

Université de Montréal

**Rôle de MTORC2 dans la sénescence et la différenciation
myofibroblastique induites par l'autophagie**

par
Monique Bernard

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.
en Biologie Moléculaire

mai, 2015

© Monique Bernard, 2015

Résumé

Il a été suggéré que l'autophagie pouvait participer au processus fibrotique en favorisant la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste. La sénescence cellulaire a aussi été montrée comme impliquée dans la réparation tissulaire et la fibrose. Des liens ont été établis entre autophagie et sénescence. Cette étude a pour but d'investiguer les liens possibles entre autophagie, sénescence et différenciation myofibroblastique afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulant la réparation tissulaire et la fibrose.

Les fibroblastes carencés en sérum pendant quatre jours montrent des ratios LC3B-II/-I élevés et des niveaux de SQSTM1/p62 diminués. L'augmentation de l'autophagie est accompagnée d'une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation myofibroblastique ACTA2/ α SMA et collagènes de type 1 et 3 et de la formation de fibres de stress. Les fibroblastes autophagiques expriment les marqueurs de sénescence CDKN1A (p21) et p16INK4a (p16) et montrent une augmentation de l'activité beta-galactosidase associée à la sénescence.

L'inhibition de l'autophagie à l'aide de différents inhibiteurs de phosphoinositide 3-kinase de classe I et de phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PtdIns3K) ou par inhibition génique à l'aide d'ARN interférant *ATG7* bloquent l'expression des marqueurs de différenciation et de sénescence.

L'expression et la sécrétion de CTGF (connective tissue growth factor) sont augmentées chez les fibroblastes autophagiques. L'inhibition de l'expression du CTGF par interférence génique prévient la différenciation myofibroblastique, démontrant l'importance de ce facteur pro-fibrotique pour la différenciation induite par l'autophagie.

La phosphorylation de la kinase RPS6KB1/p70S6K, cible du complexe MTORC1, est abolie dans les fibroblastes autophagiques. La phosphorylation d'AKT à la Ser473, une cible du complexe MTORC2, diminue lors de la carence en sérum des fibroblastes mais est suivie

d'une rephosphorylation après 2 jours. Ce résultat suggère la réactivation de MTORC2 lors d'une autophagie prolongée. Ceci a été vérifié par inhibition de l'autophagie dans les fibroblastes carencés en sérum. Les inhibiteurs de PtdIns3K et le siRNA *ATG7* bloquent la rephosphorylation d'AKT. L'inhibition de la réactivation de MTORC2, et donc de la rephosphorylation d'AKT, est aussi obtenue par exposition des fibroblastes à la rapamycine, le Torin 1 ou par inhibition génique de *RICTOR*. Ces traitements inhibent l'augmentation de l'expression du CTGF ainsi que des marqueurs de différenciation et de sénescence, démontrant le rôle central joué par MTORC2 dans ces processus.

Le stress oxydant peut induire la sénescence et la carence en sérum est connue pour augmenter la quantité de ROS (reactive oxygen species) dans les cellules. Afin d'investiguer le rôle des ROS dans la différenciation et la sénescence induites par l'autophagie, nous avons incubés les fibroblastes carencés en sérum en présence de N-acetyl-L-cysteine (NAC). Le NAC diminue la production de ROS, diminue les marqueurs d'autophagie, de sénescence et de différenciation myofibroblastique. Le NAC inhibe aussi la phosphorylation d'AKT Ser473.

L'ensemble de ces résultats identifient les ROS en association avec une autophagie prolongée comme des nouveaux activateurs du complexe MTORC2. MTORC2 est central pour l'activation subséquente de la sénescence et de la différenciation myofibroblastique.

Mots-clés: Autophagie, connective tissue growth factor (CTGF), différenciation, fibroblaste, fibrose, MTORC2, myofibroblaste, rapamycine, reactive oxygen species (ROS), sénescence.

Abstract

Recent evidence suggests that autophagy may favor fibrosis through enhanced differentiation of fibroblasts in myofibroblasts. Cellular senescence is also involved in tissue repair and fibrosis. Autophagy has been linked with senescence. This study focuses on understanding the molecular mechanisms linking autophagy, senescence and myofibroblast differentiation and the roles they could play in wound healing and fibrosis.

Fibroblasts, serum starved for up to 4 days, showed increased LC3B-II/-I ratios and decreased SQSTM1/p62 levels. Autophagy was associated with acquisition of markers of myofibroblast differentiation including increased protein levels of ACTA2/ α SMA (actin, α 2, smooth muscle, aorta), enhanced gene and protein levels of COL1A1 (collagen, type I, α 1) and COL3A1, and the formation of stress fibers. Autophagic fibroblasts showed expression of the senescence markers CDKN1A (p21) and p16INK4a (p16) and also exhibit increase in Senescence Associated-beta-galactosidase activity.

Inhibiting autophagy with different class I phosphoinositide 3-kinase and class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) inhibitors or through *ATG7* silencing prevented myofibroblast differentiation and senescence markers expression.

Autophagic fibroblasts showed increased expression and secretion of CTGF (connective tissue growth factor), and *CTGF* silencing prevented myofibroblast differentiation. Phosphorylation of the MTORC1 target RPS6KB1/p70S6K kinase was abolished in starved fibroblasts. Phosphorylation of AKT at Ser473, a MTORC2 target, was reduced after initiation of starvation but was followed by spontaneous rephosphorylation after 2 d of starvation, suggesting the reactivation of MTORC2 with sustained autophagy. Importantly, inhibition of autophagy with PtdIns3K inhibitors or *ATG7* silencing blocked AKT rephosphorylation.

Inhibiting MTORC2 activation with long-term exposure to rapamycin, Torin 1 or by silencing *RICTOR*, a central component of the MTORC2 complex, abolished AKT rephosphorylation.

RICTOR silencing, Torin 1 and rapamycin treatments prevented CTGF and ACTA2 upregulation and induction of senescence markers demonstrating the central role of MTORC2 activation in CTGF and senescence induction for myofibroblast differentiation.

Since oxidative stress is a known inducer of senescence, we investigated the role of reactive oxygen species (ROS) in autophagy-induced myofibroblast differentiation and senescence markers induction. Exposing fibroblasts to N-acetyl-L-cysteine (NAC) decreased production of ROS during serum starvation, inhibited autophagy and significantly decreased the expression of senescence and myofibroblast differentiation markers. NAC also inhibited the phosphorylation of AKT Ser473, establishing the importance of ROS in fuelling MTORC2 activation.

Collectively, these results identify ROS production in association with sustained autophagy as novel inducers of MTORC2 signaling which in turn concomitantly activate senescence and myofibroblast differentiation.

Keywords: Autophagy, connective tissue growth factor (CTGF), differentiation, fibroblast, fibrosis, MTORC2, myofibroblast, rapamycin, reactive oxygen species (ROS), senescence.

Résumé de vulgarisation

La fibrose est un mécanisme de réparation tissulaire anormal associé à l'accumulation de myofibroblastes, qui par leur production accrue d'éléments de la matrice extracellulaire, entravent la fonction du tissu. En plus d'être une complication majeure de la transplantation d'organe, la fibrose est retrouvée dans plusieurs syndromes, comme la sclérodermie, la cirrhose hépatique, la dysfonction rénale ou les effets secondaires des médicaments anti-cancéreux. À ce jour, les traitements contre la fibrose sont limités et sous-optimaux.

Des études récentes montrent que la raréfaction microvasculaire i.e. la perte des microvaisseaux suite au dommage endothélial, est un facteur prédictif du rejet de greffe d'organe solide et précède le développement de la fibrose. La raréfaction microvasculaire est aussi un symptôme associé à la sclérodermie. La raréfaction microvasculaire entraîne une diminution de l'apport nutritif, de l'oxygène et de facteurs de croissance au tissu lésé. Comme la carence en éléments nutritifs est un inducteur reconnu de l'autophagie, mécanisme de survie cellulaire en condition de stress, nous avons émis l'hypothèse que l'autophagie pouvait être impliquée dans la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste et dans le développement de la fibrose.

Grâce à des analyses moléculaires effectuées sur des lignées cellulaires de fibroblastes humains, nous avons mis en lumière une nouvelle voie fibrogénique initiée par l'autophagie. L'autophagie, lorsqu'activée sur une longue période, mène à l'activation d'un complexe protéique spécifique : MTORC2. L'activation de MTORC2 conduit à la sénescence, soit un arrêt permanent du cycle cellulaire, et à la surexpression d'un facteur pro-fibrotique, le CTGF (connective tissue growth factor). Le CTGF dirige la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste. Nous avons aussi mis au jour la contribution essentielle des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) pour la réalisation de la différenciation myofibroblastique et de la sénescence induites par l'autophagie.

Nos résultats identifient un nouveau mécanisme liant l'autophagie et la fibrose. Comme la compréhension des processus de différenciation du fibroblaste en myofibroblaste est importante pour permettre d'élaborer des stratégies visant à contrôler le processus fibrotique, nos découvertes permettent d'entrevoir de nouvelles avenues thérapeutiques ciblant l'autophagie, la sénescence, les ROS, le CTGF et la voie de signalisation MTORC2.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Résumé de vulgarisation.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
Partie 1 Fibrose et myofibroblaste.....	1
1.1 Fibrose.....	1
1.1.1 La réparation tissulaire.....	1
1.1.2 Fibrose chronique : problème de réparation.....	4
1.1.2.1 Problème d'apoptose.....	4
1.1.2.2 Problème de sénescence.....	5
1.2 Le myofibroblaste.....	6
1.2.1. Ses caractéristiques.....	6
1.2.2 Son origine.....	9
1.3 Les médiateurs et voies de signalisation pro-fibrotiques.....	11
1.3.1 Le TGFB.....	11
1.3.2 Le CTGF.....	12
1.3.3 Autres médiateurs.....	15
1.4 Lien entre dommage endothélial, raréfaction microvasculaire et maladies fibrotiques.....	16
Partie 2 Autophagie.....	19
2.1 Autophagie et maladies fibrotiques.....	19
2.2 Types d'autophagie.....	19
2.3 Autophagosome et autophagolysosome.....	20

2.4 Gènes ATG	22
2.5 Marqueurs de l'autophagie	23
2.6 Inhibiteurs de l'autophagie	25
2.7 Activateurs de l'autophagie	27
2.8 Voies signalétiques qui régulent l'autophagie	28
2.8.1 MTORC1	29
2.8.1.1 MTORC1 : régulation	29
2.8.1.2 MTORC1 : cibles	33
2.8.2 MTORC2	34
2.8.2.1 MTORC2 : régulation	34
2.8.2.2 MTORC2 : cibles	36
Partie 3 Liens entre autophagie et sénescence	38
3.1 La sénescence	38
3.1.1 Sénescence vs quiescence	38
3.1.2 Définir la sénescence	40
3.1.3 p53	40
3.1.4 Mécanismes d'activation de la sénescence	41
3.1.5 Marqueurs de la sénescence	42
3.1.6 Causes de la sénescence	43
3.2 Sénescence et réparation tissulaire/fibrose	45
3.2.1 Contexte	45
3.2.2 TGFB et CTGF	46
3.2.3 ROS	46
3.2.3.1 Introduction aux ROS	46
3.2.3.2 ROS, myofibroblaste et fibrose	48
3.2.3.3 ROS et sénescence	50
3.3 ROS et autophagie	51
Partie 4 Traitements et limitations	53
Partie 5 Hypothèse et Objectifs	59
5.1 Hypothèse	59
5.2 Objectifs	60

5.2.1 Objectif 1	60
5.2.2 Objectif 2	60
Résultats expérimentaux	61
6.1. Article 1	61
<i>Running title: Autophagy and myofibroblast differentiation</i>	62
6.2 Article 2	117
<i>Running title: Autophagy, senescence and myofibroblast differentiation</i>	118
Discussion	144
7.1 Introduction	144
7.2 ROS	147
7.3 CTGF	153
7.4 MTORC2	159
7.5 Implication pour études <i>in vivo</i> et pour traitements	162
7.6 Conclusion et perspectives	167
Bibliographie	170

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Le myofibroblaste est une cellule utile.....	3
Figure 2 La différenciation myofibroblastique	7
Figure 3 La macroautophagie	21
Figure 4. MTORC1 et MTORC2.....	32
Figure 5. Stimuli menant à la sénescence et voies de signalisation impliquées	39

Article 1

Figure 1. Starvation induces autophagy and myofibroblast differentiation.....	102
Figure 2. Autophagy induces myofibroblast differentiation in starved fibroblasts .	103
Figure 3. Myofibroblast differentiation induced by starvation is dependent on CTGF upregulation	104
Figure 4. Autophagy is central for CTGF upregulation in starved fibroblasts	105
Figure 5. Activation of MTORC2 signaling in starved fibroblasts.....	106
Figure 6. Blockade of autophagy-induced myofibroblast differentiation by rapamycin	107
Figure 7. Autophagy is essential for MTORC2 activity induced by serum starvation	108
Figure 8. Long-term autophagy favors MTORC2 activation leading to enhanced CTGF production and myofibroblast differentiation.....	109
Supp. Figure 1.....	110
Supp. Figure 2.....	111

Supp. Figure 3	112
Supp. Figure 4	113
Supp. Figure 5	114
Supp. Figure 6	115
Supp. Figure 7	116

Article 2

Figure 1. Serum starvation induces senescence in fibroblasts.	140
Figure 2. Autophagy induces senescence in serum-starved fibroblasts.	141
Figure 3. Senescence induced by serum starvation depends on MTORC2 signaling.	142
Figure 4. ROS are required for autophagy-induced MTORC2 activation leading to senescence.	143

Discussion

Figure 1. Réparation tissulaire versus fibrose.	146
---	-----

Liste des abréviations

3-MA	3-methyladenine
ACTA2/ α SMA	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene
AMP	adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ASASP	autophagy and senescence associated secretory phenotype
ATG7	autophagy gene 7
ATP	adénosine triphosphate
CDKN1A/p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CKI	kinases inhibitrices de cyclines
COL1A1	collagen, type I, α 1
COL3A1	collagen, type III, α 1
CTGF	connective tissue growth factor
Ctl	control
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DDR	DNA damage response
ECM	extracellular matrix
EMT	epithelial to mesenchymal transition
EndoMT	endothelial to mesenchymal transition

FACS	cytométrie en flux
FBS	fetal bovine serum
GF	growth factor
GFP	green fluorescent protein
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HIF	hypoxia inducible factor
HSC	hepatic stellate cell
IL	interleukine
IPF	fibrose pulmonnaire interstitielle
I/R	ischémie/reperfusion
Iso	isotype control
KO	knock-out
LC3B/MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
LY	LY294002
MTOR	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
MTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
MTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
N	normal growth medium
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NLR	nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3
NOX	NADPH oxydase

p16INK4a/p16	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p21/CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
p38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PtdIns3K	class 1 phosphoinositide 3-kinase/class III phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	phosphatase and tensin homolog
q-PCR	real time polymerase chain reaction
R	rapamycin
RICTOR	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2
ROS	reactive oxygen species
RPS6KB1/p70S6K,	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
RPTOR	regulatory associated protein of MTOR, complex 1
SA- β -gal	senescence-associated-beta-galactosidase
SAHF	senescent associated heterochromatin foci
SASP	senescence associated secretory phenotype
Ser473	serine 473
siRNA	small interfering RNA
SQSTM1/p62	sequestosome 1
SS	serum-free (starvation) medium
T/TGFB1	transforming growth factor, beta 1

TOR	target of rapamycin (serine/threonine kinase)
TUBA	tubulin, alpha
V	vehicle
VEGF	vascular endothelial growth factor
W	wortmannin
WB	western blotting

À Michel

Remerciements

Voilà, finalement, mon projet de doctorat touche à sa fin. Ce fut toute une aventure! Je savais au départ que je me lançais un défi de taille, mais je n'avais pas réalisé à quel point. Chapeau à tous les doctorants!!! Ces nombreux efforts ne sont pas vains : je vous présente cette thèse avec fierté. Elle est le fruit de discussions, de collaborations et de travail ardu et assidu.

Tout cela n'aurait jamais été possible sans le support et la supervision de Dr Hébert. Marie-Josée, merci de m'avoir fait confiance tout au long de ces années. On a beaucoup discuté, on a beaucoup travaillé et, regarde, j'arrive maintenant à ma « Floride ». Comme tu es une bonne professeure! Tu as su identifier mes forces et mes faiblesses et tu m'as encouragée à relever les nombreux défis.

Je tiens à remercier Dr Andrew Cybulsky et Dr Isabelle Royal, les membres de mon comité de suivi. Ils m'ont vraiment suivi! J'ai apprécié toutes vos questions et vos commentaires.

Merci aux membres du laboratoire, présents et passés. Je ne vous nommerai pas tous, mais sachez que chacun, à votre façon, vous avez participé à la réussite de ce travail. Merci pour vos encouragements, pour votre écoute lors de tous ces lab meetings...pour votre aide technique et professionnelle ainsi que pour toutes les discussions scientifiques... ou non.

Merci également à nos collaborateurs, Dr Francis Rodier et son équipe, qui m'ont facilité la tâche lors de plusieurs expériences. Ils m'ont initié au travail sur la sénescence (et maintenant je peux dire qu'il est intéressant de vieillir).

Au cours des années, aussi lorsque je travaillais comme assistante de recherche, j'ai côtoyé des scientifiques, jeunes et moins jeunes, amoureux de la recherche. Des gens qui ont la vocation. À ces gens, je dis merci de partager votre passion.

Sur une note plus personnelle, je remercie mon conjoint Michel. Toi aussi tu ne savais pas dans quoi je m'embarquais réellement! Mais tu n'as jamais douté de moi. J'ai vraiment puisé auprès de toi l'énergie et la vaillance pour mener à bien ce travail. Merci pour ton support, dans tous les sens du terme. Merci à mes trois filles qui sont maintenant trois magnifiques jeunes femmes. Vous avez été patientes avec votre mère. Vous avez été compréhensives et à l'écoute. Merci également aux parents et amis, votre soutien a été infaillible et grandement important pour moi.

En dernier lieu, je remercie les membres de mon jury de thèse, Dr Yves Berthiaume, Dr Andrew Cybulsky, Dr Naglaa Shoukry, Dr Richard Bertrand, Dr Marie-Josée Hébert, pour le temps et l'énergie consacrés à cette évaluation. Bonne lecture!

Introduction

Partie 1 Fibrose et myofibroblaste

1.1 Fibrose

1.1.1 La réparation tissulaire

L'embryon humain a la capacité de régénérer le tissu affecté suite à une insulte tissulaire. Des organismes adultes eucaryotes ont même la capacité de régénérer des membres complets après blessure. Cependant, l'humain en vieillissant tend à perdre la capacité de régénération tissulaire. La plaie est alors plutôt refermée par un tissu spécialisé que l'on appelle cicatrice. Le tissu cicatriciel est composé principalement de collagène qui est synthétisé en grande partie par le fibroblaste.

Les grandes lignes des mécanismes de cicatrisation sont conservées entre les différents tissus et organes. La formation d'une cicatrice sur la peau est un exemple de réparation que la majorité des gens a pu expérimenter au cours de son existence. Les mécanismes de guérison normale d'une plaie sont complexes. Ils impliquent plusieurs types cellulaires, voies de signalisation intracellulaires et voies de communication entre les cellules. Par exemple, le système immunitaire est engagé, une réponse inflammatoire est activée, la cascade de coagulation pour former une croûte est nécessaire.¹ Si on se réfère à la **figure 1**, qui représente le processus de cicatrisation de la peau tel que décrit par Tomasek² en 2002 et révisé par Van de Water,³ le processus de cicatrisation se divise en 3 étapes principales.

Premièrement, il y a formation d'un caillot de plaquettes et leur dégranulation, activation du complément, dégradation de bactéries. Ceci attire les granulocytes et macrophages. Il y a synthèse de facteurs de croissance et cytokines par les plaquettes, neutrophiles et macrophages. Ces facteurs recrutent d'autres cellules du système immunitaire, comme les monocytes et lymphocytes du sang, ainsi que des fibroblastes qui résident à proximité des membranes basales et dans les tissus interstitiels. Les fibroblastes sont responsables de la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire qui permet elle-même de maintenir l'intégrité tissulaire. Les fibroblastes possèdent des propriétés contractiles qui leur permettent de migrer et d'envahir le site de la blessure. Les fibroblastes, ainsi que les cellules endothéliales et épithéliales, prolifèrent suite à l'activation par les facteurs de croissance et forment un tissu temporaire riche en cellules que l'on appelle tissu de granulation. C'est la deuxième étape. Les fibroblastes exercent une force de traction sur la matrice extracellulaire, ce qui la modifie. Les modifications de la matrice et les cytokines présentes induisent en retour la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste. Le myofibroblaste synthétise alors de plus grande quantité de matrice extracellulaire et exerce une force tensile grâce à sa capacité contractile, ce qui permet la fermeture de la plaie et représente la troisième étape. Le myofibroblaste est donc une cellule utile. Il est essentiel à la cicatrisation. Il est important de constater que le tissu cicatriciel ne retrouvera jamais toutes les caractéristiques du tissu original, comme l'apparition de poil ou de glande sudoripare au niveau de la peau.

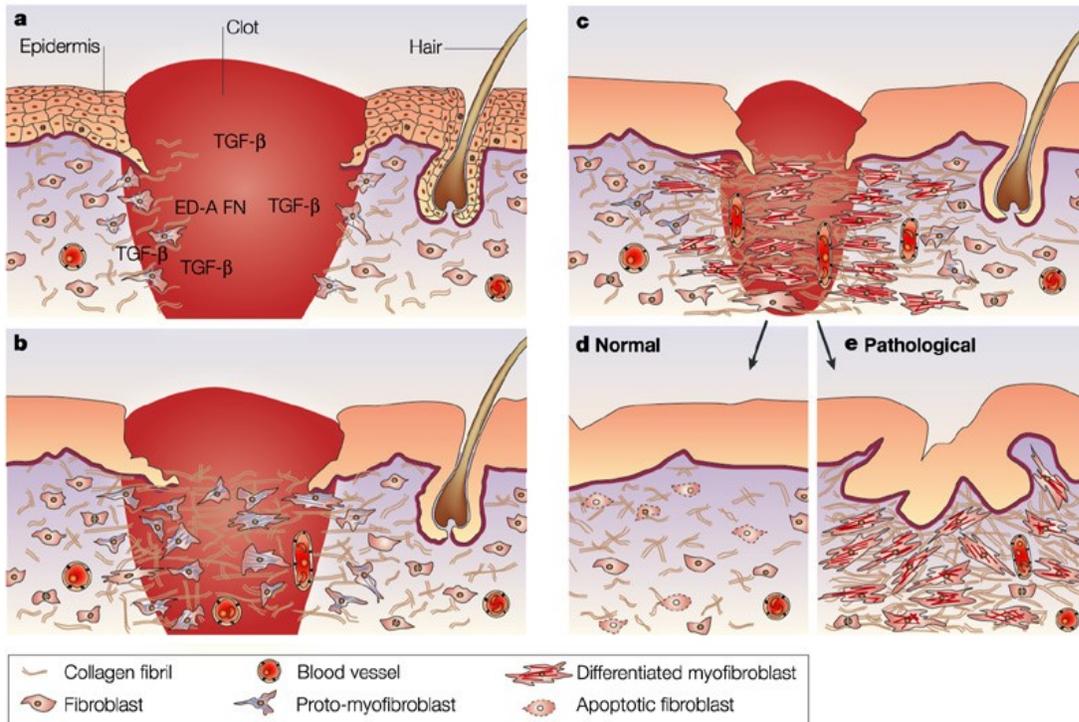


Figure 1. Le myofibroblaste est une cellule utile.

Représentation du processus de cicatrisation de la peau: a) formation d'un caillot, relargage de facteurs de croissance comme le PDGF, recrutement de granulocytes et macrophages qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, activation des fibroblastes. b) grâce à leur capacité contractile, les fibroblastes peuvent envahir le site et former le tissu de granulation (tissu riche en cellules car les fibroblastes et les petits vaisseaux sanguins s'y multiplient sous l'effet du PDGF). Les fibroblastes exercent une force de traction sur la matrice de collagène ce qui la modifie et cela induit en retour la différenciation du fibro en proto-myofibro qui synthétise alors de la fibronectine ED-A, du collagène et des cytokines pro-fibrotiques de façon autocrine. c) la différenciation continue par synthèse de l' α SMA, ce qui permet d'augmenter encore la force déployée par ces cellules. Elles sécrètent des protéases (MMP) et des inhibiteurs de protéases (TIMP), ce qui a pour effet de remodeler la matrice et de permettre finalement la fermeture de la plaie. d) les myofibroblastes meurent par apoptose lorsque le processus est terminé. e) c'est leur persistance suite à une inhibition de l'apoptose qui est à la source de plusieurs pathologies comme ici la formation d'une cicatrice hypertrophique ou la fibrose chronique.

Reproduit avec autorisation de Tomasek JJ et al. (2002) Nat Rev Mol Cell Biol. 3: 349-363.

1.1.2 Fibrose chronique : problème de réparation

On peut facilement imaginer qu'un mécanisme si important pour l'intégrité de l'individu peut mener à des pathologies s'il est dérégulé.⁴⁻⁷ La fibrose se définit comme l'accumulation anormale de collagène et de matrice extracellulaire menant à une perte d'élasticité du tissu et à la diminution de la fonction de l'organe. La fibrose peut toucher différents tissus et organes comme la peau, les vaisseaux sanguins, les poumons, les reins, le cœur. La fibrose est retrouvée dans plusieurs syndromes tels que la sclérodermie, le rejet de greffe chronique, la fibrose pulmonaire idiopathique, la cirrhose hépatique, la fibrose rénale interstitielle.⁸⁻¹² Mais comment se développe la fibrose? Il est généralement accepté que la fibrose se développe suite à une cicatrisation anormale. Par exemple, le processus de cicatrisation ne peut se résoudre car le problème à la base de l'insulte tissulaire est toujours présent et perdure dans le temps ce qui entraîne la persistance de cellules immunitaires et fibroblastes activés.¹³ Aussi, il peut y avoir un problème à l'intérieur même du processus de cicatrisation. Si on se réfère une autre fois à la **figure 1**, on constate que dans le modèle de cicatrisation de Tomasek,^{2,3} lorsque le processus de cicatrisation est terminé les myofibroblastes meurent par apoptose. D'après lui, c'est leur persistance suite à une inhibition de l'apoptose qui est à la source de plusieurs pathologies fibrotiques comme ici la formation d'une cicatrice hypertrophique (formation d'un bourrelet due à une trop grande quantité de collagène).

1.1.2.1 Problème d'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmé dont les constituants moléculaires et les voies de signalisation sont bien décrits.¹⁴ Elle permet de se débarrasser de cellules

superflues ou qui ont terminé leur fonction, lors du développement embryonnaire par exemple. D'après Tomasek,² il serait possible que l'apoptose soit dérégulée au cours de la fibrose. Il a basé cette hypothèse sur les travaux originaux de Desmoulière¹⁵ qui a démontré la présence de cellules apoptotiques dans les plaies en cicatrisation à la suite de marquage par TUNEL des cellules du tissu de granulation de peau dans un modèle de fermeture de plaie chez le rat en 1995. Par la suite, d'autres équipes ont aussi montré l'importance de l'apoptose pour la résolution de la cicatrisation.^{16, 17} L'induction de l'apoptose spécifiquement dans les myofibroblastes est même envisagée comme avenue thérapeutique pour lutter contre la fibrose.¹⁸

1.1.2.2 Problème de sénescence

Cependant, des défauts dans d'autres processus cellulaires peuvent aussi participer à l'établissement de la fibrose. La sénescence est définie comme l'arrêt irréversible du cycle cellulaire. La sénescence a d'abord été décrite comme un mécanisme suppresseur de tumeur. En effet, la sénescence permet de mettre en veilleuse les cellules qui accumulent des modifications de leur ADN, ce qui diminue la transmission d'aberrations chromosomiques. Cependant des travaux plus récents montrent que, dépendant du contexte, la sénescence pourrait aussi jouer un rôle pro-tumoral. De plus, elle est aussi impliquée dans le vieillissement et dans la réparation tissulaire.¹⁹ L'entrée en sénescence des myofibroblastes serait bénéfique car les fibroblastes sénescents synthétiseraient moins de collagène et plus de protéases capables de dégrader la matrice extracellulaire.²⁰ De plus, les cellules sénescents activeraient la surveillance par le système immunitaire ce qui faciliterait la résolution de la

fibrose en éliminant les cellules pro-fibrotiques.²¹ Dans un tel contexte, le passage des cellules de l'état quiescent (arrêt provisoire du cycle cellulaire) à l'état sénescence semble bénéfique.

1.2 Le myofibroblaste

1.2.1. Ses caractéristiques

Le myofibroblaste est la cellule responsable de la synthèse excessive de matrice extracellulaire et de la déformation du tissu que l'on retrouve dans la fibrose. La différenciation du fibroblaste en myofibroblaste implique plusieurs étapes^{2, 3} illustrées à la **figure 2**. Comme décrit à la section **1.1.1**, les fibroblastes exercent une force de traction sur la matrice extracellulaire, ce qui la modifie. Les modifications de la matrice et les cytokines présentes dans le milieu induisent en retour la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste. Le fibroblaste réorganise son cytosquelette d'actine pour former des fibres de stress et poursuit sa différenciation en exprimant **l'alpha actine des cellules musculaires lisses (aSMA/ACTA2)**. On parle alors de proto-myofibroblaste. Puis, sous l'effet de l'augmentation de la tension dans le tissu et des cytokines, le proto-myofibroblaste augmente sa synthèse d'aSMA et l'incorpore dans les fibres de stress. On parle alors de myofibroblastes qui ont un pouvoir de contraction accru.

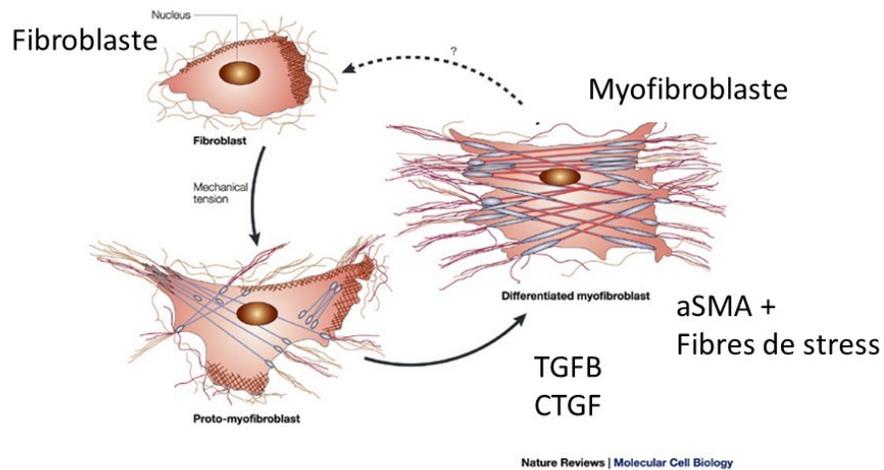


Figure 2 La différenciation myofibroblastique.

La cellule responsable de la synthèse du collagène est le fibroblaste. La cellule responsable de la synthèse accrue du collagène lors de la fibrose est le myofibroblaste. Les myofibroblastes se distinguent par la synthèse d'un nouvel isoforme d'actine: l' α SMA et par la formation de fibres de stress. La différenciation du fibroblaste est causée par des changements dans l'environnement, comme par exemple, l'augmentation de la force tensile du tissu et la présence de facteurs pro-fibrotiques. Les principaux facteurs pro-fibrotiques connus sont le TGFB et le CTGF.

Reproduit avec autorisation de Tomasek JJ et al. (2002) Nat Rev Mol Cell Biol. 3: 349-363.

Le proto et le myofibroblaste synthétisent aussi un nouveau variant de la fibronectine: la fibronectine ED-A (pour extra-cellular domain A). La fibronectine peut se lier à d'autres molécules de fibronectine et former des fibrilles ce qui change les propriétés de la matrice. La fibronectine interagit avec les composants de la matrice extracellulaire comme le collagène et les protéoglycans. Les intégrines, qui sont situées à la surface de la membrane plasmique sont les ligands de la fibronectine.

