sénescents. Cela contribue à l'homéostasie tissulaire. En effet, les cellules sénescents sont résistantes à l'apoptose suite à l'augmentation de la protéine anti-apoptotique BCL2. Ainsi, le système immunitaire est essentiel à l'élimination des cellules sénescents. Le SASP permet le recrutement des cellules immunitaires innées et adaptatives nécessaire à l'élimination des cellules sénescents suite à la sécrétion de molécules solubles pro-inflammatoires telles que CCL2

et IL-6 (33). Ces deux cytokines favorisent le recrutement des cellules tueuses NK qui permettent, non seulement l'élimination des cellules cancéreuses et sénescences, mais également d'induire un changement de polarisation dans les macrophages. La différence de polarisation des macrophages leur permet d'éliminer les cellules tumorales sénescences (36). Ainsi, le SASP contribue à l'immunosurveillance en agissant comme un mécanisme extrinsèque de suppression tumorale.

D'autre part, le SASP aide à la cicatrisation en induisant une inflammation et un remodelage de la matrice extracellulaire. De plus, le SASP permet de maintenir et de renforcer l'état sénescence de manière autocrine pour empêcher son échappement. En effet, une étude démontre dans les cellules sénescences que l'inhibition de l'IL-6 et la déplétion du récepteur IL-8 (IL8RB) inhibent l'inflammation et permet le contournement de la sénescence (37). Cependant, les interleukines, telles que IL-6 et IL-8, peuvent avoir des actions antagonistes selon le contexte tissulaire (38).

Ainsi, le SASP contribue aux effets positifs de la sénescence. Cependant, c'est l'intensité, la durée et le type de SASP qui déterminent s'il a un effet positif ou négatif sur l'organisme (39).

1.3.2 Effets pathologiques du SASP

Lors du vieillissement, il y a une accumulation des cellules sénescences dans les tissus. Cette accumulation est délétère pour l'organisme et contribue au développement de maladies liées à l'âge. L'immunosénescence est un terme désignant le déclin des fonctions du système immunitaire causé par le vieillissement. Il se caractérise par une involution thymique et une diminution de la diversité des cellules immunitaires adaptatives. Les cellules sénescences induisent également une sénescence paracrine dans les cellules saines du micro-environnement par l'action de certaines molécules du SASP telles que l'IL-8, IL-6, GRO α et IGFBP-7. De plus, la fréquence des dommages et des stress se multiplie avec l'âge, ce qui augmente le nombre de cellules sénescences. Ainsi, ces trois éléments agiraient en synergie pour permettre l'accumulation des cellules sénescences avec l'âge (40, 41).

De ce fait, les molécules du SASP s'accumulent dans le micro-environnement et engendrent une inflammation chronique stérile nommée l'«inflammaging». Les dysfonctions tissulaires causées par cette inflammation contribuent au développement de maladies liées à l'âge telles que les

maladies cardiovasculaires et rénales, le diabète de type 2, l'ostéoporose, la fibrose, le cancer et plusieurs autres (40). Les effets du SASP dépendent des molécules qui le composent et des cellules du micro-environnement.

La sénescence des fibroblastes et leurs actions sur différents cancers et maladies liées à l'âge sont très bien étudiées. La co-culture de fibroblastes sénescents avec plusieurs types de cellules préneoplasiques augmente la prolifération des cellules cancéreuses par l'action de certaines molécules du SASP telles que l'IL-8, VEGF et les ECM (38, 42). De plus, la sécrétion d'IL-6, IL-8 et de MMP, par les fibroblastes sénescents, augmente l'invasion et la migration de cellules cancéreuses du sein et de plusieurs types de cellules épithéliales. De plus, le SASP peut influencer la différenciation des cellules immunitaires, comme les macrophages, et engendrer un micro-environnement immunosuppresseur favorable au cancer (38).

L'accumulation de cellules sénescents serait également responsable, par l'action du SASP, du développement de la fibrose pulmonaire (43). De plus, les cellules bêta du pancréas développent des marqueurs de sénescence lors du diabète de type 2 et l'élimination des cellules hépatocytes sénescents diminue l'accumulation de graisse lors de la stéatose hépatique non alcoolique (44, 45).

Ces données démontrent que l'accumulation de cellules sénescents avec l'âge a un impact significatif sur le développement de maladies et de cancer. De plus, cela démontre l'importance d'étudier la sénescence et de développer des thérapies permettant leur élimination spécifique. D'ailleurs, plusieurs modèles de souris transgénique et de drogues ont été développés pour ces études.

1.3.3 Sénolytique et sénomorphes

L'élimination sélective des cellules sénescents est la meilleure option lors du développement de thérapie contre des pathologies liés à l'âge et aux cellules sénescents, car cela permet de garder les effets anticancéreux de la sénescence tout en éliminant ses effets négatifs à long terme. Cela se démontre lors de l'étude de souris déficientes en protéine p16 et p19 où l'absence des effecteurs de la sénescence prédispose les souris au cancer (46). Cette étude illustre bien le concept de pléiotropie antagoniste selon laquelle la sénescence est bénéfique à un jeune âge et

délétère en vieillissant. Ainsi, plusieurs drogues visant spécifiquement les cellules sénescents ont vu le jour au cours des dernières années. Ces drogues sont nommées sénolytiques.

Les sénolytiques sont des molécules tuant spécifiquement les cellules sénescents par apoptose. La majorité des sénolytiques visent des protéines impliquées dans des mécanismes anti-apoptotiques ou de survie comme p53, p21, BCL-2, AKT, PI3K et FOXO4. Le cocktail sénolytique Dasatinibe et Quercétine (D+Q) est l'un des premiers traitements anti-sénescence qui ont été découverts. Il fait partie, avec l'ABT-263 (ou navitoclax), de la famille des sénolytiques inhibiteurs de BCL-2. Certains produits naturels tels que la curcumine sont également des sénolytiques de cette famille d'inhibiteurs (47). L'étude sur des souris démontre que l'utilisation de ces drogues diminue l'incidence des maladies liées à l'âge et augmente l'espérance de vie en santé. D'ailleurs, l'utilisation du cocktail D+Q est actuellement testée en clinique pour le traitement de maladies chroniques du rein (NCT02848131) et de l'Alzheimer (NCT04063124).

Cependant, l'élimination complète des cellules sénescents ne semble pas toujours la meilleure option due à leur implication lors de la cicatrisation. Ainsi, certaines molécules suppriment l'expression du SASP en visant les voies de signalisation NF- κ B, mTOR ou encore p38 MAPK. Ces molécules se nomment des sénomorphes. Elles permettent de diminuer l'incidence du SASP et d'induire une sénostase dans les cellules sénescents. La rapamycine et la metformine sont des exemples de sénomorphes visant la voie de signalisation NF- κ B (6, 47).

Certaines molécules peuvent autant être des sénolytiques que des sénomorphes selon le type cellulaire et la concentration. De plus, les sénolytiques sont souvent type cellulaire spécifique (47). Ainsi, l'identification des éléments cibles de ces spécificités pourrait nous aider à développer de meilleurs traitements contre les maladies liées à l'âge et au cancer.

1.4 Les vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (EV) sont de petites structures formées d'une bicouche lipidique contenant une grande variété de biomolécules comme des protéines, des acides nucléiques, des lipides et des métabolites. Le terme vésicule extracellulaire réfère à un large éventail de vésicules membranaires sécrétées dans le milieu extracellulaire. Ces particules ont longtemps été considérées comme des poubelles cellulaires. Cependant, les EV sont maintenant considérées comme un important mécanisme de communication intercellulaire grâce à la livraison de molécules bioactives.

Les EV sont divisés en deux sous-groupes principaux qui se distinguent par leur taille et leur origine subcellulaire : les exosomes et les microvésicules.

1.4.1 Biogenèse des exosomes

Les exosomes sont une catégorie de petites vésicules extracellulaires découlant du système endosomal et ayant un diamètre de 30 à 150 nm. Leur processus de biogenèse est initié par la formation de l'endosome précoce suite à la fusion de vésicules primaires provenant du bourgeonnement interne de la membrane cytoplasmique. La deuxième étape est la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs aussi appelée corps multivésiculaires (MVB). Les MVB peuvent ensuite se fusionner aux lysosomes et être dégradés, ou se lier à la membrane plasmique et libérer leurs vésicules intraluminales (ILV) sous forme d'exosomes. En effet, lors de la maturation des endosomes précoces, la membrane endosomale bourgeonne vers la lumière du compartiment pour former les ILV.

Les ILV peuvent se former de manière dépendante ou indépendante des complexes de tri endosomal requis pour la machinerie de transport (ESCRT). Ces deux voies de biogenèse sont indépendantes l'une de l'autre, mais elles agissent en synergie lors de la biogenèse des exosomes.

1.4.1.1 Les voies indépendantes de l'ESCRT

A) Les céramides

Les voies indépendantes de l'ESCRT dépendent de la composition de la membrane endosomale. La fluidité des membranes lipidiques permet le déplacement latéral de molécules effectives dans des régions énergétiques qui leur sont favorables. Cette caractéristique permet la formation de microdomaines composés principalement de cholestérols et de sphingolipides, dits microdomaines à base de radeaux (48, 49). Les microdomaines sont des régions lipidiques distinctes dont la composition moléculaire attribue une fonction.

Les sphingolipides, retrouvés dans ces domaines, peuvent être convertis en céramides grâce à la sphingomyélinase neutre (nSMase). Les céramides ont la capacité d'induire une coalescence de petits microdomaines requis pour la formation de grands microdomaines impliqués dans le bourgeonnement de la membrane. L'amoncellement de céramides dans une même région membranaire permet l'invagination de la membrane grâce à leur forme conique qui induit une courbure négative spontanée dans la membrane. L'inhibition de la nSMase par le GW4869 démontre l'importance des céramides dans la biogenèse des exosomes, car cela diminue leur production (50). De plus, le tri de la cargaison transmembranaire ne dépend pas de l'ubiquitination protéique, mais est plutôt effectué par des tétraspanines (TEM) tels que CD63 et CD81 lors de la biogenèse médiée par les céramides (51).

B) Les tétraspanines

Les tétraspanines sont reconnus pour être impliqués dans la sélection du cargo des EV. Ils sont présents dans les mécanismes dépendants et indépendants de l'ESCRT. La membrane des endosomes a des microdomaines enrichis en tétraspanines permettant la sélection de cargos ubiquitinés ou non. Les TEM seraient également impliqués dans la biogenèse indépendante de l'ESCRT des ILV. En effet, certaines TEM, comme CD81, ont une forme conique avec un espace intramembranaire pouvant accueillir du cholestérol. Comme les céramides, cette caractéristique structurelle leur permettrait d'induire une courbure négative spontanée dans la membrane (52-54).

1.4.1.2 La voie dépendante de l'ESCRT

La voie dépendante de l'ESCRT est la principale voie de biogénèse des exosomes. Elle régule la formation des ILV de manière progressive et efficace et assure une plus grande spécificité de chargement. Premièrement, il y a formation de microdomaines spécifiques sous forme de radeaux lipidiques riches en phosphoinositides à la membrane des endosomes précoces. Le complexe ESCRT-0 recrute les protéines ubiquitinées sur ces microdomaines et facilite l'invagination de la membrane endosomale (55). L'invagination est stabilisée par les complexes ESCRT-I et ESCRT-II. Pour conclure, l'ESCRT-III rétrécit le col d'invagination et recrute le complexe accessoire Vps4 qui amorce la scission. Les ILV sont ensuite libérés dans l'endosome tardif (51, 56).

Le complexe syndécane-synthénine-ALIX, ainsi que la protéine TSAP6, peuvent également initier l'invagination de la membrane endosomale et le tri des cargaisons de manière indépendante de l'ubiquitination. Cependant, cette voie de biogénèse est dépendante de l'ESCRT-III (53).

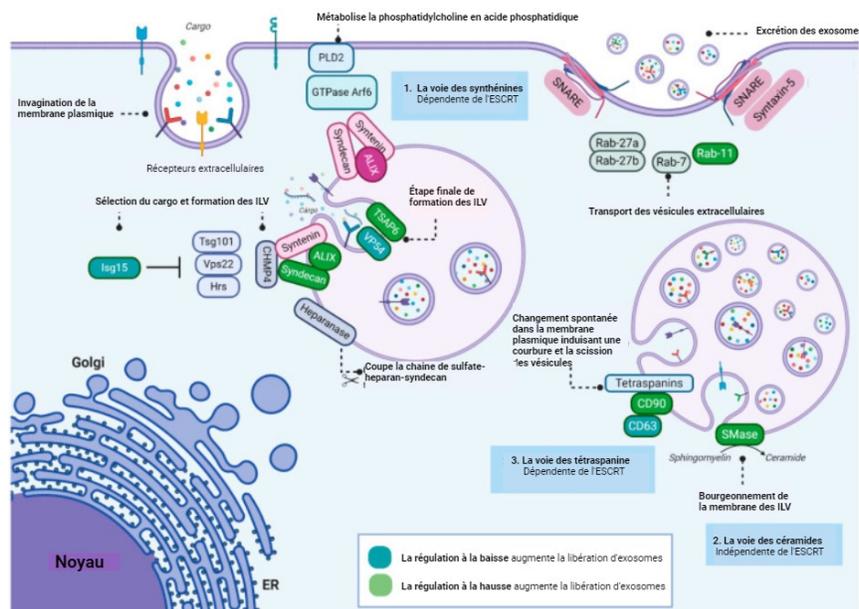


Figure 4. – Voies dépendantes et indépendantes de l'ESCRT de la biogénèse des exosomes

La biogénèse des exosomes est soit dépendante ou indépendante de l'ESCRT et débute par la formation de l'endosome précoce suite au bourgeonnement interne de la membrane plasmique. Les ILV se forment selon 1) Voie dépendante de l'ESCRT, 2) voie indépendante de l'ESCRT induite par les céramides et 3) voie indépendante de l'ESCRT induite par les tétraspanines. Adapté avec biorender de Ahegert H et al (56).

1.4.2 Transport et excrétion des exosomes

Tout d'abord, les corps multivésiculaires doivent éviter la dégradation par les lysosomes et, par la suite, ils doivent être transportés vers la membrane plasmique pour excréter les ILV sous forme d'exosomes. Ces deux aspects sont interconnectés et dépendent de la composition lipidique des membranes, de l'action des petites GTPase et du cytosquelette.

Il a été observé dans les lymphocytes T et dans les cellules cancéreuses que les RAB GTPases déterminent l'orientation du transport des MVB sur le cytosquelette. Cela détermine leur destin cellulaire (57).

La RAB GTPase RAB7 est reconnue, dans certains types cellulaires, pour avoir une double fonction. En effet, elle permet autant le ciblage des MVB au lysosome qu'à la membrane plasmique. RAB7 ubiquitiné est régulé par les niveaux de cholestérol sur la membrane endosomale. Ainsi, de faibles niveaux de cholestérol dans les ILV vont favoriser le recrutement sur les MVB de la dyénine motrice rétrograde par Rab7 ubiquitiné. Cela cible les MVB au lysosome en permettant leur transport rétrograde (vers les extrémités négatives) sur les microtubules. À l'opposé, de faible niveaux de cholestérol dans les ILV vont favoriser la libération des exosomes par Rab7 non-ubiquitiné en permettant le transport dans le sens positif des microtubules (53, 57).

En fonction du type cellulaire, d'autres petites GTPases vont réguler l'excrétion d'exosomes en permettant le transport des MVB vers la membrane plasmique. Parmi celles-ci, il y a les petites GTPases RAB27A et RAB27B. RAB27B régule la motilité des MVB vers la membrane plasmique et, avec la coopération de RAB27A, favorise l'amarrage des MVB à la membrane en réorganisant le cytosquelette d'actine (57).

Pour conclure, les MVB fusionnent à la membrane plasmique par l'action des protéines SNARE dépendantes du calcium (Ca^{2+}). Le complexe SNARE, retrouvé sur la membrane plasmique et sur la membrane des MVB, permet la fusion des membranes et l'excrétion des exosomes dans le milieu extracellulaire suite à son activation par le Ca^{2+} (57).

1.4.3 Biogenèse des microvésicules

Les microvésicules sont plus grosses que les exosomes et leur biogenèse est différente. En effet, leur taille varie de 50 à 1000 nm et elles proviennent du bourgeonnement de la membrane cytoplasmique vers le milieu extracellulaire. Comme lors de la formation des ILV dans les endosomes, la membrane plasmique subit un changement de composition. Cela permet la formation de microdomaines nécessaires à l'induction d'une courbure dans la membrane. Ainsi, la formation de microvésicules dépend de l'interaction dynamique entre le changement de composition membranaire et les contractions du cytosquelette d'actine (53).

Premièrement, la membrane cytoplasmique subit un changement lipidique et protéique, ainsi qu'un changement dans les niveaux de calcium (Ca^{2+}). La modification du gradient de calcium active les enzymes dépendantes de Ca^{2+} telles que la flippase et la floppase qui font partie de la famille d'enzymes translocases aminophospholipides (53). Les flippases et les floppases réarrangent l'asymétrie des phospholipides dans la membrane en permettant la translocation de la phosphatidylsérine vers la membrane externe. Ce changement induit une flexion membranaire et une restructuration du cytosquelette d'actine (58).

Deuxièmement, le facteur-ribosylation 6 (ARF6) initie une cascade de signalisation qui active la phospholipase D (PLD) menant au recrutement de ERK à la membrane cytoplasmique. ERK va phosphoryler et activer la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK). Pour conclure, MLCK va phosphoryler et activer la chaîne légère de la myosine (MLC). Cela va permettre la fission de la membrane cytoplasmique et la libération de microvésicules (58). MLC peut également être activé par la Rho GTPase RhoA suite à l'activation de la voie de signalisation ROCK (53).

De plus, la relocalisation de la protéine endosomale tardive TSG101 à la membrane cytoplasmique induit une courbure de la membrane qui permet également l'excrétion des microvésicules. Ainsi, la machinerie de l'ESCRT serait également utilisée lors de la biogenèse des microvésicules et ne serait pas exclusive aux exosomes (59).

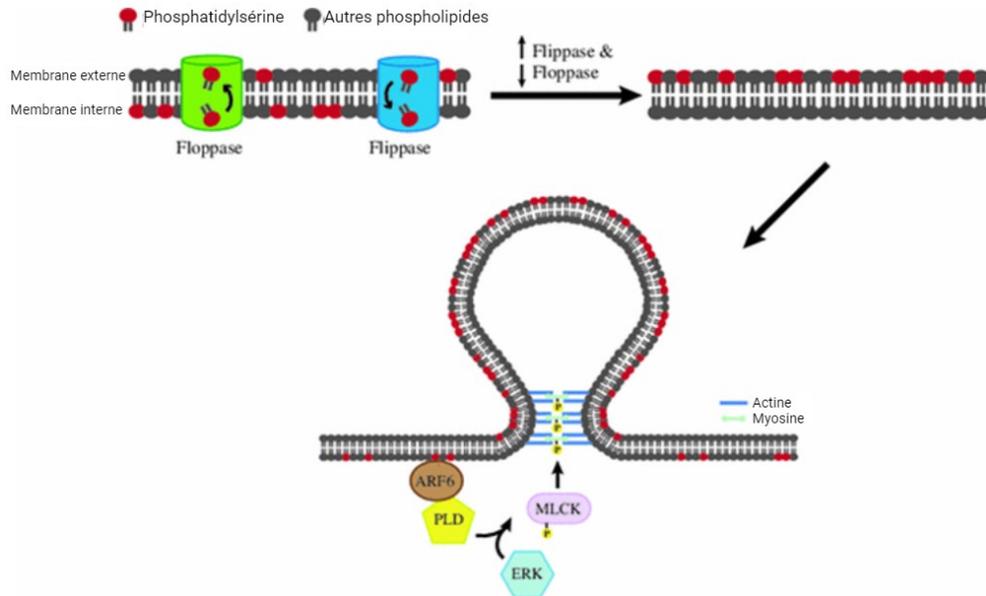


Figure 5. – Biogenèse des microvésicules (Adapté avec biorender de Akers JC et al) [58]

1.4.4 Les vésicules extracellulaires et la communication intercellulaire

Les vésicules extracellulaires contiennent une grande variété de biomolécules actives et on les détecte dans plusieurs liquides biologiques comme le sang et l'urine. La capacité des EV à transporter des biomolécules actives et de les transmettre à travers tout l'organisme leur confère un important rôle de communicateur intercellulaire. De plus, le contenu des EV est en partie régulé. Ainsi, le cargo des EV a la capacité d'influencer le phénotype des cellules réceptrices et celui-ci change en fonction de la biogenèse ainsi que du type et du contexte cellulaire. Cela supporte leur rôle de communicateur intercellulaire.