La fibronectine, de par sa liaison aux intégrines, relie la matrice extracellulaire aux fibres de stress intracellulaires par l'intermédiaire des sites d'adhésion focaux. Les sites d'adhésion focaux peuvent être constitués d'une centaine de protéines différentes. En plus d'être des sites d'ancrage, ils servent à sentir le changement du milieu environnant et à envoyer des signaux intracellulaires pour informer la cellule de ces modifications. Une kinase importante pour la transmission de ces signaux est la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase). Elle permet la réorganisation du cytosquelette. Le myofibroblaste est donc une cellule capable de s'adapter aux changements. Il possède une grande force de traction grâce à ses fibres de stress et peut agir sur son environnement en modifiant la composition de la matrice extracellulaire, par exemple en synthétisant différents types et différentes quantités de collagène et, comme déjà mentionné, de fibronectine. Les principaux types de collagène retrouvés dans les tissus fibrotiques sont les collagènes de type 1 et 3. Cependant, il faut noter qu'il faut plus d'un marqueur pour identifier un myofibroblaste. Par exemple, les myofibroblastes ne synthétisent pas tous de l' α SMA. De plus, ce ne sont pas toutes les cellules α SMA⁺ qui sont des myofibroblastes.²² Comme son nom l'indique, α SMA est synthétisé principalement par les cellules musculaires lisses.

1.2.2 Son origine

L'origine du myofibroblaste est matière à débat depuis plusieurs années parmi les chercheurs qui s'intéressent au processus fibrotique. En effet, identifier la source des myofibroblastes dans un type de fibrose en particulier permettrait de cibler la thérapie sur ces cellules avant qu'elles ne deviennent nuisibles. Il est reconnu que les sources de myofibroblastes varient en fonction du tissu et aussi en fonction de l'inducteur ou modèle d'étude utilisé.

Pour étudier la fibrose rénale, les modèles d'UUO (obstruction unilatérale de l'uretère) et d'I/R (ischémie/reperfusion) sont souvent utilisés. Le rein UUO est un modèle où la néphropathie est causée mécaniquement par la ligature de l'uretère d'un des reins de l'animal. Celui-ci développe une fibrose tubulo-interstitielle en environ une semaine.²³ Dans le modèle d'I/R, on enlève un rein et le deuxième rein est soumis à une ischémie par arrêt du flot sanguin par ligature de l'artère rénale. La durée de la ligature est variable et fixée par l'investigateur, selon qu'il veut étudier des dommages réversibles ou permanents (fibrose interstitielle).²⁴

En ce qui a trait à la fibrose rénale, dans un modèle d'UUO et un modèle d'I/R, la cellule productrice de l'excès de matrice extracellulaire est le fibroblaste résident dans le tissu interstitiel.²⁵ Cependant, l'équipe de Dr Duffield²⁶ a identifié le péricyte, une cellule qui est en contact avec les cellules endothéliales des capillaires du glomérule et qui contrôle la microcirculation, comme étant la source des myofibroblastes dans le rein. En utilisant une technique de fate-mapping, ils ont montré que le péricyte se différencie en cellule α SMA+ dans les modèles d'UUO et d'I/R. En fibrose hépatique, ce sont les HSC (hepatic stellate cells)

qui sont à l'origine des myofibroblastes. Les HSC sont considérées comme les péricytes du foie.²⁷

D'autres sources de myofibroblaste ont aussi été identifiées, parmi elles, citons les fibrocytes et les phénomènes d'EMT (transition d'une cellule épithéliale vers un état mésenchymateux) et d'EndoMT (transition d'une cellule endothéliale vers un état mésenchymateux).²² Les fibrocytes sont des cellules circulantes dérivant de la moelle osseuse. Elles seraient attirées au site de lésion par les cytokines qui y sont sécrétées. Les fibrocytes peuvent sécréter des constituants de l'ECM. L'EMT et l'EndoMT sont des phénomènes de différenciation cellulaire. L'EMT a d'abord été observé *in vitro* en culture cellulaire.²⁸ Sous l'effet de cytokines de la famille TGFB, la cellule épithéliale perd ses caractéristiques pour en acquérir de nouvelles comme la capacité de migration et d'invasion, ce qui fait que ces processus sont importants aussi dans la progression tumorale et la formation de métastases. Les cellules acquièrent des marqueurs de cellules mésenchymateuses comme l'expression de vimentine, d'aSMA et la formation de fibres de stress. Elles changent de marqueurs de surface, par exemple le répertoire des intégrines et des cadhérines, et varient leur sécrétion de MMP (matrix metalloproteases) et de TIMP (tissue inhibitor of metalloproteases). En fibrose, elles participeraient à la déformation de l'ECM.¹¹

1.3 Les médiateurs et voies de signalisation pro-fibrotiques

1.3.1 Le TGFB

Le TGFB est un puissant médiateur pro-fibrotique: il peut à lui seul initier le processus de différenciation myofibroblastique.²⁹ *In vitro*, lorsqu'ajouté au milieu de culture des fibroblastes, il peut induire leur prolifération et la synthèse de collagène, d'aSMA et la formation de fibres de stress. Le TGFB possède plusieurs autres fonctions. En autres, lorsqu'ajouté au milieu de culture des cellules épithéliales, il induit l'EMT. Le TGFB est important pour le système immunitaire : il est nécessaire pour la production des cellules T régulatrices, pour la maturation des lymphocytes B, pour la survie des lymphocytes T.³⁰ Il joue aussi un rôle dans la différenciation des cellules T helper de type 17³¹ et dans la polarisation des macrophages de type M2 (anti-inflammatoire).³² Puisqu'il possède des propriétés pléiotropiques, il n'est pas nécessairement un candidat de choix si on l'envisage comme cible thérapeutique en fibrose.

TGFB médie son action principalement en activant la voie SMAD.³³ Lorsque le TGFB lie son récepteur, il y a recrutement et phosphorylation des protéines SMAD2/3. Les SMADs sont alors transférés au noyau et activent directement la transcription des gènes impliqués dans la différenciation comme aSMA, collagènes et CTGF (connective tissue growth factor). Ces gènes possèdent des SBE (SMAD binding element) dans leur promoteur. Le TGFB peut aussi initier le processus fibrotique par des voies SMAD indépendantes.²⁹ Par exemple, le TGFB active la voie de signalisation PI3K/AKT, importante pour la prolifération des fibroblastes. Je

décrierai cette voie de façon plus détaillée dans le prochain chapitre. Cependant, il n'est pas encore clair comment la liaison du TGFB à son récepteur active la PI3K.

Pour démontrer l'importance du TGFB en fibrose, on peut rapporter que l'expression du TGFB est augmentée dans plusieurs modèles animaux, que la surexpression du TGFB dans des souris transgéniques cause la fibrose de plusieurs tissus, que les souris KO pour SMAD3 sont résistantes au développement de la fibrose, que l'injection d'anticorps neutralisant du TGFB peut diminuer la sévérité de la fibrose chez l'animal.²⁹ Chez l'humain, une augmentation de l'expression du TGFB a été décrite dans plusieurs pathologies à composante fibrotique, comme par exemple, la sclérodermie, la cirrhose hépatique, la fibrose interstitielle pulmonaire, l'insuffisance rénale chronique.³⁴⁻³⁷ De plus, l'effet du TGFB est aussi médié par une autre cytokine pro-fibrotique, le connective tissue growth factor (CTGF).³⁸⁻⁴⁰ L'expression du CTGF est augmentée suite à une stimulation par le TGFB car le promoteur du CTGF contient un SBE.⁴¹ Cependant, le CTGF possède sa propre activité pro-fibrotique et de plus, il peut renforcer l'action du TGFB en facilitant l'interaction du TGFB avec son récepteur.⁴²

1.3.2 Le CTGF

Le CTGF est produit par les cellules épithéliales, endothéliales, musculaires lisses, les fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes où il agit sur la prolifération, la migration, la survie, l'angiogénèse. Il est aussi exprimé par les cellules du système immunitaire où il favorise l'adhésion et l'infiltration. Le CTGF est une protéine matricellulaire, i.e. qu'il est sécrété et se fixe à des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou les HSPGs (heparan sulfate proteoglycans). La structure de la protéine CTGF se décrit comme suit: en N-terminal,

un signal peptidique de sécrétion de 37 acides aminés, un module Insuline-like Growth Factor Binding Protein, un module von Willibrand factor type C repeat, un module trombospondin type 1 repeat, et une extrémité C terminale riche en cystéines. Le récepteur au CTGF n'est pas identifié. On pense qu'il agit par son interaction sur les intégrines, les LRP (low-density lipoprotein receptor).⁴³⁻⁴⁸

Plusieurs évidences expérimentales indiquent que le CTGF joue un rôle direct dans la différenciation myofibroblastique et dans la fibrose. Des études de fonction chez la souris montrent que la surexpression du CTGF, sous le contrôle du promoteur du collagène de type alpha 2 (I) (spécifique aux fibroblastes et cellules musculaires lisses), est **suffisante** pour induire la fibrose *in vivo* (peau, poumon, rein, vasculaire).⁴⁹ Le KO conditionnel du *CTGF*, construit dans un système Cre/Lox sous le contrôle du même promoteur, indique que le CTGF est **nécessaire** pour le développement de la fibrose cutanée induite par injection de bléomycine dans la peau car la souris sauvage développe la fibrose alors que le KO ne la développe pas.⁵⁰ La fibrose cutanée ou pulmonaire induites par la bléomycine sont des modèles murins fréquemment utilisés pour étudier la fibrose. La bléomycine est un antibiotique qui peut être utilisé comme agent chimiothérapeutique. Elle cause des cassures dans l'ADN des cellules tumorales. L'administration de bléomycine peut causer la fibrose pulmonaire comme effet secondaire chez l'humain.

Il faut noter que le *CTGF* KO complet est léthal à la naissance chez la souris car il y a un défaut de la chondrogénèse.⁵¹ Par contre, le CTGF semble non essentiel pour le développement de la peau lors de l'embryogénèse.⁵² De plus, la même équipe a montré plus

récemment que, bien qu'impliqué en fibrose, le CTGF n'est pas essentiel pour la réparation tissulaire.⁵³

Plusieurs études de fonction à l'aide de siRNA ciblant *CTGF* ont été effectuées chez l'animal. Par exemple, le *siCTGF* prévient la fibrose hépatique chez le rat⁵⁴ ainsi que la fibrose interstitielle dans le rein UUO de rat.⁵⁵ De plus, l'équipe du Dr Hébert a montré que le milieu conditionné de cellules endothéliales apoptotiques (SSC, milieu sans sérum conditionné par les cellules endothéliales) cause la fibrose cutanée chez la souris. Le développement de la fibrose dans ce modèle est dépendant de la présence du CTGF sécrété par les cellules endothéliales apoptotiques puisque la déplétion du CTGF par immunoprécipitation avant l'injection du SSC diminue la fibrose.⁵⁶

Chez l'humain, *in vitro*, le siRNA *CTGF* diminue l'expression de collagènes 1 et 3 de fibroblastes de peau lésionnelle de patients sclérodermiques.⁵⁷ L'augmentation de l'expression de CTGF a été démontrée dans plusieurs pathologies à composante fibrotique, comme par exemple, la sclérodermie, la cirrhose hépatique, la fibrose interstitielle pulmonaire et l'insuffisance rénale chronique.^{37, 45, 58-62}

Le développement d'une atrophie tubulaire et de fibrose interstitielle est une complication fréquente en greffe rénale et mène à la dysfonction du greffon. Le CTGF a été trouvé associé au développement de la fibrose de l'allogreffe rénale dans un modèle murin. Aussi, des niveaux de CTGF augmentés dans le sang et l'urine de patients greffés corrént avec la présence de fibrose interstitielle.⁶³ De plus, les niveaux de CTGF dans l'urine de patients

greffés évalués à différents temps après la greffe sont associés au degré de fibrose interstitielle évalué dans la biopsie protocolaire correspondante. Pour certains patients, un niveau élevé de CTGF dans l'urine 3 mois post-greffe était annonciateur de la présence de fibrose à 24 mois.⁶⁴ L'utilisation du CTGF comme marqueur et prédicteur du développement de la fibrose de l'allogreffe est donc présentement à l'étude.

Il a été démontré que le CTGF peut induire la différenciation myofibroblastique et soutenir la différenciation par des voies indépendantes du TGFβ. Ces voies ne sont pas encore complètement élucidées, mais il est montré que la réponse au stress ou à l'hypoxie serait impliquée.^{56, 65-68} La voie PI3K/AKT joue un rôle dans la synthèse de fibronectine induite par le CTGF chez les cellules mésangiales⁶⁹ et les voies PI3K/AKT et HIF1α jouent un rôle dans l'action du CTGF chez les fibroblastes.^{56, 65}

1.3.3 Autres médiateurs

Il existe d'autres voies de signalisation impliquées dans la fibrose. Pour nommer quelques exemples, l'angiotensine II active la voie SMAD dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) de façon TGFβ indépendante. Dans cette étude, l'angiotensine induit l'augmentation de l'expression du CTGF.⁷⁰ La liaison de la Prostaglandine F (2α) à son récepteur participe à la fibrose pulmonaire de façon TGFβ indépendante dans un modèle de fibrose induite par la bléomycine.⁷¹ Les souris KO pour l'interleukine-13 (IL-13) sont protégées de la fibrose et les souris TGFβ KO activent des voies fibrogéniques si on leur injecte de l'IL-13.⁷² L'IL-13 participe à la fibrose pulmonaire⁷³ et hépatique.⁷⁴ L'IL-13 est augmenté dans le sérum des patients sclérodermiques.⁷⁵ Le PDGF (Platelets Derived Growth

Factor) est aussi un facteur important pour le développement de la fibrose.^{76, 77} Finalement, les ROS (reactive oxygen species) sont des médiateurs de la différenciation myofibroblastique et sont impliqués dans plusieurs voies pro-fibrotiques.^{78, 79} Leur importance est si grande que plusieurs études cliniques sont effectuées pour déterminer l'effet d'antioxydants sur le développement de la fibrose, en sclérodémie et fibrose pulmonaire en autres.^{79, 80}

1.4 Lien entre dommage endothélial, raréfaction microvasculaire et maladies fibrotiques

Nous avons vu qu'il y a une grande diversité de médiateurs et de voies de signalisation impliqués dans la fibrose. Mais comment se fait l'induction de la fibrose *in vivo*? L'apoptose des cellules endothéliales est suspectée depuis plusieurs années d'être un facteur initiateur de la fibrose. Sgonc,⁸¹ en 1996 a montré la présence de cellules endothéliales apoptotiques dans un modèle de sclérodémie chez le poulet ainsi que dans la peau de patients. L'apoptose endothéliale participerait au dommage endothélial qui est à la source du processus de raréfaction vasculaire.⁸² En sclérodémie, les changements vasculaires (œdème et ulcère aux doigts, télangiectasie, diminution du nombre de capillaires sanguins) peuvent apparaître des années avant la fibrose cutanée et une diminution dans le nombre de cellules endothéliales progénitrices (EPC) a été observée lors des premiers stades de la maladie.⁸³

Plusieurs études ont aussi fait état d'une association entre l'apoptose endothéliale dans des modèles d'allogreffe d'organes durant le rejet et le développement subséquent de fibrose (rein de porc,^{84, 85} cœur chez la souris⁸⁶). On a rapporté un lien entre la perte des capillaires

péritubulaires et le développement de la fibrose dans le rein de rat⁸⁷ et chez l'humain.^{88, 89} Qui plus est, la perte de microvaisseaux est un facteur prédictif du développement de la fibrose dans le greffon (modèle de fibrose pulmonaire chez la souris⁹⁰ et greffe rénale chez l'humain).⁹¹

L'association entre apoptose endothéliale, raréfaction microvasculaire et fibrose rénale est aussi vraie suite à l'I/R. La perturbation de l'endothélium causée par l'insulte tissulaire entraîne une dysfonction de la barrière endothéliale ce qui amène une infiltration leucocytaire et du dommage causé par les cytokines inflammatoires libérées.⁹² Les groupes de Basile et Sutton ont montré l'induction de l'apoptose dans les cellules endothéliales ainsi que la perte de plus de 40% des microvaisseaux suite à une insulte ischémique aigüe.^{93, 94}

Bref, l'apoptose des cellules endothéliales joue un rôle dans le processus de dommage endothélial causant la perte des capillaires, ce qui favorise le développement de la fibrose. L'apoptose endothéliale joue aussi un autre rôle dans le développement de la fibrose comme décrit par le groupe de MJ Hébert.^{56, 95} Les cellules endothéliales apoptotiques libèrent des médiateurs, comme le CTGF, qui induisent la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste et induisent la fibrose cutanée lorsqu'injectés à des souris. L'apoptose a longtemps été considérée comme un processus de mort silencieux car les cellules apoptotiques et les corps apoptotiques sont rapidement éliminés par les macrophages et autres cellules phagocytaires au site de lésion. Cependant, plusieurs autres groupes ont aussi démontré l'effet des médiateurs et corps apoptotiques relâchés par les cellules apoptotiques sur les autres cellules dans leur environnement.^{96, 97} Ces études ont donné naissance à un nouveau concept décrit par Dr Sirois

comme étant des signaux post-mortem relâchés par les cellules apoptotiques et qui modulent la capacité de réparation et de remodelage tissulaire chez les cellules avoisinantes.⁹⁸

Il existe aussi d'autres processus, mis à part l'apoptose, qui peuvent causer du dommage aux microvaisseaux et être impliqués dans le développement de la fibrose. Citons le phénomène d'EndoMT qui a été mis à jour chez la souris adulte par le groupe de Kalluri.⁹⁹ Les cellules endothéliales cardiaques perdent leur marqueur de surface CD31 et acquièrent des marqueurs de cellules mésenchymateuses. Elles migrent du vaisseau à l'interstitium où elles sécrètent du collagène. L'endoMT participe donc à la fibrose de deux façons, soit en participant au dénuement des capillaires et au dommage endothélial, soit en sécrétant des constituants de l'ECM.

La perte du réseau microvasculaire entraîne l'hypo-perfusion du tissu causant une carence en oxygène, éléments nutritifs et facteurs de croissance. On peut penser que cette situation peut enclencher des mécanismes protecteurs pour favoriser la survie de la cellule. L'hypoxie entraîne la stabilisation de la protéine HIF1a. Celle-ci est un facteur de transcription qui régule l'expression du CTGF. Il a été montré que l'hypoxie induit le CTGF en stabilisant HIF1a dans plusieurs modèles cellulaires : mélanomes,⁶⁷ cellules épithéliales⁶⁵ et fibroblastes.⁶⁶ Ce phénomène pourrait participer au développement de la fibrose.

L'autophagie est un autre mécanisme de survie cellulaire pouvant être enclenché par la diminution de la disponibilité des éléments nutritifs et facteurs de croissance. La contribution de l'autophagie au développement de la fibrose commence à être investiguée.

Partie 2 Autophagie

2.1 Autophagie et maladies fibrotiques

L'autophagie est un processus normal dans l'homéostasie cellulaire. Elle permet de recycler des éléments du cytoplasme comme les protéines et organelles endommagées en les envoyant se faire dégrader par les lysosomes. L'autophagie est aussi un mécanisme de survie cellulaire en condition de stress comme par exemple, lorsqu'il y a carence en éléments nutritifs. L'autophagie permet la dégradation des protéines et organelles en acides aminés et composants moléculaires de base afin de fournir l'énergie nécessaire à la survie cellulaire.¹⁰⁰

L'autophagie serait dérégulée dans plusieurs pathologies.^{101, 102} Par exemple, les plaques d'amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer s'accumuleraient suite à une baisse de l'autophagie qui normalement devrait nous débarrasser de ces agrégats protéiques. En général, l'autophagie nous protégerait du processus de vieillissement en nous débarrassant des protéines mal repliées et des organelles dont la fonction est déficiente. Le rôle de l'autophagie en fibrose est moins clair, certaines études faisant état d'un rôle protecteur,¹⁰³ comme pour le vieillissement ou au contraire d'un rôle pro-fibrotique, en fournissant l'énergie aux cellules impliquées dans le processus fibrotiques.^{104, 105}

2.2 Types d'autophagie

Il existe plusieurs types d'autophagie.¹⁰⁶ L'autophagie médiée par des chaperons, la microautophagie et la macroautophagie. L'autophagie médiée par des chaperons demande

l'aide de protéines chaperons qui lient les protéines à dégrader et qui les ciblent à la membrane des lysosomes. Les protéines cytosoliques à dégrader passent directement à travers la membrane du lysosome, le chaperon permettant à la protéine de se déplier afin de passer la membrane. La microautophagie implique l'invagination de la membrane lysosomale vers l'intérieur et la formation d'une vésicule, ce qui emprisonne du contenu cytosolique dans la vacuole qui finira par être digérée. La macroautophagie est la forme la plus documentée. On lui réfère souvent par le terme autophagie. C'est ce que je ferai dans le présent ouvrage et c'est ce type que je vais décrire plus en détails ci-après.

De plus, la macroautophagie se subdivise en sous-types dépendant de la fonction de l'autophagosome (dégradation d'un pathogène=xénophagie) ou si un type spécifique d'organelle est visé (mitochondrie=mitophagie, peroxyosome=pexophagie).

2.3 Autophagosome et autophagolysosome

Lors de l'induction de l'autophagie, il y a formation d'une vacuole appelée autophagosome¹⁰⁷ (**figure 3, haut**). C'est cette vacuole qui contient la fraction du cytosol qui sera dégradée par le lysosome. L'autophagosome est bordé par une double membrane lipidique. L'autophagosome doit fusionner au lysosome par sa membrane externe pour que son contenu, ainsi que sa membrane interne, soit dégradé. On l'appelle alors autophagolysosome. Il est à noter que les endosomes aussi peuvent fusionner aux autophagosomes avant leur fusion aux lysosomes. On les appelle des amphisomes. L'initiation de l'autophagie nécessite l'action coordonnée de plusieurs protéines afin de former la membrane d'isolation appelée aussi phagophore. On croit

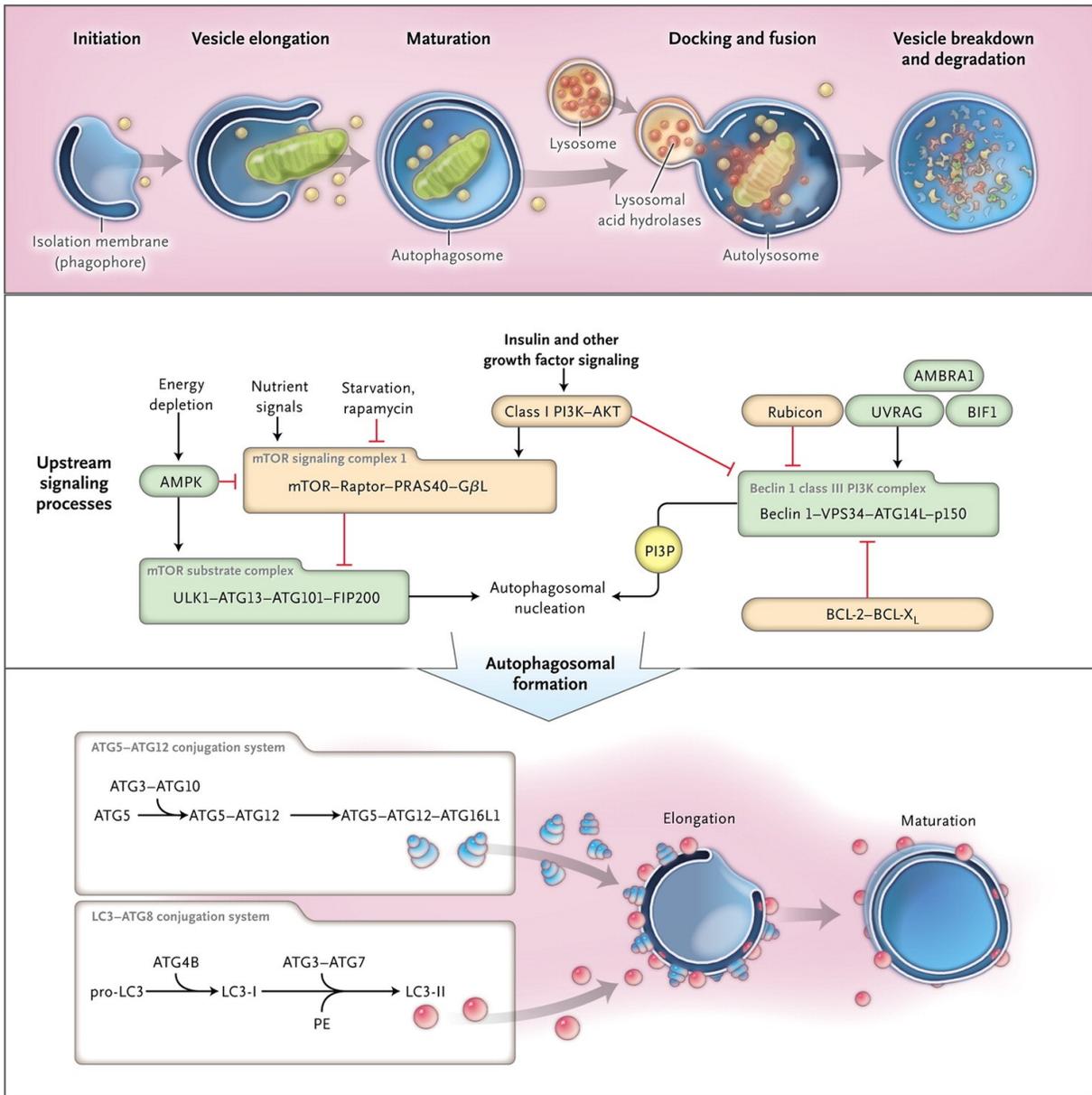


figure 3. La macroautophagie

Haut : formation de l'autophagosome.

Centre : initiation de l'autophagie.

Bas : élongation du phagophore.

Reproduit avec permission de Choi AM et al. N Engl J Med 2013; 368:651-662. Copyright Massachusetts Medical Society.

généralement que l'initiation de l'autophagie se fait à partir de la membrane du réticulum endoplasmique mais il a été montré que l'initiation pouvait se faire à partir de d'autres membranes comme la membrane plasmique, l'appareil de Golgi, la mitochondrie.¹⁰⁸

2.4 Gènes ATG

Les gènes impliqués dans l'autophagie ont été caractérisés chez la levure. Ils portent le sigle ATG avec un numéro. Une quarantaine de gènes dédiés à l'autophagie ont été identifiés.¹⁰⁹ Les gènes ATG ont des équivalents chez les autres organismes, mais les noms peuvent varier grandement. Plusieurs complexes de protéines comprenant des gènes ATG sont impliqués dans les processus majeurs de l'autophagie, comme l'initiation du phagophore, l'élongation ou la fusion avec le lysosome (**figure 3**). Je vais employer la nomenclature utilisée chez les mammifères.

Pour l'initiation, il y a formation du complexe ULK1, ATG13, FIP200. Ce complexe régule l'activité du complexe phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PtdIns3K) qui fournit les lipides essentiels à la formation de la membrane du phagophore. Ce complexe est constitué de l'enzyme PIK3C3 (Vps34) et de PIK3R4 (p150), BECN1 (beclin 1), ATG14, AMBRA1.¹¹⁰ Il y a deux composants nécessaires pour l'élongation de la membrane du phagophore : le complexe ATG12–ATG5-ATG16L1 et le LC3 (MAP1LC3B microtubule-associated 28 protein 1 light chain 3 beta; Atg8). Le complexe ATG12–ATG5-ATG16L1 possède une activité E3 ligase « like » : il est retrouvé sur la membrane du phagophore et a pour rôle de conjuguer le groupement phosphatidyléthanolamine (PE) (un lipide) au LC3 avec l'aide

d'ATG3-ATG7. Ce groupement permet l'insertion du LC3 dans la membrane du phagophore et de l'autophagosome.¹⁰⁶

De plus, l'autophagie étant un processus complexe et hautement régulé, plusieurs protéines régulatrices et « sensors » des changements dans l'environnement sont importantes. De la même façon, les protéines impliquées dans le transport des vésicules autophagiques, dans la fusion du phagosome au lysosome, dans la digestion lysosomale sont toutes considérées comme faisant partie du mécanisme de l'autophagie.¹⁰⁶

2.5 Marqueurs de l'autophagie

La protéine LC3 est particulière. Elle est normalement présente dans le cytosol. Mais après induction de l'autophagie, elle est lipidée et intégrée dans la membrane des autophagosomes. Cela en fait donc un marqueur de choix pour identifier les autophagosomes. Un marquage en immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique au LC3 peut être utilisé pour détecter les autophagosomes. Souvent, on utilise un vecteur viral ou une transfection d'un plasmide contenant le gène LC3 couplé au gène d'un marqueur fluorescent pour exprimer le LC3 dans les cellules à l'étude. Comme mentionné, le LC3 existe sous deux formes : une forme cytosolique, le LC3 I et une forme membranaire, le LC3 II. La forme membranaire est obtenue par ajout d'un groupement phosphatidylethanolamine (PE) par le complexe enzymatique spécifique qui réalise cette réaction s'apparentant à une ubiquitination (complexe ATG12, ATG5, ATG16L). Le marquage au LC3 donnera donc une coloration diffuse s'il est libre dans le cytoplasme ou il sera concentré sous forme de point s'il est associé aux autophagosomes. Le

LC3 II peut se situer sur la membrane externe de l'autophagosome ou sur la membrane interne. Le LC3 II externe est clivé par la protéine ATG4 lorsqu'il y a fusion au lysosome, il est alors recyclé. Le LC3 II interne est digéré par les enzymes lysosomales. Les lysosomes ne sont donc pas marqués au LC3. On peut ainsi suivre la formation des autophagosomes et évaluer leur nombre en comptant les *puncta* fluorescents dans chaque cellule. De plus, les LC3 I et II ne migrent pas au même poids moléculaire (18 vs 16 kD), on peut donc suivre le passage d'une forme à l'autre par Western Blot. Le ratio LC3 II/I est utilisé pour évaluer le processus autophagique. Il est à noter que la forme membranaire (LC3 II) migre plus loin sur le gel SDS-PAGE non pas que la protéine soit plus petite mais parce qu'elle est très hydrophobe, dû au groupement PE.^{106, 107}

Un autre marqueur de l'autophagie est la protéine p62, un substrat spécifique de l'autophagie.¹⁰⁷ Il se lie au LC3 et est incorporé à l'intérieur du phagosome où il sera dégradé. Sa quantité, évaluée en Western Blot ou immunofluorescence, varie de façon inversement proportionnelle à l'autophagie. Cependant, la transcription de p62 pourrait varier durant l'autophagie.¹¹¹ C'est pourquoi il est suggéré d'utiliser plusieurs marqueurs pour analyser l'autophagie et aussi d'étudier le flux autophagique, qui sera décrit ci-après.

La méthode « ultime » pour détecter les autophagosomes est de les visualiser à l'aide de la microscopie électronique. Les autophagosomes sont facilement reconnaissables à cause de leur double feuillet membranaire.¹⁰⁶

2.6 Inhibiteurs de l'autophagie

L'autophagie est un processus dynamique. On parle souvent de flux autophagique pour illustrer ce fait : formation du phagophore, fusion au lysosome, dégradation. L'analyse du flux autophagique est nécessaire car si le mécanisme est bloqué et empêche la complétion du processus, ce n'est pas que l'autophagie n'est pas enclenchée dans la cellule (la cellule est capable de répondre au stimulus autophagique) mais bien qu'un élément de la chaîne est perturbé et bloque le processus. Il existe différents agents capables de bloquer l'autophagie à différentes étapes du processus. La comparaison des niveaux de LC3 soluble et membranaire en absence ou présence de ces agents permet de déterminer si le flux autophagique est normal ou est perturbé et à quel niveau se situe la perturbation.

Par exemple, il existe des inhibiteurs des phases tardives de l'autophagie. La chloroquine et la bafilomycine A1 inhibent l'acidification des lysosomes. Le pH acide des lysosomes est nécessaire à l'activité des enzymes lysosomales responsables de la dégradation des protéines. E64d et la pepstatine A sont des inhibiteurs de protéases lysosomales. La quantité de LC3 II devrait augmenter en présence de ces différents inhibiteurs, s'il y a bien de l'autophagie initiée dans ces cellules, puisqu'il ne pourra plus être dégradé, il va s'accumuler dans l'autophagolysosome.^{106, 107}

Il existe aussi des inhibiteurs de la phase précoce de l'autophagie. La PIK3C3 (Vps34) est essentielle pour fournir les lipides nécessaires à la formation du phagophore. La 3-méthyladénine, la wortmannin et le LY294002 sont des inhibiteurs de la phosphatidylinositol 3-kinase de classe III. La wortmannin lie l'enzyme de façon covalente, c'est donc une

inhibition irréversible. Le LY294002 et la 3-méthyladénine lient l'enzyme de façon réversible, la liaison étant compétitive avec l'ATP.¹¹² Cependant, il a été démontré que la cible cellulaire de ces inhibiteurs pouvait varier en fonction de l'état cellulaire (normal vs carence en nutriment) et en fonction de la durée de l'exposition aux drogues. Ces inhibiteurs peuvent tous agir sur la phosphatidylinositol 3-kinase de classe I à différents degrés. Il faut donc être prudent dans l'analyse des résultats obtenus avec ces inhibiteurs.¹¹²⁻¹¹⁴

On réalise aussi des études de perte de fonction de gènes impliqués dans l'autophagie afin, bien sûr, d'en connaître plus sur leur fonction mais aussi afin de déterminer l'importance de l'autophagie pour d'autres processus cellulaires. Ces études sont réalisées à l'aide d'ARNs interférants afin de silencer le gène visé. On utilise aussi différents modèles de souris KO total ou partiel (hétérozygote ou bien conditionnel : le gène est KO dans un organe ou type cellulaire donné, à un moment déterminé). Par exemple, l'importance du gène *ATG7* pour l'autophagie induite par la carence en nutriments a été déterminée à l'aide d'un modèle de souris KO pour *ATG7*.¹¹⁵ La souris *ATG7* KO meurt quelques heures après la naissance car elle ne peut surmonter la période de jeûne néonatale, elle a une concentration en acides aminés dans le sang de beaucoup inférieure à celle de la souris sauvage. Une souris *ATG7* KO conditionnel a été générée afin d'obtenir des souris adultes. Ces souris sont *ATG7* KO pour le foie et la rate. Les auteurs ont pu démontrer le rôle essentiel d'*ATG7* dans l'autophagie homéostatique et dans l'autophagie induite par la carence nutritionnelle. Il n'y a pas d'autophagosomes de produits dans le foie de ces souris. Le LC3 ne forme pas de puncta (par immunofluorescence), ni ne change de poids moléculaire (par Western blot). Il n'y a pas de

formation de complexe ATG12-ATG5 démontrant l'importance d'ATG7 pour l'initiation de l'autophagie et la formation des autophagosomes.

2.7 Activateurs de l'autophagie

L'inducteur biochimique le plus connu de l'autophagie est sans aucun doute la rapamycine.^{107,}

¹¹⁶ La rapamycine, aussi appelée sirolimus, est produite de façon naturelle par une bactérie vivant sur l'île de Pâques. Elle a été isolée originalement par des chercheurs qui voulaient identifier de nouveaux antibiotiques. La rapamycine a par la suite montré des effets immunosuppresseurs. Elle est présentement utilisée chez certains patients après une transplantation d'organes. La rapamycine conduit son action immunosuppressive en inhibant la prolifération des lymphocytes. Mais son mécanisme d'action implique qu'elle peut inhiber la prolifération de toutes les cellules, la rapamycine est donc présentement à l'étude dans le traitement de divers cancers. Cependant, il est contre-indiqué de l'utiliser directement après une chirurgie car elle peut limiter la réparation tissulaire.

La rapamycine agit en bloquant l'activité MTOR. MTOR a été identifié comme la cible de l'action de la rapamycine dans les cellules, c'est pourquoi on lui a donné ce nom : mechanistic target of rapamycin. Suite à sa diffusion dans la cellule (la rapamycine est liposoluble), elle se lie à une protéine : la FKBP12. Le complexe FKBP12-rapamycine se fixe à la protéine MTOR, ce qui bloque son activité. MTOR régule plusieurs activités essentielles de la cellule, comme la croissance, la prolifération et l'autophagie. Lorsque MTOR est actif, l'autophagie est inhibée. Il y a phosphorylation d'ULK1 et cette phosphorylation est inhibitrice. Il ne peut y

avoir formation du complexe ULK, ATG13, FIP200, ATG101 nécessaire à l'initiation de l'autophagie.¹¹⁰ Je reviendrai sur le mécanisme d'action de la rapamycine plus loin dans l'introduction. Il existe d'autres inducteurs biochimiques de l'autophagie comme le resvératrol que l'on trouve dans le vin rouge.¹¹⁷ Mais la façon la plus simple d'induire l'autophagie, *in vivo*, est le jeûne.¹¹⁵

Pour étudier l'autophagie *in vitro*, on utilise régulièrement la carence en éléments nutritifs, que ce soit la carence en sérum, en glucose, ou en acides aminés. Les mécanismes en jeu ne sont pas exactement les mêmes, mais le résultat est commun : l'induction de l'autophagie par inactivation de MTOR. Cependant, il faut noter qu'il peut y avoir d'autres protéines régulatrices qui agissent en concert. Par exemple, un débalancement du ratio AMP/ATP dans la cellule, au profit d'une augmentation d'AMP lorsqu'il y a une baisse d'énergie, active la kinase AMPK qui favorise l'activation d'ULK1.¹¹⁸

Il faut aussi noter qu'il est possible d'induire l'autophagie par des voies indépendantes de MTOR. L'étude de ces voies en est à ses débuts. Le but de ces études est de trouver de nouvelles approches pharmacologiques afin d'induire l'autophagie lorsque les inhibiteurs de MTOR ne sont pas efficaces.¹⁰²

2.8 Voies signalétiques qui régulent l'autophagie

MTOR est une protéine clé du métabolisme cellulaire.¹¹⁹ Elle est une sérine/thréonine protéine kinase et fait partie de la famille des phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related kinase. MTOR

fait partie de 2 complexes protéiques différents aux rôles différents. Le complexe MTORC1 est composé des protéines suivantes : MTOR, regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin (RAPTOR), proline-rich Akt substrate 40kDa (PRAS40), mammalian lethal with sec-13 (mLST8/GβL), DEP domain containing mTOR-interacting protein (DEPTOR), Tti1 et Tel2. Le complexe MTORC2 contient, en plus de MTOR, mLST8, DEPTOR, Tti1 et Tel2 qui sont commun aux deux complexes, rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR), mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1 (mSin1) et protein observed with rictor 1 and 2 (protor1/2). Des rôles spécifiques pour chacun des complexes ont été identifiés. De plus, à l'origine, MTORC1 a été décrit comme la cible de la rapamycine, alors que le complexe MTORC2 a été défini comme étant insensible à la rapamycine (d'où le nom de RICTOR).¹²⁰ Cependant des études subséquentes allaient démontrer que le complexe MTORC2 peut être inhibé par la rapamycine, à certaines conditions et dans certains types cellulaires. Une exposition prolongée à la rapamycine empêche la formation de nouveaux complexes MTORC2, inhibant ainsi son activité.¹²¹

2.8.1 MTORC1

2.8.1.1 MTORC1 : régulation

Le complexe MTORC1 est central pour le métabolisme. Il contrôle la croissance cellulaire en régulant la synthèse protéique, la transcription des ARNm ribosomiaux et de transfert, la synthèse de lipides, l'autophagie. Il répond à divers signaux : les facteurs de croissance, le statut énergétique (glucose, ratio AMP/ATP), les acides aminés, l'oxygène, le stress (se référer à la **figure 4 A**). C'est pourquoi on le considère comme un détecteur « sensor » et intégrateur

de l'environnement afin de réguler l'homéostasie de la cellule. Il promeut la croissance lorsque les conditions sont favorables ou au contraire favorise le catabolisme lorsque les conditions sont défavorables.¹¹⁹

MTORC1 est régulé par le complexe tuberous sclerosis 1 et 2 (TSC1/TSC2 ou hamartine/tubérine) qui lui-même régule l'activité de Ras homolog enriched in brain (Rheb) GTPase nécessaire pour phosphoryler la kinase MTOR et l'activer. Le complexe TSC1/TSC2 est une GTPase-activating protein (GAP) pour Rheb, c'est donc un régulateur négatif de la voie. Il faut donc que TSC1/TSC2 soit inactivé pour activer MTORC1. Il y a plusieurs kinases capables d'inactiver TSC1/TSC2 soit AKT, ERK1/2, RSK1. La voie PI3KI est centrale pour le contrôle de MTOR par les facteurs de croissance et hormones. Après liaison du facteur de croissance à son récepteur, le second messenger phosphatidylinositol (3, 4, 5) P3 est formé grâce à l'activation de la PI3Kinase de classe I. Le second messenger favorise le recrutement de PDK1 à la membrane plasmique qui recrute à son tour AKT. Comme mentionné, AKT est responsable de l'activation de MTOR. La voie de signalisation est inhibée par la phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog) et peut être inactivée par des inhibiteurs biochimiques. Comme mentionné précédemment, la 3-méthyladénine, la wortmannin et le LY294002 peuvent agir sur la PI3Kinase de classe I.¹⁰⁷

Il y a aussi des kinases qui phosphorylent TSC1/TSC2 de façon activatrice, ce qui augmente son activité GTPase, inactive Rheb et donc inhibe MTORC1. Par exemple, AMPK, une kinase qui est activée lors des déséquilibres énergétiques, lorsque le rapport AMP sur ATP augmente, ou par un stress hypoxique, peut phosphoryler TSC2. AMPK peut aussi

phosphoryler RAPTOR, et cette phosphorylation est inhibitrice pour MTORC1. Ces mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'autophagie par le statut énergétique et l'hypoxie.¹²² La réponse au dommage à l'ADN implique aussi l'activation de TSC1/TSC2 : on observe une augmentation de l'expression de TSC2 ainsi que l'inactivation de la voie PI3K/AKT par l'augmentation de l'expression de PTEN.¹¹⁹

Les acides aminés peuvent aussi réguler l'activité MTORC1 de façon TSC1/TSC2 indépendante. Il a été montré que le positionnement du complexe MTORC1 dans la cellule pouvait être influencé par la disponibilité en acides aminés. Le positionnement de MTORC1 influence son activité. Le positionnement de MTORC1 dépend de l'activité de Rag GTPases qui interagissent avec RAPTOR et permet à MTORC1 de se lier à un complexe nommé « Ragulator ». Lorsque les Rag GTPases sont activées par la présence d'acides aminés, les complexes MTORC1 se localisent aux lysosomes par le Ragulator. Il est postulé que cette localisation favorise l'activation de MTORC1 par Rheb. Lorsque la voie PI3K/AKT est inactive, le complexe TORC1 se trouverait dans le cytoplasme.¹²³

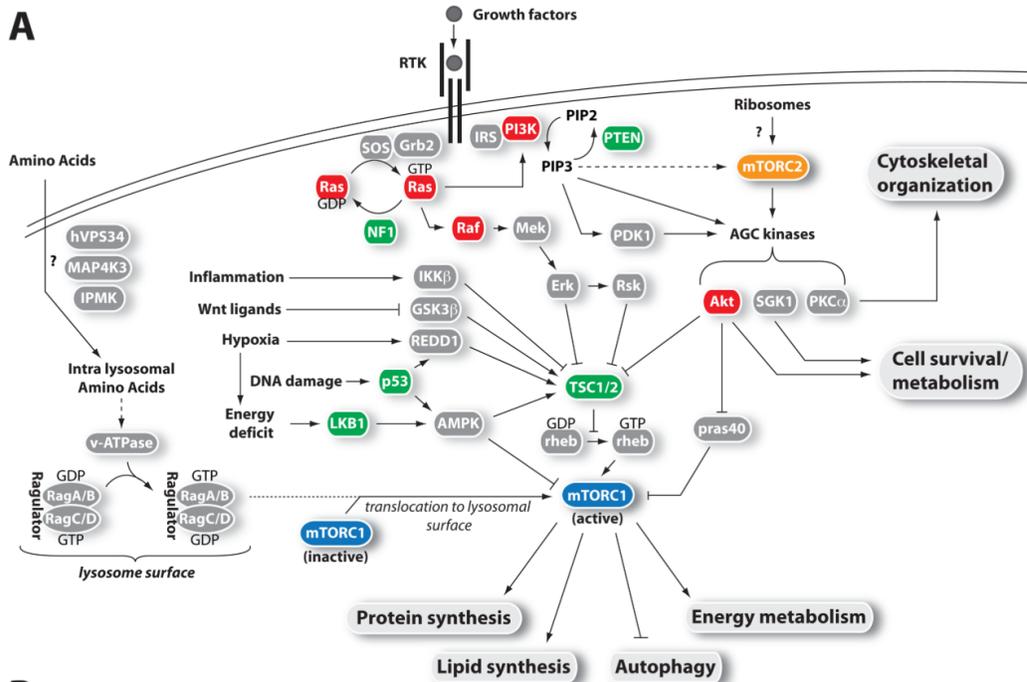


Figure 4. mTORC1 et mTORC2.

A) voies de signalisation les régulant B) leurs cibles. Voir le texte pour la description. Reproduit avec permission de Laplante et Sabatini. Cell 2012; 149:274-93.

2.8.1.2 MTORC1 : cibles

La fonction la plus étudiée de MTORC1 concerne la régulation de la synthèse protéique (se référer à la **figure 4 B**). MTORC1 phosphoryle directement RPS6KB1 (S6K1/p70S6K/ribosomal protein S6 kinase, 70 kDa, polypeptide 1) à la thréonine 389 et ce site de phosphorylation est souvent utilisé comme marqueur de l'activité MTORC1. MTORC1 phosphoryle aussi 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding protein 1). La traduction des ARN messagers CAP-dépendante nécessite la formation du complexe de « capping ». eIF4E fait partie de ce complexe. 4E-BP1 est un régulateur négatif de la traduction car son interaction avec eIF4E empêche ce dernier de former le CAP. La phosphorylation de 4E-BP1 par MTORC1 libère eIF4E et permet l'initiation de la traduction CAP-dépendante. RPS6KB1 possèdent plusieurs substrats qui agissent de concert pour favoriser la traduction des protéines. Par exemple, RPS6KB1 phosphoryle eIF4B nécessaire à l'initiation de la traduction CAP-dépendante. RPS6KB1 phosphoryle aussi la protéine ribosomale S6, qui fait partie de la sous-unité 40S des ribosomes. Cette phosphorylation est nécessaire à la traduction des protéines.¹¹⁹

MTORC1 régule la synthèse de lipides en activant le facteur de transcription SREBP1/2 (sterol regulatory element binding protein 1/2) qui favorise la transcription de gènes impliqués dans la lipogénèse. MTORC1 régule aussi le métabolisme cellulaire en favorisant la production d'ATP en activant la transcription de HIF1a dans les cellules tumorales.¹²⁴ HIF1a régule, entre autres, l'utilisation du glucose dans la cellule, il favorise la glycolyse.

Et bien sûr, MTORC1 est un régulateur négatif de l'autophagie. MTORC1 phosphoryle et inhibe ULK1 et ATG13, 2 protéines qui avec FIP200 font partie du complexe initiateur de la formation de l'autophagosome.¹²⁵ MTORC1 phosphoryle aussi AMBRA1 et l'inhibe.¹¹⁰ AMBRA1 fait partie du complexe phosphatidylinositol 3-kinase de classe III qui phosphoryle les lipides de la membrane de l'autophagosome. Donc, l'inhibition de l'autophagie par MTORC1 s'effectue sur plusieurs niveaux.

2.8.2 MTORC2

2.8.2.1 MTORC2 : régulation

La régulation de MTORC2 est beaucoup moins connue. On sait que les ribosomes sont nécessaires pour l'activation de MTORC2 et que MTORC2 doit se lier aux ribosomes pour cette activation. Cette liaison est dépendante de l'activité de la PI3K de classe I.¹²⁶ Comme nous l'avons vu, la voie PI3K/AKT est centrale pour le contrôle de la croissance cellulaire ainsi que pour le métabolisme, la prolifération, la survie et l'organisation du cytosquelette. Après liaison du facteur de croissance à son récepteur Tyrosine Kinase, la PI3KI est activée et permet le recrutement à la membrane plasmique de PDK1. PDK1 recrute à son tour AKT et le phosphoryle à la thréonine 308. AKT est responsable de l'activation de MTOR dans les 2 complexes et MTORC2 est aussi responsable de la phosphorylation de AKT à la serine 473. Cette phosphorylation est nécessaire à l'activation complète d'AKT, ce qui crée une boucle de rétroaction positive sur la voie.¹²⁷

L'activation de MTORC2 est aussi régulée par un mécanisme de feedback négatif contrôlé par MTORC1 par l'entremise, en outre, de RPS6KB1/p70S6K1.^{128, 129} La stimulation des récepteurs Tyrosine Kinases par leur ligand passe par l'intermédiaire de l'IRS (Insulin Receptor Substrate) pour activer la PI3K. L'activation de l'IRS est downrégulée par la voie MTORC1, ce qui permet de freiner et contrôler cette voie menant à la croissance et prolifération cellulaire. On peut constater que ces mécanismes de régulation sont très importants pour éviter une sur-stimulation de la voie PI3K/AKT/MTOR, ce qui aurait des effets indésirables. En effet, en cancer, des mutations entraînant une sur-stimulation de cette voie sont souvent identifiées. Par exemple, des mutations activatrices pour la PI3K ou inhibitrices pour PTEN.¹³⁰ La rapamycine est utilisée pour traiter certains cancers, comme les cancers du rein, car elle diminue la prolifération en agissant sur TORC1. Cependant, il est à noter que la rapamycine, en inactivant TORC1, inhibe la boucle de rétroaction négative de RPS6KB1 sur la voie PI3K/AKT/MTORC2 et donc permet à certaines cellules tumorales de proliférer. C'est pourquoi des inhibiteurs communs de MTORC1 et MTORC2 ont été développés. Par exemple le Torin 1 ou le PP242. Ces inhibiteurs sont à l'essai présentement pour le traitement de différents cancers.¹³¹ Malheureusement, de la même façon, dans certains types cellulaires, ces nouveaux inhibiteurs permettaient la survie de cellules qui échappent au traitement par développement de résistance due à une augmentation de l'activité de la PI3K de classe I. Donc, un traitement combinant les inhibiteurs de MTOR et de PI3K sont aussi à l'essai. De plus, comme des cellules résistent à l'action des inhibiteurs de MTOR en activant l'autophagie, une combinaison d'inhibiteurs de MTOR et d'autophagie est aussi considérée.¹³²

2.8.2.2 MTORC2 : cibles

Il y a 3 cibles connues pour MTORC2 : AKT, SGK1 (serum and glucocorticoid-induced protein kinase 1) et PKC- α (protein kinase C- α) (se référer à la **figure 4 B**). Ce sont des kinases de la famille AGC. Cette famille de kinases ont en commun un motif serine/thréonine kinase et un motif PH (Pleckstrin Homology) qui permet la liaison aux lipides de type phosphoinositides (PIP3). MTORC2 est responsable de la phosphorylation d'AKT à la serine 473. Comme AKT fait partie de la voie PI3K/AKT/MTOR, à ce titre, MTORC2 régule donc la croissance et la prolifération cellulaire, la synthèse protéique, l'autophagie, etc... Comme mentionné à la section précédente, AKT régule l'autophagie en phosphorylant le complexe TSC1/TSC2. De plus, il phosphoryle PRAS40 qui fait partie de MTORC1. AKT régule aussi la survie cellulaire par inhibition de l'apoptose. En effet, AKT phosphoryle FOXO (facteurs de transcription de la famille forkhead) qui est un facteur de transcription pour des gènes régulateurs de l'apoptose. FOXO phosphorylé par AKT est dégradé dans le cytoplasme. Lorsqu'il n'est pas phosphorylé par AKT, FOXO migre au noyau et active la transcription de Bim, Fas-L et autres gènes pro-apoptotiques.¹³³ AKT régule aussi le métabolisme par la régulation de l'utilisation de glucose. La réponse à l'insuline dans les cellules sensibles passe par l'activation de facteurs de transcription de la famille FOXO.¹³⁴ De plus, l'insuline active directement la voie PI3K/AKT/MTOR.

La réponse de SGK1 à l'activation par MTORC2 recoupe celle d'AKT dans ce sens où SGK1 régule FOXO et donc l'inhibition de l'apoptose et la régulation du métabolisme. SGK1 est aussi impliqué dans la réponse au stress par la régulation des canaux ioniques.¹¹⁹

Il a aussi été démontré que MTORC2 régule le cytosquelette d'actine. En utilisant des ARNs interférants pour les composants de MTORC2 (*mTOR*, *mLST8* ou *mAVO3/RICTOR*), Jacinto et al.¹³⁵ ont montré que l'étalement de la cellule et la polymérisation des fibres de stress étaient dépendants de MTORC2 dans des fibroblastes NIH 3T3. Cette activité de MTORC2 passe par l'activation de Rho GTPase car Rac1 permet de retrouver la formation de lamellipodes dans les cellules silencées pour MTORC2. Le groupe de Sabatini¹²⁰ a aussi identifié PKC- α comme cible de MTORC2; la phosphorylation de PKC- α par MTORC2 est impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine.

Par son action sur le cytosquelette, MTORC2 régule la polarité cellulaire et la migration.¹³⁶ MTORC2 semble donc très important pour la réparation tissulaire car les différentes cellules impliquées doivent migrer au site de la blessure pour agir. De plus, on sait que les myofibroblastes ont leur cytosquelette modifié par la formation de fibres de stress, ce qui leur donne un pouvoir de traction augmenté nécessaire pour la fermeture de la plaie.

Partie 3 Liens entre autophagie et sénescence

3.1 La sénescence

3.1.1 Sénescence vs quiescence

La sénescence est opposée à la quiescence en ce qu'elle représente un arrêt permanent du cycle cellulaire par rapport à un arrêt temporaire. Le cycle cellulaire est divisé en 4 phases : une phase Gap 1 (G1) où la cellule croît i.e. augmente sa masse en dédoublant ses organites et macromolécules, la phase S (DNA Synthesis) où il y a réplication de l'ADN, une deuxième phase Gap (G2) où la cellule continue d'augmenter sa masse, et finalement la division (phase M : Mitose). En moyenne, un cycle cellulaire s'étale sur une journée. Il existe aussi une phase appelée G0 ou quiescence, qui est l'équivalent de la phase G1 mais qui, au lieu de durer une douzaine d'heures, peut durer des jours, semaines et mêmes des années.

La progression du cycle cellulaire d'une étape à l'autre est très régulée, elle est régit par des systèmes de contrôle de qualité que l'on nomme « checkpoints ». Le cycle cellulaire est sous le contrôle de gènes régulateurs : les gènes cdc (cell-division-cycles genes). La présence des cyclines régule la progression du cycle cellulaire par leur association avec les différentes kinases dont l'activité dépend des cyclines (cdk). Les complexes cyclines-cdk sont eux aussi régulés car il existe des kinases inhibitrices de cyclines (CKI), comme p27, p21, p19, p16. Les CKI sont surtout actives lors de la transition G1/S et sont responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (voir **figure 5**). La régulation de l'expression des CKI est donc cruciale pour déterminer si l'arrêt du cycle cellulaire sera provisoire ou permanent.¹³⁷

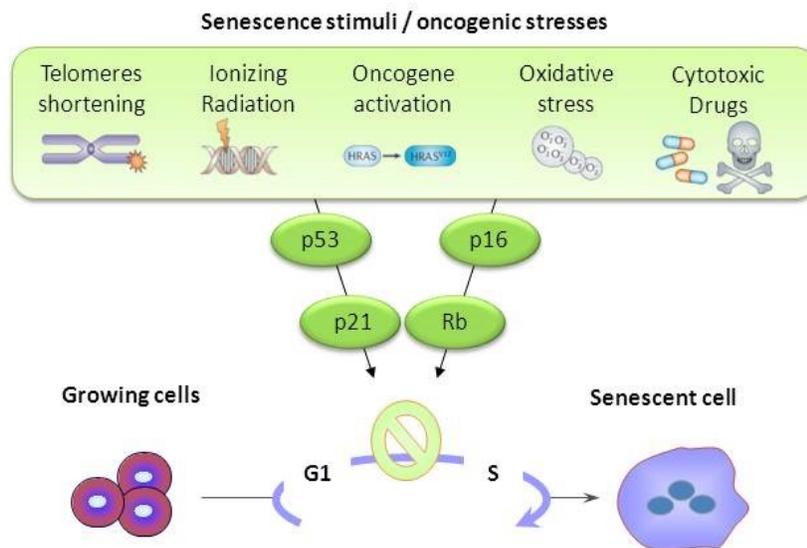


Figure 5. Stimuli menant à la sénescence et voies de signalisation impliquées.

Plusieurs stimuli sont connus pour induire la sénescence, dont le stress oxydant. Ces stimuli activent des voies de réparation de l'ADN qui convergent vers l'activation de la voie p53/p21 et/ou p16/Rb. p21 et p16 sont des kinases inhibitrices des cyclines, elles bloquent donc le cycle cellulaire. L'arrêt permanent du cycle cellulaire ainsi induit est dénommé sénescence cellulaire.

Adapté avec permission de Collado and Serrano. Nature reviews Cancer 2006; 6:472-6 (avec l'aide de Dr Nicolas Malaquin).

3.1.2 Définir la sénescence

L'arrêt irréversible du cycle cellulaire, ou sénescence, a été observé *in vitro* par Hayflick au début des années 60.¹³⁸ Il a observé que les lignées cellulaires non transformées possèdent un nombre fini de passages i.e. un nombre déterminé de divisions cellulaires pouvant être obtenu en culture. Ce phénomène a été dénommé sénescence répllicative. Plus tard, ce phénomène a été expliqué par l'attrition des télomères. Les chromosomes possèdent à leur extrémité une séquence d'ADN dite télomère. Cette séquence rapetisse à chaque division cellulaire dans les cellules somatiques car celles-ci possèdent peu ou pas d'activité télomérase i.e. de l'enzyme responsable de l'entretien des télomères.¹³⁹

In vivo, la sénescence joue un rôle positif comme mécanisme suppresseur de tumeur. En effet, la sénescence bloque la prolifération des cellules ayant subies des dommages comme par exemple des mutations et présentant un risque de transformation tumorale.¹³⁹ Cependant, la sénescence joue aussi un rôle négatif. Des études ont fait le lien entre vieillissement et sénescence. Par exemple, dans la peau de personnes âgées, on retrouve plus de cellules sénescentes.¹⁴⁰ Cependant, l'âge chronologique ne correspond pas toujours à l'âge biologique car comme nous allons le voir, des insultes infligées aux différents tissus et organes peuvent influencer l'apparition de la sénescence.

3.1.3 p53

p53 est un gène suppresseur de tumeur.¹³⁷ Il est muté (inactivation) dans 50% des cancers chez l'humain. p53 est un facteur de transcription. Il régule plusieurs voies contrôlant la destinée de

la cellule, c'est pourquoi on le décrit comme le gardien du génome. Lors d'un stress à l'ADN, p53 va induire la transcription d'un programme génétique permettant la réparation de l'ADN. Si la réparation génomique est impossible, p53 va dicter l'entrée en vigueur d'un programme génétique déclenchant l'apoptose, donc menant à la mort cellulaire. Cependant, dépendant du contexte, p53 peut aussi entraîner la mise en place du programme menant à la sénescence de la cellule. p53 régule directement la transcription de la CKI p21.

Il faut aussi savoir que p53 possède plusieurs activités reliées au contrôle du métabolisme cellulaire. Il est impliqué dans la réponse au déficit en acides aminés, la glycolyse, la respiration mitochondriale, l'autophagie.¹⁴¹ En ce qui concerne l'autophagie, le dommage à l'ADN induit la transcription p53 dépendante de TSC2 et de PTEN, ce qui résulte en une down-régulation de la voie PI3K/MTORC1 et donc peut induire l'autophagie.¹⁴² p53 est aussi impliqué dans la régulation de la sécrétion des exosomes.¹⁴³

3.1.4 Mécanismes d'activation de la sénescence

L'établissement de la sénescence par l'activation de la voie de réparation du dommage à l'ADN (DDR) comprend plusieurs étapes : 1-arrêt du cycle cellulaire par stabilisation de p53 et activation des CKI p21 et/ou p16 2-décondensation de l'hétérochromatine de la région des centromères (laissant suggérer la transcription de nouveaux gènes) 3-diminution de l'expression de la lamine B1 nécessaire à l'intégrité de la membrane nucléaire 4-modifications de l'euchromatine par déacétylation et méthylation des histones ce qui mène à la séquestration des gènes nécessaires au cycle cellulaire et à la formation de SAHF (Senescent Associated Heterochromatin Foci). Les SAHF sont identifiés en microscopie à fluorescence après

marquage des cellules avec des anticorps reconnaissant des modifications spécifiques des Histones (ex : H3K9me3 : méthylation répressive de la transcription) 5-activation du SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) qui sera décrit plus en détail ci-après 6-plus tardivement, activation de transposons (Alu, Li, SVA) suite à la dérégulation de l'hétérochromatine, apparition de CCF (Cytoplasmic Chromatin Fragments), perte d'histones 7-expression de nouveaux microRNAs : mir146a/b. Comme on peut le constater, l'établissement de la sénescence est un mécanisme complexe nécessitant plusieurs étapes.^{19, 144}

3.1.5 Marqueurs de la sénescence

Il n'existe pas un marqueur universel pour reconnaître une cellule sénescence. Les principaux marqueurs utilisés pour étudier les cellules sénescence sont : stabilisation de p53 et l'augmentation de l'expression de p21¹⁴⁵ et/ou p16,¹³⁷ l'expression de SA-beta-galactosidase (SA pour Senescence Associated) qui reflète une activité accrue des lysosomes,¹⁴⁶ une augmentation du volume de la cellule, les SAHF et le SASP.^{19, 144}

Il y a aussi les PML-NB (Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies) et les DDR-Scars (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence). Les cellules tumorales de leucémies promyélocytiques aiguës ne présentent pas de PML-NB. Les PML-NB sont des amas de protéines situés au noyau et contiennent la protéine PML. Ces amas sont présents dans les cellules sénescence suite à l'activation de p53.¹⁴⁷ Les DDR-Scars sont produits suite au dommage à l'ADN par une tentative infructueuse de réparation de l'ADN. Les mécanismes normaux de réparation échouent (activation de p53, ATM/ATR, CHK2) et cela laisse une trace permanente sur l'ADN sous la forme d'un complexe protéique associé à l'ADN. On peut

les reconnaître par marquage contre ces protéines (exemple : 53BP1) ou par des modifications spécifiques aux Histones (ex : gammaH2AX : phosphorylation de H2AX à la serine139 après dommage à l'ADN résultant en bris double brins d'ADN).¹⁴⁸

Les cellules sénescents sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance et des protéases: le fameux SASP.¹⁴⁹ La composition du SASP évolue dans le temps avec l'établissement de la sénescence, il varie aussi en fonction du type cellulaire étudié et de l'inducteur employé pour établir la sénescence. Ceci peut expliquer en partie les différents rôles attribués au SASP. Par exemple, en plus de renforcer la sénescence de manière autocrine, le SASP joue un rôle pro-tumoral sur les cellules épithéliales (MMP présentes dans le SASP dégradent ECM et favorisent l'invasion tumorale). Il joue un rôle pro-inflammatoire sur les cellules immunitaires (cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, 6, 8).¹⁹ Récemment, il a été démontré que le SASP pouvait établir la sénescence sur des cellules normales à proximité de la cellule sénescence émettrice du SASP, phénomène dénommé sénescence paracrine.¹⁵⁰ L'activation du SASP est contrôlée par l'activation de l'inflammasome qui amène l'activation de la Caspase 1 et le clivage de l'IL-1b en sa forme active. L'expression ectopique d'IL-1a est aussi capable d'induire la sénescence.¹⁵⁰

3.1.6 Causes de la sénescence

La sénescence peut se développer dans tous les types cellulaires (fibroblastes,¹³⁸ cellules immunitaires,¹⁵¹ cellules endothéliales¹⁵²). En cancer, on étudie surtout la sénescence des cellules épithéliales. Induire la sénescence des cellules épithéliales serait un moyen de déjouer le processus tumoral. Les différents types de cellules souches peuvent aussi entrer en

sénescence. Par rapport au traitement contre le cancer, la sénescence des cellules souches qui participent au développement tumoral est la bienvenue. Cependant, en général, la sénescence des cellules souches est considérée comme un phénomène accompagnant le vieillissement.¹⁹

Il existe plusieurs stimuli pouvant mener à la sénescence (**Figure 5**). Premièrement, par l'attrition des télomères comme mentionné plus haut. La sénescence peut être causée par des signaux mitotiques élevés comme l'activation d'un oncogène. La transfection de cellules avec l'oncogène Ras est un modèle d'étude d'activation de la sénescence très utilisé. Il a été montré qu'après une poussée de prolifération causée par l'oncogène, les cellules entrent en arrêt permanent du cycle cellulaire. Ce modèle cherche à reproduire ce qui peut arriver *in vivo*, chez les cellules tumorales, où il y a activation d'un oncogène.¹³⁷

La sénescence peut aussi être causée par un stress causant des dommages à l'ADN qui résulte en l'activation de la DDR (DNA Damage Response).¹⁹ Les agents stressants les plus connus sont les radiations ionisantes, les radicaux libres oxygénés (ROS) et les drogues cytotoxiques utilisées en chimiothérapie par exemple. La sénescence peut aussi être activée sans DDR ou érosion des télomères comme par exemple lors de l'expression ectopique de CKI comme p16 ou p21. Les stimuli causant la sénescence passent par différentes voies de signalisation cellulaire qui convergent vers l'activation de p53-p21 et/ou p16.