1.4.4.1 Composition du cargo des EV

Le terme cargo désigne autant les composantes membranaires que le contenu luminal des EV. Ainsi, les composantes du cargo sont très variées et incluent les lipides, les protéines, les métabolites et les acides nucléiques.

1) Les lipides

Les EV ont une composition lipidique distincte des cellules mères. L'enrichissement de la membrane des EV en cholestérol, en sphingomyéline et en acide gras, leur procure une plus

grande rigidité structurelle et une plus grande résistance aux changements physiologiques. La composition lipidique des EV n'est pas seulement importante pour leur biogenèse ou leur structure, mais elle est également importante pour la signalisation cellulaire. Les lipides bioactifs comme le cholestérol, les acides gras et les eicosanoïdes peuvent influencer des voies de signalisation telle que la signalisation Notch qui induit la mort cellulaire dans les cellules tumorales pancréatiques (49, 60).

2) *Les protéines*

La majorité des protéines retrouvée dans les EV sont des protéines du cytosquelette, des enzymes, des protéines membranaires, des chaperonnes et des protéines impliquées dans la biogenèse des EV telles qu'ALIX et TSG101. De plus, le cargo transmembranaire des EV est régulé par l'ubiquitination et leur reconnaissance par les complexes ESCRT (57).

3) *Les acides nucléiques*

Les vésicules extracellulaires sont d'importants transporteurs d'ARN fonctionnel. Plusieurs études démontrent que le cargo des EV ne reflète pas la composition moléculaire des cellules. En effet, les petites EV auraient un enrichissement en ARN par rapport aux niveaux cellulaires. De plus, les petites EV seraient enrichies en ARN spécifiques tels que les micro-ARN (miARN) et petits ARN nucléaires (61). La restriction de taille des petites EV pourrait expliquer l'acquisition spécifique de miARN. Cependant, certains miARN sont sélectivement incorporés ou exclus des EV malgré une abondance équivalente dans les cellules mères. Ces données suggèrent qu'il y a des mécanismes de tri sélectif des ARN (49).

1.4.4.2 Tri sélectif des ARN aux EV

Le modèle dominant pour le tri sélectif d'ARN aux EV repose sur **1)** la présence de motifs de nucléotides sur les ARN et **2)** le transport des ARN au site de biogenèse des EV par les protéines de liaison à l'ARN (RBP). Les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP) reconnaissent des EXOmotifs dans les miARN et contrôlent leur chargement. Par exemple, hnRNPA2B1 reconnaît l'EXOmotif GGAG et permet le chargement des miARN suite à sa sumoylation dans la lumière des EV (62).

Les ARNm sont également enrichis dans les EV. Comme pour l'EXOmotif des miARN, une séquence consensus dans la région 3'UTR a été suggérée comme mécanisme de ciblage aux EV. La séquence consiste en 25 nucléotides (nt) formant une structure tige-boucle ayant un domaine central CTGCC. D'ailleurs, certaines EV auraient un enrichissement en fragment d'ARN 3'UTR plutôt qu'en ARNm intacts. La région 3'UTR des ARNm contient des sites de liaison au miARN. Ainsi, les ARNm contenus dans les EV permettent également de réguler l'expression génique de manière épigénétique en créant une compétition pour la régulation par les miARN avec les ARNm de la cellule réceptrice (63).

La régulation active des ARN, et plus particulièrement des miARN, a rapidement suscité l'intérêt de plusieurs groupes de recherche dû à leur fonction de modulateur de l'expression génique. Malgré tout, les mécanismes de tri et d'incorporation dans les EV sont encore mal compris et peuvent diverger entre certains types cellulaires.

1.4.4.3 Les micro-ARN

Les miARN sont de petites séquences d'acides nucléiques non codantes d'environ 21 nt pouvant modifier l'expression des gènes. La biogenèse des miARN implique plusieurs étapes de maturation. Elle débute, au noyau, par la transcription du pri-miARN par les ARN polymérases II/III et se poursuit par sa maturation en pré-miARN par l'action du complexe de microprocesseur composé de la protéine de liaison à l'ARN DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) et de l'enzyme ribonucléase III Drosha. Le pré-miARN est ensuite transporté au cytoplasme (64).

Dans le cytoplasme, le pré-miARN subit une deuxième étape de maturation par l'endonucléase RNase III Dicer qui élimine la boucle de la structure en épingle à cheveux. Cela forme un duplex d'ARN. La direction du miARN détermine le nom de la forme mature et fonctionnelle. Le duplex d'ARN contient un brin 5' et un brin 3'. Les deux brins peuvent être fonctionnels. C'est la stabilité du brin à son extrémité qui détermine le brin fonctionnel et le brin passager (64).

Le miARN peut agir comme régulateur de l'expression génique suite à son association avec les protéines Argonaute tel que AGO2 pour former le complexe d'inhibition d'expression ou *microRNA-induced silencing complexe* (miRISC). Le miARN mature agit comme brin guide et permet la liaison du complexe miRISC sur l'élément de réponse aux miARN (MRE) à l'extrémité

3'UTR de l'ARNm. Les miARN peuvent avoir plusieurs ARNm cibles, ce qui leur procure un large spectre d'action (64).

Les miARN inhibent l'expression génique en induisant la dégradation de l'ARNm par AGO2 ou en diminuant la traduction par obstruction stérique. La détermination du mécanisme d'inhibition dépend de la complémentarité de séquence entre le miARN et le MRE. Dans certaines conditions spécifiques, tel que l'arrêt du cycle cellulaire, les miARN comme let-7 peuvent induire la traduction à l'aide de l'AGO2 et de la protéine 1 liée au retard mental Fragile-x (FXR1) (64, 65).

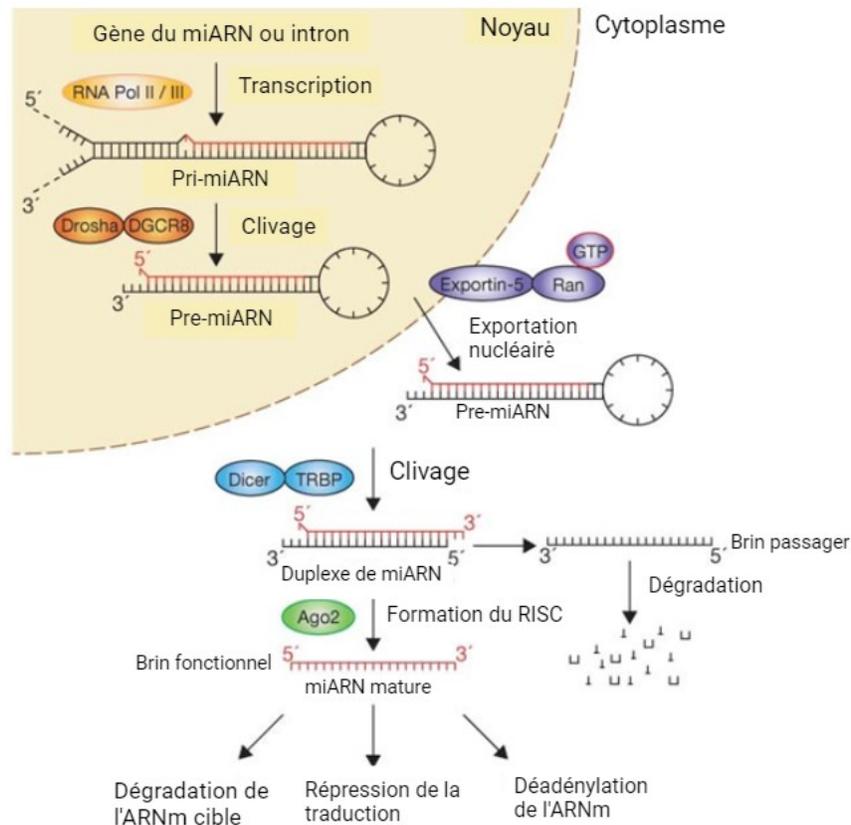


Figure 6. – La Biogenèse des miARN et leurs actions dans les cellules (Adaptée avec Biorender de Winter J) (66)

Ainsi, les miARN ont un large spectre d'action et leur présence de manière régulée dans les EV indique que les EV peuvent influencer l'expression des gènes de manière épigénétique lors de la communication intercellulaire.

1.4.4.3 Internalisation des EV par les cellules cibles

La capacité des EV à modifier l'état physiologique et pathologique des cellules réceptrices dépend de leur amarrage aux cellules cibles et de leur internalisation par celles-ci. L'internalisation d'EV dans des cellules réceptrices spécifique est controversée. En effet, plusieurs études démontrent que ce phénomène est non sélectif tandis que d'autres démontrent que les EV ciblent spécifiquement des cellules, des tissus ou des organes (67). De plus, une cellule mère peut produire plusieurs sous-types d'EV qui ne sont pas internalisés par les mêmes cellules réceptrices. La spécificité d'amarrage est encore mal comprise, mais la composition membranaire des EV est l'explication la plus courante (68). Ainsi, l'hétérogénéité de ciblage au sein d'une même population d'EV, couplé à une technique de séparation peu spécifique peuvent expliquer la présence d'articles ne démontrant pas d'incorporation sélective d'EV.

La surface membranaire des EV dépend de la biogenèse, du type cellulaire et de l'état de la cellule productrice. La composition lipidique, les tétraspanines, les intégrines, les lectines, les protéoglycanes de sulfate d'héparine et les composantes de la matrice extracellulaire (ECM) sont impliqués dans la spécificité d'amarrage et d'internalisation des EV. Par exemple, l'expression d'intégrines sur la membrane des EV permet l'amarrage de celles-ci aux cellules exprimant la protéine d'adhésion ICAM. De plus, l'hétérogénéité des dimères d'intégrine serait également responsable du ciblage différentiel des EV aux cellules réceptrices. Ainsi, les intégrines permettent deux niveaux de régulation lors de l'amarrage spécifique des EV aux cellules (57).

Les EV sont ensuite incorporées par l'action de divers mécanismes d'internalisation comme la fusion membranaire ou l'endocytose médiée par les clathrines ou les radeaux lipidiques. Il y a trois options possibles suite à l'internalisation des EV : la dégradation, la réexcrétion par le système endosomal ou la libération de leur contenu dans le cytoplasme pour induire des changements phénotypiques. D'autre part, l'internalisation des EV n'est pas nécessaire pour induire un changement phénotypique dans les cellules réceptrices. En effet, les EV amarrés à la membrane plasmique des cellules peuvent activer des voies de signalisation par leur interaction avec des récepteurs (57).

1.4.5 Les vésicules extracellulaires associées à la sénescence

Il est maintenant évident que toutes les cellules sécrètent des EV et que ces particules participent à la communication intercellulaire en transportant du contenu régulé et dépend des conditions cellulaires. De plus, le contenu des EV et la nature des cellules réceptrices déterminent l'effet des EV sur l'état physiologique ou pathologique de la cellule receveuse (69, 70).

Lors de la sénescence, il y a une augmentation de la production et de la sécrétion d'EV par les cellules (71). D'ailleurs, l'activation de p53 participe non seulement à l'induction de la sénescence, mais également à l'expression de protéines responsables de la biogenèse et de l'excrétion de petites vésicules extracellulaires, ou plus particulièrement, d'exosomes. Par exemple, TSAP6, impliqué dans la biogenèse des exosomes, et RAB27B, impliqué dans le transport et l'ancrage des MVB à la membrane plasmique, sont régulés par p53 (56, 72). Cela suggère que les EV jouent un rôle important lors de la sénescence.

De plus, le cargo des EV provenant de cellules sénescents (EV-sen) est largement différent des cellules jeunes et a des effets antagonistes selon le contexte cellulaire. De ce fait, leur capacité à influencer l'environnement s'apparente aux effets du SASP. Donc, il a été proposé que les EV de cellules sénescents seraient une composante du SASP (72).

1.4.5.1 Effets des vésicules extracellulaires associées à la sénescence

Les EV sont des transporteurs de molécules fonctionnelles. La bicouche lipidique des EV protège la fonctionnalité des molécules qu'elles transportent. Cela permet de livrer des molécules avec une signalisation puissante à comparer aux molécules solubles du SASP qui sont diluées et dont la fonctionnalité peut être diminuée. En effet, une étude a démontré le récepteur de l'éphrine A2 (EphA2), l'interféron gamma (IFN γ) et TGF- β ont des effets augmentés lors de leur transport par les EV-sen par rapport à leur forme soluble (73). Cependant, il y a très peu de chevauchement protéique entre la composition des EV-sen et les facteurs solubles du SASP. Ainsi, les EV-sen contribuent au SASP de manière distincte des molécules solubles du SASP (73).

Les EV ont autant des effets physiologiques que pathologique lors de la sénescence. En effet, les EV sécrétées par les cellules sénescents jouent un rôle de communicateur intercellulaire, mais également un rôle homéostatique.

Les cellules sénescents (cell-sen) ont tendance à accumuler des fragments d'ADN de chromatine cytoplasmique (CCF) qui peuvent être nocifs et induire la formation de ROS par l'activation de la voie des DDR. Ainsi, l'incorporation d'ADN dans les EV-sen permet l'homéostasie de la cellule productrice en diminuant la force de signalisation de la voie DDR. Cela permet de maintenir la sénescence. Cependant, l'ADN contenu dans les EV peuvent également induire la sénescence paracrine dans les cellules réceptrices par l'activation de la voie cGas/STING (73, 74).

L'induction de la sénescence de manière paracrine ou autocrine est aussi positive que négative et dépend du contexte. D'ailleurs, plusieurs autres molécules contenues dans les EV-sen peuvent induire la sénescence dans les cellules réceptrices. Par exemple, les miARN miR-21a-5p et miR-217, enrichis dans les EV de cellules endothéliales sénescents, ont des effets pro-sénescence en inhibant l'expression de DNMT1 et SIRT1. Cela induit la sénescence en réduisant l'expression de gènes prolifératifs (75). De plus, le SASP peut réguler l'expression de miARN pro-sénescences et pro-inflammatoires comme miR-155. En effet, miR-155 est reconnu pour induire l'expression de gènes inflammatoires, ce qui contribue à l'inflammation chronique et au développement de maladies liés à l'âge comme l'athérosclérose (76).

D'autre part, le contenu des EV peut également avoir des effets procancer. Par exemple, EphA2 est régulé à la hausse dans les EV de fibroblastes sénescents et favorise la prolifération de plusieurs types de cellules cancéreuses (77).

Pour conclure, les vésicules extracellulaires font partie intégrante du SASP et elles participent aux effets néfastes de la sénescence. Leur capacité à transporter des molécules fonctionnelles à travers tout l'organisme étend le potentiel d'action des cellules sénescents à plusieurs organes au lieu d'un seul micro-environnement. Ainsi, élucider le rôle des EV dans différentes maladies et identifier leur contenu de manière type et contexte cellulaire spécifique serait une bonne piste de solution pour favoriser un vieillissement plus sain.

1.4.6 Les macrophages, la sénescence et les vésicules extracellulaires

Les macrophages sont des cellules du système immunitaire inné. Ils sont retrouvés sous forme de monocytes dans le sang et dans la majorité des tissus. Les macrophages tissulaires sont nommés les macrophages résidents (TRM). Leurs progéniteurs sont soit d'origine embryonnaire ou de

monocytes. Les macrophages sont impliqués dans la fonction métabolique, l'élimination des débris cellulaires, l'homéostasie tissulaire et la défense. Cependant, ils sont aussi souvent associés à plusieurs maladies (78).

La fonction des macrophages est modulée par les cytokines qui induisent une polarisation vers un état pro-inflammatoire, dit M1 ou prorréparation, dit M2. Cette polarisation détermine leur fonction et peut changer avec le temps (78). Par contre, plusieurs études démontrent que cette classification n'est pas exacte et que les macrophages ont plus que deux états fonctionnels. De plus, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont très abondants dans le micro-environnement tumoral et ils influencent l'initiation et la progression des tumeurs selon leur polarisation (79).

D'autre part, les macrophages seraient également affectés par la sénescence. En effet, il a été démontré chez la souris qu'une grande proportion des cellules positives aux marqueurs p16 et SA- β -gal sont des macrophages (80). Les macrophages sénescents sont d'ailleurs associés au développement et à la progression de plusieurs maladies liées à l'âge. Par exemple, lors de l'obésité morbide, les macrophages sénescents seraient impliqués dans l'inflammation chronique et dans les défauts de la voie de signalisation de l'insuline dans les cellules adipeuses (81). De plus, une étude a démontré que l'élimination des macrophages alvéolaires sénescents retarde la progression des tumeurs pulmonaires (82). Ces données démontrent donc l'importance de l'étude de la sénescence des macrophages. Malheureusement, les macrophages sénescents sont très peu étudiés en comparaison aux fibroblastes sénescents. La prépondérance des macrophages à travers tous les organes fait d'eux des cellules clés dans une multitude de maladies et il est donc important d'investiguer sur les mécanismes leur permettant d'avoir des effets pathologiques.

Un de ces mécanismes d'action est la sécrétion de vésicules extracellulaires. Les macrophages sont des cellules sécrétant un large éventail de molécules solubles participant à leur fonction. Cependant, les macrophages sécrètent également des EV pouvant contribuer à leur rôle pathologique.

Par exemple, les EV dérivées de macrophages associés aux tumeurs favorisent la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses en inhibant GREM1 suite au transfert de miR-155-5p par les EV (83). De plus, les macrophages infectés par le VIH seraient également impliqués dans le développement d'une hypertension artérielle pulmonaire en libérant dans les EV le miR-130a qui induit la prolifération des cellules musculaires lisses pulmonaires (84).

D'autre part, les TAM seraient impliqués dans la progression tumorale et la chimiorésistance. En effet, les TAM sécrètent des EV enrichis en miR-21-5p et miR-29a-3p qui inhibent la voie STAT3 et créent un déséquilibre dans le phénotype des cellules T menant à la formation d'un milieu immunosuppresseur. De plus, les TAM en condition hypoxique favorisent l'excrétion par les EV de miR-223 qui favorise la résistance aux médicaments dans le cancer épithélial de l'ovaire (84).

Ainsi, l'étude des EV dérivés de macrophages est en pleine expansion. Cependant, le lien entre le vieillissement, les macrophages, les EV et les maladies liées à l'âge sont encore peu étudiés.

1.4.7 Techniques et marqueurs pour l'étude des EV

L'étude des vésicules extracellulaires est encore nouvelle et en pleine expansion. L'hétérogénéité, la petite taille des EV ainsi que les difficultés d'isolement sont des défis de taille lors de l'étude des vésicules extracellulaires. De plus, la diversité de méthodes entre différents groupes de recherche lors de l'isolement d'EV diminue la reproductibilité. Ainsi, pour diminuer l'impact de ces limitations, le groupe *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) a publié un guide intitulé *Minimal information for studies of extracellular vesicles* (MISEV) visant à introduire des méthodes standards et vigoureuses pour l'étude des EV. Ces différentes techniques seront décrites dans les prochaines pages (85).

1.4.7.1 Séparation et concentration des EV

Il n'existe pas une manière absolue d'isoler les EV. En fait, le terme isolement n'est pas approprié, car il est impossible de faire un isolement pur d'EV. Donc, les termes de séparation et de concentration sont utilisés. Aucune technique de séparation et de concentration, à ce jour, ne permet d'avoir à la fois une grande spécificité de séparation et un grand rendement. Ainsi, il est

important de bien choisir la technique de séparation selon le type de questions expérimentales (85).

Les techniques de précipitation, telles que l'ultracentrifugation longue et la précipitation à l'aide de polymères, ont une faible spécificité et un haut rendement. Ces techniques permettent de récupérer tous les types d'EV, mais également certains composants cellulaires indésirables. Au contraire, certaines techniques permettent d'avoir une grande spécificité, mais un faible rendement tel que les gradients de densité, la cytométrie en flux, qui se base sur les composantes de surface pour l'isoler de sous-types d'EV spécifiques, et la filtration qui se base sur la taille des EV. La combinaison de plusieurs techniques de séparation et de concentration permet d'augmenter la spécificité. Pour conclure, certaines techniques permettent d'avoir une spécificité et un rendement intermédiaire telles que la chromatographie à exclusion stérique et l'ultracentrifugation différentielle. L'ultracentrifugation différentielle consiste à augmenter, de façon graduelle, la vitesse de rotation entre chaque cycle de centrifugation. Cela permet de séparer les particules de haut poids moléculaire de celles à plus faible poids moléculaire (85).