3.2 Sénescence et réparation tissulaire/fibrose

3.2.1 Contexte

Comme mentionné au point 1.1.2.2, la sénescence n'est pas seulement un mécanisme suppresseur de tumeur.¹⁹ La sénescence des myofibroblastes joue un rôle positif dans la réparation tissulaire en permettant la synthèse de MMPs capables de dégrader la matrice extracellulaire²⁰ et en activant la sécrétion de médiateurs qui activeraient les cellules du système immunitaire capables d'éliminer les cellules pro-fibrotiques.²¹

Le SASP peut cependant avoir des effets négatifs, dépendant du contexte, et perpétuer l'état de différenciation myofibroblastique. Un composant majeur du SASP est la cytokine Interleukine-6 (IL-6).¹⁴⁹ IL-6 est une cytokine pro-fibrotique dans plusieurs modèles de fibrose (rejet chronique d'allogreffe cardiaque, fibrose du foie induite par CCl₄ (carbon tetrachloride)).¹³ Chez l'humain, des quantités élevées d'IL-6 sérique corrént avec la sévérité de la sclérose systémique.¹⁵³ La source de l'IL-6 dans ces différents modèles n'est pas toujours clairement définie. L'IL-6 est produit par les leucocytes comme les macrophages et les cellules T. Les ostéoblastes, cellules musculaires lisses, fibroblastes sécrètent aussi de l'IL-6. L'entrée en sénescence et la formation du SASP chez ces différentes cellules pourraient augmenter la quantité d'IL-6 produite. Donc, l'induction de la sénescence semble être une arme à deux tranchants.

3.2.2 TGFB et CTGF

Le TGFB et le CTGF, 2 cytokines pro-fibrotiques majeures décrites aux sections **1.3.1** et **1.3.2**, ont aussi été identifiés dans le SASP. Le CTGF est sécrété par les cellules induites en sénescence par l'expression ectopique de p21.¹⁵⁴ Les fibroblastes humains en sénescence répliquative expriment des niveaux augmentés de la protéine CTGF ainsi que de son ARN messenger.¹⁵⁵ Le TGFB, au niveau protéique, est aussi augmenté dans les fibroblastes humains en sénescence répliquative.¹⁵⁵ Le TGFB est présent dans le SASP des cellules en sénescence répliquative, en sénescence induite par un oncogène et en sénescence induite par le stress oxydant.¹⁵⁶ Le SASP de ces cellules est capable d'induire la sénescence d'autres cellules, phénomène que les auteurs dénomment « bystander effect »¹⁵⁶ ou sénescence paracrine.¹⁵⁰

Donc, le TGFB ne fait pas qu'induire l'EMT, la différenciation myofibroblastique ou la prolifération cellulaire (section **1.3.1**). Plusieurs études montrent que le TGFB induit la sénescence chez plusieurs types cellulaires comme Hepatic Cell Carcinoma¹⁵⁷, mesenchymal stem cells,¹⁵⁸ cellules épithéliales.¹⁵⁹ Plusieurs de ces études indiquent que l'action pro-sénescence du TGFB est médiée par les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species).

3.2.3 ROS

3.2.3.1 Introduction aux ROS

Les ROS (dérivés réactifs de l'oxygène) sont générés lors de réactions physiologiques ou pathologiques. Ce sont des sous-produits du métabolisme cellulaire. Ils agissent sur des

composants cellulaires facilement oxydables comme certains acides aminés, les protéines, cholestérol, acides gras insaturés et acides nucléiques. Il y a plusieurs types de ROS¹⁶⁰ : oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), anion superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$), radical hydroxylé (OH), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), oxyde nitrique (NO). Il existe des sondes moléculaires permettant de détecter les ROS, de façon spécifique ou globale. Par exemple, le DHE (dihydroethidium) réagit spécifiquement avec l'anion superoxyde alors que le DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) est oxydable par tous les types de ROS. Ces molécules, en interagissant avec les ROS, deviennent fluorescentes et peuvent donc être facilement dosées par un lecteur fluoromètre, par FACS ou en microscopie confocale.¹⁶¹

Plusieurs voies métaboliques produisent des ROS, la principale étant la respiration aérobie. Les mitochondries sont le siège de la réaction dite de phosphorylation oxydative.¹⁶² Cette réaction permet le catabolisme des nutriments afin de fournir l'énergie nécessaire à la cellule, sous forme de molécules d'ATP. En même temps, des ROS comme le superoxyde et le peroxyde sont générés. La NADPH oxydase (NOX)¹⁶³ est un enzyme qui produit des ions superoxydes lors de son activité. Cet enzyme sert à transférer les électrons du NADPH à l'oxygène lors de la respiration. Des ROS (peroxyde) sont aussi produits physiologiquement dans les peroxysomes, organites responsable de la bêta-oxydation des acides gras à très longue chaîne.

Les ROS peuvent être présents à différentes concentrations dans les cellules. Aux concentrations physiologiques, ils jouent un rôle dans la signalisation intracellulaire où on les considère comme des seconds messagers¹⁶⁰. Ils peuvent affecter l'activité d'un enzyme en

modifiant son statut redox. Par exemple, la phosphatase PTEN est régulée par l'oxydation réversible de cystéines : la production de peroxyde inhibe PTEN ce qui favorise la voie PI3K/AKT suite à l'activation d'un récepteur membranaire.

Les ROS peuvent aussi être synthétisés en grande quantité. À forte concentration, les ROS peuvent avoir un effet bénéfique ou au contraire avoir des effets délétères¹⁶⁰. Par exemple, les cellules phagocytaires professionnelles peuvent produire des ROS en grande quantité dans les phagolysosomes après avoir engouffré un microbe afin de le tuer. Cette réaction s'appelle « respiratory burst ». Des ROS produits en trop grande quantité peuvent induire du dommage tissulaire. Ils peuvent causer des dommages à l'ADN et induire la réponse au dommage à l'ADN (DDR). Si les dommages ne peuvent pas être réparés, la cellule peut entrer soit en apoptose soit en sénescence. C'est pourquoi les ROS (appelé aussi stress oxydant quand ils causent des dommages aux constituants cellulaires) sont considérés comme un stimulus de la sénescence¹³⁷.

Heureusement, nous possédons des enzymes capables de détoxifier l'organisme en réduisant les ROS libérés.¹⁶³ Par exemple, la catalase du peroxyosome permet la formation d'H₂O et d'O₂ à partir de H₂O₂. La superoxyde dismutase est responsable de nous débarrasser des anions superoxydes. Et bien sûr, il existe plusieurs molécules anti-oxydantes que nous pouvons ingérer par notre diète et qui nous permettent de contrôler notre niveau de stress oxydant.¹⁶⁴

3.2.3.2 ROS, myofibroblaste et fibrose

Plusieurs groupes ont montré que la différenciation myofibroblastique nécessite la participation des ROS.⁷⁸ L'invalidation génétique de la NOX4 par siRNA bloque la différenciation myofibroblastique et la fibrose dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.¹⁶⁵ De plus, ce groupe a examiné la présence de NOX4 dans des coupes de tissu pulmonaire de patients atteints de fibrose pulmonaire interstitielle. La NOX4 est présente en quantité élevée dans des foci de myofibroblastes.¹⁶⁶

Plusieurs stimuli comme le TGF β , l'angiotensine ou le PDGF sont capables d'augmenter l'expression des NOXs et de par le fait même, d'augmenter la quantité de ROS.^{78, 165} De plus, cibler la NOX4 pour diminuer les ROS a permis de renverser le phénotype fibrotique dans un modèle de fibrose pulmonaire.¹⁶⁶

De façon plus spécifique, des études récentes ont montré que l'action du TGF β sur l'augmentation de la production de ROS se fait au niveau des mitochondries.¹⁶⁷ Dans les fibroblastes du cœur, NLRP3, une protéine essentielle à la formation de l'inflammasome, serait impliquée dans la production des ROS mitochondriaux nécessaires à la différenciation en myofibroblaste. Ce rôle de NLRP3 serait indépendant de son rôle dans l'inflammation.¹⁶⁸

Comme on peut le constater, la régulation du niveau de stress oxydant dans les cellules est très complexe et je n'ai donné que quelques exemples de l'action que peuvent avoir les ROS sur les fibroblastes. Il faut considérer que les ROS ont des rôles spécifiques à jouer dans tous les types cellulaires et dans bien d'autres processus que la fibrose, comme le vieillissement.

3.2.3.3 ROS et sénescence

Les ROS et le stress oxydant qu'ils provoquent sont un des stimuli pouvant causer la sénescence (voir **figure 5**). La sénescence cellulaire est souvent associée au vieillissement d'un organisme puisque l'arrêt du renouvellement cellulaire ou son ralentissement sont corrélés avec l'âge. Une théorie du vieillissement a été élaborée à partir des effets nocifs du stress oxydant. Cette théorie, nommée « the free radical theory of aging » énonce que les ROS produits par le métabolisme cellulaire normal amènerait l'accumulation de dommages aux constituants cellulaires, aussi bien ADN, protéines ou lipides, et cette accumulation serait la cause du vieillissement.^{169, 170}

D'autres théories sur le vieillissement existent. Par exemple, la théorie appelée « limite de Hayflick » postule que la vie d'un organisme est limitée par le nombre de division que les différentes cellules le constituant peuvent supporter. Ce nombre de division est déterminé par la longueur des télomères des chromosomes et l'activité protectrice de l'enzyme télomérase.¹⁷⁰

Une autre théorie édicte que la voie TOR contrôle le vieillissement.¹⁷¹ Il a été montré que la restriction calorique prolonge la longévité des souris. La restriction calorique diminue l'activité du complexe MTORC1. De plus, des mutations inhibitrices de la voie de signalisation TOR induisent aussi une augmentation de la durée de vie des levures, vers et mouches. La rapamycine, un inhibiteur de MTORC1, prolonge la longévité des souris.¹⁷² Ces résultats semblent suggérer que l'autophagie pourrait aussi jouer un rôle dans le vieillissement, la sénescence. Est-ce que l'autophagie joue un rôle dans la production de ROS?

3.3 ROS et autophagie

L'autophagie jouerait un rôle dans le contrôle de l'intégrité des mitochondries et leur production de ROS car l'autophagie (mitophagie dans ce cas-ci) permet la dégradation des organelles dysfonctionnelles. La mitophagie est un processus homéostatique mais peut être induite par restriction nutritionnelle.¹⁰⁶ Une réduction de la mitophagie ou de l'autophagie en général permettrait donc la « survie » de mitochondries dysfonctionnelles, l'accumulation de ROS, l'apparition du stress oxydant. Une insuffisance au niveau du processus de l'autophagie peut ainsi participer au vieillissement.

Un autre exemple où la diminution de l'autophagie est liée au vieillissement est donné par l'apparition de taches de lipofuscine (ou taches de vieillesse) au niveau de la peau, un pigment coloré qui s'accumule avec l'âge. La lipofuscine forme des agrégats qui sont difficilement digérés par les lysosomes, ceux-ci étant de moins en moins fonctionnels avec l'âge.¹⁶⁴

De plus, la diminution de l'autophagie avec l'âge pourrait être responsable de l'augmentation des processus inflammatoires qui sont souvent associés aux syndromes liés au vieillissement. Par exemple, l'autophagie permet la dégradation de NF κ B, un facteur de transcription responsable de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires.¹⁷³ Aussi, l'autophagie régulerait l'activité de l'inflammasome. Des macrophages génétiquement invalidés pour des gènes autophagiques montrent des niveaux de cytokines pro-inflammatoires accrus.¹⁷⁴

À la section **3.2.3.1**, j'ai décrit comment les ROS produits à fortes concentrations peuvent avoir des effets bénéfiques ou néfastes. Les cellules phagocytaires produisent des quantités

élevées de ROS afin de nous débarrasser des microbes. Cependant, la production de ROS de façon incontrôlée ou à un mauvais moment peut entraîner une inflammation néfaste et endommager les tissus.¹⁶³

En résumé, l'autophagie contrôle le niveau de ROS. Les ROS sont bénéfiques pour combattre les infections ou pour répondre à une insulte tissulaire en activant les processus d'inflammation et/ou de réparation. Cependant, trop de ROS peuvent mener à la différenciation myofibroblastique et à la fibrose ou à de l'inflammation chronique comme celle liée à l'âge. De plus, les ROS sont un important inducteur de la sénescence.

Partie 4 Traitements et limitations

Les mécanismes pouvant mener à la fibrose sont nombreux. Les types cellulaires impliqués sont variés. La majorité des tissus et organes peuvent être touchés. Il est difficile d'imaginer qu'un médicament pourrait être efficace pour tous les types de fibrose en toutes situations. Cela n'empêche pas les laboratoires académiques et les compagnies de rechercher des cibles thérapeutiques ainsi que de nouvelles molécules pouvant ralentir, bloquer ou même prévenir la fibrose.

Si on se réfère au site web de l'association pulmonaire canadienne, sous la rubrique fibrose pulmonaire idiopathique/traitement, on observe qu'il y a très peu de traitements disponibles au Canada pour cette maladie. En plus des corticostéroïdes comme la prednisone, on y fait mention de la pirfénidone.

Les corticostéroïdes sont des anti-inflammatoires qui peuvent être utilisés pour traiter tous les types de fibrose : comme ce sont des immunosuppresseurs, ils diminuent l'activité et le nombre de cellules lymphocytaires ainsi que l'inflammation associée aux réactions immunitaires. Ce médicament n'est d'aucune utilité s'il n'y a pas de composante immunitaire au processus fibrotique en cours ou si la balance de l'action des cellules immunitaires penche du côté anti-fibrotique. De plus, les corticostéroïdes ne peuvent être utilisés à long terme car nous avons besoin d'un système immunitaire actif pour lutter contre les infections et le cancer.

La pirfénidone (Esbriet) diminue la synthèse du TGF β ¹⁷⁵ et du TNF-alpha.¹⁷⁶ Ce composé possède donc des propriétés anti-fibrotiques et anti-inflammatoires. Il a été démontré comme ayant un effet bénéfique dans l'étude clinique internationale de phase III ASCEND (Assessment of Pirfenidone to Confirm Efficacy and Safety in IPF) d'une durée de 52 semaines et regroupant plus de 500 patients.¹⁷⁷ Une étude pour évaluer ce médicament à plus long terme est déjà en cours (RECAP par InterMune Inc/Roche).¹⁷⁸

Le nintedanib fait aussi l'objet d'étude clinique de phase III avec des résultats prometteurs. On fait état de la réduction du déclin de la fonction pulmonaire.¹⁷⁹ Le nintedanib est un inhibiteur de tyrosine kinase, il cible les récepteurs des facteurs de croissance comme VEGFR, PDGFR, FGFR qui sont impliqués dans le développement de la fibrose pulmonaire¹⁸⁰. Le nintedanib n'est pas encore approuvé par Santé Canada.

Il faut noter que les résultats expérimentaux qui précèdent les essais cliniques sont obtenus grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo* qui ne peuvent représenter la complexité et la diversité des pathologies humaines. Par exemple, le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine a été utilisé pour valider les effets anti-fibrotiques de la pirfénidone¹⁸¹ et du nintedanib.¹⁸² Ce modèle est un modèle de fibrose TGF β dépendante majoritairement mais pas exclusivement car l'inhibition biochimique du récepteur du TGF β ne bloque pas complètement la fibrose.¹⁸³ Le TGFBR est de type sérine/thréonine kinase. On constate que deux inhibiteurs avec des cibles différentes montrent des effets dans le même modèle animal.

Ceci démontre bien la complexité du phénomène pro-fibrotique, la diversité des voies de signalisation impliquées et le cross-talk possible entre ces voies. Par contre, cela nous donne aussi de l'espoir car il n'est peut-être pas indispensable de connaître la cause exacte de la fibrose chez un patient donné pour atteindre une réponse thérapeutique. Cependant, si on pouvait connaître le ou les facteurs pro-fibrotiques et les cytokines présentes et actives chez un patient, cela permettrait de mieux cibler la thérapie. Ceci sous-entend que les modalités de diagnostics, comme les marqueurs pouvant être présents dans les biopsies et le sang doivent être étudiés et identifiés. Cela fait actuellement l'objet d'intenses recherches.

Le modèle animal de fibrose pulmonaire idiopathique (bléomycine) est encore à l'étude. L'équipe du Dr Stevenson¹⁸³ a comparé les profils d'expression génique pulmonaire à différentes étapes de la fibrose murine induite par la bléomycine avec ceux de patients IPF atteints à différents degrés. Leurs résultats mettent en lumière la correspondance entre les gènes exprimés lors de la phase proliférative de la fibrose murine avec ceux exprimés dans les biopsies de poumons de patients jugés avec fibrose active (progression rapide). Ceci semble suggérer que les médicaments performant dans le modèle de fibrose pulmonaire induite à la bléomycine seraient plus efficaces chez les patients avec fibrose progressant rapidement que chez ceux dont la fibrose progresse lentement. Ceci est un autre exemple de l'utilité de cibler les thérapies et que de nouvelles thérapies seront nécessaires pour soulager les patients atteints de formes plus lentes ou plus avancées de la maladie. Ce commentaire est valide pour tous les types de fibrose : un médicament efficace en phase proliférative ou inflammatoire ne le sera pas nécessairement en phase tardive, où le tissu est moins cellularisé, ou il y a plus de cross-

linking entre les protéines de la matrice et où le remodelage de la matrice est moins efficace.¹⁸⁴

En ce qui a trait à la maladie auto-immune sclérose systémique ou sclérodermie, où on peut observer la fibrose de la peau et des organes internes, l'immunothérapie est privilégiée. On utilise, comme déjà mentionné, des corticostéroïdes, et des immunosuppresseurs comme la cyclosporine¹⁸⁵. La rapamycine est en essai clinique de phase I/II.¹⁸⁶ Des médicaments agissant sur le système vasculaire sont aussi employés pour atteindre la composante endothéliale de la maladie. Les prostacyclines et le bosentan (inhibiteur de récepteur à l'endothéline) ont pour rôle de dilater les vaisseaux sanguins et favoriser la circulation du sang. Des médicaments visant en premier lieu la composante fibrotique de la maladie comme la voie TGFB, le CTGF ou l'IL6, sont présentement à l'étude.

Selon le relevé de la littérature sur le sujet effectué par McMahan, en 2014¹⁸⁶, l'anticorps monoclonal humanisé anti-récepteur à l'IL-6, ou Tocilizumab, est le médicament le plus avancé dans les essais cliniques pour les patients sclérodermiques. De petites études ont montré des effets très prometteurs chez des patients réfractaires aux thérapies conventionnelles.¹⁸⁷ Comme pour tous les types de fibrose, un traitement adapté à la phase de la maladie, et aux cytokines et facteurs pro-fibrotiques présents seront garants du succès de la thérapie. Là encore, des marqueurs spécifiques seront nécessaires pour mesurer l'efficacité des médicaments, et pourront devenir des « end-points » biologiques pour les essais cliniques. En

effet, actuellement, l'analyse de biopsies de tissus est le moyen privilégié pour évaluer le niveau de fibrose. Des méthodes moins invasives sont nécessaires afin de mieux suivre l'évolution du patient.

En ce qui concerne la fibrose rénale, là aussi les principales cibles thérapeutiques sont la voie TGFB et le CTGF. La pirfénidone est en essai clinique de phase II alors que le fresolimumab (un anticorps anti-TGFB) est en essai clinique de phase I (évaluation chez des sujets sains). L'anticorps anti-CTGF de FibroGen est quant à lui en essai clinique de phase II. On peut souligner les essais d'un mimétique de Bone morphogenetic protein-7 (antagoniste de la voie TGFB) pour l'AKI (Acute Kidney Injury) et d'un inhibiteur de NOX (pour diminuer les ROS) dans la néphropathie diabétique.^{188, 189}

La fibrose hépatique est particulière en cela qu'il y a forte possibilité de régression de la maladie. Le foie est un organe très plastique et c'est un des seuls organes humains à pouvoir se régénérer (à part la peau). En effet, le foie humain peut se régénérer après une hépatectomie partielle.¹⁹⁰ Le foie fibrotique peut voir son état s'améliorer si la cause de la fibrose est résolue.¹⁹¹ Par exemple, les infections aux virus HBV et HCV (virus de l'hépatite de type B et C), l'abus d'alcool (Hépatite Stéatosique Alcoolique, ASH) ou de nourriture (Hépatite Stéatosique Non Alcoolique, NASH) peuvent mener à la fibrose hépatique et même au cancer du foie. Les mesures comme cesser l'alcool et diminuer la surcharge pondérale ont montré une efficacité pour freiner la progression de la fibrose hépatique. Les nouveaux antiviraux, comme

le tenofovir disoproxil fumarate¹⁹² (HBV) ou l'interféron et ribavirine¹⁹³ (HCV), diminuent la fibrose.

Les médicaments visant le TGFB et le CTGF (ex : pirfénidone, anti-CTGF) sont aussi en études cliniques pour la fibrose hépatique. Il faut noter l'étude clinique de phase 2 portant sur un anti-LOX2 comptant plus de 700 patients et ciblant le NASH. La LOX-2 (lysyl oxidase-like 2) est un enzyme qui lie ensemble le collagène et l'élastine et dont l'action est augmentée en fibrose. La LOX-2 participe aux modifications de la matrice extracellulaire¹⁹¹.

Il y a plusieurs autres modalités thérapeutiques envisagées qui sont relatées dans des revues spécialisées.^{184, 189} Les auteurs s'entendent cependant pour dire qu'une combinaison de médicaments, comme utilisée dans la lutte contre le cancer, sera probablement nécessaire pour venir à bout de ce fléau qu'est la fibrose. La connaissance des mécanismes et voies de signalisation impliqués dans la fibrogénèse est donc primordiale afin d'élaborer des stratégies curatives.

Partie 5 Hypothèse et Objectifs

5.1 Hypothèse

Le dommage endothélial et la raréfaction microvasculaire sont des éléments clés initiateurs de processus de réparation tissulaire anormaux comme la fibrose. Cette situation entraîne la mise en branle de processus de survie dans les cellules avoisinantes :

- 1) par des mécanismes intrinsèques aux cellules comme l'autophagie et la sénescence
- 2) par la production de facteurs capables d'agir sur les cellules environnantes (effet paracrin) ou sur elles-mêmes (effet autocrin).

L'autophagie et la sénescence sont connues comme pouvant participer au processus fibrotique. Des études chez l'animal montrent un effet diamétralement opposé pour chacun de ces mécanismes dépendant du contexte ou du modèle utilisé. Un rôle protecteur ou nocif peut être attribué à l'autophagie ou à la sénescence. Cependant, le rôle de l'autophagie et de la sénescence dans la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste reste à éclaircir. Le myofibroblaste est indispensable au développement de la fibrose car il est responsable de la production exagérée de matrice extracellulaire. La compréhension des processus de différenciation du fibroblaste en myofibroblaste est donc importante pour l'élaboration de stratégies visant à contrôler le processus fibrotique. À ce jour, les traitements contre la fibrose sont limités et sous-optimaux.

Nous émettons donc l'**hypothèse** suivante :

Une autophagie soutenue induite par une carence en éléments nutritifs favorise la sénescence du fibroblaste et la différenciation myofibroblastique.

5.2 Objectifs

5.2.1 Objectif 1

Étudier les liens entre autophagie et différenciation myofibroblastique

- 1) Déterminer si la carence en éléments nutritifs du fibroblaste induit l'autophagie
- 2) Déterminer si la carence en éléments nutritifs du fibroblaste induit sa différenciation en myofibroblaste
- 3) Si tel est le cas, déterminer les médiateurs et voies de signalisation impliqués
- 4) Démontrer l'importance de l'autophagie pour la différenciation myofibroblastique.

5.2.2 Objectif 2

Étudier les liens entre l'autophagie, la sénescence et la différenciation myofibroblastique

- 1) Déterminer si la carence en éléments nutritifs du fibroblaste induit la sénescence
- 2) Si tel est le cas, déterminer les médiateurs et voies de signalisation impliqués
- 3) Démontrer l'importance de l'autophagie pour la sénescence et la différenciation myofibroblastique.

Résultats expérimentaux

6.1. Article 1

Autophagy fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF.

Bernard M, Dieudé M, Yang B, Hamelin K, Underwood K, Hébert MJ.

Publié dans : Autophagy. 2014;10(12):2193-207.

Contributions des coauteurs:

Monique Bernard : planification et réalisation de 90% des expériences, analyse et interprétation des résultats, rédaction de l'article.

Mélanie Dieudé : interprétation des résultats et rédaction de l'article

Bing Yang : réalisation d'expériences avec le Torin 1

Katia Hamelin : réalisation de Western Blots

Katy Underwood : réalisation de Western Blots

Marie-Josée Hébert : planification des expériences, analyse et interprétation des résultats, rédaction de l'article, support financier.

Autophagy fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF

Monique Bernard, Mélanie Dieudé, Bing Yang, Katia Hamelin, Katy Underwood and Marie-Josée Hébert*

Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

Running title: Autophagy and myofibroblast differentiation

*Address correspondence and reprint requests to: Dr. Marie-Josée Hébert, CRCHUM, 900 St-Denis Street, Viger tower, room R12.218, Montreal, QC, Canada H2X 0A9. Telephone: (514) 890-8000 Extension 30322, Fax: (514) 412-7944.

DISCLOSURE

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

Keywords: AKT, ATG7, autophagy, connective tissue growth factor (CTGF), differentiation, fibroblast, fibrosis, MTORC2, myofibroblast, rapamycin

Abbreviations: 3-MA, 3-methyladenine; ACTA2, actin, alpha 2, smooth muscle, aorta; Ctl, control; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; ECM, extracellular matrix; FBS, fetal bovine serum; GF, growth factor; iso, isotype control; LC3B, MAP1LC3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta); LY, LY294002; N, normal growth medium; R, rapamycin; SS, serum-free (starvation) medium; T, TGFB1 (transforming growth factor, beta 1); TUBA, tubulin, alpha; V, vehicle; W, wortmannin; WB, western blotting.

ABSTRACT

Recent evidence suggests that autophagy may favor fibrosis through enhanced differentiation of fibroblasts in myofibroblasts. Here, we sought to characterize the mediators and signaling pathways implicated in autophagy-induced myofibroblast differentiation. Fibroblasts, serum starved for up to 4 days, showed increased LC3-II/-I ratios and decreased SQSTM1/p62 levels. Autophagy was associated with acquisition of markers of myofibroblast differentiation including increased protein levels of ACTA2/ α SMA (actin, alpha 2, smooth muscle, aorta), enhanced gene and protein levels of COL1A1 (collagen, type I, alpha 1) and COL3A1 and the formation of stress fibers. Inhibiting autophagy with 3 different class I phosphoinositide 3-kinase and class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) inhibitors or through *ATG7* silencing prevented myofibroblast differentiation. Autophagic fibroblasts showed increased expression and secretion of CTGF (connective tissue growth factor), and *CTGF* silencing prevented myofibroblast differentiation. Phosphorylation of the MTORC1 target RPS6KB1/p70S6K kinase was abolished in starved fibroblasts. Phosphorylation of AKT at Ser473, a MTORC2 target, was reduced after initiation of starvation but was followed by spontaneous rephosphorylation after 2 days of starvation, suggesting the reactivation of MTORC2 with sustained autophagy. Inhibiting MTORC2 activation with long-term exposure to rapamycin or by silencing *RICTOR*, a central component of the MTORC2 complex abolished AKT rephosphorylation. Both *RICTOR* silencing and rapamycin treatment prevented CTGF and ACTA2 upregulation, demonstrating the central role of MTORC2 activation in CTGF induction and myofibroblast differentiation. Finally, inhibition of autophagy with PtdIns3K inhibitors or *ATG7* silencing blocked AKT rephosphorylation.

Collectively, these results identify autophagy as a novel activator of MTORC2 signaling leading to CTGF induction and myofibroblast differentiation.

INTRODUCTION

In most if not all organs, tissue repair follows a stereotypical sequence of events that includes the differentiation of resident fibroblasts and stromal cells into myofibroblasts. In turn, differentiated myofibroblasts produce increased amounts of extracellular matrix (ECM) components such as COL1A1 and COL3A1 and acquire a contractile phenotype through enhanced expression of ACTA2 and formation of stress fibers.¹⁻³ Myofibroblasts are key effectors of tissue repair and, under the influence of appropriate extracellular signals, favor tissue remodeling and wound closure. In fibrotic disorders, persistent myofibroblast accumulation fuels inappropriate ECM deposition, contracture, tissue deformation and loss of function.³⁻⁵ TGF β (transforming growth factor, beta) is one of the first mediators shown to mediate both initiation and perpetuation of myofibroblast differentiation.^{3, 6} TGF β gene and protein expression are increased in an array of fibrotic disorders including pulmonary fibrosis, liver cirrhosis, chronic renal failure and systemic sclerosis.⁷⁻¹⁰ In the last decade, a large body of evidence has demonstrated that CTGF/CCN2, is another central mediator of myofibroblast differentiation and fibrosis. CTGF expression is activated downstream of TGF β -dependent SMAD signaling and various reports point to CTGF as a key activator of myofibroblast differentiation.¹¹ Also, the secretion of CTGF enhances TGF β signaling through increased receptor and cell-surface binding and SMAD phosphorylation favoring an autocrine fibrogenic amplification loop.¹² Increased expression of CTGF has also been reported in a wide variety of fibrotic conditions including liver, renal and pulmonary fibrosis and systemic sclerosis.¹³⁻¹⁸ More recently, different reports have shown that, in certain systems, CTGF can induce and sustain myofibroblast differentiation and development of fibrosis through TGF β -independent pathways.^{19,20} The pathways that foster CTGF overexpression independently of TGF β -

signaling remain incompletely characterized but appear to involve, at least in part, responses to stress and hypoxia.¹⁹⁻²²

Autophagy is a highly conserved catabolic pathway activated in response to stress or starvation. During autophagy, damaged organelles and selected proteins are sequestered within autophagosomes and targeted for degradation following autophagosome-lysosome fusion as a means of sustaining metabolism. Autophagy is initiated by MTORC1 inhibition, which facilitates activation of the PIK3C3/VPS34-PIK3R4-AMBRA1 complex required for initiation of autophagosome formation.²³ Recent studies have highlighted a correlation between dysregulated autophagy and the development of fibrosis.²⁴ Both up- and downregulation of autophagy have been associated with fibrosis in various organs, highlighting the potentially diverse functional role that autophagy may play in the various phases of response to stress and tissue repair.²⁴ In models of liver fibrosis, reduced autophagy was shown to prevent differentiation of hepatic stellate cells into myofibroblast-like cells therefore leading to reduced fibrogenesis.^{25, 26} Fibrogenic cells of kidney and lung origin have also been shown to rely on autophagy to maintain an activated and fibrogenic phenotype.²⁶ However, the signaling pathways and central mediators linking autophagy to myofibroblast differentiation and fibrosis remain largely undefined. Whether autophagy leads to fibrosis or prevents the onset of fibrosis is probably, at least in part, related to the cell compartments that are engaging the autophagic response and the downstream signalling pathways that may be triggered by the autophagic program.