Ainsi, ces techniques ne permettent pas d'isoler de manière spécifique les exosomes des microvésicules. En effet, l'hétérogénéité des EV rend leur identification et leur classification très complexe. De plus, lorsque l'origine des EV n'est pas clairement identifiée, il est recommandé de les nommer selon : a) leurs caractéristiques physiques telles que leur grandeur ou leur densité; b) leur composition biochimique ou c) leur cellule d'origine.

1.4.7.2 Quantification des EV

Il existe plusieurs techniques qui permettent la quantification et l'estimation du nombre de vésicules extracellulaires. Selon le type de technique de séparation et de concentration utilisé, il peut être difficile de quantifier le nombre exact d'EV. Ainsi, il est nécessaire de mentionner le volume de milieu conditionné récolté pour la séparation et le nombre de cellules productrices. De plus, lorsqu'une technique de séparation est peu spécifique, il est recommandé d'utiliser deux méthodes ou plus de quantification. Il est possible de quantifier ou d'estimer le nombre d'EV selon le nombre de particules et/ou la concentration de protéines, de lipides ou d'ARN total. La

détermination du nombre de particules et de la concentration protéique sont les deux méthodes de quantification la plus utilisée et dont la corrélation est la plus exacte (85).

Le nombre de particules est généralement mesurée par des techniques de diffusion de la lumière telles que la cytométrie en flux et l'analyse de suivi des nanoparticules (NTA). Ces techniques permettent de mesurer la taille et l'abondance des EV. La NTA mesure la taille individuelle de particules biologiques allant de 50 nm à 1 µm en captant la lumière diffusée par une particule ayant reçu un faisceau laser. La diffusion de la lumière permet d'analyser le mouvement brownien des particules et, de ce fait, de mesurer la taille de celles-ci (86).

D'autre part, il est possible d'estimer la quantité d'EV en mesurant la quantité de protéines, de lipides ou d'ARN total d'un échantillon. La combinaison d'une de ces techniques d'estimation et d'une technique de séparation peu spécifique mène souvent à une surestimation de la quantité d'EV. Par exemple, des contaminants comme l'albumine, retrouvée dans le milieu de culture, ou des détergents, souvent retrouvés dans le tampon de Laemmli, peuvent influencer la concentration protéique et donc, biaiser l'estimation du nombre d'EV (85).

Ainsi, les méthodes de quantification d'EV peuvent être coûteuses et manquer de précision. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes permet une évaluation raisonnable de la quantité d'EV dans un échantillon (85).

1.4.7.3 Caractérisation protéique des EV

Il n'existe pas de marqueurs uniques d'EV. Les mécanismes de biogenèse se recoupent souvent entre sous-types d'EV et leurs marqueurs protéiques de surface dépendent majoritairement du type cellulaire. De plus, la diversité dans la biogenèse et dans la taille des EV ne permet pas d'avoir de contrôle négatif universel pour tous les types d'EV. Ainsi, trois principales catégories ont été décrites comme marqueurs protéiques d'EV (85).

- 1) **Les protéines transmembranaires** : Ces protéines sont retrouvées sur la membrane plasmique ou endosomale. Elles indiquent la présence de la structure à bicouche lipidique des EV. Les tétraspanines sont le marqueur typique de cette catégorie comme par exemple CD9, CD63 et CD81.

- 2) **Les protéines cytosoliques** : Ces protéines suggèrent la présence d'une structure à bicouche lipidique renfermant des composantes intracellulaires. Les marqueurs typiques sont : les protéines de choc thermique, les protéines du cytosquelette, des enzymes tels que GAPDH et des protéines de la machinerie de biogenèse des exosomes telles que ESCRT, ALIX et TSG101.
- 3) **Les contaminants** : Plusieurs contaminants peuvent co-précipiter avec les EV et fausser la quantification et l'étude des fonctions des EV. Les fluides biologiques, comme le milieu de culture contenant du sérum bovin, le plasma et le sérum, contiennent des protéines telles que les apolipoprotéines A1/2 et B (APOA1/2, APOB) et l'albumine (ALB). Ces composantes peuvent être utilisées comme marqueur de contamination pour la séparation d'EV.

Une quatrième catégorie peut être ajoutée pour les petites EV (< 200 nm)

- 4) **Le contrôle négatif** : Cette catégorie permet de confirmer l'isolation de petites EV. Les petites EV ne contiennent pas de compartiments intracellulaires comme des mitochondries, l'appareil de Golgi ou des composantes du noyau ou du réticulum endoplasmique à cause de leur petite taille et de leur biogenèse éloignée de ces régions. Ainsi, il ne devrait pas y avoir la présence de protéines telles que GRP94, CYC1, ni d'histones (HIST1H) dans les petites EV.

Ces protéines peuvent être détectées par western blot ou spectrométrie de masse. L'avantage de la spectrométrie de masse est l'identification du sécrétome protéique des EV et de leurs fonctions potentielles (85).

1.5 Hypothèses et objectifs

En résumé, la sénescence cellulaire est un acteur central du vieillissement et l'accumulation de cellules sénescents dans l'organisme contribue au développement de maladies liées à l'âge par le développement d'une inflammation chronique causé par le SASP. De plus, le SASP s'accompagne d'une sécrétion accrue de vésicules extracellulaires transportant des molécules actives qui sont reconnues pour induire des effets pathologiques et la sénescence dans plusieurs types de tissus.

Les macrophages sont un type cellulaire qui résident dans les tissus. Ils sont d'ailleurs retrouvés en grande quantité dans les niches tumorales et contribuent à la progression des cancers. De plus, une grande majorité des cellules sénescents qui s'accumulent *in vivo* sont des macrophages. Ils ont d'ailleurs été reconnus pour participer aux effets pathologiques de l'athérosclérose. Malgré tout, les macrophages sénescents sont très peu étudiés en comparaison aux fibroblastes sénescents ou aux cellules cancéreuses sénescents. Ainsi, il est pertinent d'étudier l'implication des macrophages sénescents dans le développement de maladies liées à l'âge et dans le développement de cancer.

Nous proposons que les molécules sécrétées par les macrophages sénescents, sous forme soluble ou sous forme de vésicules extracellulaires, sont responsables du développement de maladies liées à l'âge par l'induction d'une sénescence paracrine dans les cellules réceptrices et une inflammation chronique dans le micro-environnement. Ainsi, il est important, tout d'abord, de caractériser les macrophages sénescents et leurs sécrétions. Pour ce faire, nous avons développé un modèle de macrophages sénescents *in vitro* dépendant de l'hyperactivation de la voie des MAPK par l'ajout de 4-hydroxitamoxifène.

L'objectif de ce mémoire est, en premier lieu, d'établir et de caractériser un modèle *in vitro* de sénescence prématurée dans les macrophages. En deuxième lieu, nous voulons caractériser les vésicules extracellulaires de ce modèle de macrophages sénescents et, en dernier lieu, démontrer l'implication de ces vésicules extracellulaires dans le développement de pathologies.

Chapitre 2 – Manuscrit

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

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

*Co-premier auteur

** Co-responsable

Contribution : L'étudiante a refait au laboratoire plusieurs des expériences afin d'augmenter le nombre d'échantillons testés. L'étudiante a également planifié, réalisé et analysé plusieurs expériences visant à démontrer l'effet des sécrétions des macrophages sénescents sur des cellules réceptrices. L'une de ces expériences est présentée dans la figure finale de cet article et les autres n'ont pas été ajoutées, car jugées non concluantes ou négatives. L'étudiante a également écrit les parties du manuscrit correspondant à ses expériences. Camille Laliberté a planifié, réalisé et analysé la majorité des expériences ainsi que rédigé la majorité du manuscrit. Véronique Bourdeau a démarré le projet en réalisant et planifiant les premières expériences ainsi que performant les analyses bio-informatiques. Sébastien Igelmann a réalisé et analysé les images d'immunofluorescence. Lisbeth Carolina Aguilar a réalisé la spectrométrie de masse ainsi qu'analysé les données brutes. Marlene Oeffinger a supervisé la réalisation de la spectrométrie de masse. Luc DesGroseillers a démarré et supervisé le projet. Gerardo Ferbeyre et Véronique Bourdeau ont dirigé le projet en tant que directeur de recherche et agente de recherche respectivement et ils ont révisé le manuscrit.

Le manuscrit présenté est une ébauche d'article et nécessite des expériences supplémentaires 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. Secretion of senescent macrophages induced proliferation in senescent MEF fibroblasts, which could potentially be caused by SASP or miRNAs found in EVs. We conclude that senescent macrophages spread proliferative signals, suggesting a potential role for senescent macrophages in malignancies. 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 «inflammaging» (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 proliferative signals that can 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, sc8002, 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 MgCl₂ solution (1 mM MgCl₂ 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 K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆ · 3H₂O, in PBS MgCl₂ 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 xg 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 xg for 10 minutes at 4°C. RNA pellet was washed with 1 mL of 75% ethanol and centrifuged at 12,000 xg 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) enriched with 2.5 mM more of MgCl₂ (M1028, Sigma). The LightCycler 96 Real-Time PCR System (Roche Applied Science) was used to detect the amplification level and was programmed

53 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 $\Delta\Delta\text{CT}$ 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 (synthesized by Biocorp), 0.2 mM dNTP (DD0056, BioBasic), 50 nM TaqMan Universal probe (synthesized 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 $\Delta\Delta\text{CT}$ 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
	Ki67	agggtaactcgtggaaccaa	ttaacttcttggtgcatacaatgct
	C2cd5	ggtaaaggttgtcttattcaggcaagg	ggcaagagattactgatagctgtgg
	Cntln	ggaggaagagctgagcagcctaa	ccacagagaccatacaaaattccttgtc
	Patzl	cagtgggcaaaccgtacatctg	tgcacctgcttgatatgtccatt
	Trdmt1	ggttgcgagaggatggaacc	tgtgcagggatatgactttctcg
	Cdkn1a/p21	cacagctcagtggactggaa	accctagaccacaatgcag
	Pml	ccagcgtcctgccacagt	ggtgcgatatgcattcagtaactc
	Fam214b	cccaaggagcctgttttggga	tcgaaggagcttagcttcagg
	Tgfb1	gcaacatgtggaactctaccaga	acagccactcaggcgtatcag
	Pai-1	ttgtccagcgggacctagag	aagtccacctgtttcacatagtct
Mus musculus	Angptl2	ccctggaggttgactgtcatc	cgatgttcccaaacccttgcct
	Tm4sf1	tgaagaggactgctgtggttgc	gggctcatagcacttgaccac
	Mcpt1	ggcacttctctgccttctgga	catgtaaggacgggagtgtggc
	Gm5483	gatctgccacaccagaaatcca	ggaggaaacaaccaccaccaac
	Tmem132b	tggggcccagcaaatcacct	tgattccacagactccaacaca
	Itgb3	cgccatcatgcaggctacagt	cactagcaaatgggatgcgtca
	Slc9a2	tgggctttcgtctgctttacc	ggtccggaaccagttaatcacc
	Upp1	acactctggaagccttctcgcg	gcacgttcttcttattgctgct
	Itga3	gggcttgggcaaagtctacatc	cctggcagtcaggatttctctc
	Tbp	gtttctgcggtcgcgtcatttt	tctgggttatcttcacacacatga
	B-Actin	tcctagcaccatgaagatcaagatc	ctgcttctgatccacatctg
	TBP	gctggcccatagtgatctttgc	cttcacacgccaagaaacagtga
	HMBS	aacggcaatgcggctgcaa	gggtaccacgcgaatcac
Homo sapiens	IL1A	cggttgagtttaagccaatccatc	ggtgctgacctaggcttgatga
	IL8	ggcaciaaactttcagagacagca	ggcaaaactgcaccttcacaca
	IL6	ccaggagcccagctatgaactc	aaggcagcaggcaacaccag

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

	Primer
mmu-miR-21a-5p forward primer	gtgccgtagcttatcagactgatgttga
mmu-miR-132-3p forward primer	gtgccgtaacagtctacagccatggtcg
mmu-miR-155-5p forward primer	gtgccgttaatgctaattgtgatag
mmu-5S rRNA forward primer	ctgggaataaccgggtgctgtag
mmu-U6 forward primer	cacgcaaattcgtgaagcgttccat
Universal real-time qPCR Reverse primer	ccagtctcagggtccgaggatttc
Universal reverse transcription primer	cgactcgatccagtctcagggtccgaggatttcgatcc taaccctctcctcggtatcgagtcgcacttttttttttv

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 56 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 oncolumn 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 59 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).

Conditioned medium transfer

RAW 264.7 cells expressing Δ Raf-1:ER were seeded in 10 cm plates at a density of 2M cells/well and treated with 4-OHT (100 nM) or at a density of 1M cells/well and treated with Vehicle (EtOH) every two days. MEF senescent cells are seeded in 6-well plate at a density of 35 000 cells/well. Culture media was replaced 24 hours later with fresh media containing 5% FBS to remove 4-OHT and EtOH on RAW 264.7 cells. The conditioned medium was filtered (0,45 μ m) and transfer on MEF senescent cells 24 hours after the change of media on RAW 264.7. The transfer of conditioned media is made every day. After a total of 21 days of conditioned media transfer from RAW 264.7, MEF senescent cells were fixed in 1% glutaraldehyde. The number of colonies was assessed by a Crystal Violet retention assay as detailed above.

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 macrophages, 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 7A**). 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 7B**). 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 7B**). 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 7B**). 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 7C-D**). We observed an accumulation of cells with senescence-associated β -Galactosidase (SA β -Gal) activity and cells displaying an enlarged morphology (**Fig 7E**). Raf-1 activation also increased the number of cells with Lamin B1 alterations (**Fig 7F-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 7H-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 (MΦ) by RNA sequencing (RNAseq). A volcano plot representations of this data highlights 1446 upregulated genes and 304 downregulated transcripts in Sen MΦ compared with Ctrl MΦ (**Fig 8A**). Some of the most highly enriched transcripts in Sen MΦ include *Itga3*, *Itgb3*, *Gm5483*, *Upp1*, *Slc9a2*, *Tm4sf1*, *Tmem132b* and *Mcpt1*. Distant regulatory elements (DiRE) algorithm predicted NF-κB to be the most important transcription factor to explain the co-regulation of the top 100 most enriched transcripts in Sen MΦ (**Fig 8B**). To further investigate the particular signatures of Sen MΦ, we performed Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) with our RNAseq data (**Fig 8C**). We determined that genes found in HALLMARK MYC TARGETS V1 and HALLMARK E2F TARGETS gene sets were downregulated in Sen MΦ. 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 MΦ. Furthermore, there was an upregulation in Sen MΦ 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-κB in response to TNF, suggesting that Sen MΦ have an important pro-inflammatory SASP signature. Indeed, RNAseq revealed a wide range of cytokines upregulated in Sen MΦ (**Fig 8D**). Curiously, classic SASP markers, such as IL6 or IL8 were not identified as upregulated in Sen MΦ. To validate some of our RNAseq findings, we performed qPCR on Ctrl and Sen MΦ (**Fig 8E**). We found that *Itga3*, *Itgb3*, *Gm5483*, *Upp1*, *Slc9a2*, *Tm4sf1*, *Tmem132b* and *Mcpt1* were highly upregulated in Sen MΦ, reproducing the data from RNAseq. Together, these results suggest that inflammation is a strong hallmark of Sen MΦ and NF-κB could regulate the expression of this program. Moreover, the composition of the SASP of Sen MΦ 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 MΦ. Fluorescent Nanoparticle Tracking analysis (fNTA) revealed that Sen MΦ secrete more EVs than Ctrl MΦ, although the size of EVs are similar in both conditions (**Fig 9A**). The proteome of EVs secreted by Ctrl and Sen MΦ 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 9B**). Of these 124 proteins, 29 were enriched and 2 were depleted in EVs from Sen MΦ compared to those of Ctrl MΦ (**Fig 9C**). As expected, some proteins enriched in EVs from Sen MΦ were associated with the GO term Vesicle. However, more than half of enriched proteins in Sen MΦ EVs were labeled as Intracellular, Extracellular space and/or Ribosomal subunit, suggesting that some proteins found in Sen MΦ EVs are not typical in EVs and their targeting to EV compartments could be promoted in senescence. Moreover, proteins enriched in Sen MΦ EVs are annotated as positive regulators of assembly and secretion of exosomes. These proteins could be responsible for the abundant EV secretions of Sen MΦ (**Fig 9D**). Interestingly, proteins of the large ribosomal subunit were found to be enriched in Sen MΦ EVs. Proteins annotated as involved in protein binding and RNA binding could be involved in the selection of the particular cargo of Sen MΦ EVs.

EVs from senescent macrophages carry pro-inflammatory miRNAs

To investigate the RNA cargo of Sen MΦ EVs, a small RNAseq analysis was performed. RNAs of both Ctrl and Sen MΦ and their derived EVs were compared. First, we compared the types of small RNAs regulated in each condition (**Fig 10A**). The majority of enriched RNAs in Sen MΦ EVs compared with Ctrl MΦ EVs are mRNAs, antisense transcripts, miRNAs and ncRNAs. Interestingly, piRNAs are largely depleted from Sen MΦ 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 10B**). 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 10C**). 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 10D**). We used snRNA U6 and rRNA 5S instead of an exogenous RNA call spike-in to normalize our qPCR results because there is not significant variation of their RNA level in all the conditions that we observe. Also, we confirm that these three miRNAs are overexpressed by the induction of senescence by RAFAER and not by the treatment with 4-OHT (result not shown). Overall, small RNAseq findings indicate that miRNAs are abundant in EVs of Sen MΦ, and some of these miRNAs have known proinflammatory functions that could affect recipient cells

Secretions of senescent macrophages induce an escape of senescence in senescent MEFs

To investigate the potential effects of Sen MΦ on other cells, we did a conditioned media transfer from either Ctrl or Sen MΦ during 21 days on mice embryonic fibroblasts (MEF) (**Fig 11A-B**). We observed by Crystal violet retention assay the formation of more colonies by MEFs cultured with the conditioned media of Sen MΦ in comparison with the MEFs cultured with 5%F culture media. Moreover, there is no formation of colonies by MEFs cultured with conditioned media of Ctrl MΦ. These results suggest that secretions of Sen MΦ induce proliferation in MEFs and that secretion of Ctrl MΦ enhance senescence in MEFs. This effect could be the result of SASP soluble factors and/or EVs carrying pro-inflammatory and pro-proliferative miRNAs.

Navitoclax treatment kills senescent macrophages

Since secretions from Sen MΦ seem to promote an inflammatory phenotype in fibroblasts, we examined the possibility of killing Sen MΦ 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 12**). 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 Sen MΦ. We also reported the RNA and protein cargo of EVs secreted by these senescent macrophages. Our results suggest that the secretions of Sen MΦ could spread pro-inflammatory and pro-proliferative signals to other cells, which could contribute to age-related diseases and cancer.

Our RNAseq data indicated an upregulation of more than 50 cytokines in Sen MΦ. We propose these cytokines as members of the SASP of Sen MΦ. 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 Sen MΦ exhibit an upregulation of Stc1, which was identified as a ubiquitous SASP marker by the same study. Sen MΦ also shared a part of the SASP signature in Ras-induced senescence: Cxck1, Mmp3 and Mmp9 (36). The SASP of Sen MΦ could be under the transcriptional control of NF-κB, as suggested by our analysis with the algorithm DiRE.