Here, we sought to characterize the impact of autophagy on myofibroblast differentiation. We report that, in fibroblasts, prolonged autophagy is associated with

inhibition of mTORC1 activation and, unexpectedly, enhanced mTORC2 activation, which in turn triggers CTGF-dependent myofibroblast differentiation.

Results

Autophagy is central to myofibroblast differentiation induced by prolonged starvation

To evaluate the functional importance of growth factor deprivation in the simultaneous activation of autophagy and myofibroblast differentiation, human embryonic lung fibroblasts were exposed to serum-free (starvation) medium (SS). LC3-II/-I ratios increased rapidly in starved fibroblasts (**Fig. 1A**) and were further increased in the presence of bafilomycin A₁, an inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPases essential for the acidification of autophagic vacuoles (**Fig. 1B**). Infection with a baculovirus vector expressing GFP-LC3B revealed enhanced accumulation of LC3⁺ puncta in starved fibroblasts, which was further increased by bafilomycin A₁ (**Fig. 1C**). Protein levels of SQSTM1, an autophagic substrate, decreased after 4 h of starvation and remained low thereafter (**Fig. 1D**). Markers of autophagy in starved cells were increased compared with cells maintained in normal culture conditions for up to 7 days (**Fig. S1A, S1B**). Collectively, these results suggest a sustained enhanced autophagic flux in serum-starved fibroblasts.²⁷

We then evaluated whether markers of myofibroblast differentiation³ were modulated in association with autophagy. Protein levels of ACTA2 increased significantly after 4 days of serum starvation (**Fig. 1E**). After 4 days, serum-starved fibroblasts also showed enhanced ACTA2 protein levels and the presence of organized stress fibers by immunofluorescence microscopy (**Fig. 1F**). *COL1A1* and *COL3A1* mRNA levels (**Fig. 1G**) and proCOL1A1 protein levels (**Fig. S1C**) also increased in starved fibroblasts. Similarly, in mouse embryonic fibroblasts and adult human lung fibroblasts, we found an association between increased autophagy upon long-term serum starvation and evidence of myofibroblast differentiation

(**Fig. S1D**). Fibroblasts maintained in normal culture conditions for up to 7 days did not show evidence of myofibroblast differentiation (**Fig. S1B**).

To analyze the functional role of autophagy in myofibroblast differentiation, we inhibited the autophagic response in starved fibroblasts with 3-methyladenine (3-MA), wortmaninn (W) or LY294002 (LY).²⁸ In starved cells these chemicals inhibit PtdIns3K.²⁸⁻³⁰ All 3 inhibitors prevented enhanced LC3-II/-I ratios upon starvation (**Fig. 2A**) and also prevented upregulation of ACTA2 (**Fig. 2B and S2A, S2B**) and proCOL1A1 (**Fig. S2C**). Autophagy inhibition also prevented the formation of stress fibers and reduced collagen mRNA synthesis (**Fig. 2C, 2D**). Inhibiting autophagy through silencing of the key autophagic gene *ATG7*³¹ prevented myofibroblast differentiation (**Fig. 2E, 2F**) further supporting the central role of autophagy in triggering pathways leading to myofibroblast differentiation. We also considered the potential role of cell death in our system. In previous work, we showed that WI-38 fibroblasts serum starved for up to 7 days maintained low levels of apoptosis and no sign of necrosis.^{32, 33} Also, PARP cleavage, another read-out of apoptotic cell death, is not enhanced in fibroblasts serum starved for 4 or 7 days (**Fig. S2D**). Collectively, these results suggest that cell death-dependent pathways are unlikely contributors to the association between autophagy and myofibroblast differentiation.

TGFB-independent and CTGF-dependent pathways control autophagy-induced myofibroblast differentiation

We then sought to characterize the mediators implicated in autophagy-induced myofibroblast differentiation. TGFB is a classical inducer of myofibroblast differentiation,⁶ and fibrogenic signaling downstream of TGFB involves the SMAD family of transcriptional activators.³⁴ To determine if TGFB signaling is implicated in autophagy-induced myofibroblast differentiation,

SMAD2 phosphorylation was evaluated by immunoblotting in serum-starved fibroblasts. Serum starvation failed to induce SMAD2 phosphorylation, whereas exposure to recombinant TGFB1 induced strong SMAD2 phosphorylation (**Fig. 3A and S3A**). Since TGFB can trigger fibrogenic signals through noncanonical SMAD-independent pathways,⁶ we also evaluated ACTA2 protein levels in serum-starved fibroblasts in the presence of antibodies neutralizing all TGFB1, 2 and 3 isoforms or isotype-matched control. Recombinant TGFB1 was used as a positive control for the neutralizing capacity of the anti-TGFB antibody. Anti-TGFB neutralization failed to reduce myofibroblast differentiation in starved fibroblasts (**Fig. 3B lane 2**) but effectively dampened ACTA2 overexpression induced by recombinant TGFB1 (**Fig. 3B lane 5**). Collectively, these results suggest that autophagy elicits myofibroblast differentiation largely through TGFB-independent pathways.

CTGF is increasingly recognized as a downstream integrator of various fibrogenic stimuli and a specific marker of fibrotic tissues.^{35,36} Hence, we evaluated if starvation modulates *CTGF* mRNA and protein levels. Prolonged starvation led to a significant increase in *CTGF* mRNA level (**Fig. 3C**). There was an initial decrease in cellular CTGF protein levels upon initiation of starvation. This was followed, after 2 and 4 days of starvation, with a progressive increase in CTGF levels (**Fig. 3D and S3B**). Also, extracellular release of CTGF rose over time in serum-starved fibroblasts (**Fig. 3E**). We then investigated the functional importance of CTGF in starvation-induced myofibroblast differentiation. Blocking CTGF upregulation with siRNAs significantly lowered ACTA2 protein levels in autophagic fibroblasts (**Fig. 3F**), establishing a central role for CTGF in myofibroblast-differentiation triggered by starvation.

To test whether autophagy is an upstream regulator of CTGF expression in starved cells, we inhibited autophagy with PtdIns3K inhibitors and evaluated intracellular and extracellular CTGF protein levels. LY294002 (**Fig. 4A**), 3-MA and wortmannin (**Fig. S4**) all prevented upregulation of intracellular CTGF protein levels in fibroblasts serum starved for 4 days. CTGF secretion (**Fig. 4B**) and *CTGF* mRNA levels (**Fig. 4C**) were also significantly reduced in fibroblasts serum starved in the presence of LY294002. To further characterize the importance of the autophagic process in regulating CTGF levels, we inhibited autophagy through *ATG7* silencing. Again, inhibition of autophagy prevented CTGF upregulation (**Fig. 4D**). Collectively, these results confirm that autophagy is an upstream regulator of CTGF expression.

Implication of the MTORC1 and MTORC2 pathways in autophagy-induced myofibroblast differentiation

Inhibition of MTOR signaling prevents myofibroblast differentiation in other systems.³⁷ We therefore considered the possibility that MTOR-dependent pathways could be implicated in autophagy-induced myofibroblast differentiation. Phosphorylation of the MTORC1 downstream target RPS6KB1³⁸ was rapidly and durably decreased in serum-starved fibroblasts (**Fig. 5B and S5A**). Phosphorylation of the MTORC2 target AKT at Ser473³⁹ initially decreased upon initiation of serum starvation (**Fig. 5A**). However, after 2 days of serum starvation, AKT was progressively rephosphorylated at Ser473 (**Fig. 5A**), suggesting the reactivation of MTORC2 with prolonged starvation.

We then evaluated the impact of rapamycin on phosphorylation of MTORC1 and MTORC2 targets, autophagy and myofibroblast differentiation. Rapamycin induces autophagy

by interacting with FKBP12 leading to MTORC1 inhibition³⁸ whereas long-term exposures to rapamycin can, in certain circumstances, inhibit MTORC2 by preventing formation of new MTORC2 complexes.^{39, 40} In starved and unstarved fibroblasts, rapamycin decreased RPS6KB1 phosphorylation confirming its MTORC1 inhibitory activity (**Fig. 5B and S5B**) and enhanced autophagy with increased LC3-II/-I ratios or decreased SQSTM1 protein levels (**Fig. 5C and S5B**). Rapamycin also significantly decreased AKT rephosphorylation at Ser473 in fibroblasts that were serum starved for longer than 2 days (**Fig. 5B**) whereas, in unstarved fibroblasts, rapamycin did not reduce and rather enhanced MTORC2 activity, as demonstrated with increased AKT phosphorylation (**Fig. S5B**). This translated into enhanced myofibroblast differentiation with increased expression of CTGF and ACTA2 (**Fig. S5B**). This result is consistent with previous reports showing that rapamycin preferentially inhibits MTORC1 vs MTORC2 and that MTORC1 blockade can release MTORC1-dependent inhibition of MTORC2.^{39, 41} However, in starved cells, rapamycin decreased MTORC2 activity leading to inhibition of myofibroblast differentiation. Rapamycin prevented the upregulation of both ACTA2 and intracellular CTGF protein levels in serum-starved fibroblasts (**Fig. 6A**) and also significantly reduced CTGF secretion (**Fig. 6B**). Serum-starved fibroblasts exposed to rapamycin also showed reduced *COL1A1* mRNA level (**Fig. 6C**) and proCOL1A1 protein level (**Fig. S6A**). We also exposed starved cells to Torin 1, a dual inhibitor of the MTOR complexes. Torin 1 inhibited MTORC1 and MTORC2 activities, reduced CTGF secretion and ACTA2 and proCOL1A1 synthesis (**Fig. S6B, S6C, S6D**). Collectively, these results suggest that MTORC2 activity is likely central for autophagy-induced myofibroblast differentiation.

To explore further the importance of MTORC2 activation in autophagy-induced myofibroblast differentiation, *RICTOR*, an integral component of the MTORC2 complex, was

silenced. *RICTOR* silencing in serum-starved fibroblasts prevented AKT phosphorylation at Ser473 (**Fig. 6D**). *RICTOR* silencing also blocked ACTA2 upregulation (**Fig. 6D**). This was associated with reduced intracellular CTGF protein levels and reduced secretion of CTGF (**Fig. 6D, 6E**). Silencing RPTOR, a constituent of the MTORC1 complex, in starved fibroblasts did not modulate ACTA2 and CTGF levels (**Fig. S6E**). Collectively, these results identify MTORC2 activation as a central regulator of CTGF upregulation and myofibroblast differentiation in serum-starved fibroblasts.

Autophagy is a novel activator of MTORC2-signaling

We then sought to evaluate whether autophagy *per se* was central to MTORC2 activation in our system. Blocking autophagy in starved fibroblasts with 3-MA, wortmannin or LY294002 significantly reduced phosphorylation of AKT at Ser473 (**Fig. 7A**), but did not modulate MTORC1 activity (**Fig. S7A, S7B**). To rule out the possibility that these autophagy inhibitors could directly alter MTORC2 activity independently of autophagy, we also evaluated the impact of *ATG7* silencing on Ser473 AKT phosphorylation. *ATG7* silencing reduced AKT phosphorylation in starved fibroblasts (**Fig. 7B**), demonstrating the importance of the autophagic response in triggering MTORC2 activation. Also, in starved fibroblasts silenced for *ATG7*, transduction with a constitutively active AKT construct enhanced myofibroblast differentiation, with increased protein levels of CTGF and ACTA2 (**Fig. S7C**). Collectively, these results identify sustained autophagy as a novel activator of MTORC2-dependent signaling leading to enhanced CTGF expression and secretion which in turn fosters myofibroblast differentiation (**Fig. 8**).

DISCUSSION

Mounting evidence suggests that dysregulated autophagy plays a central role in abnormal repair processes. Fibrosis, a maladaptive form of tissue remodeling, is characterized by the sustained presence of myofibroblasts defined by an enhanced capacity to produce ECM components and to exert a tensile force on the ECM. This leads to ECM thickening and contraction, loss of the normal tissue architecture and loss of function. Fibrosis characterizes most forms of chronic organ failure including liver cirrhosis,⁴² renal failure⁴³ and pulmonary fibrosis.⁴⁴ Both enhanced and decreased autophagy have been linked to fibrosis, suggesting that the timing of the autophagic process, the cell types at play and the downstream pathways triggered by autophagy weave a complex interplay of responses that may be either beneficial or detrimental to tissue repair. In murine models of liver injury, genetic invalidation of the central autophagic gene *ATG7* specifically in hepatic stellate cells prevents their myofibroblast differentiation and significantly decreases liver fibrosis.²⁶ An association between the activation of autophagy and acquisition of myofibroblast markers has also been documented in renal mesangial cells and pulmonary fibroblasts.^{25, 26} However, the use of the MTOR inhibitor rapamycin, a classical inducer of autophagy, in models of renal, pulmonary and skin fibrosis prevents or decreases fibrotic indices including myofibroblast differentiation.^{37,45,46} Here, we sought to characterize the pathways linking autophagy with myofibroblast differentiation in stromal cells and to define the various levels of cross-talk between autophagy and MTOR-dependent signaling regulating myofibroblast differentiation. Using starvation as a classical inducer of autophagy in fibroblasts, we demonstrate not only temporal relations between sustained autophagy and myofibroblast differentiation but a central role for autophagy in triggering myofibroblast differentiation. Preventing development of autophagy through

inhibition of PtdIns3K with LY294002, wortmannin or 3-MA blocked myofibroblast differentiation. Inhibiting autophagy through *ATG7* silencing also prevented myofibroblast differentiation.

Our results demonstrate that in a pure fibroblast system, autophagy enhances myofibroblast differentiation through TGF β -independent pathways. Indeed, we observed no evidence of SMAD signaling in our system. Also, neutralizing antibodies against all active isoforms of TGF β failed to prevent autophagy-induced myofibroblast differentiation while effectively blocking TGF β -induced differentiation. These results do not, however, rule out a potential contribution of TGF β *in vivo* where the draw of immune cells to the sites of tissue remodeling could accentuate myofibroblast differentiation via TGF β -dependent pathways. Nonetheless, our results demonstrate that in fibroblasts, autophagy triggers an intrinsic program of myofibroblast differentiation largely dependent on the upregulation of CTGF expression and secretion. Several lines of evidence support the central role of CTGF in inducing autophagy-dependent myofibroblast differentiation. Starvation initially decreased CTGF levels but prolonged starvation favored CTGF re-expression. Inhibiting autophagy in starved fibroblasts, either through PtdIns3K inhibition or *ATG7* silencing, prevented re-expression of CTGF. Finally, silencing *CTGF* in starved fibroblasts blocked myofibroblast differentiation.

CTGF is a cysteine-rich 38-kDa member of the CCN early-response gene family that was first described as an important downstream effector of TGF β ⁴⁷ and a potentiator of TGF β 's fibrogenic actions.¹² Mounting evidence gathered over the past decade has demonstrated that CTGF can initiate fibrogenic responses independently of TGF β .^{35,36} CTGF is increasingly recognized as a central fibrogenic mediator upregulated in a variety of fibrotic

disorders and is overexpressed prior to and in association with fibrosis development.^{35, 36} CTGF acts as a matricellular protein rather than a conventional growth factor, interacting with multi-domain structures in association with various cell surface receptors (integrins, proteoglycans, low-density lipoprotein receptor-related protein). CTGF-neutralizing antibodies prevent renal and pulmonary fibrosis⁴⁸⁻⁵⁰ and reduction of CTGF expression by antisense treatment ameliorates renal tubulo-interstitial fibrosis⁵¹ and prevents myofibroblast differentiation of hepatic stellate cells.⁵² In humans, CTGF is upregulated in various chronic fibrotic disorders, including liver fibrosis, systemic sclerosis, diabetic nephropathy, and chronic allograft nephropathy.^{17, 53-58}

Our results also highlight the central importance of MTORC2 in autophagy-induced myofibroblast differentiation. In our system, phosphorylation of the MTORC1 downstream target RPS6KB1 was low in starved fibroblasts and exposure to rapamycin or Torin 1 further reduced RPS6KB1 phosphorylation. The pattern of MTORC2 activation in starved fibroblasts, monitored by AKT phosphorylation at serine 473, was quite distinct. As expected, AKT phosphorylation rapidly decreased upon starvation but was followed by spontaneous rephosphorylation after 2 days. In starved cells, blocking MTORC2 activity, with rapamycin, Torin 1 or *RICTOR* silencing, prevented myofibroblast differentiation. In unstarved cells, however, rapamycin inhibited MTORC1 and triggered autophagy, but failed to reduce AKT phosphorylation. In this context, rapamycin treatment enhanced MTORC2 activity and enhanced myofibroblast differentiation. These results are consistent with previous reports showing that rapamycin preferentially inhibits MTORC1 vs MTORC2 and that MTORC1 blockade can release MTORC1-dependent inhibition of MTORC2.^{39, 41} However, in a

situation where MTORC1 activity is absent, such as starvation, prolonged rapamycin treatment can display inhibitory activity toward MTORC2.

To further define the importance of autophagy in MTORC2 activation, we inhibited autophagy in starved fibroblasts with inhibitors of PtdIns3K or by silencing *ATG7*. Both methods concurred in demonstrating a central role for autophagy in MTORC2 activation. Also, when *ATG7* silenced starved cells were transduced with a constitutively active AKT construct, myofibroblast differentiation was enhanced. These results demonstrated that MTORC2 is active downstream of autophagy and drives myofibroblast differentiation.

The conventional dogma proposes that MTORC1 regulates mRNA translation and cellular proliferation while MTORC2 activation regulates reorganization of the actin cytoskeleton.⁴⁰ Our results demonstrate that long-term MTORC2 activation leads to important changes in gene and protein expression patterns in fibroblasts, favoring the development of a fibrogenic microenvironment. These results are in line with recent reports demonstrating that MTORC2 can regulate expression of stress and hypoxia-induced proteins of potential importance in controlling cellular adaptation to external stress.⁵⁹ Our results further support the notion that MTORC2 can act as an upstream regulator of stress-induced proteins and identify CTGF as a novel downstream product of MTORC2 signaling.

Our results are consistent with the work of Hernandez-Gea V et al., showing that autophagy of hepatic stellate cells enhances liver fibrosis.^{25, 26} Our results may, however, be seen as contradictory to work published by Araya and colleagues demonstrating an inhibitory function for autophagy in myofibroblast differentiation of pulmonary fibroblasts.⁶⁰ A number of reasons could explain this discrepancy, including differences in duration of autophagy and autophagy inducers. Both studies, however, highlight the importance of MTOR-dependent

pathways in controlling myofibroblast differentiation. Also, our work highlights the importance of duration of autophagy on myofibroblast differentiation. In our system, short-term autophagy (up to 24 h) did not activate MTORC2, and failed to increase CTGF secretion and myofibroblast differentiation. Prolonged autophagy, however, induced MTORC2 activation, which in turn promoted CTGF secretion and myofibroblast differentiation (**Fig. 8**).

In summary, the present results lend further support for a key role for sustained autophagy as a central regulator of myofibroblast differentiation. Long-term starvation, while repressing MTORC1 activation, triggers activation of the MTORC2 complex, culminating in enhanced synthesis and secretion of the fibrogenic mediator CTGF, which in turn initiates a program of myofibroblast differentiation. These results provide novel insights into the fibrogenic molecular pathways triggered by the autophagic program and highlight new potential targets of intervention for preventing maladaptive myofibroblast differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

WI-38 human fibroblasts from normal embryonic lung tissue were purchased from the American Type Culture Collection (CCL-75), grown in fibroblast basal medium (Lonza, CC-3131) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS; Wisent, 090150) (normal medium [N]) and used between passages 6 and 8. Normal human lung fibroblasts (Lonza, CC-2512) and mouse embryonic fibroblasts (ATCC, CRL-2214) were grown in DMEM (Wisent, 319-005-CL) with 10% FBS. For growth factor deprivation, the fibroblasts were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; Wisent, 311-425-CL) before being exposed to serum-free medium. The media were replaced every other day. Conditioned cell culture media were centrifuged at 1,200 g for 15 min at 4 °C and kept at -20 °C for further analysis. The cells were plated at a density of 20,000 cells/cm² in 6-well plates and exposed to experimental conditions or vehicle when they reached 80-90% confluency.

Immunoblotting

Cellular proteins were extracted, separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed, as described previously.^{19,32,61} To compare levels of secreted proteins, 3 ml of conditioned medium were concentrated by centrifugation in a 5,000 molecular weight cut-off Vivaspin 500 system (Sartorius Stedim Biotech, VS0112) at 15,000 g, followed by electrophoresis and western blotting (WB). The antibodies used for WB were anti-ACTA2/ α SMA (Sigma-Aldrich, A2547), anti-CTGF (Santa Cruz Biotechnology, sc-14939), anti-LC3B (Novus, NB600-1384), anti-mouse SQSTM1/p62 (MBL, PM045B), anti-human SQSTM1/p62 (Cell Signaling Technology, 8025), anti-phospho-RPS6KB1/p70S6K (Thr389;

Cell Signaling Technology, 9205), anti-phospho-AKT (Ser473; Cell Signaling Technology, 9271) and anti-AKT (Cell Signaling Technology, 9272), anti-RICTOR (Cell Signaling Technology, 2114), anti-RPTOR (Cell Signaling Technology, 2280), anti-PARP (Cell Signaling Technology, 9542), anti-phospho-SMAD2 (Millipore, AB3849) and anti-SMAD2/3 (Millipore, 07-408), anti-proCOL1A1/collagen type I (Meridian, T59103R), anti-ATG7 (R&D Systems, MAB6608), and anti-HA (Roche Applied Science, 11 666 606 001). Membranes were stained with Ponceau S Red (Sigma, P-3504) as loading control, or, alternatively, after initial probing, they were stripped and re-probed with anti-alpha-tubulin (Calbiochem, CP06). Densitometric analyses were conducted with AlphaImager, version 3.2 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA). Data are expressed in arbitrary units.

Immunofluorescence microscopy

Cells were grown in 8-well glass slides (Nalge Nunc, Lab-Tek II 154534), rinsed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde. The slides were washed 3 times with PBS before permeabilization and after each subsequent step. Permeabilization was done with 0.1% Triton X-100 (Sigma, T9284) in PBS for 15 min. Chamber slides were blocked with PBS/10% donkey serum (Sigma, D9663)/1% BSA (Sigma, A9647)/0.1% Tween 20 (Sigma, P1379) for 15 min. For ACTA2 staining, cells were incubated with mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, A2547) and Alexa 594-labeled anti-mouse Ab (Molecular Probes, A21203), each for 60 min at room temperature in blocking buffer. For stress fiber characterization, the slides were incubated with phalloidin-FITC (Sigma-Aldrich, P5282) for 60 min at room temperature in blocking buffer. Nuclei were stained with TO-PRO 3 (Molecular Probes, T3605). The cells

were then visualized under a Leica SP5 confocal microscope and analyzed with Leica LAS AF software (Leica Microsystems, Concord, ON, Canada).

LC3B-GFP expression

We used the Premo Autophagy Sensor LC3B-GFP BacMam 2.0 Expression vector Kit from Invitrogen (P36235) and followed instructions provided by the manufacturer. In brief, WI-38 fibroblasts were plated in 8-well glass slides (Nalge Nunc, Lab-Tek II 154534). When they reached 40,000 cells/well, they were infected with LC3B-GFP-containing baculovirus at a multiplicity of infection of 30 in normal medium. After overnight incubation, the slides were washed twice with PBS and exposed to experimental conditions for 24 h. The cells were then fixed with paraformaldehyde (4%) and nuclei were stained with 0.5 ug/ml DAPI (Invitrogen, D3571). Cells were observed using a Olympus multiphoton FV-1000 MER confocal microscope.

Small interfering RNAs (siRNAs)

For silencing of *CTGF*, WI-38 fibroblasts were plated in 6-well plates at 20,000 cells per cm². When the cells were near confluency, they were transfected with oligofectamine (6 µl/well; Invitrogen, 12252-011) and siRNAs at a final concentration of 200 nM annealed oligonucleotides in cell culture medium without serum. Two days post-transfection, the medium was changed and the cells were maintained under experimental conditions (without serum) for 5 days, with medium changed every 2 days, followed by evaluation of myofibroblast differentiation. Pre-designed oligonucleotides for human *CTGF* (ON-TARGETplus SMARTpool L-012633-01) and control siRNA (ON-TARGETplus non-

targeting siRNA D-001810-01) were obtained from Dharmacon Research and Thermo Fisher Scientific.

For *ATG7*, *RICTOR* and *RPTOR* silencing, fibroblasts grown in normal conditions were harvested by trypsinization and separated in aliquots of 1.5 million cells. Separate aliquots were transfected with *siRICTOR* (Dharmacon, L-016984-00), *siATG7* (Dharmacon, L-020112-00), *siRPTOR* (Dharmacon, L-004107-00), or siControl (Dharmacon, D-001810-03). We used the Amaxa Nucleofector electroporator (Amaxa, Gaithersburg, MD, USA) and the Nucleofector electroporation kit for WI-38 (Lonza, VCA-1001) according to the manufacturer's guidelines. The final concentration of siRNA was 150 pmol of siRNA/reaction. After electroporation, each cellular aliquot was plated in 2 wells of a 6-well plate in normal medium for 24 h. The media were then changed for experimental condition (medium without serum) after 2 washes with PBS. The cells were harvested at different time points for western blot analysis. For 4 days in SS, the media were changed at day 2.

Adenoviral vector system for overexpression of constitutively active AKT

For activation of AKT, WI-38 fibroblasts were infected with an adenovirus vector encoding a constitutively active AKT construct (Ad-CA-AKT [Myr], Vector Biolabs, 1020). A commercially available adenovirus vector (Ad-CMV-null, Vector Biolabs, 1300) was used as control. Cells were infected at a multiplicity of infection of 2 in normal medium for 6 h, followed by electroporation with *siATG7* or control, as described above.

RNA preparation and quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Total RNA from WI-38 fibroblasts was prepared with the RNeasy kit from Qiagen Inc (74134). cDNA synthesis was completed according to the M-MLV-RT First-Strand Synthesis protocol (Invitrogen, 28025-013) with a starting amount of 1 µg RNA and reverse transcription with random hexamers (Invitrogen, 48190-011). PCR was performed with a Rotor-gene 3000 Real-Time Centrifugal DNA Amplification System (Corbett Tumor Tissues Research, Sydney, Australia). Quantitect™ SYBR Green PCR (Qiagen, 204143) reaction mixture was employed according to the manufacturer's instructions. Serial dilutions generated a standard curve for each gene tested, to define the efficiency of real time qPCR. All experiments, including positive and negative controls, were run in triplicate. The primer sequences were: *CTGF* fw 5'- TTGGCCAGACCCAACTATG, rev 5'- CAGGAGGCGTTGTCATTGGT; *COL1A1* fw 5'- CCTCAAGGGCTCCAACGAG, rev 5'- TCAATCACTGTCTTGCCCCA; *COL3A1* fw 5'- AACACGCAAGGCTGTGAGACT, rev 5'- GCCAACGTCCACACCAAATT; *GAPDH* fw 5'- TGCACCACCAACTGCTTAGC, rev 5'- GGCATGGACTGTGGTCATGAG.

Reagents

Recombinant human TGFB1 (100-B), pan-TGFB1/2/3-blocking antibody (AB-100-NA) and isotype controls (AB-105-C) were obtained from R&D Systems. LY294002 (440202) and 3-methyladenine (189490) were purchased from Calbiochem, and rapamycin (R0395), wortmannin (W3144) and bafilomycin A₁ (B1793) from Sigma. Torin 1 (4247) was obtained from TOCRIS bioscience. All other reagents were from Sigma Chemicals.

Statistical analysis

The results, expressed as means±SEM, were analyzed by unpaired Student's t-test or the Mann-Whitney test as appropriate. $p < 0.05$ was considered significant for all tests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-123436) to MJH, holder of the Shire Chair in Nephrology, Transplantation and Renal Regeneration of Université de Montréal. MJH is supported by the Canadian Transplant Research Program (CNTRP). MB is the recipient of a fellowship from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRQS). The authors thank the J.-L. Lévesque Foundation for renewed support.

REFERENCES

1. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127:526-37.
2. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117:524-9.
3. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2002; 3:349-63.
4. Hinz B, Gabbiani G. Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. *F1000 Biol Rep* 2010; 2:78.
5. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003; 83:1689-707.
6. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors* 2011; 29:196-202.
7. Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Co-localization of transforming growth factor beta 2 with alpha 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1990; 86:917-22.
8. Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38:441-50.
9. Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol* 2001; 99:308-19.
10. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7:d793-807.
11. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999; 181:153-9.
12. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002; 4:599-604.
13. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996; 107:404-11.
14. Leask A, Parapuram SK, Shi-Wen X, Abraham DJ. Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? *Journal of cell communication and signaling* 2009; 3:89-94.
15. Liu S, Shi-wen X, Abraham DJ, Leask A. CCN2 is required for bleomycin-induced skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism* 2011; 63:239-46.
16. Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)--a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol* 2010; 114:e83-92.
17. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR, Takehara K. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 1996; 106:729-33.
18. Huang G, Brigstock DR. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17:2495-507.

19. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, Beliveau A, Prat A, Pshezhetsky AV, Hebert MJ. Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell death and differentiation* 2010; 17:291-303.
20. Hong KH, Yoo SA, Kang SS, Choi JJ, Kim WU, Cho CS. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2006; 146:362-70.
21. Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *American journal of physiology Renal physiology* 2004; 287:F1223-32.
22. Braig S, Wallner S, Junglas B, Fuchshofer R, Bosserhoff AK. CTGF is overexpressed in malignant melanoma and promotes cell invasion and migration. *Br J Cancer* 2011; 105:231-8.
23. Nazio F, Strappazon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, Gretzmeier C, Dengjel J, Piacentini M, Fimia GM, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature cell biology* 2013; 15:406-16.
24. Del Principe D, Lista P, Malorni W, Giammarioli AM. Fibroblast autophagy in fibrotic disorders. *J Pathol* 2013; 229:208-20.
25. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Autophagy fuels tissue fibrogenesis. *Autophagy* 2012; 8:849-50.
26. Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, Czaja MJ, Friedman SL. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012; 142:938-46.
27. Kliensky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8:445-544.
28. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285:10850-61.
29. Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1997; 243:240-6.
30. Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275:992-8.
31. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 2005; 169:425-34.
32. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AMJ, Langelier Y, Bernard M, Raymond Y, Hebert MJ. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: Implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005; 174:5740-9.
33. Laplante P, Raymond MA, Labelle A, Abe J, Iozzo RV, Hebert MJ. Perlecan proteolysis induces an alpha2beta1 integrin- and Src family kinase-dependent anti-apoptotic

pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281:30383-92.

34. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113:685-700.

35. Leask A. CCN2: a bona fide target for anti-fibrotic drug intervention. *J Cell Commun Signal* 2011; 5:131-3.

36. Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals. *J Cell Commun Signal* 2010; 4:1-4.

37. Chen G, Chen H, Wang C, Peng Y, Sun L, Liu H, Liu F. Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts. *PloS one* 2012; 7:e33626.

38. Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer biology & therapy* 2003; 2:222-32.

39. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; 22:159-68.

40. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149:274-93.

41. Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol* 2010; 30:908-21.

42. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117:539-48.

43. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:1819-34.

44. Sivakumar P, Ntolios P, Jenkins G, Laurent G. Into the matrix: targeting fibroblasts in pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18:462-9.

45. Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, Rosas IO, Morse D. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS one* 2012; 7:e41394.

46. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Asano Y, Hasegawa M, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism* 2010; 62:2476-87.

47. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996; 7:469-80.

48. Ponticos M, Holmes AM, Shi-wen X, Leoni P, Khan K, Rajkumar VS, Hoyles RK, Bou-Gharios G, Black CM, Denton CP, et al. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. *Arthritis and rheumatism* 2009; 60:2142-55.

49. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair* 2012; 5 Suppl 1:S24.

50. Wang Q, Usinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W, Oliver N, et al. Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis & tissue repair* 2011; 4:4.

51. Yokoi H, Mukoyama M, Nagae T, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Nishida T, Takigawa M, et al. Reduction in connective tissue growth factor by antisense treatment ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1430-40.
52. Li G, Xie Q, Shi Y, Li D, Zhang M, Jiang S, Zhou H, Lu H, Jin Y. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *The journal of gene medicine* 2006; 8:889-900.
53. Allen JT, Knight RA, Bloor CA, Spiteri MA. Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:693-700.
54. Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratziu V, et al. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999; 30:968-76.
55. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000; 27:149-54.
56. Metalidis C, van Vuuren SH, Broekhuizen R, Lerut E, Naesens M, Bakker SJ, Wetzels JF, Goldschmeding R, Kuypers DR. Urinary connective tissue growth factor is associated with human renal allograft fibrogenesis. *Transplantation* 2013; 96:494-500.
57. Cheng O, Thuillier R, Sampson E, Schultz G, Ruiz P, Zhang X, Yuen PS, Mannon RB. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2006; 6:2292-306.
58. Nguyen TQ, Tarnow L, Andersen S, Hovind P, Parving HH, Goldschmeding R, van Nieuwenhoven FA. Urinary connective tissue growth factor excretion correlates with clinical markers of renal disease in a large population of type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2006; 29:83-8.
59. Nayak BK, Feliers D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, Fitzgerald JP, Eid A, Denapoli T, Parekh DJ, et al. Stabilization of HIF-2alpha through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* 2013; 32:3147-55.
60. Araya J, Kojima J, Takasaka N, Ito S, Fujii S, Hara H, Yanagisawa H, Kobayashi K, Tsurushige C, Kawaishi M, et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2013; 304:L56-69.
61. Cailhier JF, Sirois I, Laplante P, Lepage S, Raymond MA, Brassard N, Prat A, Iozzo RV, Pshezhetsky AV, Hebert MJ. Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283:27220-9.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Starvation induces autophagy and myofibroblast differentiation. **(A)** Upper panel: Western blot showing LC3B-I and -II protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to serum-free (starvation) medium (SS). Lower panel: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I normalized to time 0 (representative of 4 independent experiments, * $p < 0.05$ t=0 vs 1 h). **(B)** Western blot showing LC3B-I and -II protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline, starved for 4 h or 1 day and exposed to DMSO (V) or bafilomycin A₁ (20 nM; Baf). Representative of 3 independent experiments. **(C)** Evaluation of LC3B puncta by confocal microscopy in WI-38 fibroblasts infected with a baculovirus vector expressing GFP-LC3B and exposed to normal conditions (medium with 10% FBS; N), serum-free medium with DMSO (V) or serum-free medium with bafilomycin A₁ (20 nM) for 1 d. Representative of 3 independent experiments. **(D)** Upper panel: Western blot showing SQSTM1 and tubulin (TUBA) protein levels in starved WI-38 fibroblasts. Lower panel: Densitometric analysis of SQSTM1 protein levels relative to tubulin. Data are presented as mean \pm s.e.m. (representative of 4 independent experiments, * $p = 0.02$ 4 h vs 2 d and 4 h vs 4 d). **(E)** Upper panel: Western blot showing ACTA2 protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS medium or grown under normal conditions (N). Tubulin was used as a loading control. Lower panel: Densitometric analysis of ACTA2 protein levels relative to tubulin normalized to time 0 (representative of 4 independent experiments; * $p = 0.0170$ SS vs N at 4 d). **(F)** Evaluation of the myofibroblast markers ACTA2 (red) and stress fiber (green) by immunofluorescence microscopy in cells grown in normal medium (N) or maintained without serum (SS) for 4 days. Representative of 3 independent experiments. **(G)** Real time qPCR evaluation of mRNA levels of *COL1A1* and *COL3A1* after 4 days in N or SS. *GAPDH* was used as the reference

gene (**p<0.001 N vs SS, representative of 2 independent experiments performed in triplicate).

Figure 2. Autophagy induces myofibroblast differentiation in starved fibroblasts. **(A)** Western blot showing LC3B-I and -II protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline or starved in the presence of 3-methyladenine (1 mM; 3-MA), wortmannin (100 nM; W), LY294002 (5 μ M; LY) or vehicle (V) for 4 h. Representative of 4 independent experiments. **(B)** Western blot showing ACTA2 protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline or starved and incubated with the same inhibitors as in **A** for 4 days. Representative of 4 independent experiments. **(C)** Evaluation of the myofibroblast markers ACTA2 (red) and stress fiber formation (green) by immunofluorescence microscopy in fibroblasts exposed to SS in the presence of LY or V for 4 days. Cell nuclei are visualized in blue. ACTA2 and stress fiber staining of fibroblasts grown in normal medium or starved for 4 days from the same experiment are shown in **Fig. 1F**. Representative of 3 independent experiments. **(D)** *COL1A1* and *COL3A1* mRNA levels evaluated by real time qPCR in WI-38 fibroblasts serum starved for 4 days in the presence of the PtdIns3K inhibitor LY or vehicle. *GAPDH* was used as the reference gene (**p<0.001 V vs LY for *COL1A1* and **p<0.01 V vs LY for *COL3A1*). Collagen mRNA levels of fibroblasts grown in normal medium or starved for 4 days from the same experiment are shown in **Fig. 1G**. Representative of 2 independent experiments performed in triplicate. **(E)** Left panel: Western blot showing ATG7, SQSTM1 and tubulin (TUBA) protein levels in WI-38 fibroblasts starved for 2 days post-nucleofection with control siRNA (siCTL) or *ATG7* siRNA (*siATG7*). Representative of 3 independent experiments. Right panel: Densitometric analysis of SQSTM1 protein level relative to tubulin (representative of 3 independent experiments, *p=0.0318) in WI-38 fibroblasts silenced for *ATG7* expression (*ATG7* silencing

is effective at $80.6\% \pm 6.0\%$, representative of 3 independent experiments, $***p < 0.0001$). **(F)** Left panel: Western blot showing ATG7, ACTA2 and tubulin (TUBA) protein levels in WI-38 fibroblasts starved for 4 days post-nucleofection with control siRNA (siCTL) or *ATG7* siRNA (*siATG7*). Representative of 4 independent experiments. Right panel: Densitometric analysis of ACTA2 level relative to tubulin ($***p = 0.0005$ representative of 4 independent experiments) in WI-38 fibroblasts silenced for *ATG7* expression (*ATG7* silencing is effective at $87.4\% \pm 4.4\%$, from 4 independent experiments, $***p < 0.0001$).

Figure 3. Myofibroblast differentiation induced by starvation is dependent on CTGF upregulation. **(A)** Western blot showing phosphorylated SMAD2 and total SMAD2/3 in WI-38 fibroblasts cultured under normal conditions (N), serum starved (SS) or incubated with human recombinant TGFB1 (2 ng/ml) in SS for 1 or 3 days. Incubation with TGFB1 was used as a positive control for SMAD signaling. Representative of 3 independent experiments. **(B)** Upper panel: Western blot showing ACTA2 protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 4 days in the presence of a neutralizing antibody (NAb) against pan-TGFB, or isotype-matched control (iso), both at 10 ug/ml. Recombinant human TGFB1 (0.1 ng/ml) was used as a positive control for the neutralizing activity of the pan-TGFB antibody. Representative of 4 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of ACTA2 relative to tubulin (TUBA) protein levels (representative of 4 independent experiments, $*p = 0.03$ neutralizing antibody vs iso in the presence of TGFB1, $*p = 0.03$ SS vs TGFB1 in SS). **(C)** Evaluation of CTGF expression by real time qPCR in WI-38 fibroblasts exposed to serum-free medium (SS) or grown in normal condition (N) for 4 days ($**p = 0.002$). Representative of 2 independent experiments performed in triplicate. **(D)** Upper panel: Western blot showing intracellular CTGF protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline, starved for up to 4 days or maintained in

normal medium for 4 days. Representative of 8 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of intracellular CTGF relative to tubulin protein levels normalized to time 0 (representative of 8 independent experiments, * $p=0.01$ 1d vs 4 d and 2 d vs 4 d in SS). (E) Upper panel: Evaluation of extracellular CTGF by WB in media conditioned by WI-38 fibroblasts exposed to SS for 0, 2 or 4 days. Representative of 8 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of extracellular CTGF (representative of 8 independent experiments, * $p=0.01$ 2 d vs 4 d). (F) Upper panel: Western blot showing intracellular CTGF and ACTA2 protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 5 days post-transfection with control siRNA (siCTL) or siRNA specific to *CTGF* (si*CTGF*). Representative of 5 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of ACTA2 level relative to tubulin (representative of 5 independent experiments, ** $p=0.004$) in WI-38 fibroblasts silenced for *CTGF* expression (*CTGF* silencing is effective at $77.3\% \pm 4.8\%$, representative of 5 independent experiments, *** $p=0.0002$).

Figure 4. Autophagy is central for CTGF upregulation in starved fibroblasts. (A) Upper panel: Western blot showing intracellular CTGF protein levels in serum-starved WI-38 fibroblasts incubated with the autophagy inhibitor LY294002 5 μ M (LY) or vehicle (V) for 4 days. Representative of 4 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of intracellular CTGF protein levels relative to tubulin (representative of 4 independent experiments, * $p=0.0286$). (B) Upper panel: Western blot of extracellular CTGF protein levels in media conditioned by starved WI-38 fibroblasts in the presence of the inhibitor LY294002 5 μ M (LY) or vehicle (V) for 4 days. Representative of 4 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of extracellular CTGF protein levels (representative of 4 independent experiments, * $p=0.03$ V vs LY at 4 days). (C) Evaluation of *CTGF* expression by

qPCR in WI-38 fibroblasts exposed to serum-free medium (SS) in the presence of LY294002 5 μ M (LY) or vehicle (V) for 4 days (** $p=0.0036$). *CTGF* expression was normalized to *GAPDH*. *CTGF* mRNA levels of fibroblasts grown in normal medium or starved for 4 days from the same experiment are shown in **Fig. 3C**. Representative of 2 independent experiments performed in triplicate. **(D)** Left panel: Western blot showing ATG7, CTGF and tubulin (TUBA) protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 4 days post-nucleofection with control siRNA (siCTL) or siRNA specific to *ATG7* (*siATG7*). Representative of 4 independent experiments. Right panel: Densitometric analysis of CTGF level relative to tubulin (** $p=0.0087$ representative of 4 independent experiments) in WI-38 fibroblasts silenced for *ATG7* expression (*ATG7* silencing is effective at $87.4\% \pm 4.4\%$, representative of 4 independent experiments, *** $p<0.0001$).

Figure 5. Activation of MTORC2 signaling in starved fibroblasts. **(A)** Upper panel: Western blot showing phosphorylation of AKT Ser473 (AKT p) and total AKT (AKT t) in WI-38 fibroblasts at baseline and exposed to serum-free medium (SS) for up to 4 days. Representative of 5 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of AKT p relative to AKT t normalized to time 0 (representative of 5 independent experiments, * $p=0.0189$ 2 d vs 4 d and * $p=0.0238$ 1d vs 4 d). **(B)** Upper panel: Western blot showing phosphorylation of RPS6KB1 (MTORC1 downstream target) and phosphorylation of AKT Ser473 (MTORC2 target) in WI-38 fibroblasts at baseline and starved (SS) for up to 4 days in the presence of rapamycin (R) or vehicle (V). Total AKT level was also evaluated by WB. Ponceau Red staining was used as loading control. Representative of 4 independent experiments. Middle panel: Densitometric analysis of phosphorylated RPS6KB1 relative to tubulin (representative of 4 independent experiments, * $p=0.0286$ V vs R at 10 min). Data were

normalized to baseline. Lower panel: Densitometric analysis of AKT p relative to AKT t (representative of 4 independent experiments, *p=0.0237 V vs R at day 4). Data were normalized to baseline. (C) Upper panel: Western blot showing LC3B-I and -II protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline or exposed to SS for 4 h, 2 days or 4 days in the presence of rapamycin (10 nM; R) or vehicle (V). Representative of 5 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (representative of 5 independent experiments; *p=0.0456 V vs R at 4 h, *p=0.0444 V vs R at 2 days, *p=0.0266 V vs R at 4 days).

Figure 6. Blockade of autophagy-induced myofibroblast differentiation by rapamycin. (A) Upper panel: Western blot showing ACTA2 and intracellular CTGF protein levels by WB in serum-starved WI-38 fibroblasts incubated with the MTOR inhibitor rapamycin (10 nM; R) or vehicle (V) for 4 days. Representative of 5 independent experiments. Middle panel: Densitometric analysis of ACTA2 protein levels relative to tubulin (representative of 5 independent experiments; *p=0.0189). Lower panel: Densitometric analysis of intracellular CTGF protein levels relative to tubulin (representative of 5 independent experiments, *p=0.0485). (B) Upper panel: Western blot showing extracellular CTGF protein levels in media conditioned by WI-38 fibroblasts starved in the presence of rapamycin (R) or vehicle (V) for 4 days. Representative of 5 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of extracellular CTGF, representative of 5 independent experiments, ***p<0.0001 V vs R. (C) Evaluation of the expression of the myofibroblast marker *COL1A1* by real time qPCR in WI-38 fibroblasts serum starved for 4 days in the presence of rapamycin (10 nM; R) or vehicle (V) (**p=0.005 V vs R). Collagen mRNA levels of fibroblasts grown in normal medium or starved for 4 days from the same experiment are shown in **Fig. 1G**. Representative

of 2 independent experiments performed in triplicate. **(D)** Effects of MTORC2 inhibition by *RICTOR* silencing on levels of downstream target AKT phosphorylation, myofibroblast marker ACTA2 and intracellular CTGF. Left panel: Cells were incubated in SS for 4 days after electroporation with control siRNA (siCTL) or *siRICTOR*. Cell lysates were analyzed by WB. Inhibition of RICTOR expression (82.3 +/- 17.3%, representative of 4 independent experiments, *** $p < 0.0001$) was achieved over siCTL. Right upper panel: Densitometric analysis of AKT p relative to total AKT (representative of 4 independent experiments; *** $p = 0.0002$). Right middle panel: Densitometric analysis of ACTA2 relative to tubulin (representative of 4 independent experiments; *** $p = 0.0003$). Right lower panel: Densitometric analysis of intracellular CTGF relative to tubulin (representative of 4 independent experiments; * $p = 0.0286$). **(E)** Upper panel: Evaluation of extracellular CTGF by WB in conditioned media from the experiment described in (C). Lower panel: Densitometric analysis of extracellular CTGF (representative of 4 independent experiments; * $p = 0.0286$).

Figure 7. Autophagy is essential for MTORC2 activity induced by serum starvation. **(A)** Upper panel: Evaluation of AKT Ser473 phosphorylation (AKT p) and total AKT (AKT t) by WB in WI-38 fibroblasts at baseline or exposed to SS plus vehicle for 2 days or maintained in SS with the autophagy inhibitors 3-methyladenine (1 mM; 3-MA), wortmannin (100 nM; W), or LY294002 (5 μ M; LY). Representative of 4 independent experiments. Lower left panel: Densitometric analysis of AKT p relative to AKT t in cells exposed to DMSO or 3-MA (representative of 4 independent experiments, * $p = 0.0286$). Lower right panel: Densitometric analysis of AKT p relative to AKT t in cells exposed to DMSO or LY (representative of 4 independent experiments, * $p = 0.0114$ V vs LY at day 2). **(B)** Upper panel: Evaluation of AKT Ser473 phosphorylation (AKT p) and total AKT (AKT t) by WB in WI-38 fibroblasts exposed

to SS for 2 days post-transfection with control siRNA (siCTL) or siRNA specific to *ATG7* (*siATG7*). Representative of 3 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of AKT p protein level relative to AKT t (representative of 3 independent experiments, *** $p < 0.0001$) in WI-38 fibroblasts silenced for *ATG7* expression (*ATG7* silencing is effective at $80.6\% \pm 6.0\%$, representative of 3 independent experiments, *** $p < 0.0001$).

Figure 8. Long-term autophagy favors MTORC2 activation leading to enhanced CTGF production and myofibroblast differentiation. Short-term serum starvation inactivates MTORC1 and MTORC2 signaling leading to dephosphorylation of RPS6KB1 (Thr389) and AKT (Ser473). MTORC1 inhibition induces autophagy, demonstrated by a higher LC3B-II/-I ratio and lower SQSTM1 level. Rapamycin increases autophagy by further inhibiting MTORC1. A sustained autophagic response is responsible for the MTORC2 reactivation when fibroblasts are starved for 2 days or more (long term), as measured by rephosphorylation of AKT at Ser473. In turn, MTORC2 activity drives the production and secretion of the pro-fibrotic cytokine CTGF leading to myofibroblast differentiation. Long-term exposure to rapamycin inactivates MTORC1 leading to an increased autophagic response, but prevents MTORC2 activation and downstream CTGF induction and myofibroblast differentiation.

Supplementary figures

Figure S1. Markers of autophagy and myofibroblast differentiation. (A) Western blot showing LC3B-I and -II protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline or exposed to DMSO (V) or bafilomycin A₁ (20 nM; Baf) in normal media for 4 h and 1 day. Representative of 3 independent experiments. (B) Western blot showing proCOL1A1, SQSTM1, ACTA2 and tubulin (TUBA) in WI-38 fibroblasts cultured in normal condition at base line, 4 and 7 days of

incubation or starved for 4 and 7 days. Representative of 4 independent experiments. **(C)** Evaluation of proCOL1A1 protein levels by WB in WI-38 fibroblasts exposed to serum-free (starvation) medium (SS) or grown in normal medium (N) for 4 days. Tubulin was used as loading control. Representative of 3 independent experiments. **(D)** Western blot showing SQSTM1, ACTA2 and tubulin in mouse embryonic fibroblasts (MEF) and normal human lung fibroblasts (NHLF) exposed to SS or grown in the normal condition (N) for 7 days. Representative of 2 independent experiments.

Figure S2. Effect of biochemical inhibition of autophagy on markers of myofibroblast differentiation. **(A)** Densitometric analysis of ACTA2 relative to tubulin evaluated by WB in WI-38 fibroblasts starved and incubated with the autophagy inhibitor 3-methyladenine (1 mM; 3-MA) or DMSO as vehicle (V) (representative of 4 independent experiments; * $p=0.0286$ V vs 3-MA at day 4). **(B)** Densitometric analysis of ACTA2 relative to tubulin evaluated by WB in WI-38 fibroblasts incubated with the autophagy inhibitor LY294002 5 μ M or DMSO as vehicle (V) (representative of 4 independent experiments; * $p=0.0286$ V vs LY at day 4). **(C)** Evaluation of proCOL1A1 protein levels by WB at baseline, in serum-starved WI-38 fibroblasts incubated with the autophagy inhibitors 3-methyladenine (1 mM; 3-MA), wortmannin (100 nM; W), LY294002 (5 μ M; LY) or vehicle (V) for 4 days. Representative of 3 independent experiments. **(D)** Western blot showing full length PARP (116 kDa), cleaved PARP (89 kDa), ACTA2 protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline or exposed to serum-free (starvation) medium (SS) for 4 and 7 days. Tubulin was used as a loading control. Representative of 3 independent experiments.

Figure S3. Evaluation of SMAD2 phosphorylation and CTGF levels in fibroblasts during starvation. **(A)** Densitometric analysis of phosphorylated SMAD2 and total SMAD2/3 in WI-

38 fibroblasts cultured under normal conditions (N), serum starved (SS) or incubated with human recombinant TGFB1 (T; 2 ng/ml) in SS for 1 or 3 days. Incubation with TGFB1 was used as a positive control for SMAD signaling (representative of 3 independent experiments; * $p < 0.0001$ SS vs TGFB1 in SS at 1 and 3 days). **(B)** Western blot showing CTGF and tubulin in WI-38 cells at baseline and cultured in normal conditions for 4 and 7 days or starved for 4 and 7 days. Representative of 4 independent experiments. **(C)** Western blot showing full length PARP (116 kDa), cleaved PARP (89 kDa), intracellular CTGF and ACTA2 protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 5 days post-transfection with control siRNA (siCTL) or *siCTGF*. +: HUVECs serum starved for 4 h were used as a positive control for apoptotic PARP cleavage.

Figure S4. Effect of biochemical inhibition of autophagy on intracellular CTGF protein levels. Western blot showing intracellular CTGF protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline or starved cells incubated with the autophagy inhibitors 3-methyladenine (1 mM; 3-MA), wortmannin (100 nM; W) or vehicle (V) for 4 days. Representative of 4 independent experiments.

Figure S5. Markers of MTORC1 and MTORC2 activities in fibroblasts cultured in starvation medium or treated with rapamycin in normal medium. **(A)** Western blot showing RPS6KBP1 p, AKT p, AKT total (t) and tubulin in WI-38 fibroblasts cultured in normal conditions (N) at baseline, 4 and 7 days or starved (SS) for 4 and 7 days. Representative of 4 independent experiments. **(B)** Western blot showing MTORC1 (RPS6KBP1 p) and MTORC2 (AKT p and t) activities, SQSTM1, ACTA2, intracellular CTGF and tubulin protein levels in WI-38 fibroblasts in normal medium at baseline or exposed to rapamycin (10 nM; R) or vehicle (V, ethanol) for 3 or 7 days.

Figure S6. Autophagy, MTORC1 and MTORC2 activities, and myofibroblast differentiation in starved fibroblasts treated with Torin 1 or silenced for *RPTOR*. **(A)** Western blot showing proCOL1A1 protein levels in starved WI-38 fibroblasts incubated with rapamycin (10 nM; R) or vehicle (V) for 4 days. Representative of 2 independent experiments. **(B)** Western blot showing RPS6KBP1 p, SQSTM1, AKT p, AKT total and tubulin (TUBA) protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline or starved for 10 min or 4 days and exposed to vehicle (V) or the dual MTOR complexes inhibitor Torin 1 at 250 nM for 10 min or 4 days. Representative of 3 independent experiments. **(C)** Western blot showing myofibroblast differentiation markers proCOL1A1 and ACTA2 and tubulin (TUBA) protein levels in WI-38 fibroblasts at baseline, starved for 4 days (SS) or starved for 4 days in the presence of vehicle (V) or Torin 1 (250 nM). Representative of 3 independent experiments. **(D)** Western blot of extracellular CTGF protein levels in medium conditioned by starved WI-38 fibroblasts in the presence of Torin 1 (250 nM) or vehicle (V) for 4 days. Representative of 3 independent experiments. **(E)** Western blot showing RPTOR, RPS6KBP1 p, SQSTM1, AKT p, AKT total, ACTA2, CTGF and tubulin (TUBA) protein levels in WI-38 fibroblasts starved for 4 days (SS) or starved for 4 days post-nucleofection with control siRNA (siCTL) or *RPTOR* siRNA (*siRPTOR*). Representative of 3 independent experiments.

Figure S7. Impact of autophagy inhibition on MTORC1 and impact of adenovirus-mediated enhancement of AKT activity on myofibroblast differentiation. **(A)** Western blot showing phosphorylated RPS6KBP1 and tubulin protein levels in starved WI-38 fibroblasts at baseline or in the presence of 3-methyladenine (1 mM; 3-MA), wortmannin (100 nM; W), LY294002 (5 μ M; LY) or vehicle (V) for 4 h. Representative of 2 independent experiments. **(B)** Upper panel: Evaluation of ATG7, phosphorylated RPS6KBP1 and tubulin (TUBA) by WB in WI-38

fibroblasts exposed to SS for 2 days post-transfection with control siRNA (siCTL) or *siATG7*. Representative of 3 independent experiments. Lower panel: Densitometric analysis of phosphorylated RPS6KBP1 protein level relative to tubulin (TUBA) (representative of 3 independent experiments, p not significant) in WI-38 fibroblasts silenced for *ATG7* expression (*ATG7* silencing is effective at $80.6\% \pm 6.0\%$, representative of 3 independent experiments, $***p < 0.0001$). (C) Western blot showing ATG7, RPS6KBP1 p, SQSTM1, HA, AKT p, AKT total (t), ACTA2, intracellular CTGF and tubulin (TUBA) protein levels in WI-38 fibroblasts infected with a control adenovirus (Ad Null) or an adenovirus expressing a constitutively active AKT (Ad ca-AKT). The fibroblasts were starved for 2 days post-nucleofection with control siRNA (siCTL) or *siATG7*. Representative of 2 independent experiments.