Furthermore, our results showed an important increase in the secretions of EVs by Sen MΦ compared with non-senescent MΦ. 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 Sen MΦ, 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 Sen MΦ was different than the one of EVs from non-senescent MΦ. Among others, miR-21, miR-155, miR-132, ribosomal proteins and Major Vault Protein (Mvp) were enriched in EVs of Sen MΦ. Interestingly, classic EV markers tetraspanins Cd9, Cd63 and Cd81 were not detected by mass spectrometry in EVs from both non-senescent and Sen MΦ, suggesting that tetraspanins might not be EV markers in MΦ. 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 66 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 Sen MΦ. 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 Sen MΦ, it could contribute to paracrine senescence by promoting MAPK signaling. In addition, Mvp could take part in the cargo selection of EVs in Sen MΦ. 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 escape of senescence in mice embryonic fibroblast (MEF) after their exposition to secretions of Sen MΦ. Several miRNAs were enriched in EVs of Sen MΦ, including miR-21 and miR-155. These miRNAs share common targets. PTEN is targeted by these two miRNAs (74, 75). PTEN is an important tumor suppressor, and its depletion has been reported to induce inflammation and proliferation in cancer cell (76-78). This suggests that miR-21 and miR-155 could act in synergy to repress these targets and therefore promote inflammation-related pathologies or cancer by promoting proliferation. It has been observed previously that miR-21 is enriched in EVs of senescent cells and in EVs of old mice (79). Besides, miR-21 has been linked to various age-related diseases, including non-alcoholic fatty liver disease (80), idiopathic pulmonary fibrosis (81), and lung cancer (47). Studies have established a role for miR-155 in Alzheimer's disease (82), insulin resistance (83), (67) atherosclerosis (84) and various cancers (85). Moreover, it has been shown that miR-155 could promote inflammation by generating reactive oxygen species (86).

In addition, the escape of senescence in MEF suggest that they potentially acquire malignant characteristics. Although, additional experiments will be necessary such as a soft agar colony formation assay to confirm this hypothesis. Interestingly, EVs secreted by Sen MΦ have the

potential to induce paracrine proliferation. It has been reported that miR-21 can induce proliferation by targeting Pdc4 and Pten (87-88). Furthermore, miR-155 has been shown to promote proliferation by targeting Tp53inp1, which decreases the expression of p53 (89). Also, miR-155 decrease the expression of p21 by targeting Smad5 (90). Moreover, SASP soluble factors also have the potential to induce paracrine proliferation. In fact, the fibroblast growth factor Fgf2 induce an escape of senescence in senescent human mesenchymal stem cell by decreasing the expression of TGF- β 2, p53, p21 et p16 (91). So, SASP soluble factors and exosomal miRNA probably work in synergy to induce proliferation in senescent MEFs.

Identifying ways to eliminate Sen M Φ is relevant since the potential of these cells to promote various disorders associated to aging. We observed a small senolytic effect of Navitoclax on Sen M Φ . Navitoclax inhibits anti-apoptotic BCL2 and BCLXL (92). Different anti-apoptotic proteins could be at play in Sen M Φ , rendering them less responsive to Navitoclax. Interestingly, our RNAseq data shows an important upregulation of antiapoptotic Bcl2a1a in Sen M Φ , suggesting a potential target for senolysis (93).

Our observations need to be reproduced in models of senescence induced by other stimuli in order to determine which characteristics apply to Sen M Φ in general. Moreover, we have to assess if the effect of senescent macrophages on MEF is due to EVs, soluble SASP or both. The effect of miR-21 and miR-155 on their targets should be evaluated in MEF receiving EVs from Sen M Φ . In conclusion, our results are consistent with a pathologic effect of Sen M Φ , notably by secreting pro-proliferative and pro-inflammatory signals through the miRNA cargo of EVs and SASP soluble factors.

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, Condell L, Carey D, Sedivy JM. Cellular senescence in aging primates. *Science*. 2006;311(5765):1257. 69
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 proregenerative 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. 70
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. Ogradnik 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. 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. 72
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. 73

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 sequencingbased 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. 74

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 sestrindependent 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. 75

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 nonsmall 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. 76

79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. Yang Y, Yang L, Liang X, Zhu G. MicroRNA-155 Promotes Atherosclerosis Inflammation via Targeting SOCS1. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(4):1371-81.
85. 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.
86. 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.
87. Roupakia E, Markopoulos GS, Kolettas E. Genes and pathways involved in senescence bypass identified by functional genetic screens. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2021;194:111432.
88. Wang Q, Yang HS. The role of Pcd4 in tumour suppression and protein translation. *Biol Cell*. 2018.

89. Zhang CM, Zhao J, Deng HY. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci.* 2013;20(1):79.
90. Jiang D, Aguiar RCT. MicroRNA-155 controls RB phosphorylation in normal and malignant B lymphocytes via the noncanonical TGF- β 1/SMAD5 signaling module. *Blood.* 2014;123(1):86-93.
91. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T. FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- β 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007;359(1):108-14.
92. 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.
93. Champa D, Russo MA, Liao XH, Refetoff S, Ghossein RA, Di Cristofano A. Obatoclax 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 7. 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), phosphoERK 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 MannWhitney U Test.

Fig 8. 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 9. 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 (FNNTA). 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 10. 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 11. Secretions of senescent macrophages induce an escape of senescence in mice fibroblasts

A) Quantification of the colony essay of MEF after 21 days with transfer of conditioned media from Ctrl M Φ , Sen M Φ or 5% F culture media. The number of colonies was quantified after a Crystal violet coloration. Experiment was performed 3 times. Error bars represent standard deviation. * p-value < 0.05 using Student's t-Test. **B)** Visualisation of the colony after coloration by crystal violet and visualisation of the cell's shape after 21 days of conditioned media transfert. Experiment was performed 3 times.

Fig 12. 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

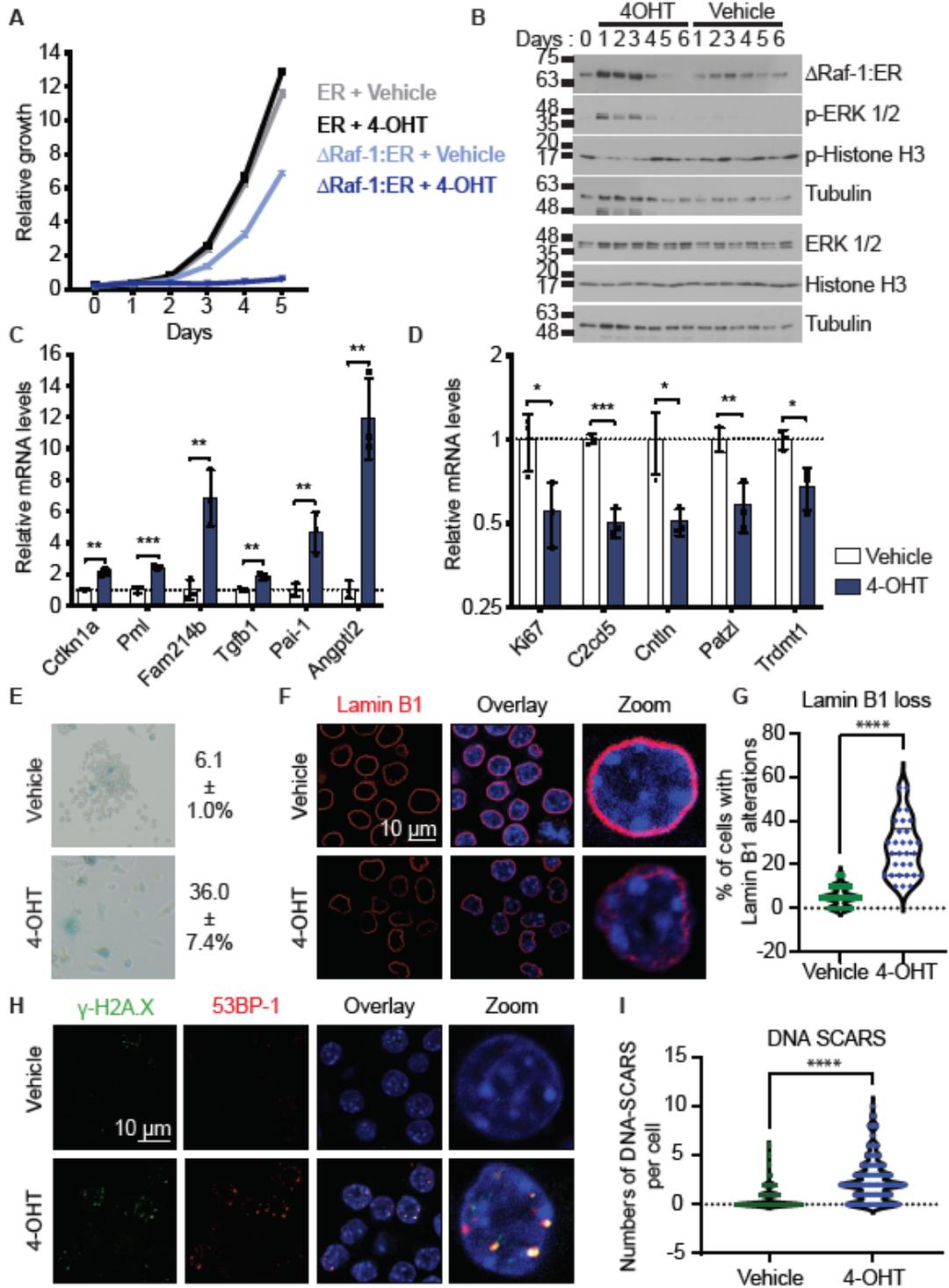


Figure 7. – Raf hyper-activation induces cellular senescence in RAW 264.7 murine macrophages

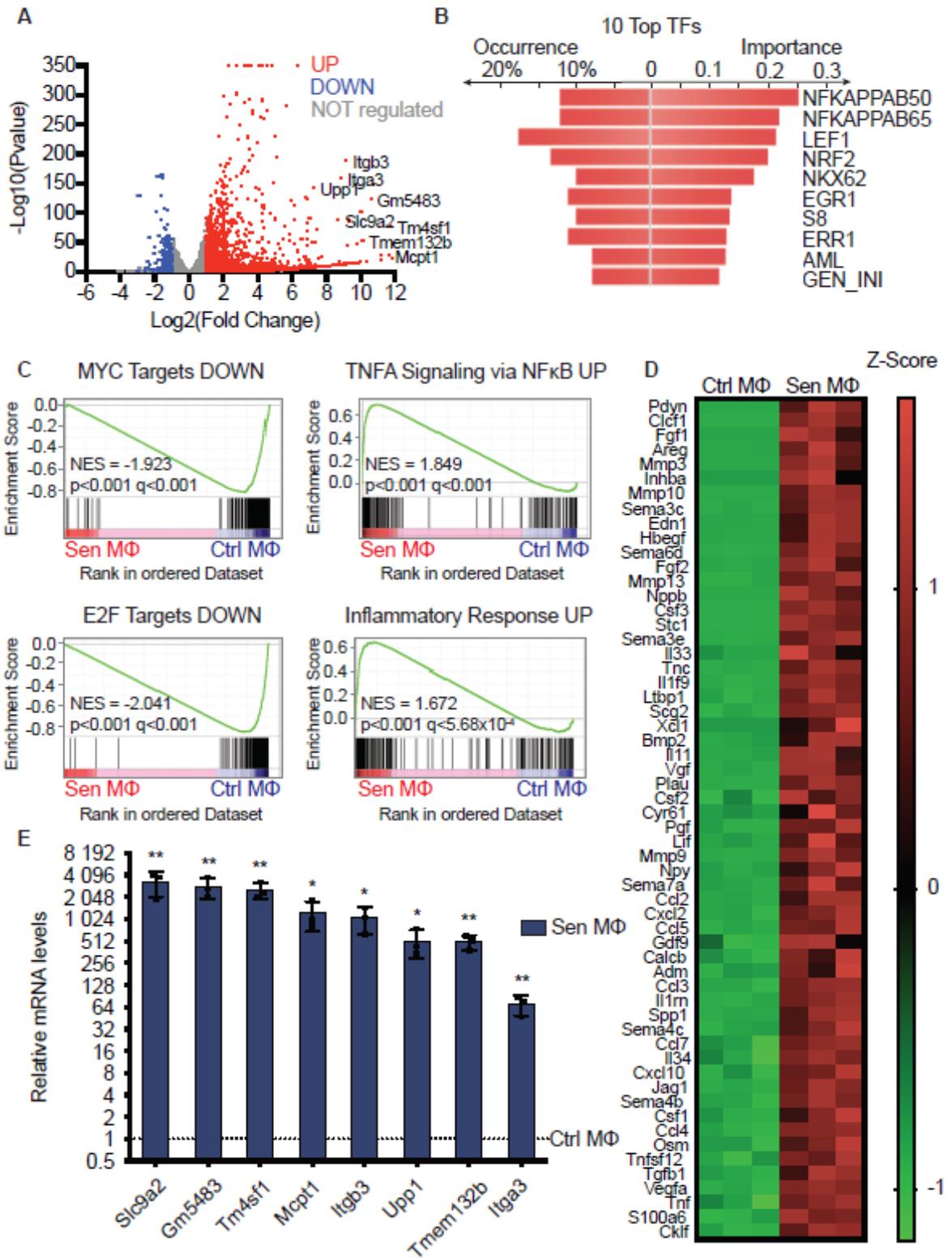


Figure 8. – Enrichment of inflammatory genes in the transcriptome of senescent macrophages

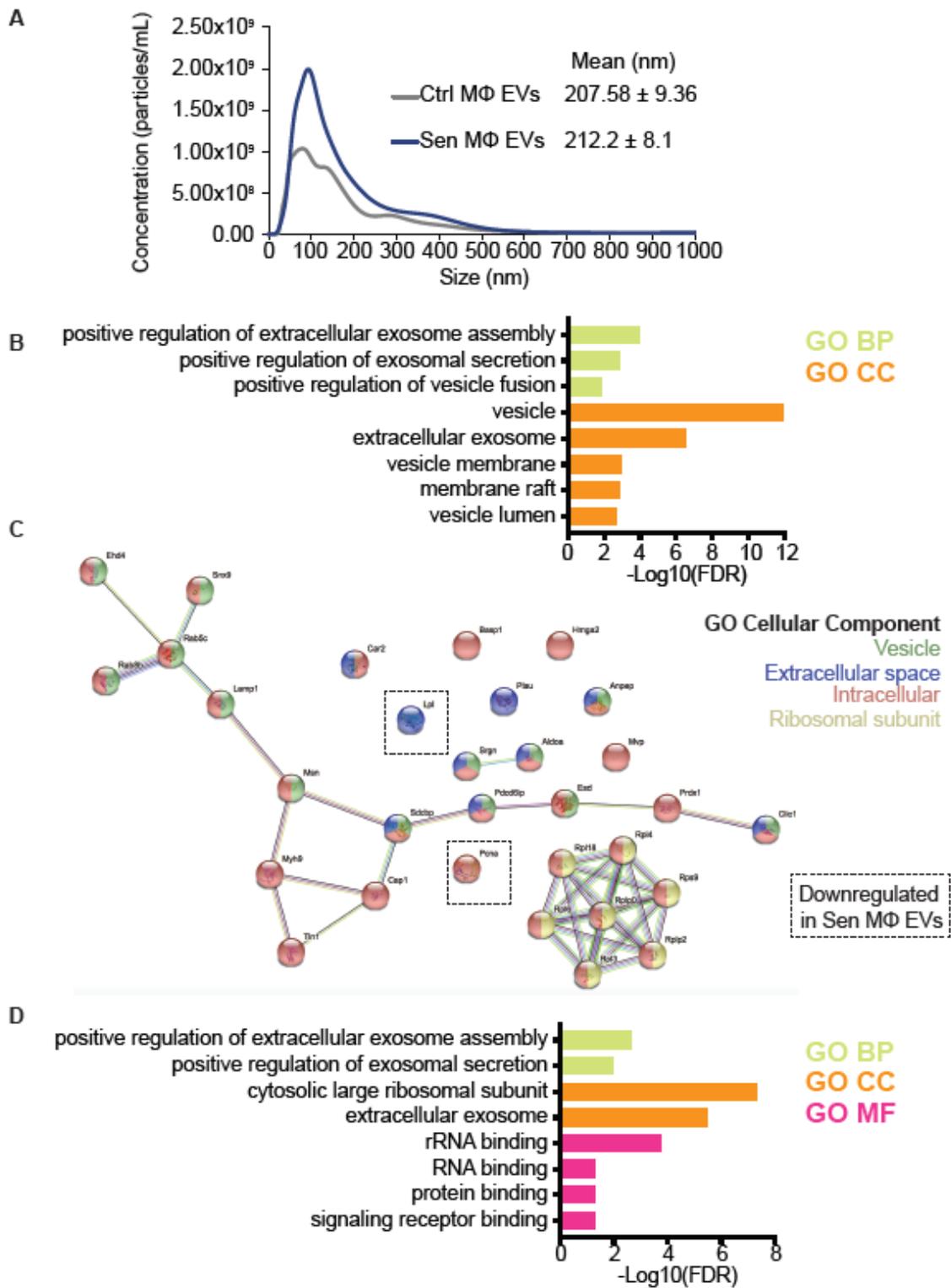


Figure 9. – Senescent macrophages secrete more EVs carrying RNA binding proteins and exosome proteins

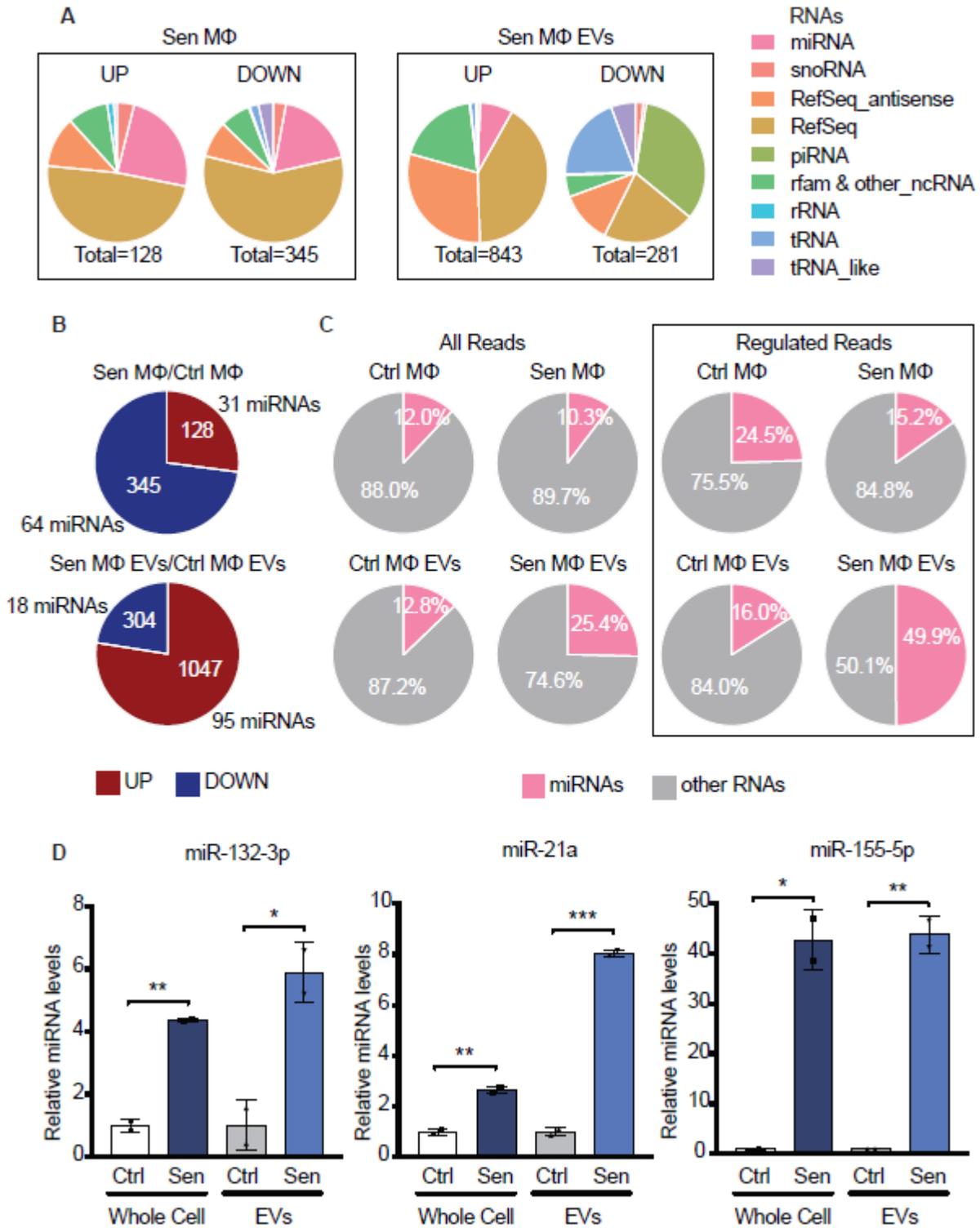
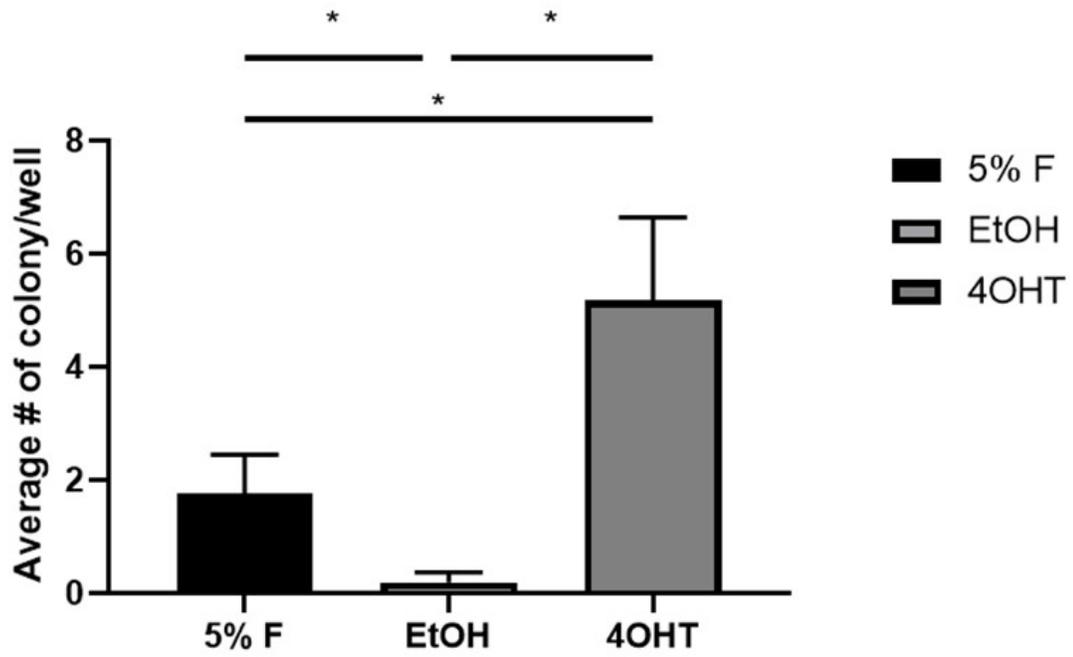


Figure 10. – EVs from senescent macrophages carry pro-inflammatory miRNAs

A



B

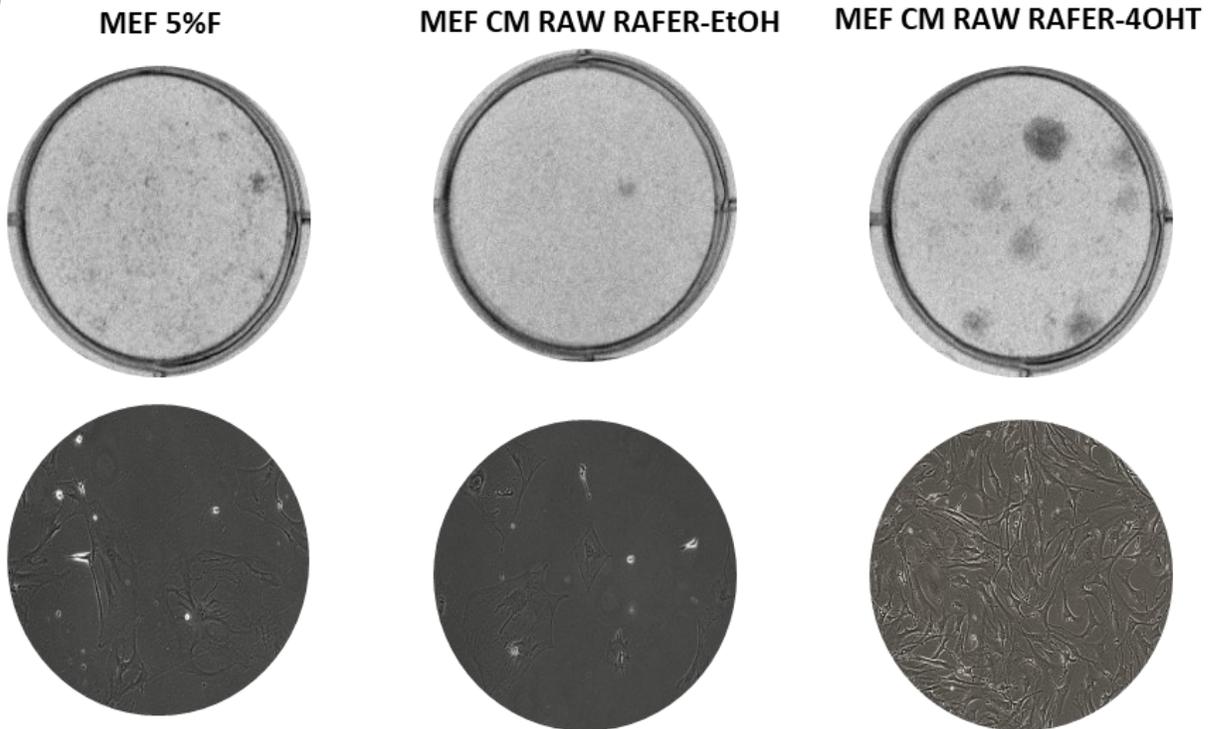


Figure 11. – Secretion of senescent macrophages induce an escape of senescence in mice embryonic fibroblasts

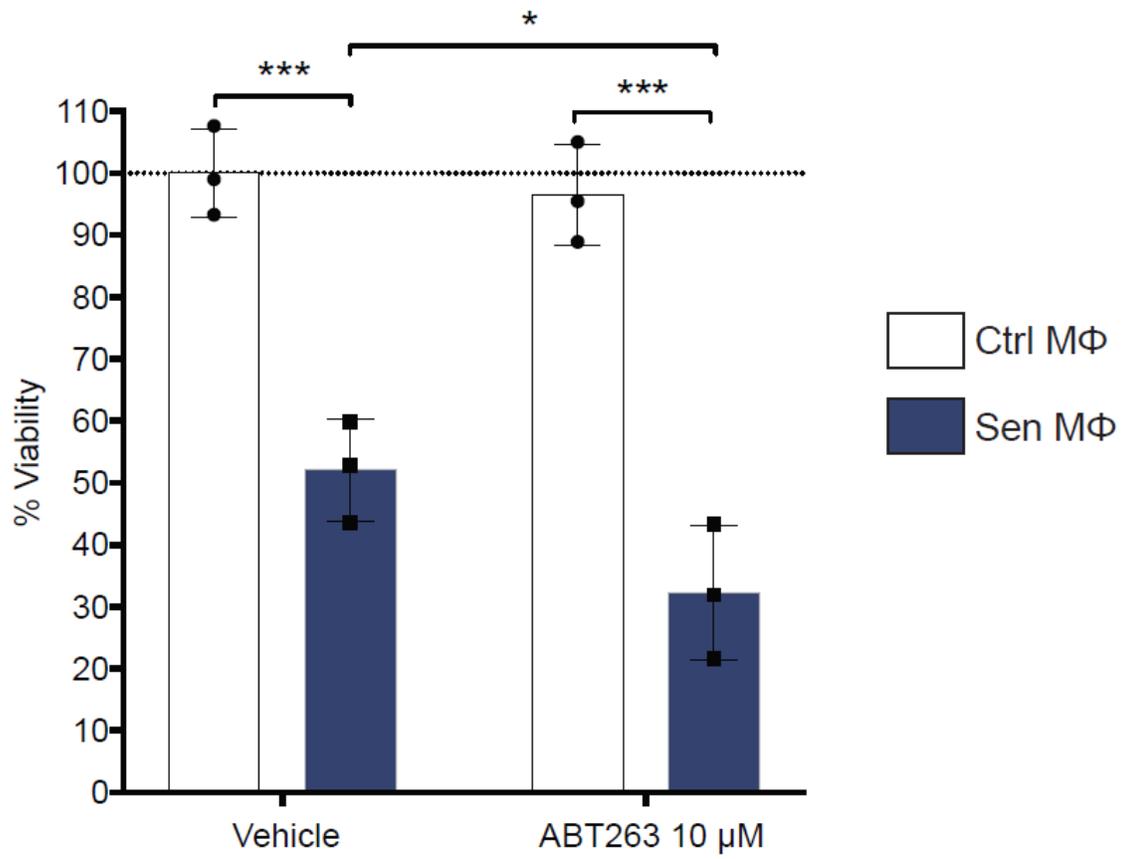


Figure 12. – Navitoclax treatment kills senescent macrophages

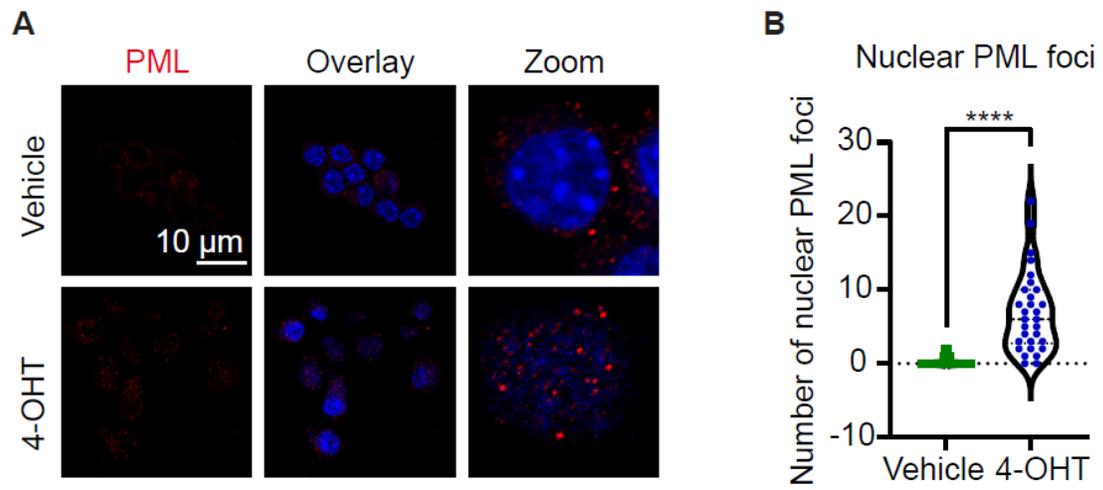


Figure S1 *Raf hyper-activation induces nuclear PML foci in RAW 264.7 murine macrophages*

Chapitre 3 – Discussion

Lors de cette étude, nous avons développé un modèle de sénescence *in vitro* dans les macrophages murins RAW 264.7. Notre modèle de sénescence est induit de manière conditionnelle à l'activation de l'oncogène Raf-1 par le 4-hydroxytamoxifène. Dans cette étude, nous démontrons que l'induction de la sénescence par Raf-1 dans les RAW 264.7 change le transcriptome des macrophages vers un profil pro-inflammatoire. De plus, la sécrétion d'EV est fortement augmentée dans ce modèle de sénescence et leur contenu en petits ARN et en protéine est régulé. Les EV Sen MΦ sont enrichis en miARN, comme le miR-155-5p, le miR-21a-5p et le miR-132-3p, ainsi qu'en protéines ribosomiques, en protéine Alix et en protéine de la voûte majeure (Mvp). Nous démontrons également que les sécrétions des macrophages sénescents (MΦ Sen) induisent un échappement de la sénescence dans les cellules de fibroblastes embryonnaires murins sénescents (MEF-sen). D'autre part, nos données suggèrent l'utilisation du sénolytique navitoclax pour l'élimination partielle des macrophages sénescents.

Les macrophages sénescents produisent un SASP inflammatoire et unique

Bien que la sénescence soit un domaine très étudié, peu d'études se sont intéressées à la sénescence des macrophages et à leur implication dans le développement des maladies. Par conséquent, il y a peu de données comparatives des caractéristiques de la sénescence chez ces cellules. Dans ce papier, nous caractérisons la sénescence induite par Raf-1 dans les macrophages murins en analysant leur profil sécrétoire et leur effet sur des cellules réceptrices de fibroblaste.

L'activation de Raf-1 induit la sénescence dans les macrophages

Tout d'abord, nous avons démontré que la sénescence est induite par l'hyperactivation de la voie des MAPK en réponse à l'ajout de 4-OHT qui active l'oncogène Raf-1. En effet, la phosphorylation de Erk, une protéine en aval de Raf-1, démontre l'activation de la voie des MAPK. De plus, l'activation de Raf-1 mène à l'apparition de dommages à l'ADN (DNA-SCARS) responsables de l'activation de la sénescence. D'ailleurs, les données de RT-qPCR démontrent une augmentation de la transcription de gènes inhibiteurs du cycle cellulaire, comme p21 (Cdkn1a) et une diminution des gènes prolifératifs comme Ki67. Ainsi, ces données suggèrent que, comme lors de l'activation

de Ras, Raf-1 induit la voie des MAPK qui mène à la formation de dommages à l'ADN. Ces dommages induisent l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence en promouvant la transcription de gènes inhibiteurs du cycle cellulaire (14, 17, 19).

D'autre part, nous démontrons une diminution de la lamine B1 à la membrane nucléaire ainsi que l'expression de la Sa- β -gal. Seulement 36% des macrophages traités au 4-OHT expriment la Sa- β -gal. Cela pourrait indiquer que peu de cellules sont sénescents après l'activation de Raf-1. Cependant, bien que certaines cellules continuent à proliférer en réponse au traitement 4-OHT, la majorité des macrophages acquièrent une forme aplatie caractéristique de la sénescence. De plus, la fixation et la coloration ont été effectuées 3 jours post-traitement au 4-OHT. Certaines études rapportent que l'activité de la Sa- β -gal est maximale 5 à 6 jours après activation de la sénescence et certaines autres rapportent que l'expression de la Sa- β -gal n'est pas requise lors de la sénescence (87, 88). Ainsi, il est possible que les conditions de l'expérience n'aient pas été optimales. Malgré tout, il n'y a pas de marqueur unique de la sénescence et nos données de caractérisations confirment que la majorité de nos cellules sont sénescents, mais que cet état est possiblement hétérogène à travers la population de macrophages.

Le profil inflammatoire des macrophages sénescents

Dans un autre ordre d'idée, une analyse du transcriptome a été réalisée par RNAseq. Les données obtenues ont permis d'établir le profil inflammatoire et unique des RAW 264.7 sénescents. Une cinquantaine de cytokines ont été augmentées significativement suite à l'induction de la sénescence. Nous proposons ces molécules comme marqueurs du SASP dans notre modèle de M Φ Sen. Les articles *The senescence-associated secretory phenotype : The dark side of tumor suppression* et *Inflammatory Networks during Cellular Senescence: Causes and Consequences* résument et comparent la littérature connue sur le SASP selon différents types cellulaires et types de sénescences (38, 89). Les protéines typiques du SASP sont les interleukines IL-6, IL-8 et IL-1, les *matrix metalloproteinase* (Mmp-1, -3 et -10), les (*C-X-C motif*) *ligand 1/2* (Cxcl-1, -2), les *membrane cofactor protein* (MCP-1, -2), l'*insuline-like growth factor* (IGFB) et la *stanniocalcin* (STC-1). Chose intéressante, nos M Φ Sen surexpriment très peu de ces protéines typiques du SASP au niveau transcriptionnel. En effet, seulement les métalloprotéinases Mmp-3 et Mmp-10,

la *stanniocalcin* (STC-1), ainsi que le ligand au chimiokines Cxcl-2 sont partagés avec le profil commun d'inflammation. De plus, les interleukines clés du SASP, IL-6, IL-8 et IL-1 ne sont pas surexprimés par nos MΦ Sen. Au contraire, on retrouve une surexpression de l'IL-11, dont l'expression est généralement inchangée lors de la sénescence (38, 89).

Ces articles mentionnent également des protéines moins communes du SASP lors de la sénescence induite par RAS dans les fibroblastes. Parmi ces protéines, notre modèle de MΦ Sen surexprime les ARNm des ligands des chimiokines Ccl-2, Ccl-3 et Ccl-7. Notre modèle surexprime également l'ARNm de la *matrix metalloproteinase-9* (Mmp-9) qui est un marqueur du SASP lors de la sénescence induite par des dommages à l'ADN dans les cellules d'adénocarcinome du côlon (38, 89). Certaines de ces protéines, telles que Mmp-3, Mmp-9, Cxcl-10 ainsi que les *fibroblasts growth factor* (Fgf-1, -2) ont des effets inflammatoires et procancer *in Vivo* (90-92). Le SASP est généralement composé d'un mélange de cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires (89). Ainsi, nos MΦ Sen se distinguent des macrophages M1 et M2, car ils partagent des marqueurs d'inflammation avec ces deux catégories de macrophages tels que Cxcl-10 et TGF-β1 respectivement (93). De plus, nos données suggèrent que le SASP de nos MΦ Sen est unique et partage très peu de ressemblances avec le SASP des cellules sénescents induites par Ras et par les dommages à l'ADN.

D'autre part, nos analyses de RNAseq peuvent être influencées par l'hétérogénéité de notre population de MΦ Sen. En effet, l'augmentation de certains transcrits d'ARNm pourrait être attribuée à l'activation de Raf-1 et non à la sénescence. Cependant, nous avons confirmé que la majorité de la population de macrophages devient sénescents. De plus, le SASP est généralement régulé au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription NFκB et C/EBPβ et notre analyse des données de RNAseq, avec l'outil bio-informatique *Distant Regulatory Elements* (DiRE), confirme que le facteur de transcription NFκB est le principal régulateur du transcriptome de notre modèle de MΦ Sen (94). Ainsi, nous avons établi la signature inflammatoire unique de nos MΦ Sen au niveau transcriptionnel. Cependant, des études protéomiques restent à prévoir pour confirmer la surexpression au niveau protéique de ces molécules.

La sécrétion de vésicules extracellulaires est augmentée dans les macrophages sénescents

Notre modèle de MΦ Sen sécrète deux fois plus d'EV que les MΦ Ctrl. Cette caractéristique est observée dans plusieurs modèles de cellules sénescents et a d'ailleurs été nommée les EV-associées à la sénescence (71, 95, 96). De plus, la majorité des EV sécrétées par nos macrophages, qu'ils soient sénescents ou non, sont de petites vésicules extracellulaires d'environ 100 nm. Cela suggère que les macrophages sécrètent majoritairement des exosomes, malgré que certaines microvésicules peuvent avoir une taille similaire. Cependant, l'origine intracellulaire de nos EV n'a pas été étudiée. De ce fait, nous ne pouvons pas confirmer cette hypothèse tant qu'une analyse par imagerie de cellules vivantes, en utilisant des techniques telles que FRET ou la microscopie à lumière transmise, ne sera faite (85). Nous pouvons tout de même émettre des hypothèses quant à l'origine de nos EV et aux mécanismes impliqués dans l'augmentation de leur sécrétion dans notre modèle.

L'activation de la voie des céramides pourrait expliquer l'augmentation de la sécrétion d'EV dans nos MΦ Sen. Lors de la sénescence, il y a une augmentation de l'expression de la sphingomyélinase neutre 2 (nSMA2) qui est impliquée dans la conversion des sphingomyélines en céramide lors de la biogenèse des exosomes (50, 97). De plus, p53 est impliqué dans l'augmentation de la nSMA2 (98). Ainsi, il est possible que l'activation de p53 augmente la production de l'enzyme nSMA2 dans nos MΦ Sen, ce qui pourrait augmenter la sécrétion d'EV par la voie des céramides. Cependant, il est fort probable que plusieurs mécanismes de biogenèse soient responsables de l'augmentation de la sécrétion d'EV lors de la sénescence des macrophages.

Par exemple, nos données de spectrométrie de masse démontrent que la protéine Alix, aussi appelée Pcd6ip, est enrichie dans nos EV dérivées de MΦ Sen (EV MΦ Sen). La protéine Alix favorise l'invagination de la membrane lors de la biogenèse des ILV en formant un complexe syndécane-synthénine-Alix (99). De plus, la protéine synthénine-1 (Sdcbp) est également enrichie dans nos EV MΦ Sen. Ces données suggèrent qu'une majorité d'EV MΦ Sen proviennent de la biogenèse des exosomes régulée par le complexe syndécane-synthénine-Alix. D'ailleurs, l'inhibition d'Alix est reconnue pour réduire la sécrétion d'EV (100).