Figure 1

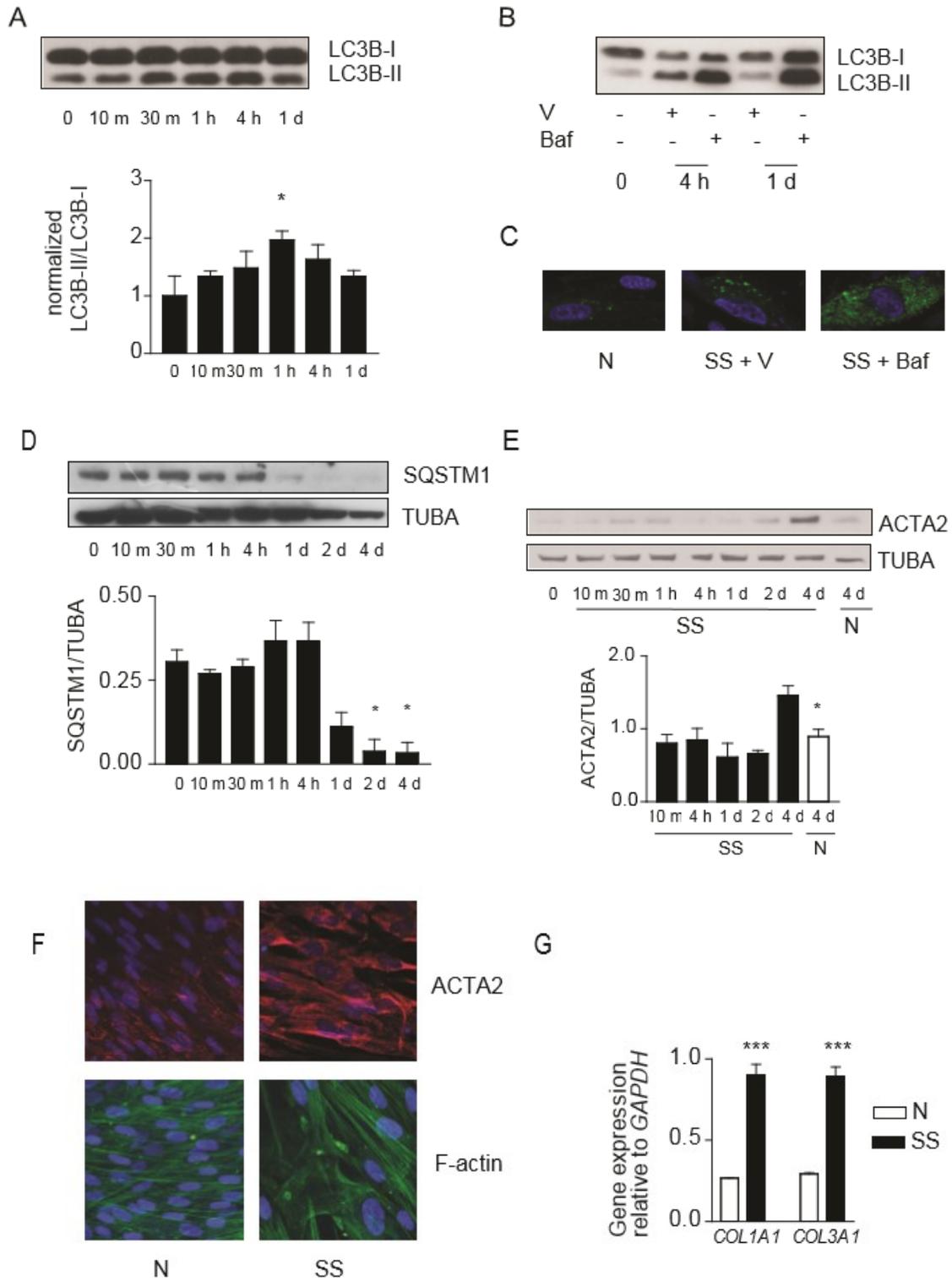


Figure 2

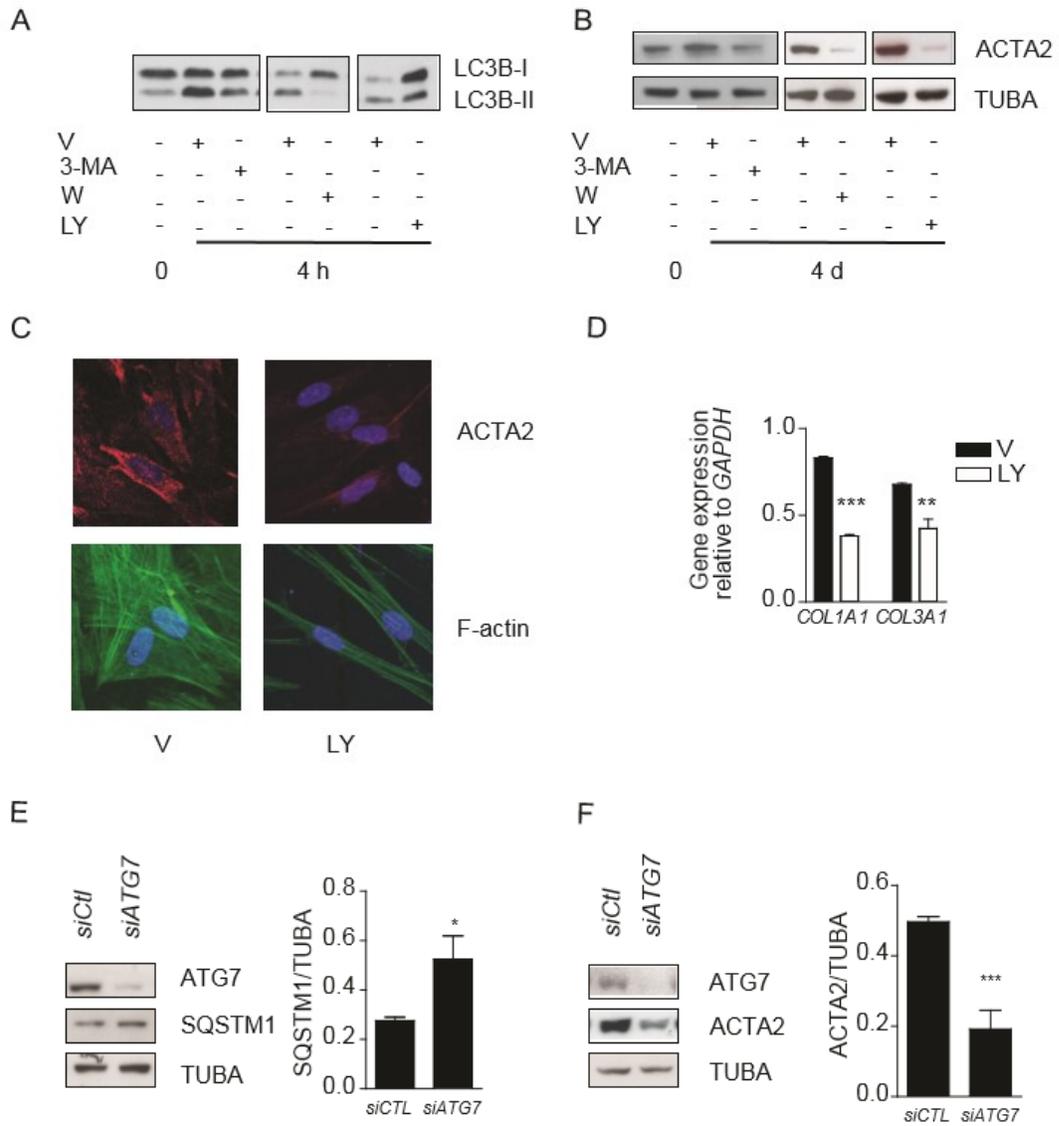


Figure 3

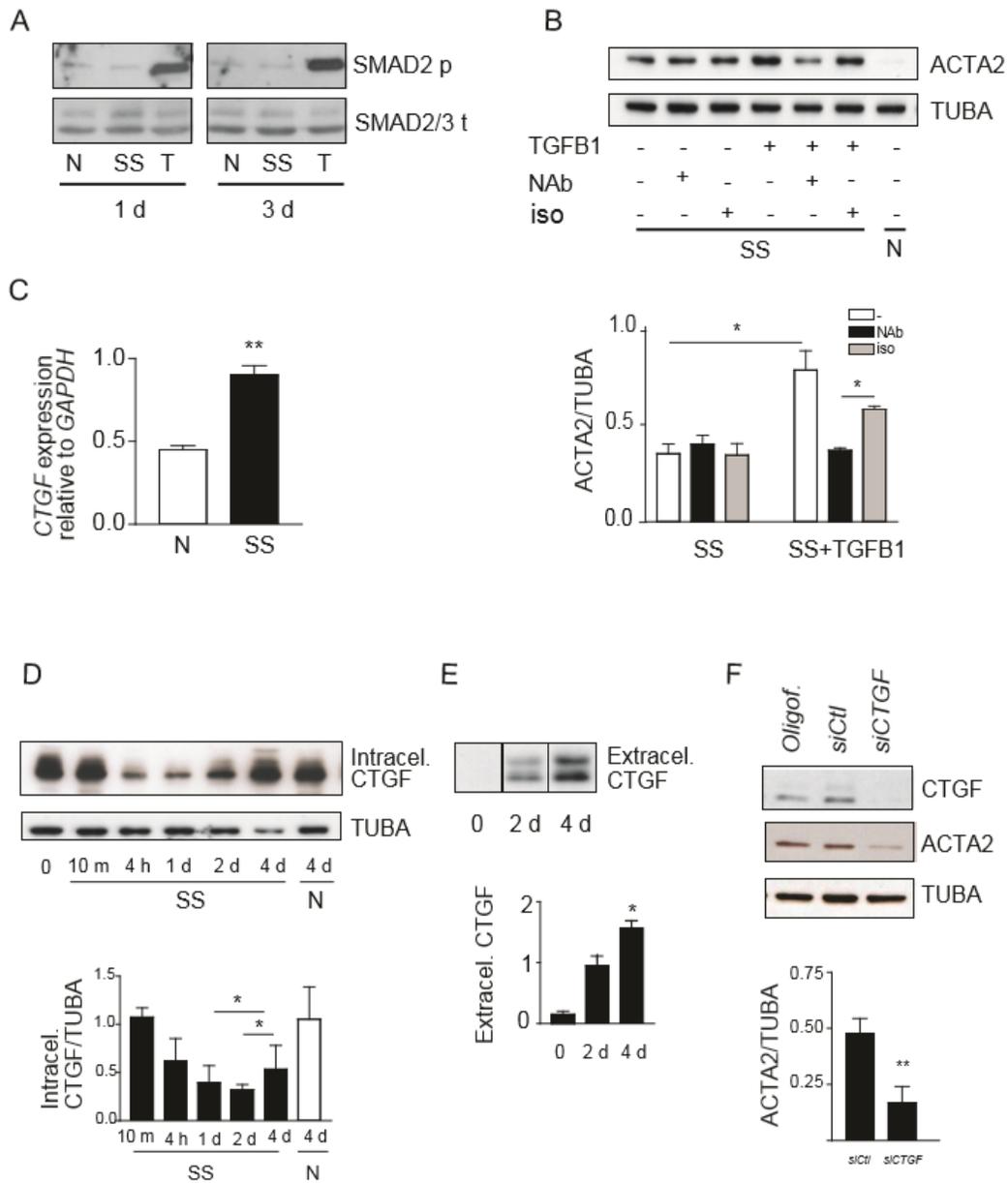


Figure 4

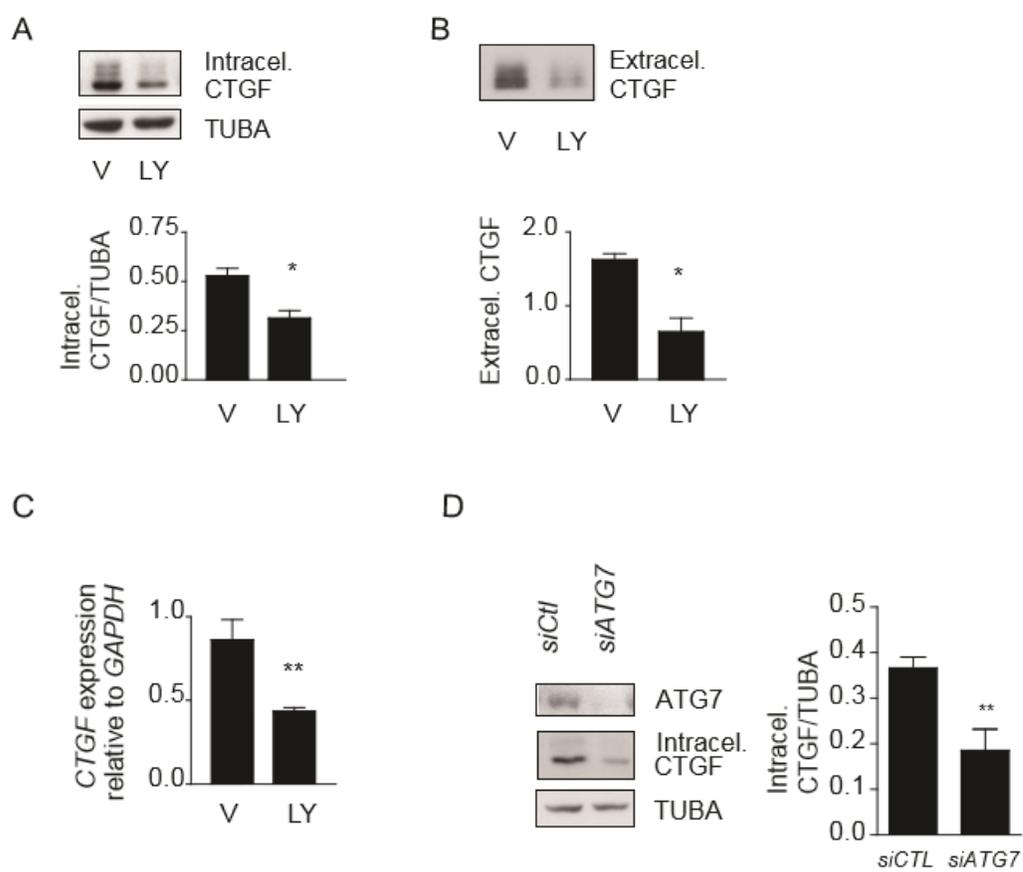


Figure 5

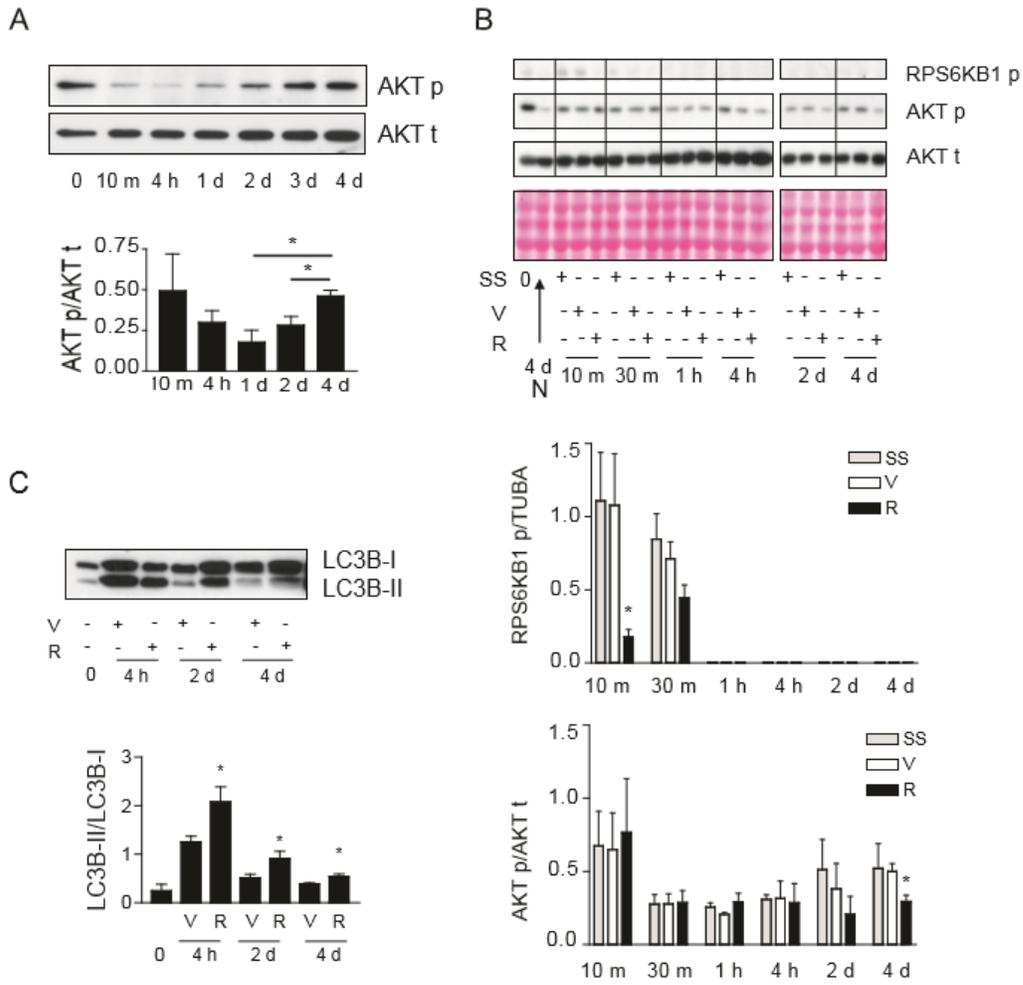


Figure 6

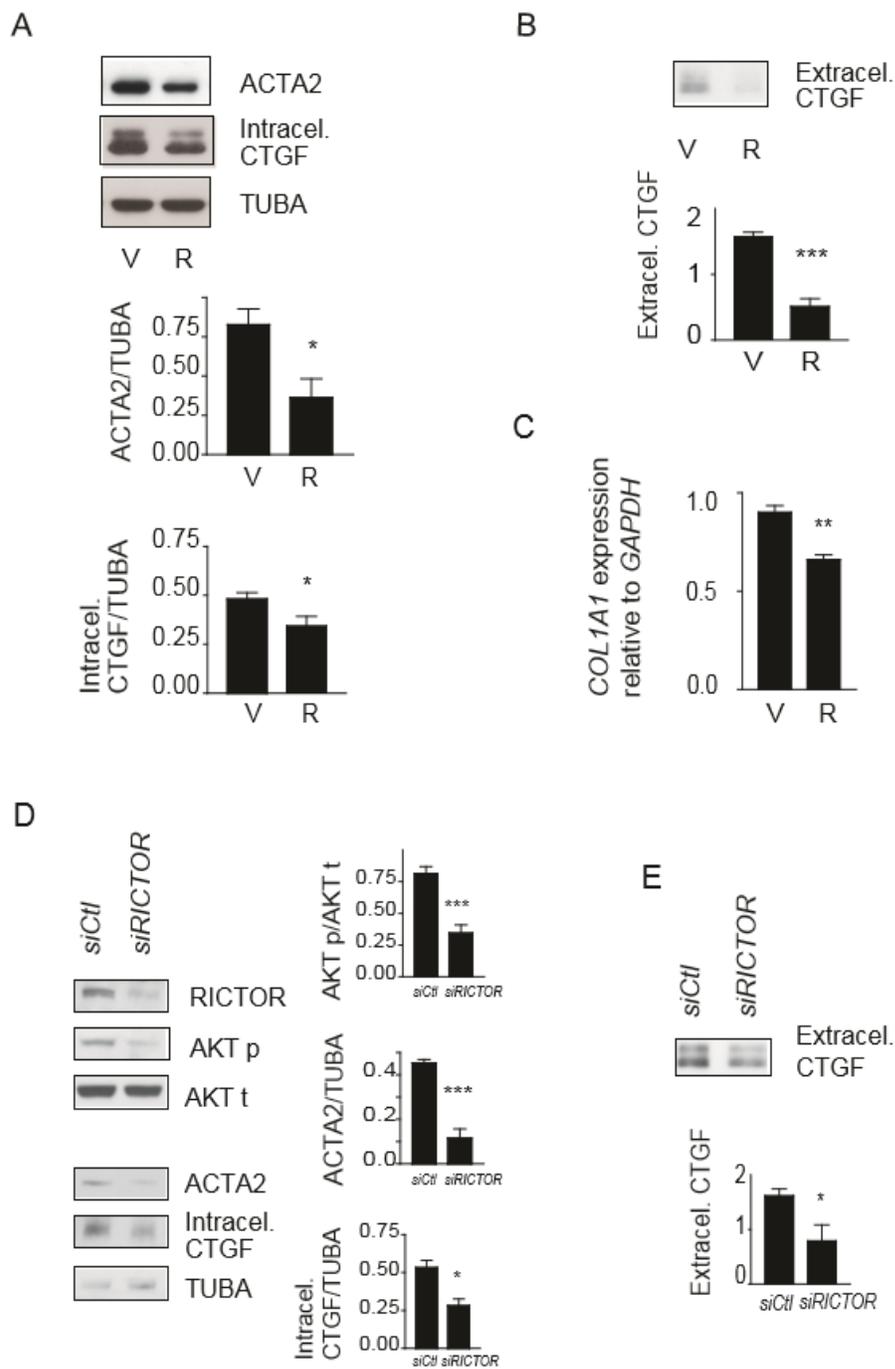
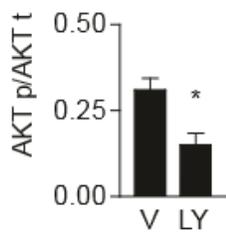
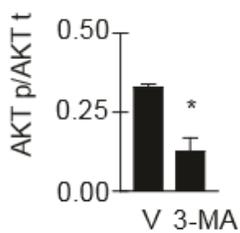
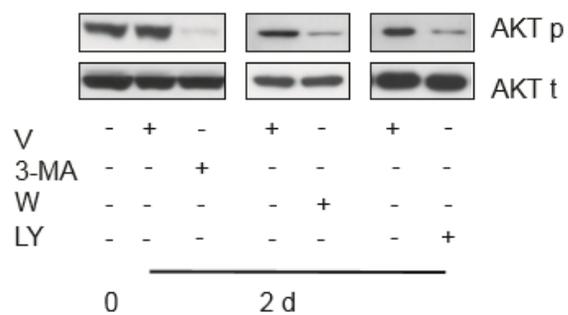


Figure 7

A



B

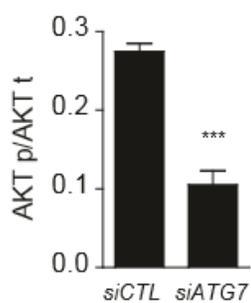
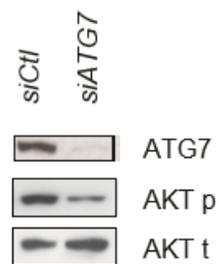


Figure 8

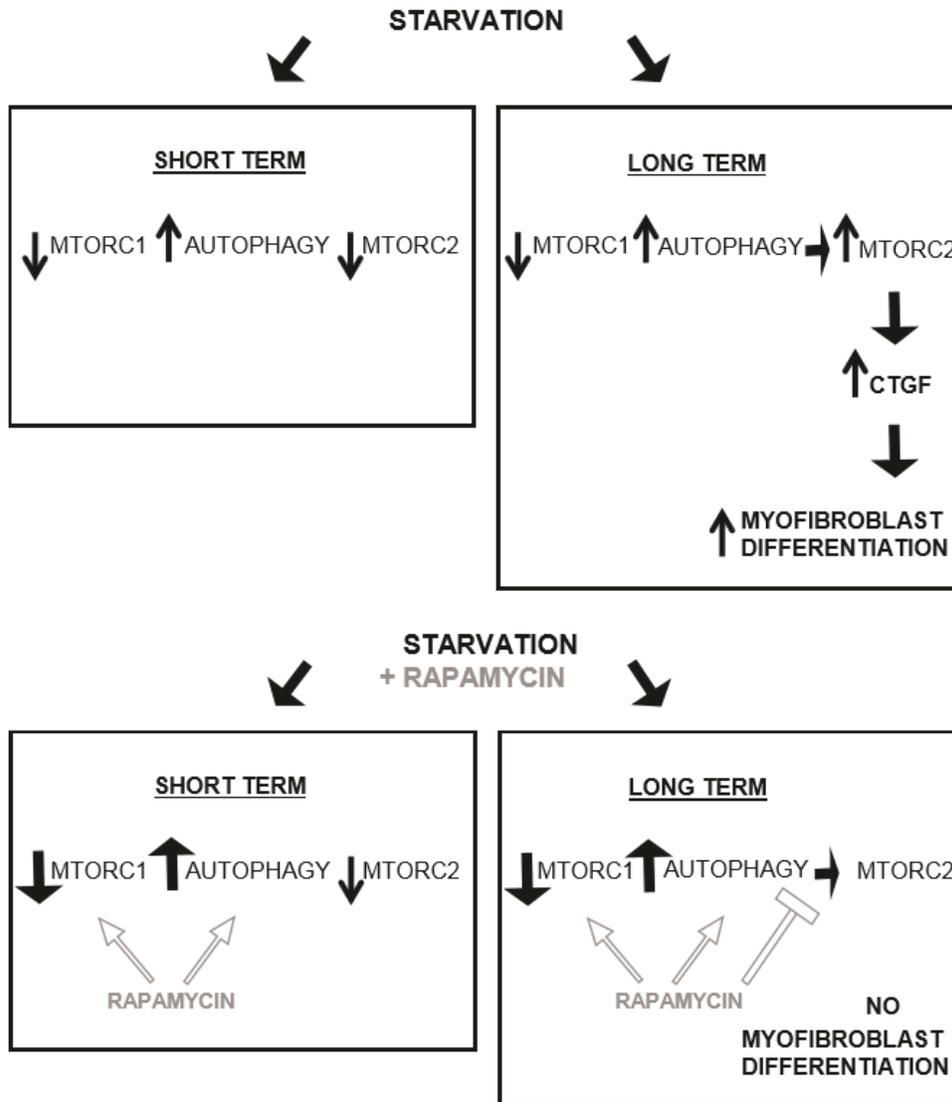


Figure supplémentaire 1

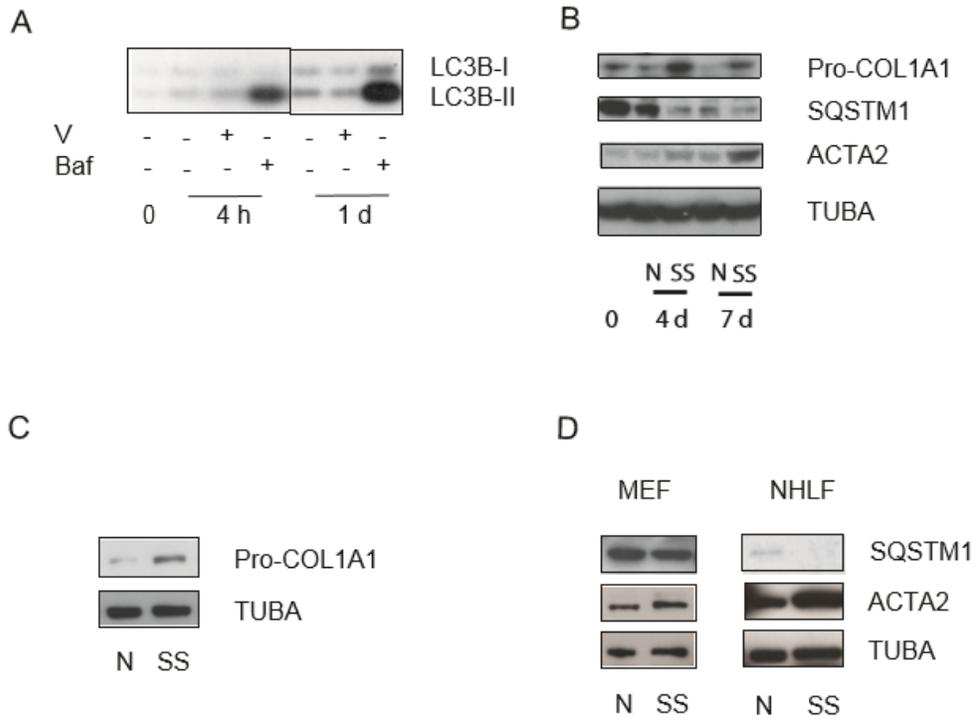


Figure supplémentaire 2

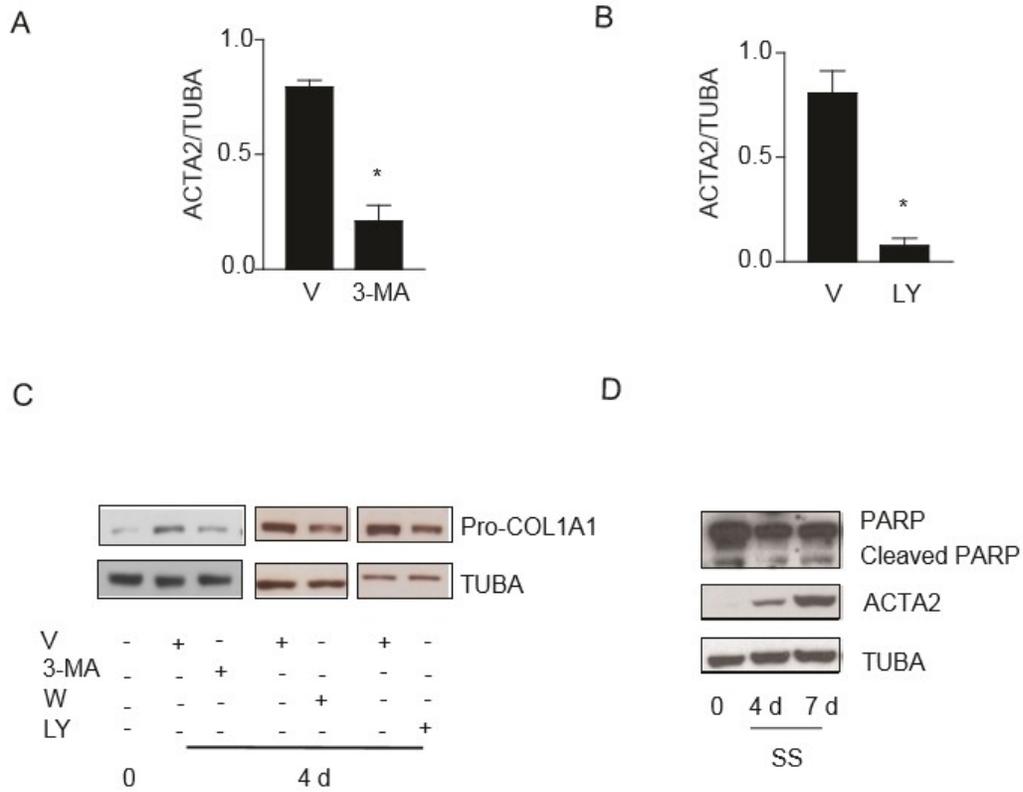
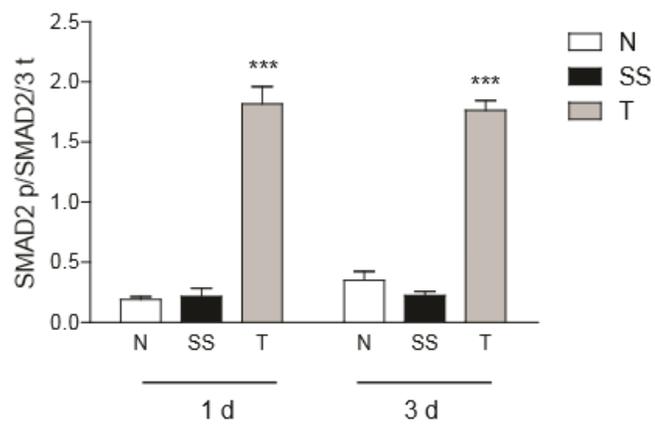
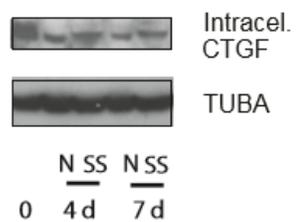


Figure supplémentaire 3

A



B



C

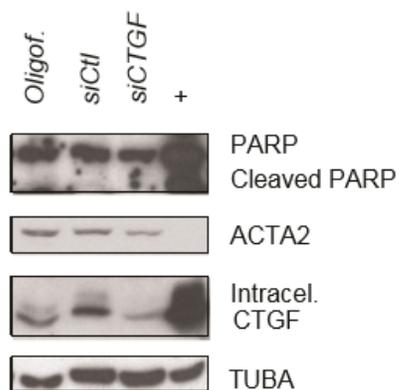


Figure supplémentaire 4

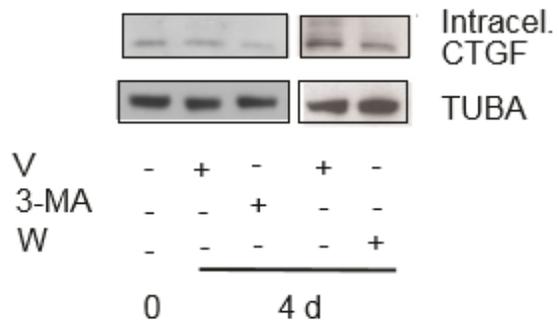
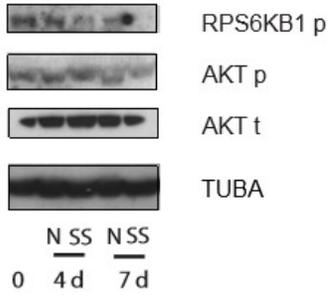


Figure supplémentaire 5

A



B

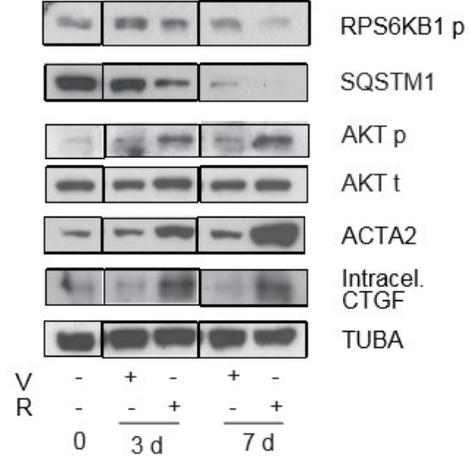


Figure supplémentaire 6

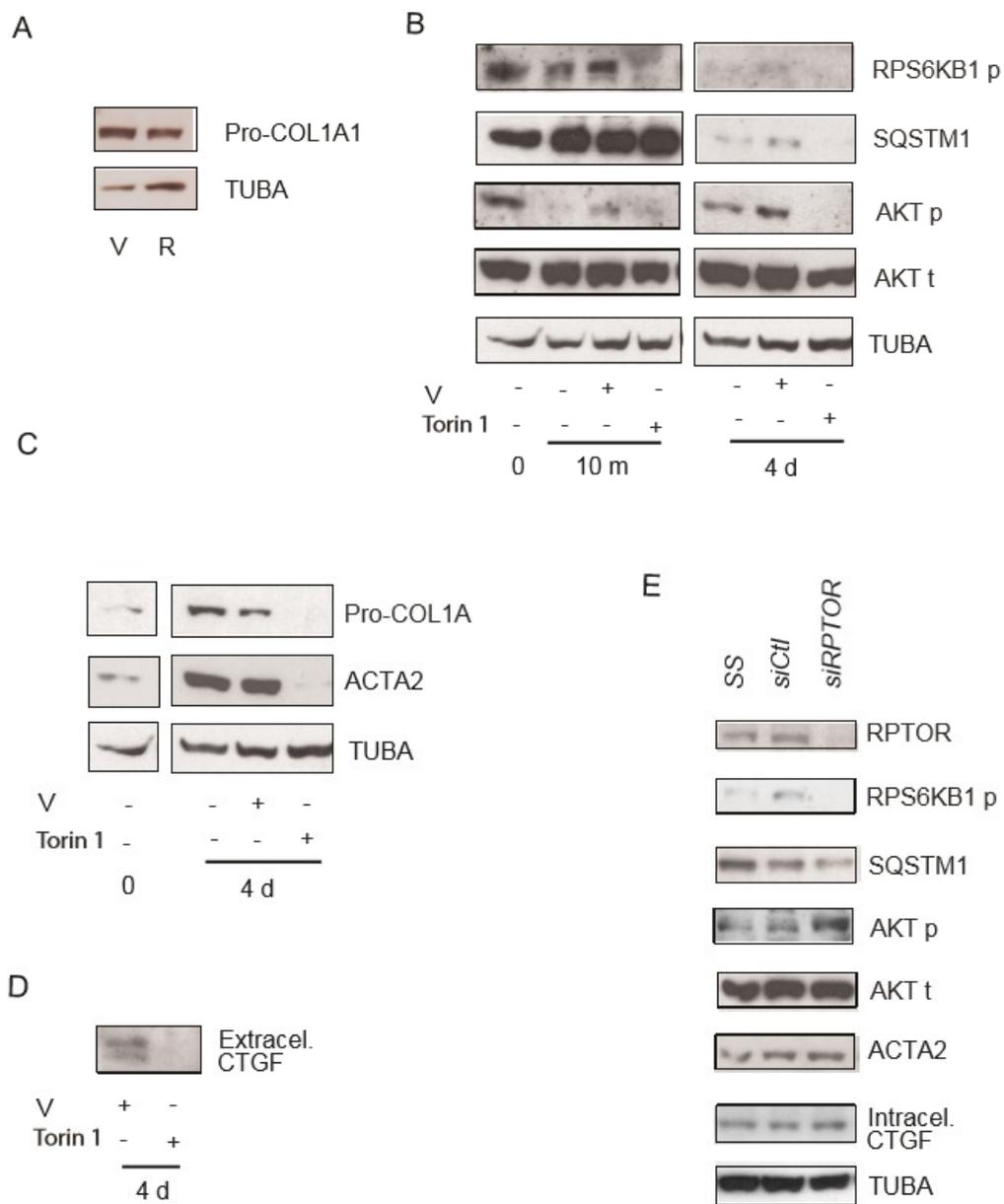
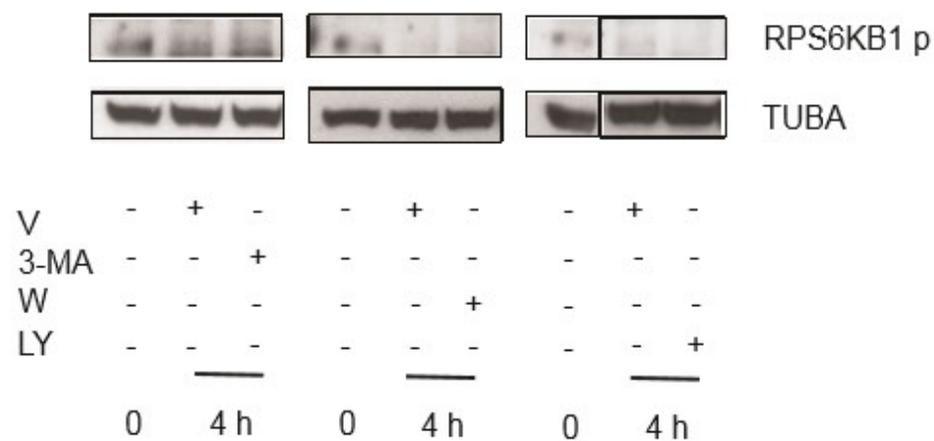
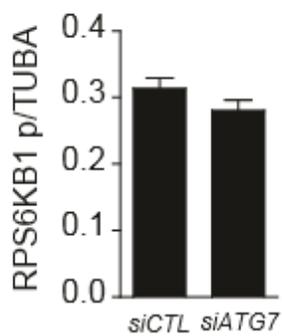
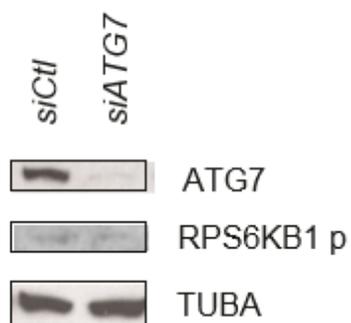


Figure supplémentaire 7

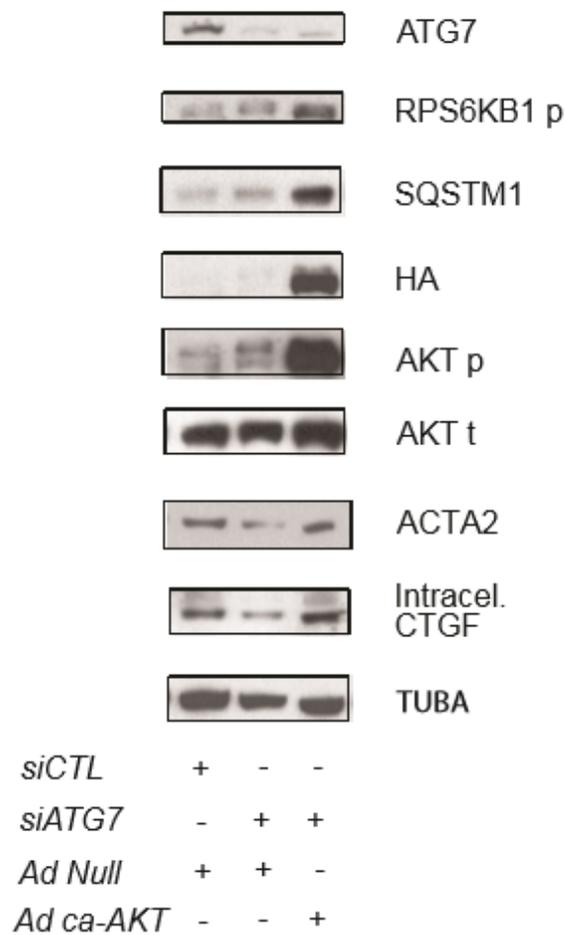
A



B



C



6.2 Article 2

Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation

Monique Bernard, Bing Yang, Mostafa El-Diwany, Katy Underwood, Francis Rodier and Marie-Josée Hébert

En préparation

Contributions des coauteurs:

Monique Bernard : planification et réalisation de 90% des expériences, analyse et interprétation des résultats, rédaction de l'article.