En outre, les données RNAseq indiquent une augmentation des ARNm Alix, synthénine-1 et Rab7 dans les MΦ Sen à comparer au MΦ Ctrl. Dans les cellules de cancer du sein MCF7, Rab7 est impliqué dans la sécrétion de vésicules extracellulaire syndécane-synthénine-Alix positives (99). Donc, l'augmentation transcriptionnelle de ces trois protéines dans les MΦ Sen, couplée à leur enrichissement dans les EV MΦ Sen, suggère que ces protéines sont responsables de l'augmentation de la biogenèse et de la sécrétion d'EV dans ces cellules. Cependant, malgré une différence transcriptionnelle significative de Rab7, Alix et synthénine-1 dans les MΦ Sen à comparer aux MΦ Ctrl, l'augmentation de leur ARNm n'est pas très élevée dans les MΦ Sen. Ainsi, il est probable que ces protéines agissent en synergie pour augmenter la sécrétion des EV Syndécane-Synthénine-Alix positives.

D'autre part, le transport vésiculaire vers la membrane plasmique peut être favorisé, lors de la sénescence, par des dysfonctions lysosomales. La dysfonction lysosomale peut se définir par une alcalinisation du lysosome. Dans les macrophages, l'alcalinisation favorise l'exocytose lysosomale (101). Cette fonction a longtemps été considérée comme un moyen de réparer la membrane plasmique (102). Cependant, des études démontrent que la régulation à la baisse de NEU1, ainsi que l'accumulation de l'hypersialylation de Lamp1 dans les cellules cancéreuses, promeut l'exocytose lysosomale et la sécrétion d'exosome (103, 104). D'ailleurs, l'ARNm de Lamp1 est augmenté dans notre modèle de MΦ Sen et sa protéine est enrichie dans les EV MΦ Sen.

De plus, la spectrométrie de masse indique un enrichissement de la petite GTPase Rab5c qui est impliquée dans la biogenèse des endosomes précoces (105). Ainsi, l'association de l'alcalinisation des lysosomes et de l'enrichissement de Lamp1 dans les MΦ Sen pourrait augmenter l'exocytose lysosomale et, de ce fait, la sécrétion d'EV enrichis en Rab5c provenant du système endosomal. Cependant, les niveaux protéiques de Lamp1 n'ont pas été mesurés dans les cellules et nous ne pouvons confirmer que la protéine sera assez abondante pour expliquer l'augmentation de la sécrétion d'EV.

Dans le même ordre d'idée, nous remarquons également un enrichissement de Rab8b dans nos EV MΦ Sen. Les petites GTPase Rab peuvent favoriser le transport des EV à la membrane plasmique, ainsi que leur biogenèse. Malgré que Rab8b n'ait pas été relié directement au

transport ou à la biogenèse des EV, son isoforme Rab8a est impliqué dans le transport des EV à la membrane plasmique (106). Chose intéressante, Fgf-2, l'une des protéines proposées comme composante du SASP dans notre modèle de MΦ Sen, favorise la sécrétion de vésicules extracellulaires enrichies en Rab8b dans les cellules neuronales (107). Ainsi, il est possible que Fgf-2 favorise le transport des EV à la membrane plasmique par l'action de Rab8b.

De plus, nos données de RNAseq indiquent une augmentation de la transcription de la petite GTPase Rab11a dans les MΦ Sen. Dans les cellules de carcinomes humains (HN4 et CNE2), Rab11a est reconnu pour interagir avec les sous-unités du complexe exocyste Sec3 et Exo70 qui sont impliquées dans le ciblage de ce complexe à la membrane plasmique. Ainsi, Rab11a permet le transport et l'amarrage des MVB à la membrane plasmique en interagissant avec le complexe exocyste (108).

Donc, la majorité des mécanismes proposés indiquent l'augmentation de la biogenèse d'exosomes ainsi que l'augmentation du transport des exosomes par les petites GTPase Rab à la membrane plasmique. Néanmoins, la petite GTPase Rhoa a été identifiée par spectrométrie de masse en proportion semblable dans les EV MΦ Sen et dans les EV MΦ Ctrl. La GTPase Rhoa est impliquée dans la fission de la membrane plasmique lors de la biogenèse des microvésicules (59). Ainsi, les macrophages semblent produire des microvésicules de manière égale dans les conditions sénescences et contrôles.

Ainsi, nos données de RNAseq suggèrent que, lors de la sénescence des macrophages, il y a une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans la biogenèse des exosomes, comme Alix et synthénine-1, et une augmentation de la transcription de petites GTPase Rab impliquées dans le transport des exosomes à la membrane plasmique. Bien que certaines de ces protéines soient enrichies dans les EV MΦ Sen, cela n'indique pas une augmentation de la protéine dans les MΦ Sen. En effet, cet enrichissement indique seulement que les EV sécrétées par les MΦ Sen expriment plus ces protéines. Cette observation pourrait être causée par une régulation positive de ces protéines aux EV MΦ Sen et non à une augmentation de la protéine dans les cellules parentales.

Ainsi, il serait pertinent d'effectuer une analyse protéomique dans les macrophages pour confirmer les résultats de RNAseq. De plus, nous pourrions étudier l'implication de ces protéines dans l'augmentation de la sécrétion d'EV dans les MΦ Sen en inhibant leur traduction à l'aide d'ARNsh. En outre, nos données indiquent l'hétérogénéité de notre isolation d'EV sans toutefois confirmer leur origine.

Le cargo protéique des EV dérivées de macrophages sénescents

Notre analyse de spectrométrie de masse a permis de caractériser nos EV et de remarquer des différences dans le cargo protéique entre les EV MΦ Sen et les EV MΦ Ctrl. En effet, les EV MΦ Sen sont enrichis en protéines ribosomiques, en protéines du système endosomal, ainsi qu'en protéine de voûte major (Mvp).

Les protéines associées aux vésicules extracellulaires

Tout d'abord, il est essentiel de confirmer l'isolation d'EV en effectuant une analyse protéomique. Selon le MISEV, il est important d'identifier au minimum quatre catégories de protéines lors de l'isolation de petites vésicules extracellulaires : les protéines transmembranaires, les protéines cytoplasmiques habituellement incorporées dans les EV, l'absence de protéines contaminantes et l'absence d'organelles (85).

Certaines protéines typiques des EV n'ont pas été identifiées par spectrométrie de masse. En effet, les tétraspanine Cd9, Cd63 et Cd81, ainsi que la protéine TSG101 et la protéine de choc thermique HSP70 ne sont pas exprimées par nos EV MΦ Sen (85). Il est possible que la limite de détection de la technique n'ait pas été assez sensible pour détecter ces protéines. Cependant, l'expérience de spectrométrie de masse a permis d'identifier 124 protéines dans les EV de macrophages qui, selon l'analyse GO, sont majoritairement associées aux vésicules extracellulaires.

De ce fait, nous avons identifié neuf protéines dans nos EV de macrophages qui sont également proposés par le MISEV comme marqueurs d'EV. Parmi ces protéines, il y a les protéines membranaires suivantes : La chaînes beta des intégrines (Itgb2), la protéine membranaire associée au lysosome 1 et 2 (Lamp1/2), la syndécane-4 (Sdc4) et la basigine (Bsg). Il y a également les protéines cytoplasmiques suivantes : la protéine de choc thermique HSP 90-beta (HSP90ab1),

la petite GTPase Rhoa, la synthénine-1 (Sdcbp), l'enzyme Gapdh et la protéine Alix (Pdcd6ip) (85). Chose intéressante, seulement les protéines Alix, Sdcbp et Lamp1 sont enrichis dans les EV MΦ Sen. De plus, un western blot de l'albumine (Alb) et de Grp94 indique l'absence de contamination protéique par le milieu de culture et l'absence d'organelles (**annexe 1**).

D'autre part, nous proposons les cinq protéines suivantes comme marqueur supplémentaire de nos EV de macrophages : Le transporteur d'acides aminés neutres B (Slc1a5), la sous-unité alpha-1 de l'ATPase (Atp1a1), la protéine de liaison à la galectine-3 (Lgals3bp), la sous-unité alpha de type 5 du protéasome (Psm5) et le facteur d'élongation eucaryote 2 (Eef2). Une étude a comparé le protéome d'EV dérivées de 14 lignées cellulaires différentes. Ces cinq protéines, ainsi que 17 autres, sont proposées comme marqueur d'EV par cette étude. Chose intéressante, les tétraspanines Cd9, Cd63 et Cd81 n'étaient pas exprimées de manière homogène à travers les EV dérivées des 14 lignées cellulaires. Ainsi, ces tétraspanines ne sont probablement pas les meilleurs marqueurs d'EV et leur absence dans nos EV de macrophages ne semble pas être une exclusivité de notre type cellulaire (109).

Donc, la caractérisation protéique de nos EV confirme la présence de vésicules extracellulaires, car nous avons identifié plusieurs protéines transmembranaires et cytoplasmiques. De plus, notre caractérisation démontre l'isolation de petites vésicules extracellulaires, car la protéine Grp94 est absente de notre isolation et il ne semble pas y avoir de contamination par l'albumine bovine provenant du milieu de culture. Cependant, une expérience de microscopie électronique par lumière transmise serait nécessaire pour confirmer la structure vésiculaire de nos EV. De plus, l'isolation d'EV par une deuxième technique d'isolation, comme l'ultracentrifugation, permettrait de confirmer nos résultats.

D'autre part, la majorité des marqueurs d'EV identifiés sont communs entre les EV MΦ Sen et les EV MΦ Ctrl. En outre, ces résultats suggèrent que les tétraspanines ne sont pas des marqueurs d'EV chez les Raw 264.7 et que les protéines Alix, Sdcbp et Lamp1, enrichis dans les EV MΦ Sen, sont possiblement de bons marqueurs de la sénescence des macrophages dans les EV.

Les protéines ribosomiques

L'analyse de spectrométrie de masse démontre que nos EV MΦ Sen sont majoritairement enrichis en protéines ribosomiques de la sous-unité 60S. Les protéines ribosomiques 60S Rpl3, Rpl4, Rpl6, Rpl18 ainsi que les protéines ribosomiques acides 60S Rplp0 et Rplp2 sont enrichis dans les EV MΦ Sen. Seulement la protéine ribosomique 40S Rps9 est enrichie dans les EV MΦ Sen. L'enrichissement de ces protéines pourrait être causé par les défauts de ribogenèse associés à la sénescence (SARD). En effet, lors de la sénescence, il y a une accumulation de protéines ribosomiques due aux défauts de ribogenèse. Cela contribue à l'arrêt du cycle cellulaire suite à l'activation de Rb par la protéine 60SRpl14 (110). L'accumulation des protéines ribosomiques causée par le SARD pourrait expliquer leur enrichissement dans les EV MΦ Sen.

Malgré tout, peu d'études se sont penchées sur la présence de protéines ribosomiques dans les EV et encore moins dans les EV associées à la sénescence. Cependant, une étude a démontré que des exosomes dérivés de cellules souches du tissu adipeux épiqueardique, ayant subis une ischémie, étaient enrichis en protéines ribosomiques dont Rpl18 (111). De plus, une autre étude a également remarqué un enrichissement de plusieurs protéines ribosomiques dans les EV dérivés de microglies, des macrophages spécialisés du système nerveux central, activés lors de l'inflammation causée par le lipopolysaccharide (LPS). Parmi ces protéines ribosomiques, il y avait Rpl3, Rpl4, Rpl6, Rpl18 et Rplp0 qui sont également exprimées dans nos EV MΦ Sen (112). Chose intéressante, la sénescence est également un état inflammatoire. Ainsi, il est possible que l'incorporation de protéines ribosomiques dans les EV soit une caractéristique spécifique des macrophages inflammatoires.

De plus, les protéines ribosomiques contenues dans les EV MΦ Sen pourraient participer aux effets pathologiques ou physiologiques paracrines des cellules sénescents. En effet, plusieurs protéines ribosomiques incorporées dans nos EV MΦ Sen ont des effets opposés et leur effet sur les cellules réceptrices pourrait dépendre du contexte cellulaire et/ou tissulaire. Par exemple, Rpl3 serait un médiateur de l'apoptose en régulant p21 au niveau transcriptionnel et post-traductionnel dans les cellules cancéreuses du poumon et du côlon déficientes en p53 (113). La protéine Rpl4 serait également impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant Mdm2 (114).

Au contraire, les protéines ribosomiques Rpl6 et Rpl18 pourraient être impliquées dans la prolifération tumorale (115, 116). Ainsi, il serait intéressant d'isoler les sous-populations d'EV MΦ Sen pour déterminer si l'enrichissement des différentes protéines ribosomiques est homogène à travers la population d'EV ou si seulement des populations distinctes contiennent les Rpl prosénescentes ou les Rpl protumorales. Par exemple, une isolation d'EV par gradient de densité permettrait d'augmenter notre spécificité pour certaines sous-populations d'EV à comparer à la précipitation par l'ExoQuick-T. Cependant, nous aurions un moins bon rendement.

Le cargo en acides nucléiques est régulé dans les EV dérivées de macrophages sénescents

Notre expérience de *small RNAseq* montre un enrichissement des miARN ainsi qu'une exclusion des ARNpi dans les EV MΦ Sen. De plus, notre analyse indique que l'incorporation des petits ARN est régulée dans les EV MΦ Sen.

Les ARNpi sont exclus des vésicules extracellulaires dérivées de macrophages sénescents.

Les ARN interagissant avec PIWI (ARNpi) sont de petits ARN non codants permettant d'inhiber l'expression des transposons par méthylation de l'ADN. Les ARNpi régulent également la transcription et la traduction des gènes ainsi que la stabilité des ARNm. Ils sont habituellement exprimés dans les cellules germinales et permettent le maintien de l'intégrité génomique. En effet, les transposons ont la capacité de se déplacer à travers le génome selon un mécanisme nommé « copier-coller ». Cela peut induire des dommages à l'ADN ou des mésappariements de bases (117). Ainsi, les ARNpi sont souvent diminués lors du vieillissement, ce qui contribue au développement de cellules sénescentes (118). De plus, ces petits ARN sont souvent exprimés dans les cellules cancéreuses, car ils promeuvent le maintien de la prolifération, de la résistance à l'apoptose et ils augmentent le caractère invasif des cellules cancéreuses (117). Les macrophages RAW 264.7 sont des cellules cancéreuses. Cependant, l'expérience de *small RNAseq* n'indique aucune régulation de l'expression des ARNpi entre les MΦ Sen ou les MΦ Ctrl. En contrepartie, l'incorporation d'ARNpi semble régulée dans les EV MΦ Sen. En effet, les ARNpi sont fortement exclus des EV MΦ Sen. Cette exclusion pourrait contribuer aux effets paracrines antitumoraux et prosénescentes des cellules sénescentes. De plus, cette exclusion indique un mécanisme puissant de régulation des petits ARN aux EV.

Les EV dérivées de macrophages sénescents sont majoritairement composés de miARN

Nous avons comparé l'expression des miARN entre les MΦ Sen et les MΦ Ctrl. Nous avons également comparé l'expression de ces miARN entre les EV MΦ Sen et les EV MΦ Ctrl. Nos résultats démontrent que l'expression de la majorité des miARN exprimés dans nos MΦ Ctrl est diminuée dans nos MΦ Sen. En effet, l'expression de 64 miARN est diminuée et l'expression de 31 miARN est augmentée dans les MΦ Sen par rapport aux MΦ Ctrl. Chose intéressante, la composition en miARN des EV MΦ Sen ne reflète pas la composition en miARN des cellules parentales. En effet, il y a une augmentation de l'expression de 95 miARN et une diminution de l'expression de 18 miARN dans les EV MΦ Sen par rapport aux MΦ Ctrl. Ainsi, la majorité des miARN surexprimés dans les EV MΦ Sen sont des miARN dont l'expression est diminuée dans les MΦ Sen. Donc, cela indique que la majorité des miARN surexprimés dans les EV MΦ Sen ne sont pas incorporés à cause de l'augmentation de leur abondance dans la cellule parentale, mais parce que leur incorporation est régulée.

D'autre part, l'analyse des lectures régulées de la composition en acide nucléique des macrophages démontre que les MΦ Ctrl contiennent plus de miARN que les MΦ Sen. En effet, les MΦ Ctrl sont composés de 24,5% de miARN à comparer à 15,2% chez les MΦ Sen. Encore une fois, l'abondance cellulaire des miARN n'est pas représentative de leur abondance vésiculaire. En effet, les EV MΦ Ctrl sont composés de seulement 16% de miARN à comparer à 49,9% dans les EV MΦ Sen. Ces résultats démontrent que les miARN sont incorporés spécifiquement dans les EV MΦ Sen. Ainsi, nos résultats indiquent qu'il y a une régulation de l'incorporation des miARN dans les EV MΦ Sen et qu'ils sont spécifiquement enrichis en miARN. D'ailleurs, plusieurs études démontrent que les ARN, et plus précisément les miARN, sont sélectivement incorporés dans les EV (119, 120).

De plus, nous avons confirmé l'enrichissement spécifique des miR-155, miR-21 et miR-132 dans nos EV MΦ Sen par qPCR. Il existe deux méthodes couramment utilisées pour normaliser les résultats de qPCR : L'utilisation d'un ARN endogène ou d'un ARN exogène dit « *spike-in* » (121, 122). La stabilité et l'expression des ARN peuvent être affectées par les différentes conditions de traitement ou par les états cellulaires. Ainsi, il est important de choisir le meilleur ARN de

normalisation en fonction de l'expérience réalisée. Donc, nous avons normalisé l'expression des miARN sur les ARNr 5S et ARNsn U6. En effet, nos résultats de qPCR démontrent aucune variation significative de ces deux ARN entre la condition contrôle et la condition traitée au 4-hydroxitamoxifène que ce soit dans les cellules ou dans les EV. Ainsi, notre analyse par qPCR confirme l'enrichissement spécifique des miR-155-5p, miR-21a-5p et miR-132-3p dans les EV MΦ Sen. D'ailleurs, le miR-155 et le miR-21 ont déjà été démontrés comme étant incorporés dans les EV lors de la sénescence (123).

D'autre part, nous avons également validé, par qPCR, que l'expression du miR-155-5p, du miR-21a-5p et du miR-132-3p n'est pas affectée par l'ajout de 4-hydroxitamoxifène (**Annexe 2**). Nos résultats préliminaires démontrent une légère augmentation des niveaux d'expressions de ces trois miARN lors du traitement au 4-OHT. Cependant, l'augmentation observée dans les cellules RAFER traitée au 4-OHT est deux à six fois plus élevée dépendamment du miARN et cette augmentation est encore plus importante dans les EV. Ainsi, ces résultats indiquent que le traitement au 4-OHT n'est pas suffisant pour expliquer la forte augmentation d'expression de ces trois miARN dans les macrophages et EV RAFER traités au 4-OHT. Cependant, cette expérience contrôle a été effectuée une fois et normalisée seulement sur l'ARNsn U6. Ainsi, il serait nécessaire de répéter l'expérience et de refaire la qPCR en normalisant sur l'ARNsn U6 et l'ARNr 5S.

Pour conclure, nos résultats démontre l'importance des miARN comme mécanisme majeur des EV pour réguler l'expression génique des cellules réceptrices. De plus, comprendre les mécanismes permettant la régulation de l'incorporation des miARN aux EV pourrait mener au développement de nouvelles thérapies contre les maladies liées à l'âge.

Les protéines impliquées dans la régulation des miARN aux vésicules extracellulaires

Nous avons identifié 31 protéines régulées dans les EV MΦ Sen. Une analyse *Go* de ces protéines a démontré la présence de plusieurs *RNA binding protein (RBP)*. Ainsi, nous suggérons que ces protéines sont responsables de l'incorporation sélective des miARN dans les EV MΦ Sen.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer l'incorporation d'ARN dans les EV. Parmi celles-ci, il y a les séquences ou les structures spécifiques, l'affinité avec la membrane lipidique et

l'association des miARN avec des RBP. Plusieurs RBP ont été identifiées comme régulateur de l'incorporation de miARN dans les EV telles que la protéine argonaute 2 (Ago2), l'*heterogenous nuclear ribonucleoproteins A2/B1* (Hnrnpa2b1), l'*heterogenous nuclear ribonucleoproteins C* (Hnhnpc), la *synaptotagmin binding cytoplasmic RNA interacting protein* (Syncrip), la *scaffold-attachment factor B1* (Safb), la protéine de voûte majeure (Mvp) et les protéines de biogenèse des exosomes Alix (Pdc61p) et annexine A2 (Anax2) (124-126).

Nos EV MΦ Sen expriment plusieurs de ces protéines, dont Syncrip, Safb, Anax2, Alix et Mvp. L'expression de Syncrip et Safb n'est pas significativement changée entre les EV MΦ Sen et les EV MΦ Ctrl. Ainsi, il est peu probable qu'elles soient responsables de l'enrichissement des miARN aux EV MΦ Sen. D'autre part, Anax2 est significativement augmentée dans les EV MΦ Sen, mais elle n'est pas considérée régulée par nos analyses. En outre, Alix et Mvp sont enrichis dans nos EV MΦ Sen et leur ARNm est également augmenté dans les MΦ Sen. Cela fait d'eux de potentiels candidats comme protéines responsables de l'incorporation spécifique des miARN aux EV MΦ Sen.

Alix, comme nous l'avons mentionné plus haut, est une protéine impliquée dans la biogenèse des exosomes. Cependant, une étude a démontré son implication dans l'incorporation de miARN aux EV. En effet, le *Knockdown* d'Alix, dans les cellules souches humaines du foie (HLSC), a diminué l'expression de miARN dans les EV. De plus, une co-immunoprécipitation a démontré qu'Alix interagissait avec Ago2 lors du transfert de miARN aux EV (127). Nos résultats de spectrométrie de masse n'ont pas détecté Ago2 dans les EV MΦ Sen. Il se peut qu'Ago2 soit trop peu exprimée dans les EV MΦ Sen pour être détectée par la spectrométrie de masse. Cependant, il a été rapporté qu'Ago2 n'est pas toujours incorporée avec les miARN dans les EV (125). Donc, cela n'exclut pas la possibilité qu'Ago2 puisse cibler les exosomes par sa liaison avec Alix dans la cellule. Ainsi, Alix pourrait augmenter l'enrichissement des miARN dans nos isolations d'EV MΦ Sen de deux manières différentes : 1) en augmentant le nombre d'EV sécrétés contenant des miARN et 2) en augmentant l'incorporation de miARN spécifiques dans les EV par sa liaison avec Ago2 dans la cellule. Il serait intéressant d'effectuer un *knock-down* d'Alix, suivi d'un *Small RNAseq* des EV MΦ Sen, pour confirmer l'implication d'Alix dans le ciblage des miARN aux EV MΦ Sen, ainsi que pour identifier les miARN régulés par cette protéine.

D'autre part, la protéine Anax2 est significativement augmentée dans les EV MΦ Sen sans être régulée. Anax2 est reconnu pour réguler l'incorporation dans les EV de plusieurs miARN également régulés par Alix tels que miR-16, miR-24 et miR-125b. Chose intéressante, le *knock-down* de Anax2 a diminué l'incorporation de miR-21 dans les EV, un des miARN les plus abondants dans nos EV MΦ Sen (126, 127). Anax2 et Alix sont déjà reconnus pour former un complexe avec synthénine-1 lors de la biogenèse des EV (99). Ainsi, il est possible qu'Alix interagisse avec Ago2 et Anax2 lors de l'incorporation de miARN aux EV MΦ Sen.

Il y a également un enrichissement de Mvp dans nos EV MΦ Sen. Une étude a démontré que Mvp se lie au miR-193a et que son *knock-out* diminue l'incorporation de ce miARN dans les exosomes (128). De plus, Mvp semble lier des petits ARN spécifiques. En effet, seulement le miR-193a et les ARN spécifiques à la structure du complexe de voûte majeur, les *non-coding vault RNA* (vtRNA), ont été identifiés comme ARN se liant à Mvp (129). Ainsi, il est possible que Mvp soit responsable de l'incorporation spécifique de seulement quelques miARN et, qu'au contraire, la protéine Alix, avec ces partenaires de liaison, soit responsable de l'incorporation spécifique d'un plus large éventail de miARN.

Donc, il est possible que Mvp et Alix agissent en synergie lors de l'enrichissement et de l'incorporation spécifique des miARN dans les EV MΦ Sen. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions effectuer un *knock-out* individuel et simultané de ces deux protéines, suivi d'une *small RNAseq* des EV. Cela nous permettrait d'identifier les miARN régulés spécifiquement par ces protéines lors de l'incorporation de miARN aux EV MΦ Sen.

Ainsi, la découverte des mécanismes impliqués dans la régulation du cargo des EV MΦ Sen pourrait permettre le développement de nouvelles thérapies contre les maladies liées à l'âge en contrôlant le cargo des EV. De plus, avec l'âge, il y a une accumulation de cellules sénescents et donc, une augmentation du nombre d'EV sécrétées. Ces EV pourraient servir de biomarqueur de la charge en cellules sénescents dans l'organisme. Ainsi, cela permettrait de prévenir les effets pathologiques des cellules sénescents. Notre étude pourra servir de base pour l'identification de marqueurs communs d'EV dans la sénescence.

Les sécrétions des macrophages sénescents favorisent l'échappement de la sénescence chez les MEF

Nous avons émis l'hypothèse que les sécrétions inflammatoires des MΦ Sen participeraient à la sénescence paracrine. Cependant, notre expérience de transfert de milieux conditionnés sur des cellules de fibroblastes embryonnaires murins sénescents (MEF-sen) à, au contraire, favoriser l'échappement de la sénescence dans ces cellules. Les MEF sont un type cellulaire sensible au stress de culture. En effet, les conditions *in vitro* induisent un stress oxydatif causant des dommages à l'ADN dans les MEF. De ce fait, après seulement quelques passages des MEF en culture, il y a une induction de la sénescence dépendante de p53. De plus, ces cellules, après un certain temps en culture, ont tendance à sortir de sénescence suite à la désactivation de p53 ce qui les rend "immortelles" (130).

Ainsi, nos résultats suggèrent que les sécrétions des MΦ Sen réactivent le cycle cellulaire, ce qui permet l'échappement de la sénescence. De plus, on remarque que les sécrétions des MΦ Ctrl semblent empêcher l'échappement spontané des MEF de la sénescence en renforçant l'état sénescents. Des analyses de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire, ainsi que des différents marqueurs du SASP dans les MEF seraient nécessaires pour confirmer ces résultats. Malgré tout, notre résultat suggère que les sécrétions des MΦ Sen sont pro-prolifératives, ce qui indique un potentiel protumoral. Ainsi, il serait intéressant de voir si les sécrétions de MΦ Sen peuvent également favoriser l'échappement de la sénescence chez les cellules cancéreuses sénescents induites par les chimiothérapies. De plus, nous ne pouvons pas confirmer l'effet protumoral de nos sécrétions de MΦ Sen, car nos résultats ne démontrent pas que les MEF échappant à la sénescence acquièrent un caractère malin ou invasif. Ainsi, une expérience de *soft agar colony formation assay* permettrait de confirmer l'acquisition d'un caractère malin chez les MEF échappant à la sénescence.

Lors de l'échappement de la sénescence, l'activation des régulateurs du cycle cellulaire, les cyclines et les CDK, ainsi que l'activation des voies de suppression tumorales peuvent être perturbées (131). Les sécrétions de nos MΦ Sen sont autant composées de protéines solubles que d'EV enrichis en miR-155 et miR-21.

Ainsi, les sécrétions de nos MΦ Sen pourraient augmenter l'échappement en modulant, de manière épigénétique, l'expression génique des protéines impliquées dans l'activation des voies de suppression tumorales.

miR-21a

Le miR-21 est considéré comme un oncomiR. C'est-à-dire qu'il est reconnu pour promouvoir le cancer et que son inhibition diminue le caractère invasif des cellules cancéreuses. D'ailleurs, plusieurs études démontrent un enrichissement du miR-21 dans les EV dérivées de cellules cancéreuses (132, 133). Le miR-21 est également enrichi dans les EV dérivées de cellules sénescents endothéliales induites par H₂O₂ (134). Ainsi, le miR-21 n'est pas seulement augmenté dans les EV lors du cancer, mais également lors du vieillissement. Le miR-21 exosomal est reconnu pour promouvoir la prolifération, l'invasion et la résistance aux thérapies chez les cellules cancéreuses telles que les cellules d'adénocarcinome du côlon et les cellules du carcinome hépatocellulaire. En effet, le miR-21 vise plusieurs gènes suppresseurs de tumeur tels que Rhob, Pcd4 et Pten (132, 135, 136).

Pten est un inhibiteur de la voie pro-proliférative Pi3k/Akt/mTor. Ainsi, l'inhibition de Pten, par miR-21, promeut l'activation de cette voie de signalisation, et donc, la prolifération (131). De plus, le *knock-out* de Pcd4 chez les MEF augmente également la prolifération (137). Ainsi, l'internalisation du miR-21 exosomal pourrait promouvoir l'activation de voies de signalisation induisant la prolifération dans les MEF sénescents. Ainsi, cela induirait l'échappement de la sénescence dans ces cellules.

Le miR-155

Le miR-155 est également considéré comme un oncomiR et il est reconnu pour promouvoir la prolifération et la chimiorésistance des cellules cancéreuses (138). Chose intéressante, le miR-155 exosomal, tout comme le miR-21 exosomal, cible le suppresseur de tumeur Pten. Ainsi, ces deux miARN pourraient agir en synergie pour promouvoir l'échappement de la sénescence chez les MEF en activant la voie pro-proliférative Pi3k/Akt/mTor par l'inhibition de Pten. D'ailleurs, le miR-155 exosomal contribue à la prolifération des cellules de carcinome hépatocytaire en activant cette voie de signalisation (139). En plus d'être enrichi dans les EV dérivées de cellules

cancéreuses, miR-155 est également augmenté dans les EV de fibroblastes synoviaux sénescents (140).

En outre, le miR-155 est également impliqué dans la modulation de protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, le miR-155 cible Tp53inp1 qui régule l'activité transcriptionnelle de p53 (141). Ainsi, l'inhibition de Tp53inp1 diminue p53 ce qui inhibe l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, le miR-155 diminue l'expression de Smad5 qui diminue l'activation, médié par Tgf- β 1, de Rb. Ainsi, il y a une diminution du complexe Rb-E2F qui entraîne une diminution de la transcription de p21 (142).

D'autre part, en plus de la perturbation des voies de suppression tumorale par les miARN exosomaux, les M Φ Sen peuvent également promouvoir la prolifération par l'action des protéines solubles du SASP. En effet, nos macrophages sénescents produisent des cytokines de la catégorie des facteurs de croissance, tels que Fgf-1/2, et des métalloprotéases, telles que Mmp-10.

Les protéines solubles du SASP

Les facteurs de croissance des fibroblastes (Fgf) sont d'importants mitogènes. En effet, ils promeuvent la prolifération et la migration de plusieurs types cellulaires (143). D'ailleurs, les fibroblastes stromaux promeuvent la prolifération des cellules tumorales en sécrétant Fgf2 (144). De plus, une étude a déjà démontré que l'expression de Fgf2 entraîne l'échappement de la sénescence dans les cellules souches mésenchymateuses humaines sénescents. En effet, l'expression de Fgf2 a permis l'échappement de la sénescence en diminuant l'expression de TGF- β 2. De plus, l'expression de Fgf2 était accompagnée d'une diminution de l'expression de p53, p21 et p16 (145). D'autre part, Mmp-10 peut moduler la migration et l'invasion des cellules tumorales en stimulant l'expression de Pai-1, Cxcr2, Hif-1a et Mmp-2 (146).

Bref, les sécrétions de nos M Φ Sen sont composées autant de protéines solubles que de miARN exosomaux ayant la capacité d'induire la prolifération dans les cellules réceptrices. Ainsi, il est probable que ces composantes du SASP agissent en synergie lors de l'échappement de la sénescence dans les MEF.

Pour le moment, nos résultats ne nous permettent de comprendre les mécanismes impliqués dans l'échappement de la sénescence par les MEF. Nous avons soulevé quelques hypothèses qui devront être confirmées. De plus, nous n'avons pas évalué l'implication individuelle des molécules solubles du SASP et des miARN exosomaux lors du phénotype d'échappement. Ainsi, pour confirmer ces hypothèses, nous pourrions évaluer par western blot, ou RT-qPCR, la régulation des différentes cibles de nos composantes du SASP dans les MEF, suite à l'expérience de transfert de milieux conditionnés. D'autre part, nous pourrions évaluer l'implication des miR-21 et miR-155 dans le phénotype d'échappement en surexprimant ces miARN dans les MEF. Nous pourrions également essayer de reproduire l'échappement de la sénescence par les MEF en inhibant par ARNsh ou ARNsi, dans les MEF, les différentes cibles de nos composantes du SASP.

Les macrophages sénescents sont partiellement éliminés par le navitoclax

Pour conclure nos expériences, nous avons traité nos MΦ Sen avec l'inhibiteur de Bcl-2 et Bclx1 nommé navitoclax. Le navitoclax est un sénolytique permettant d'induire l'apoptose dans les cellules sénescents (147). Le traitement au navitoclax a diminué le nombre de MΦ Sen de 40% par rapport au traitement contrôle des MΦ Sen. La sensibilité de nos cellules provient probablement de l'expression de la protéine Bclx1. En effet, nos données de RNAseq démontrent que l'ARNm de Bclx1, aussi nommé Bcl2l1, est augmenté dans nos MΦ Sen. Malgré tout, notre modèle semble peu sensible au navitoclax.

Cette observation est probablement liée au fait qu'il y a également une augmentation de l'ARNm de plusieurs isoformes de Bcl2a1 dans nos MΦ Sen. Un article a décrit les inhibiteurs actuellement identifiés pour Bcl2a1. Parmi ces inhibiteurs, il y avait le N-aryl maléimides, le sulfonylpyrimidines et l'indoles (148). Ainsi, nous pourrions combiner le traitement au navitoclax avec un de ces inhibiteurs spécifiques de Bcl2a1 pour augmenter l'élimination de nos cellules sénescents. L'identification de sénolytiques efficaces contre les MΦ Sen permettrait de diminuer leurs effets sur les maladies liées à l'âge.

La totalité de nos expériences a été réalisée en induisant la sénescence dans les macrophages en activant l'oncogène Raf-1. Dans le futur, nous devrions répéter nos expériences avec un deuxième type de sénescence pour confirmer que nos résultats sont représentatifs de la sénescence

générale des macrophages et non qu'ils soient spécifiques à la sénescence activée par Raf-1. Dans le même principe, une deuxième méthode d'isolation d'EV devrait être effectuée pour confirmer la caractérisation des EV MΦ Sen.

Chapitre 4 – Conclusion et perspective

En conclusion, nos travaux ont permis de caractériser la sénescence dans les macrophages sénescents. La caractérisation des protéines solubles du SASP et des EV a permis d'identifier la surexpression de protéines et de miARN pro-prolifératifs et pro-inflammatoires. En outre, ces résultats suggèrent que les sécrétions des macrophages sénescents sont impliquées dans le développement de cancer et de maladies liées à l'âge, non en promouvant une sénescence paracrine comme nous avons émis l'hypothèse, mais en permettant l'échappement de la sénescence par l'action de signaux prolifératifs.

Dans le futur, il serait important de caractériser l'échappement de la sénescence par les MEF. Pour ce faire, nous pourrions évaluer l'expression des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, nous pourrions déterminer si les MEF échappant à la sénescence développent un caractère malin en effectuant une expérience de *soft agar colony formation assay*. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'impact individuel des miARN et des protéines solubles du SASP dans les cellules réceptrices. Pour ce faire, nous pourrions surexprimer les miARN dans les cellules réceptrices et voir si le phénotype est reproduit. En outre, nous pourrions également inhiber l'expression des différentes cibles proposées des protéines solubles du SASP et des miARN exosomaux. Dernièrement, l'implication d'Alix et de Mvp dans la sélection des miARN aux EV pourrait être étudiée. À cet effet, nous pourrions diminuer l'expression de ces deux protéines à l'aide d'ARNsh et, par la suite, évaluer les niveaux de miARN dans les EV par *small RNAseq*. Cela nous permettrait d'identifier les miARN régulés par les protéines Alix et Mvp.

Références bibliographiques

1. Canada S. L'espérance de vie des Canadiens de 1920-1922 à 2009-2011. In: Santé Sdl, editor. Online: Statistique Canada; 2018.
2. Kyriazis M. Ageing Throughout History: The Evolution of Human Lifespan. *Journal of Molecular Evolution*. 2020;88(1):57-65.
3. Plebon-Huff; Cynthia Robitaille; Barbara Sérandour; Jennette Toews; Bruce Tudin; Murray Weeks et Dianne Zakaria. SBADSDCDHSGALLMSODS-BPCPS. Vieillesse et maladies chroniques : Profil des aînés canadiens. In: Canada Spd, editor. Online: Gouvernement du Canada; 2020.
4. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
5. Schmeer C, Kretz A, Wengerodt D, Stojiljkovic M, Witte OW. Dissecting Aging and Senescence—Current Concepts and Open Lessons. 2019;8(11):1446.
6. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2018;217(1):65-77.
7. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1961;25(3):585-621.
8. Larousse. Online2023.
9. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458-60.
10. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. 2021;9.
11. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. 2013;32(33):3789-97.
12. Campisi J. The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer*. 1997;33(5):703-9.
13. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010;24(22):2463-79.
14. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell*. 2010;40(2):179-204.
15. Köberle B, Schoch S. Platinum Complexes in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Cancers (Basel)*. 2021;13.
16. Liu X-l, Ding J, Meng L-h. Oncogene-induced senescence: a double edged sword in cancer. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2018;39(10):1553-8.
17. Deschênes-Simard X, Gaumont-Leclerc M-F, Bourdeau V, Lessard F, Moiseeva O, Forest V, et al. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes & development*. 2013;27(8):900-15.
18. Zhu H, Blake S, Kusuma FK, Pearson RB, Kang J, Chan KT. Oncogene-induced senescence: From biology to therapy. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2020;187:111229.
19. Benson EK, Mungamuri SK, Attie O, Kracikova M, Sachidanandam R, Manfredi JJ, et al. p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes. *Oncogene*. 2014;33(30):3959-69.

20. Mijit M, Caracciolo V, Melillo A, Amicarelli F, Giordano A. Role of p53 in the Regulation of Cellular Senescence. *Biomolecules*. 2020;10(3):420.
21. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J*. 2003;22(16):4212-22.
22. Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, et al. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *Journal of Cell Biology*. 2009;186(3):393-407.
23. Naka K, Tachibana A, Ikeda K, Motoyama N. Stress-induced Premature Senescence in hTERT-expressing Ataxia Telangiectasia Fibroblasts*. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(3):2030-7.
24. Meng S, Luo M, Sun H, Yu X, Shen M, Zhang Q, et al. Identification and characterization of Bmi-1-responding element within the human p16 promoter. *J Biol Chem*. 2010;285(43):33219-29.
25. Rouget A. *Revue Médicale Suisse : Théorie évolutionniste de la sénescence*. 2009;5(210):1481-5.
26. Storer M, Mas A, Robert-Moreno A, Pecoraro M, Ortells MC, Di Giacomo V, et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*. 2013;155(5):1119-30.
27. 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.
28. Terzi MY, Izmirli M, Gogebakan B. The cell fate: senescence or quiescence. *Mol Biol Rep*. 2016;43(11):1213-20.
29. Freund A, Laberge R-M, Demaria M, Campisi J. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell*. 2012;23(11):2066-75.
30. Aird KM, Zhang R. Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol Biol*. 2013;965:185-96.
31. 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.
32. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*. 2000;113(20):3613-22.
33. Rao SG, Jackson JG. SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes! *Trends Cancer*. 2016;2(11):676-87.
34. Cuollo L, Antonangeli F, Santoni A, Soriani A. The Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) in the Challenging Future of Cancer Therapy and Age-Related Diseases. 2020;9(12):485.
35. Huang W, Hickson LJ, Eirin A, Kirkland JL, Lerman LO. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nature Reviews Nephrology*. 2022;18(10):611-27.
36. Yang J, Liu M, Hong D, Zeng M, Zhang X. The Paradoxical Role of Cellular Senescence in Cancer. 2021;9(2200).
37. Brondello JM, Prieur A, Philipot D, Lemaitre JM, Lenaers G, Piette J, et al. [Cellular senescence and the myth of Janus]. *Med Sci (Paris)*. 2012;28(3):288-96.
38. Coppé 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.

39. Iltis C. Rôle de l'immunosurveillance des cellules sènescentes dans le cancer et le vieillissement. HAL open science: Université Côte d'Azur; 2020.
40. Lee KA, Flores RR, Jang IH, Saathoff A, Robbins PD. Immune Senescence, Immunosenescence and Aging. *Front Aging*. 2022;3:900028.
41. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685-705.
42. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):12072-7.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ, et al. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature*. 2001;413(6851):86-91.
47. Zhang L, Pitcher LE, Prahalad V, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. 2023;290(5):1362-83.
48. Robinson D, Ding Y, Jiang L. Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. *Protoplasma*. 2016;253.
49. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.
50. 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.
51. Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(4):452-7.
52. Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*. 2014;5:442.
53. Teng F, Fussenegger M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. 2021;8(1):2003505.
54. Horbay R, Hamraghani A, Ermini L, Holcik S, Beug ST, Yeganeh B. Role of Ceramides and Lysosomes in Extracellular Vesicle Biogenesis, Cargo Sorting and Release. 2022;23(23):15317.
55. Bissig C, Gruenberg J. Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(10):a016816.
56. Aheget H, Tristán-Manzano M, Mazini L, Cortijo-Gutierrez M, Galindo-Moreno P, Herrera C, et al. Exosome: A New Player in Translational Nanomedicine. 2020;9(8):2380.
57. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(4):213-28.
58. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*. 2013;113(1):1-11.

59. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*. 2017;8(4):220-32.
60. Beloribi S, Ristorcelli E, Breuzard G, Silvy F, Bertrand-Michel J, Beraud E, et al. Exosomal lipids impact notch signaling and induce death of human pancreatic tumoral SOJ-6 cells. *PLoS One*. 2012;7(10):e47480.
61. Dixon AC, Dawson TR, Di Vizio D, Weaver AM. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2023;24(7):454-76.
62. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013;4:2980.
63. Batagov AO, Kurochkin IV. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct*. 2013;8:12.
64. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. 2018;9.
65. Vasudevan S, Steitz JA. AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*. 2007;128(6):1105-18.
66. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009;11(3):228-34.
67. Liu Y-J, Wang C. A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Communication and Signaling*. 2023;21(1):77.
68. Laulagnier K, Javalet C, Hemming FJ, Chivet M, Lachenal G, Blot B, et al. Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2018;75(4):757-73.
69. Kogure A, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Cancer Metastasis: Potential as Therapeutic Targets and Materials. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(12):4463.
70. Takasugi M. Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging. *Aging Cell*. 2018;17(2).
71. Tanaka Y, Takahashi A. Senescence-associated extracellular vesicle release plays a role in senescence-associated secretory phenotype (SASP) in age-associated diseases. *J Biochem*. 2021;169(2):147-53.
72. 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.
73. Wallis R, Mizen H, Bishop CL. The bright and dark side of extracellular vesicles in the senescence-associated secretory phenotype. *Mechanisms of ageing and development*. 2020;189:111263-.
74. 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.
75. Melidoni A. Small extracellular vesicles combat senescence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(9):498-9.
76. Guo Q, Zhang H, Zhang B, Zhang E, Wu Y. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) Enhances miR-155-Mediated Endothelial Senescence by Targeting Sirtuin1 (SIRT1). *Med Sci Monit*. 2019;25:8820-35.

77. 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.
78. Zhang C, Yang M, Ericsson AC. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. 2021;12.
79. Tu D, Dou J, Wang M, Zhuang H, Zhang X. M2 macrophages contribute to cell proliferation and migration of breast cancer. *Cell Biol Int.* 2021;45(4):831-8.
80. Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, et al. Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging (Albany NY).* 2016;8(7):1294-315.
81. Matacchione G, Perugini J, Di Mercurio E, Sabbatinelli J, Prattichizzo F, Senzacqua M, et al. Senescent macrophages in the human adipose tissue as a source of inflammaging. *Geroscience.* 2022;44(4):1941-60.
82. Zhou L, Ruscetti M. Senescent macrophages: A new "old" player in lung cancer development. *Cancer Cell.* 2023;41(7):1201-3.
83. Feng Z, Zhang X, Li L, Wang C, Feng M, Zhao K, et al. Tumor-associated macrophage-derived exosomal microRNA-155-5p stimulates intracranial aneurysm formation and macrophage infiltration. *Clin Sci (Lond).* 2019;133(22):2265-82.
84. Wang Y, Zhao M, Liu S, Guo J, Lu Y, Cheng J, et al. Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death & Disease.* 2020;11(10):924.
85. Théry 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. *Journal of Extracellular Vesicles.* 2018;7(1):1535750.
86. VAN DER POL E, HOEKSTRA AG, STURK A, OTTO C, VAN LEEUWEN TG, NIEUWLAND R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. 2010;8(12):2596-607.
87. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* 1998;12(19):2997-3007.
88. 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.
89. Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 2010;16(5):238-46.
90. Huang W, Hickson LJ, Eirin A, Kirkland JL, Lerman LO. Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nat Rev Nephrol.* 2022;18(10):611-27.
91. Guccini I, Revandkar A, D'Ambrosio M, Colucci M, Pasquini E, Mosole S, et al. Senescence Reprogramming by TIMP1 Deficiency Promotes Prostate Cancer Metastasis. *Cancer Cell.* 2021;39(1):68-82.e9.
92. Alimirah F, Pulido T, Valdovinos A, Alptekin S, Chang E, Jones E, et al. Cellular Senescence Promotes Skin Carcinogenesis through p38MAPK and p44/42MAPK Signaling. *Cancer Res.* 2020;80(17):3606-19.
93. Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A. Macrophage Polarity and Disease Control. 2022;23(1):144.

94. Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*. 2008;133(6):1006-18.
95. Alfonzo MC, Al Saedi A, Fulzele S, Hamrick MW. Extracellular Vesicles as Communicators of Senescence in Musculoskeletal Aging. 2022;6(11):e10686.
96. Wallis R, Mizen H, Bishop CL. The bright and dark side of extracellular vesicles in the senescence-associated secretory phenotype. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2020;189:111263.
97. Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM. Role of Ceramide in Cellular Senescence (*). *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(51):30701-8.
98. Shamseddine AA, Clarke CJ, Carroll B, Airola MV, Mohammed S, Rella A, et al. P53-dependent upregulation of neutral sphingomyelinase-2: role in doxorubicin-induced growth arrest. *Cell Death Dis*. 2015;6(10):e1947.
99. 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.
100. Catalano M, O'Driscoll L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. 2020;9(1):1703244.
101. SUNDLER R. Lysosomal and cytosolic pH as regulators of exocytosis in mouse macrophages. 1997;161(4):553-6.
102. Guerrero-Navarro L, Jansen-Dürr P, Cavinato M. Age-Related Lysosomal Dysfunctions. *Cells*. 2022;11(12).
103. Machado E, White-Gilbertson S, van de Vlekkert D, Janke L, Moshiah S, Campos Y, et al. Regulated lysosomal exocytosis mediates cancer progression. 2015;1(11):e1500603.
104. Kim MS, Muallem S, Kim SH, Kwon KB, Kim MS. Exosomal release through TRPML1-mediated lysosomal exocytosis is required for adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019;510(3):409-15.
105. Nagano M, Toshima JY, Siekhaus DE, Toshima J. Rab5-mediated endosome formation is regulated at the trans-Golgi network. *Commun Biol*. 2019;2:419.
106. Hassanpour M, Rezabakhsh A, Rezaie J, Nouri M, Rahbarghazi R. Exosomal cargos modulate autophagy in recipient cells via different signaling pathways. *Cell & Bioscience*. 2020;10(1):92.
107. Kumar R, Donakonda S, Müller SA, Bötzel K, Höglinger GU, Koeglsperger T. FGF2 Affects Parkinson's Disease-Associated Molecular Networks Through Exosomal Rab8b/Rab31. 2020;11.
108. Bai S, Hou W, Yao Y, Meng J, Wei Y, Hu F, et al. Exocyst controls exosome biogenesis via Rab11a. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022;27:535-46.
109. 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.
110. 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.
111. Thankam FG, Huynh J, Fang W, Chen Y, Agrawal DK. Exosomal-ribosomal proteins-driven heterogeneity of epicardial adipose tissue derived stem cells under ischemia for cardiac regeneration. 2022;16(4):396-408.

112. Yang Y, Boza-Serrano A, Dunning CJR, Clausen BH, Lambertsen KL, Deierborg T. Inflammation leads to distinct populations of extracellular vesicles from microglia. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):168.
113. Russo A, Pagliara V, Albano F, Esposito D, Sagar V, Loreni F, et al. Regulatory role of rpL3 in cell response to nucleolar stress induced by Act D in tumor cells lacking functional p53. *Cell Cycle*. 2016;15(1):41-51.
114. He X, Li Y, Dai MS, Sun XX. Ribosomal protein L4 is a novel regulator of the MDM2-p53 loop. *Oncotarget*. 2016;7(13):16217-26.
115. Lai MD, Xu J. Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Curr Genomics*. 2007;8(1):43-9.
116. Zhang J, Ma Q, Han Y, Wen H, Zhang Z, Hao Y, et al. Downregulated RPL6 inhibits lung cancer cell proliferation and migration and promotes cell apoptosis by regulating the AKT signaling pathway. *J Thorac Dis*. 2022;14(2):507-14.
117. Chen S, Ben S, Xin J, Li S, Zheng R, Wang H, et al. The biogenesis and biological function of PIWI-interacting RNA in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 2021;14(1):93.
118. Lin KY, Wang WD, Lin CH, Rastegari E, Su YH, Chang YT, et al. Piwi reduction in the aged niche eliminates germline stem cells via Toll-GSK3 signaling. *Nat Commun*. 2020;11(1):3147.
119. Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*. 2013;14(1):319.
120. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González M, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2:282.
121. Nepotchatykh E, Elremaly W, Caraus I, Godbout C, Leveau C, Chalder L, et al. Profile of circulating microRNAs in myalgic encephalomyelitis and their relation to symptom severity, and disease pathophysiology. *Sci Rep*. 2020;10(1):19620.
122. Forero DA, González-Giraldo Y, Castro-Vega LJ, Barreto GE. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. 2019;67(4):192-9.
123. Popov A, Mandys V. Senescence-Associated miRNAs and Their Role in Pancreatic Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2022;28:1610156.
124. O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, Laurent LC, Breakefield XO. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(10):585-606.
125. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.
126. Hagiwara K, Katsuda T, Gailhouste L, Kosaka N, Ochiya T. Commitment of Annexin A2 in recruitment of microRNAs into extracellular vesicles. *FEBS Letters*. 2015;589(24, Part B):4071-8.
127. Iavello A, Frech VS, Gai C, Deregibus MC, Quesenberry PJ, Camussi G. Role of Alix in miRNA packaging during extracellular vesicle biogenesis. *Int J Mol Med*. 2016;37(4):958-66.
128. 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.
129. Bornstein S, Shapiro I, Mazumdar A, Zitzmann K, Nölting S, Luca E, et al. The Vault Complex Is Significantly Involved in Therapeutic Responsiveness of Endocrine Tumors and Linked to Autophagy under Chemotherapeutic Conditions. *Cancers (Basel)*. 2023;15(6).
130. Odell A, Askham J, Whibley C, Hollstein M. How to become immortal: let MEFs count the ways. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(3):160-5.

131. Roupakia E, Markopoulos GS, Kolettas E. Genes and pathways involved in senescence bypass identified by functional genetic screens. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2021;194:111432.
132. Sun LH, Tian D, Yang ZC, Li JL. Exosomal miR-21 promotes proliferation, invasion and therapy resistance of colon adenocarcinoma cells through its target PDCD4. *Sci Rep*. 2020;10(1):8271.
133. Shen L, Wan Z, Ma Y, Wu L, Liu F, Zang H, et al. The clinical utility of microRNA-21 as novel biomarker for diagnosing human cancers. *Tumor Biology*. 2015;36(3):1993-2005.
134. Shaban SA, Rezaie J, Nejati V. Exosomes Derived from Senescent Endothelial Cells Contain Distinct Pro-angiogenic miRNAs and Proteins. *Cardiovascular Toxicology*. 2022;22(6):592-601.
135. Cao L-q, Yang X-w, Chen Y-b, Zhang D-w, Jiang X-F, Xue P. Exosomal miR-21 regulates the TETs/PTENp1/PTEN pathway to promote hepatocellular carcinoma growth. *Molecular Cancer*. 2019;18(1):148.
136. Feliciano A, Sánchez-Sendra B, Kondoh H, Lleonart ME. MicroRNAs Regulate Key Effector Pathways of Senescence. *J Aging Res*. 2011;2011:205378.
137. Wang Q, Yang HS. The role of Pcd4 in tumour suppression and protein translation. *Biol Cell*. 2018.
138. Mattiske S, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(8):1236-43.
139. Sun JF, Zhang D, Gao CJ, Zhang YW, Dai QS. Exosome-Mediated MiR-155 Transfer Contributes to Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation by Targeting PTEN. *Med Sci Monit Basic Res*. 2019;25:218-28.
140. Wijesinghe SN, Anderson J, Brown TJ, Nanus DE, Housmans B, Green JA, et al. The role of extracellular vesicle miRNAs and tRNAs in synovial fibroblast senescence. *Front Mol Biosci*. 2022;9:971621.
141. Zhang CM, Zhao J, Deng HY. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci*. 2013;20(1):79.
142. Jiang D, Aguiar RCT. MicroRNA-155 controls RB phosphorylation in normal and malignant B lymphocytes via the noncanonical TGF- β 1/SMAD5 signaling module. *Blood*. 2014;123(1):86-93.
143. Kottakis F, Polytarchou C, Foltopoulou P, Sanidas I, Kampranis SC, Tsihliis PN. FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. *Mol Cell*. 2011;43(2):285-98.
144. Akl MR, Nagpal P, Ayoub NM, Tai B, Prabhu SA, Capac CM, et al. Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. *Oncotarget*. 2016;7(28):44735-62.
145. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Seyama Y, Tsuchiya T. FGF-2 suppresses cellular senescence of human mesenchymal stem cells by down-regulation of TGF- β 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;359(1):108-14.
146. Zhang G, Miyake M, Lawton A, Goodison S, Rosser CJ. Matrix metalloproteinase-10 promotes tumor progression through regulation of angiogenic and apoptotic pathways in cervical tumors. *BMC Cancer*. 2014;14(1):310.
147. Opferman JT, Kothari A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):37-45.

148. Li X, Dou J, You Q, Jiang Z. Inhibitors of BCL2A1/Bfl-1 protein: Potential stock in cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021;220:113539.

Annexe 1

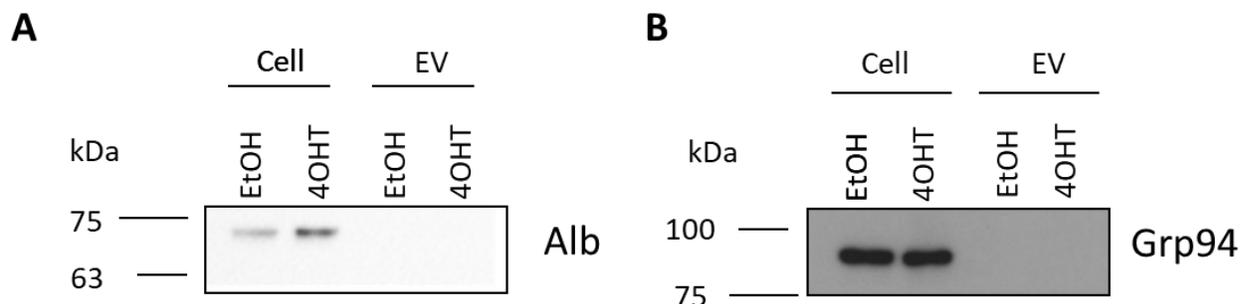


Figure 13. – Caractérisation des vésicules extracellulaires dérivées de macrophages

Les lysats protéiques ont été obtenus à partir de RAW 264.7 traités au 4-OHT ou à l'EtOH et à partir d'EV dérivées de RAW 264.7 traités au 4OHT ou à l'EtOH. Les lysats protéiques ont été chargés sur un gel SDS-PAGE 15% polyacrylamide. Ensuite, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et les protéines ont été révélées avec l'*ECL detection reagent*.

A) Démontre l'absence de contamination par l'albumine bovine (Alb), contenu dans le milieu de culture, dans les lysats protéiques d'EV et **B)** démontre l'absence d'organelles (Grp94) dans les lysats protéiques d'EV. L'expérience a été effectuée 3 fois (la figure correspond à un des triplicatas biologiques). EV : Vésicules extracellulaires ; Cell : Macrophages ; 4OHT : sénescents ; EtOH : contrôle

Annexe 2

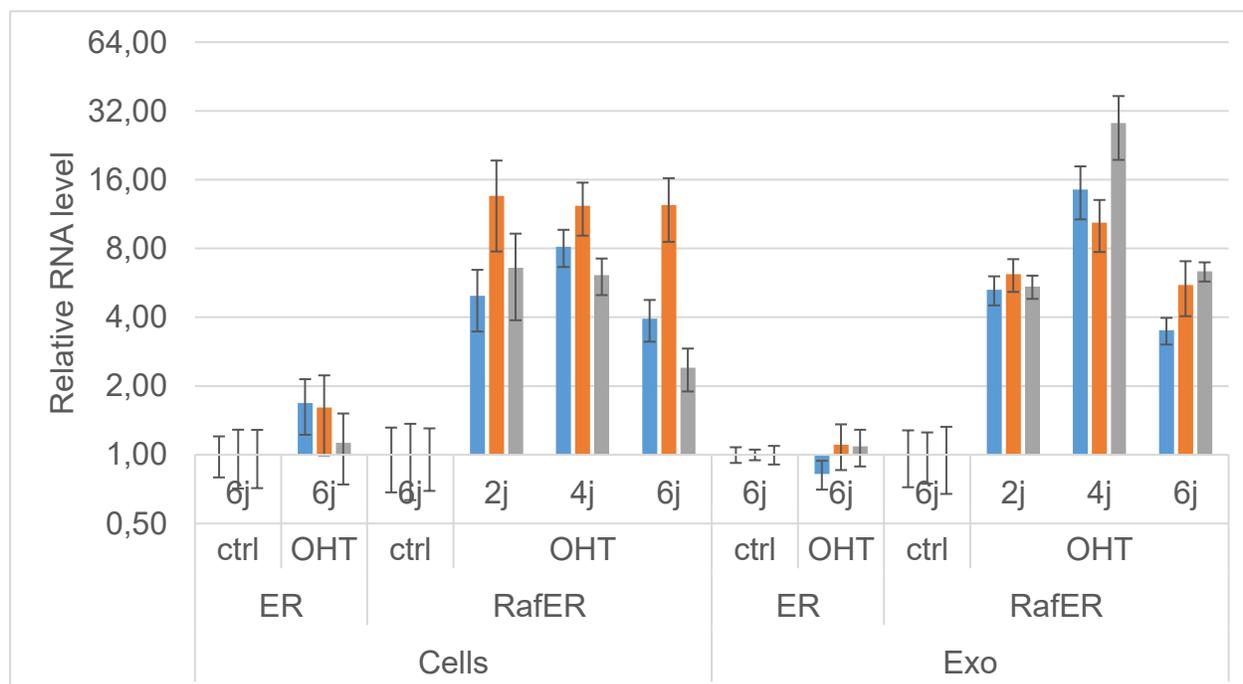


Figure 14. – Validation de l'effet du traitement au 4-hydroxytamoxifène sur l'expression des miARN dans les macrophages et dans les EV

RT-qPCR démontrant l'expression des miR-155-5p (bleu), miR-21a-5p (orange) et miR-132-3p (gris) dans les RAW 264.7 (Cells) exprimant Δ Raf-1:ER ou ER traités à chaque 48 heures avec véhicule (Éthanol) ou 4-hydroxytamoxifène (OHT, 100 nM) et dans les vésicules extracellulaire (Exo) correspondant. Les cellules et les vésicules extracellulaires ont été récoltées à chaque deux jours. L'expression des miARN est normalisée sur les ARNs U6 et ARNr 5S. L'expérience a été réalisée une fois.