Bing Yang : réalisation d'expériences avec le Torin 1

Mostafa El-Diwany : comptes cellulaires de coloration SA-beta-galactosidase

Katy Underwood : réalisation de Western Blots

Francis Rodier : planification des expériences, interprétation des résultats

Marie-Josée Hébert : planification des expériences, analyse et interprétation des résultats, rédaction de l'article, support financier.

Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation

Monique Bernard, Bing Yang, Mostafa El-Diwany, Katy Underwood, Francis Rodier and Marie-Josée Hébert*

Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Running title: Autophagy, senescence and myofibroblast differentiation

*Address correspondence and reprint requests to: Dr. Marie-Josée Hébert, CRCHUM, 900 St. Denis Street, Viger Tower, Room R12.218, Montreal, QC, Canada H2X 0A9. Telephone: (514) 890-8000 Extension 30322, Fax: (514) 412-7944.

DISCLOSURE

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

Keywords: Autophagy, CDKN1A, p16INK4a, differentiation, fibroblast, MTORC2, myofibroblast, ROS, senescence, rapamycin.

Abbreviations: 3-MA, 3-methyladenine; ACTA2, actin, alpha 2, smooth muscle, aorta; ATG7, autophagy gene 7; CTGF, connective tissue growth factor; Ctl, control; ECM, extracellular matrix; LC3B, MAP1LC3B, microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta; LY, LY294002; MTORC2, mammalian target of rapamycin complex 2; N, normal growth medium; NAC, N-acetyl-L-cysteine; PBS, phosphate-buffered saline; PtdIns3K, class 1 phosphoinositide 3-kinase/class III phosphatidylinositol 3-kinase; R, rapamycin; ROS, reactive oxygen species; SA- β -gal, senescence-associated-beta-galactosidase; siRNA, small interfering RNA; SS, serum-free (serum starvation) medium; TUBA, tubulin, alpha; V, vehicle.

ABSTRACT

We recently showed that sustained autophagy favors differentiation of fibroblasts into myofibroblasts. Autophagy induces mammalian target of rapamycin complex 2 (MTORC2) activity, leading to up-regulation of the pro-fibrotic cytokine connective tissue growth factor. Here, we test the hypothesis that senescence is central to myofibroblast differentiation elicited by sustained autophagy. We analyzed markers of cell cycle arrest/senescence in fibroblasts *in vitro*, where autophagy was triggered by serum starvation (SS). Autophagic fibroblasts serum starved for up to 4 days expressed the senescence markers CDKN1A (p21) and p16INK4a (p16). Autophagic fibroblasts also exhibited increased senescence-associated-beta-galactosidase activity. Inhibition of autophagy in serum-starved fibroblasts with 3-methyladenine, LY294002 or *autophagy gene 7* silencing prevented the expression of these senescence markers. Suppressing MTORC2 activation by long-term exposure to rapamycin, Torin 1 or by silencing *RICTOR* also prevented senescence marker induction. Since reactive oxygen species (ROS) are known inducers of senescence, we investigated their role in autophagy-evoked myofibroblast differentiation. Exposing fibroblasts to N-acetyl-L-cysteine (NAC) decreased ROS production during SS, inhibited autophagy and significantly reduced the expression of senescence and myofibroblast differentiation markers. NAC also curbed the phosphorylation of AKT serine 473, a MTORC2 target, establishing the importance of ROS in fuelling MTORC2 activation. Collectively, our results identify ROS production in association with sustained autophagy as novel inducers of MTORC2 signaling which, in turn, concomitantly activate senescence and myofibroblast differentiation.

INTRODUCTION

Characterized by abnormal accumulation of myofibroblasts, fibrosis leads to extracellular matrix (ECM) protein overproduction, ECM thickening, loss of normal tissue architecture and organ functions. Fibrosis is considered a consequence of abnormal tissue repair.¹ Mounting evidence suggests that senescence is implicated in tissue repair^{2, 3} and that impaired senescence plays a central role in abnormal repair processes. Both enhanced and decreased cellular senescence have been linked to fibrosis, suggesting that timing of the senescence process, the cell types at play and the downstream pathways triggered by senescence induction weave a complex interplay of responses that may be either beneficial or detrimental to tissue repair.

In a murine model of liver injury, genetic invalidation of the central senescence gene *p53* significantly increased liver fibrosis after carbon tetrachloride treatment.⁴ In another model, mice with specific *CCN1* deletion in hepatocytes developed fibrosis concomitantly with a deficit in cellular senescence.⁵ *CCN1* is a matricellular protein involved in tissue repair. Lau and collaborators have shown that, in a model of skin repair, *CCN1* knockout mice present decreased p16- and p53-pathway activation after injury and develop more pronounced fibrosis.⁶ However, increased p53 signaling levels, achieved by hepatocyte-specific *MDM2* deletion, induce connective tissue growth factor (CTGF) synthesis by mouse hepatocytes and result in liver fibrosis.⁷ In a model of pulmonary fibrosis, *caveolin-1* deficient mice were protected from bleomycin-induced fibrosis, correlating with senescence pathway down-regulation in the epithelium.⁸

Autophagy has also been linked with abnormal tissue repair and fibrosis.^{9, 10} Cross-talk between autophagy and senescence in fibroblasts has already been studied with seemingly

contradictory results.¹¹ For example, in the context of oncogene-induced senescence, Narita *et al.* first generated senescence with oncogenic Ras, and then scrutinized the implication of autophagy in the expression of senescence markers. They demonstrated that inhibition of autophagy delayed the expression of senescence markers.¹² Kang *et al.* let cells enter replicative senescence with or without small hairpin RNA against key autophagy genes. Their results disclosed that cell lines with autophagy impairment reached senescence more rapidly than their control small hairpin counterparts.¹³

Here, we consider the question from another angle. We induced autophagy in a pure *in vitro* model: a well-known fibroblast cell line in which autophagy was initiated by serum starvation. We showed recently that sustained autophagy evokes myofibroblast differentiation through MTORC2 activation, culminating in CTGF up-regulation.¹⁴ We sought to clarify whether autophagy-induced MTORC2 activation regulates senescence development concomitantly with initiation of myofibroblast differentiation.

Results

Autophagy induced by prolonged serum starvation is central to senescence.

WI-38 human embryonic lung fibroblasts were exposed to serum-free (serum starvation) medium (SS) to evaluate the functional importance of growth factor deprivation in the simultaneous activation of autophagy, senescence and myofibroblast differentiation. CDKN1A/p21 protein, a marker of cell-cycle arrest and senescence,¹⁵ increased rapidly in fibroblasts with up to 4 hours of SS, followed by a progressive decline (**Fig. 1A**). p16INK4a/p16 protein, another cell-cycle arrest and senescence marker,¹⁶ was present in serum-starved fibroblasts (**Fig. 1B**). Senescence-associated-beta-galactosidase (SA- β -gal) activity¹⁷ was also induced in fibroblasts serum starved for up to 7 days (**Fig. 1C**). As reported previously¹⁴ prolonged serum starvation decreased SQSTM1 protein level, a marker of autophagy induction, and increased ACTA2/aSMA (actin, alpha 2, smooth muscle, aorta) protein level, a marker of myofibroblast differentiation (**Fig. 1A and 1B**). These results suggest that autophagy and myofibroblast differentiation are associated with the induction of senescence in long-term serum-starved fibroblasts.

We evaluated whether markers of senescence were modulated by autophagy. We used the class I phosphoinositide 3-kinase/class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) inhibitors 3-methyladenine (3-MA) and LY294002 (LY), both of which are known to curtail PtdIns3K in starved cells¹⁸⁻²⁰. PtdIns3K activity is necessary for autophagosome formation.²¹ As expected,¹⁴ 3-MA and LY prevented the enhancement of LC3-II/-I ratios (**Fig. 2A and 2B**) and blocked ACTA2 up-regulation (**Fig. 2A and 2B**). 3-MA and LY also inhibited CDKN1A and p16INK4a up-regulation as well as SA- β -gal activity (**Fig. 2A, 2B, 2D, 2E**). To further assess the importance of sustained autophagy in the induction of senescence markers, we

silenced *autophagy gene 7 (ATG7)*²² in serum starved fibroblasts. *siATG7* decreased LC3-II/I ratios (**Fig. 2C**) and prevented ACTA2 and p16INK4a expression (**Fig. 2C**). These results indicate that autophagy is instrumental in triggering pathways to senescence and myofibroblast differentiation.

Implication of MTORC2 in autophagy-induced senescence.

MTORC2 is responsible for AKT phosphorylation at Ser473.²³ We showed previously that prolonged autophagy activates MTORC2 leading to AKT phosphorylation at Ser473.¹⁴ Inhibiting MTORC2 with rapamycin (R),²³ Torin 1²⁴ or by silencing *RICTOR*, an essential component of MTORC2²⁵ suppresses AKT phosphorylation at Ser473 in serum-starved fibroblasts.¹⁴ These results motivated us to investigate whether the expression of senescence markers in fibroblasts exposed to prolonged SS is also under MTORC2 control.

Prolonged exposure of serum-starved fibroblasts to rapamycin prevented phosphorylation of the MTORC2 target AKT without reducing LC3-II/I ratios (**Fig. 3A**). Serum-starved fibroblasts exposed to R showed lowered CDNK1A and p16INK4a protein levels and decreased SA- β -gal activity (**Fig. 3A and 3D**). Long-term R treatment of serum-starved fibroblasts also reduced ACTA2 expression (**Fig. 3A**). Exposing serum-starved fibroblasts to Torin 1 and *siRICTOR* also decreased the expression of senescence and myofibroblast differentiation markers (**Fig. 3B, 3C, 3E**). Collectively, these results suggest that autophagy-induced MTORC2 activation concomitantly controls the expression of senescence markers and myofibroblast differentiation.

Reactive oxygen species (ROS) are involved in MTORC2-signaling, senescence and myofibroblast differentiation during sustained autophagy.

ROS are known inducers of autophagy²⁶ and senescence,¹⁶ depending on cell type and stress conditions. ROS are also known to be involved in myofibroblast differentiation.²⁷ We sought to investigate the role played by ROS in autophagy-induced senescence and myofibroblast differentiation. First, we evaluated ROS production in serum-starved fibroblasts. ROS were increased in cells starved for 1 or 4 hours (**Fig 4A**). Incubating cells with N-acetyl-L-cysteine (NAC) during SS blocked ROS production in serum-starved cells (**Fig 4A**). NAC prevented the increment of LC3-II/I ratios, obstructed CDKN1A and p16INK4a expression, and inhibited the up-regulation of CTGF and ACTA2 (**Fig 4B**). NAC also inhibited increased SA- β -gal activity (**Fig 4D**). We, therefore, undertook to verify if ROS are central to MTORC2 activation in serum-starved fibroblasts. Chelating ROS in serum-starved fibroblasts with NAC significantly reduced AKT phosphorylation at Ser473 (**Fig. 4C**). These results indicate that, in serum-starved fibroblasts, increased ROS production is a central trigger for autophagy induction which, in turn, activates MTORC2 and evokes downstream induction of senescence and myofibroblast differentiation.

DISCUSSION

Previous work has shown that autophagy and senescence affect tissue repair and that abnormal tissue repair can result in fibrosis.^{2, 3, 9, 10} In the present study, we focus on fibroblasts and the links between autophagy and senescence that may evoke myofibroblast differentiation, with myofibroblasts being major cellular determinants of ECM thickening seen in fibrosis. We found that ROS and sustained autophagy induce MTORC2 activity and that MTORC2 signaling concomitantly activates senescence and myofibroblast differentiation.

The role of autophagy in cellular senescence has been studied in the context of oncogene activation,¹² replicative senescence¹³ and telomere dysfunction.²⁸ Autophagy has been shown to accelerate, delay or have no effect on senescence. Here, we first demonstrated its role in the induction of senescence markers in serum-starved WI-38 cells. Inhibiting autophagy with 3-MA, LY or *siATG7* lowered the expression of senescence markers and myofibroblast differentiation. Then, we identified a new signaling pathway linking autophagy to senescence. MTORC2 activity, induced by prolonged SS, is necessary for the expression of senescence markers. Inhibiting MTORC2 activity with rapamycin, Torin 1 or *siRICTOR* lowered the expression of senescence markers and myofibroblast differentiation. Thirdly, we demonstrated the importance of ROS in this process. We inhibited ROS production in serum-starved fibroblasts with NAC, a ROS scavenger. We showed that ROS scavenging curbed MTORC2 activation, concomitantly limiting senescence and myofibroblast differentiation.

ROS are essential for the regulation of many cellular processes. They are known inducers of autophagy.²⁹ For example, they are essentials for ATG4 activation and autophagosome elongation.³⁰ ROS act as signaling molecules and many enzymatic activities are known to be regulated by their redox status. They also control protein phosphatases and protein kinases,

such as PTEN and AKT.³¹ MTORC2 activity is also sensitive to redox state.³² Based on these observations and our present findings, it is plausible that MTORC2 re-activation, in fibroblasts serum-starved long-term, is linked with ROS levels in cells. We noted that ROS production is rapidly and sustainably elevated in serum-starved fibroblasts. ROS chelation with NAC inhibits MTORC2 activity, differentiation and senescence but how ROS are produced after SS is still a mystery. Filomeni and al.²⁹ reported that a large amount of data converge to point out that mitochondria represent the principal source of ROS required for autophagy induction and that nutrient deprivation suddenly results in energetic stress which, in turn, increases ATP demand and causes mitochondrial overburden in the face of adverse conditions. As a consequence, electron leakage and ROS production increase.

Conversely, it is possible that long-term ROS production culminates in mitochondrial dysfunction. Indeed, high ROS levels are associated with oxidative stress, a known stimulus of senescence¹⁶ and with myofibroblast differentiation.^{27, 33} Oxidative stress harms cellular components, such as proteins, lipids and DNA. DNA damage is sensed by p53 which activates DNA damage response. If DNA cannot be repaired, the result may be senescence induction.

In the present experimental setting, NAC inhibited senescence induction, pro-fibrotic cytokine CTGF production and myofibroblast differentiation. NAC also suppressed autophagy induction. These data highlight the dichotomic part played by autophagy in senescence. As mentioned earlier, oxidative stress causes damage. Mitochondrial DNA is also a victim. It is possible that cumulative mitochondrial DNA damage causes mitochondrial dysfunction and enhances ROS levels, with autophagy being insufficient to restrain it. ROS then continuously damage nuclear DNA. Finally, senescence and myofibroblast differentiation follow.

In summary, our results suggest that in a nutrient-depleted environment, fibroblasts induce cell cycle arrest and the autophagic program attempts to adapt to stress. If these stressful conditions are sustained, ROS production will persist, favoring MTORC2 activation and leading to long-term cell cycle arrest/senescence induction and myofibroblast differentiation. Taking into consideration the importance of senescence and myofibroblast differentiation in tissue repair and fibrosis, our results highlight potential targets of intervention to control maladaptive tissue modeling.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

WI-38 human fibroblasts from normal embryonic lung tissue were purchased from the American Type Culture Collection (CCL-75), grown in fibroblast basal medium (Lonza, CC-3131) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (Wisent, 090150) (normal growth medium [N]) and used between passages 6 and 8. For growth factor deprivation, the fibroblasts were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS; Wisent, 311-425-CL) before being exposed to serum-free medium (SS). Media were replaced every other day. The cells were plated at a density of 20,000 cells/cm² in 6-well plates and exposed to experimental conditions or vehicle when they reached 80-90% confluency.

Immunoblotting

Cellular proteins were extracted, separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed, as described previously.^{14, 34-36} The antibodies used for Western blotting were anti-ACTA2/ α SMA (Sigma-Aldrich, A2547), anti-CTGF (Santa Cruz Biotechnology, sc-14939), anti-LC3B (Novus, NB600-1384), anti-human SQSTM1/p62 (Cell Signaling Technology, 8025), anti-phospho-AKT (Ser473; Cell Signaling Technology, 9271), anti-AKT (Cell Signaling Technology, 9272), anti-RICTOR (Cell Signaling Technology, 2114), anti-ATG7 (R&D Systems, MAB6608), anti-CDKN1A/p21 (BD Biosciences, BD556430) and anti-p16INK4a/p16 (BD Biosciences, BD551153). Membranes were stained with Ponceau S Red (Sigma, P-3504) as loading control, and after initial probing, they were stripped and re-probed with anti-alpha-tubulin (Calbiochem, CP06). Densitometric analyses

were conducted with AlphaImager, version 3.2 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA). Data are expressed in arbitrary units.

SA- β -gal staining

Cytochemical SA- β -gal detection was done as described previously.¹⁷ In brief, cells were washed with PBS, fixed in formalin (Sigma, HT5014), washed, and incubated overnight at 37°C with staining solution containing X-gal at 1mg/ml (Invitrogen, 15520-034), pH 6.0.

Analysis of ROS production

ROS generation was measured on adherent cells by fluorescent microplate reader after staining with CM-H2DCFDA (Molecular Probes, C6827), a dye which becomes fluorescent after oxidation by ROS. Briefly, cells were plated at 25,000 cells/well in 96-well dark-clear bottom plates. The next day, the wells were washed twice with PBS, and the cells were stained with 5 μ M CM-H2DCFDA in PBS at 37°C for 30 min. Then, the wells were washed once with PBS and incubated with treatment medium for the desired time period (1 or 4 h). The plates were read by fluorescent plate reader at excitation wavelength of 495 nm and emission wavelength of 525 nm.

Small interfering RNAs

For *ATG7* and *RICTOR* silencing, fibroblasts grown in normal conditions were harvested by trypsinization and separated in aliquots of 1.5 million cells. Separate aliquots were transfected with *siRICTOR* (Dharmacon, L-016984-00), *siATG7* (Dharmacon, L-020112-00), or siControl (Dharmacon, D-001810-03). We used the Amaxa Nucleofector electroporator (Amaxa,

Gaithersburg, MD, USA) and Nucleofector electroporation kit for WI-38 cells (Lonza, VCA-1001) according to the manufacturer's guidelines. The final concentration of siRNA was 150 pmol of siRNA/reaction. After electroporation, each cellular aliquot was plated in 2 wells of a 6-well plate in normal medium for 24 h. The media were then changed for the experimental condition (media without serum) after 2 washes with PBS. For 4 days in SS, the media were changed on day 2.

Reagents

LY294002 (440202) and 3-methyladenine (189490) were purchased from Calbiochem, rapamycin (R0395) and N-acetyl-L-cysteine (A9165) from Sigma, zeocin (46-0509) from (Invitrogen). Torin 1 (4247) was obtained from Tocris Bioscience. All other reagents were from Sigma Chemicals.

Statistical analysis

The results, expressed as means±SEM, were analyzed by unpaired Student's t-test or the Mann-Whitney test as appropriate. $p < 0.05$ was considered significant for all tests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-123436) to MJH, holder of the Shire Chair in Nephrology, Transplantation and Renal Regeneration of Université de Montréal. MJH is also supported by the Canadian Transplant Research Program (CNTRP). MB is the recipient of a fellowship from Fonds de la

recherche en santé du Québec (FRQS). The authors thank the J.-L. Lévesque Foundation for renewed support.

REFERENCES

1. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2002; 3:349-63.
2. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dolle ME, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell* 2014; 31:722-33.
3. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011; 192:547-56.
4. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008; 134:657-67.
5. Kim KH, Chen CC, Monzon RI, Lau LF. Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Mol Cell Biol* 2013; 33:2078-90.
6. Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature cell biology* 2010; 12:676-85.
7. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, et al. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:3343-56.
8. Shivshankar P, Brampton C, Miyasato S, Kasper M, Thannickal VJ, Le Saux CJ. Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47:28-36.
9. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Autophagy fuels tissue fibrogenesis. *Autophagy* 2012; 8:849-50.
10. Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, Czaja MJ, Friedman SL. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012; 142:938-46.
11. Gewirtz DA. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy* 2013; 9:808-12.
12. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavares S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23:798-803.
13. Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR, Park SC. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PloS one* 2011; 6:e23367.
14. Bernard M, Dieude M, Yang B, Hamelin K, Underwood K, Hebert MJ. Autophagy fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF. *Autophagy* 2014; 10:2193-207.
15. Itahana K, Dimri GP, Hara E, Itahana Y, Zou Y, Desprez PY, Campisi J. A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277:18206-14.
16. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nature reviews Cancer* 2006; 6:472-6.

17. Debaq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols* 2009; 4:1798-806.
18. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285:10850-61.
19. Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1997; 243:240-6.
20. Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275:992-8.
21. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8:445-544.
22. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 2005; 169:425-34.
23. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; 22:159-68.
24. Dufour M, Dormond-Meuwly A, Demartines N, Dormond O. Targeting the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Cancer Therapy: Lessons from Past and Future Perspectives. *Cancers* 2011; 3:2478-500.
25. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149:274-93.
26. Gibson SB. Investigating the role of reactive oxygen species in regulating autophagy. *Methods Enzymol* 2013; 528:217-35.
27. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int* 2011; 79:944-56.
28. Mar FA, Debnath J, Stohr BA. Autophagy-Independent Senescence and Genome Instability Driven by Targeted Telomere Dysfunction. *Autophagy* 2015:0.
29. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell death and differentiation* 2015; 22:377-88.
30. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; 26:1749-60.
31. Corcoran A, Cotter TG. Redox regulation of protein kinases. *The FEBS journal* 2013; 280:1944-65.
32. Nayak BK, Feliers D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, Fitzgerald JP, Eid A, Denapoli T, Parekh DJ, et al. Stabilization of HIF-2alpha through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* 2013; 32:3147-55.
33. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 2009; 15:1077-81.

34. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AMJ, Langelier Y, Bernard M, Raymond Y, Hebert MJ. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: Implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005; 174:5740-9.
35. Cailhier JF, Sirois I, Laplante P, Lepage S, Raymond MA, Brassard N, Prat A, Iozzo RV, Pshezhetsky AV, Hebert MJ. Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283:27220-9.
36. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, Beliveau A, Prat A, Pshezhetsky AV, Hebert MJ. Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell death and differentiation* 2010; 17:291-303.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Serum starvation induces senescence in fibroblasts. (A) Left panel: Western blot showing SQSTM1, ACTA2, CDKN1A and TUBA (tubulin) protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to serum-free medium (SS). Right panel: Densitometric analysis of SQSTM1 (**p=0.0016, 4 h vs 2 d; **p=0.0032, 4 h vs 4 d, representative of 5 independent experiments), ACTA2 (***p=0.0006, 2 d vs 4 d, representative of 5 independent experiments), CDKN1A (*p=0.0187, 0 vs 4 h, representative of 4 independent experiments) relative to tubulin. Data are presented as mean \pm s.e.m. (B) Western blot showing SQSTM1, ACTA2, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS medium or grown under normal conditions (N) (representative of 2 independent experiments). (C) Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity of cells grown in normal medium (N) or maintained without serum (SS) for 1, 3 or 7 days. Zeocin (Zeo) in normal media (50 ug/ml) served as a positive control. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m). (*p=0.0160, 0 vs SS 7 d; ****p<0.0001, 0 vs zeocin 7 d).

Figure 2. Autophagy induces senescence in serum-starved fibroblasts. (A) Upper left panel: Western blot showing LC3B-I and -II protein levels in WI-38 fibroblasts starved in the presence of 3-methyladenine (1 mM; 3-MA) or vehicle (V) for 4 h. Upper right panel: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (representative of 3 independent experiments, *p=0.0462). Lower left panel: Western blot showing ACTA2, CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts starved and incubated with 3-MA (1 mM) or V for 4 days. Lower right panel: Densitometric analysis of ACTA2 (****p<0.0001),

CDKN1A (*p=0.0116) and p16INK4a (*p=0.0115) relative to tubulin (representative of 3 independent experiments). **(B)** Upper left panel: Western blot showing LC3B-I and -II protein levels in WI-38 fibroblasts starved in the presence of LY294002 (5 μ M; LY) or vehicle (V) for 4 h. Upper right panel: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (representative of 3 independent experiments, **p=0.0045). Lower left panel: Western blot showing ACTA2, CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts serum-starved and incubated with LY (5 μ M) or V for 4 days. Lower right panel: Densitometric analysis of ACTA2 (*p=0.0485), CDKN1A (*p=0.0350), p16INK4a (**p=0.0012) relative to tubulin (representative of 3 independent experiments). **(C)** Left panel: Western blot showing ATG7, LC3B-I and -II, ACTA2, p16INK4a and tubulin (TUBA) protein levels in WI-38 fibroblasts serum-starved for 4 days post-nucleofection with control siRNA (siCTL) or *ATG7* siRNA (*siATG7*). Right panel: Densitometric analysis of LC3B-I/-II ratios (*p=0.0229), ATG7 (**p=0.0002), ACTA2 (*p=0.0134) and p16INK4a (*p=0.0230) protein levels relative to tubulin (representative of 4 independent experiments) in WI-38 fibroblasts silenced for *ATG7* expression. **(D)** Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity in cells serum-starved and incubated with 3-MA (1 mM) or V for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m). (*p=0.0417). **(E)** Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity in cells serum-starved and incubated with LY (5 μ M) or V for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m). (**p=0.0010).

Figure 3. Senescence induced by serum starvation depends on MTORC2 signaling. **(A)** Left panel: Western blot showing LC3B-I and -II, ACTA2, AKT Ser473 phosphorylation (AKT p), total AKT (AKT t), CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 4 days in the presence of rapamycin (10 nM; R) or vehicle (V). Representative of 3 independent experiments. Right panel: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (*p=0.0483), ACTA2 relative to tubulin (*p=0.0162), AKT p relative to AKT t (*p=0.0179), CDKN1A (*p=0.0202) and p16INK4a (**p=0.0061) relative to tubulin (representative of 3 independent experiments). **(B)** Western blot showing SQSTM1, ACTA2, CDKN1A, p16INK4a and TUBA protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 4 days in the presence of Torin 1 (250 nM; Torin) or V. Representative of 3 independent experiments. **(C)** Effects of MTORC2 inhibition by *RICTOR* silencing on levels of SQSTM1, ACTA2 and CDKN1A. Cells were incubated with SS for 4 days after electroporation with control siRNA (siCTL) or *siRICTOR*. Cell lysates were analyzed by Western blotting. Tubulin is used as loading control. **(D)** Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity in cells serum-starved and incubated with rapamycin (10 nM; R) or vehicle (V) for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m) (****p<0.0001). **(E)** Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity in cells serum-starved and incubated with Torin 1 (250 nM; Torin) or vehicle (V) for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m) (****p<0.0001).

Figure 4. ROS are required for autophagy-induced MTORC2 activation leading to senescence. **(A)** Upper panel: Starvation elicits ROS generation in WI-38 fibroblasts. Cells

were stained with CM-H2DCFDA and cultured for 1 h in the normal condition (N), without serum (SS) or without serum but with 10 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC) or 500 μ M hydrogen peroxide (H_2O_2) (as positive control). Fluorescence was measured by plate reader. * $p < 0.05$ N vs SS, NAC vs SS and H_2O_2 vs SS, in triplicate. Lower panel: Stained cells were incubated for 4 h in the conditions described in A before fluorescence was measured. * $p < 0.05$ N vs SS, NAC vs SS and H_2O_2 vs SS, in triplicate. **(B)** Left panel: Evaluation of LC3B-I and -II, ACTA2, CTGF, CDKN1A, p16INK4a and tubulin (TUBA) protein levels by Western blotting of WI-38 fibroblasts exposed to NAC 10 mM or vehicle (V) for 4 days. Right panels: Densitometric analysis of LC3B-II relative to LC3B-I (* $p = 0.0309$), ACTA2 (* $p = 0.0286$), CTGF (* $p = 0.0294$), CDKN1A (** $p = 0.0025$) and p16INK4a (** $p = 0.0056$) relative to tubulin. Data are presented as mean \pm s.e.m. Representative of 4 independent experiments. **(C)** Left panel: Evaluation of AKT Ser473 phosphorylation (AKT p) and total AKT (AKT t) by Western blotting in WI-38 fibroblasts exposed to SS for 2 days with N-acetyl-L-cysteine 10 mM (NAC) or vehicle (V) for 2 days. Right panel: Densitometric analysis of AKT p relative to AKT t (* $p = 0.0028$) Data are presented as mean \pm s.e.m. Representative of 3 independent experiments. **(D)** Cytochemical evaluation of the senescence marker SA- β -gal activity in serum-starved cells (SS) or starved and incubated with NAC (10 mM) for 7 days. Representative of 3 independent experiments. Data from one experiment are presented as % of SA- β -gal positive cells (mean \pm s.e.m). (** $p = 0.0019$).

Figure 1

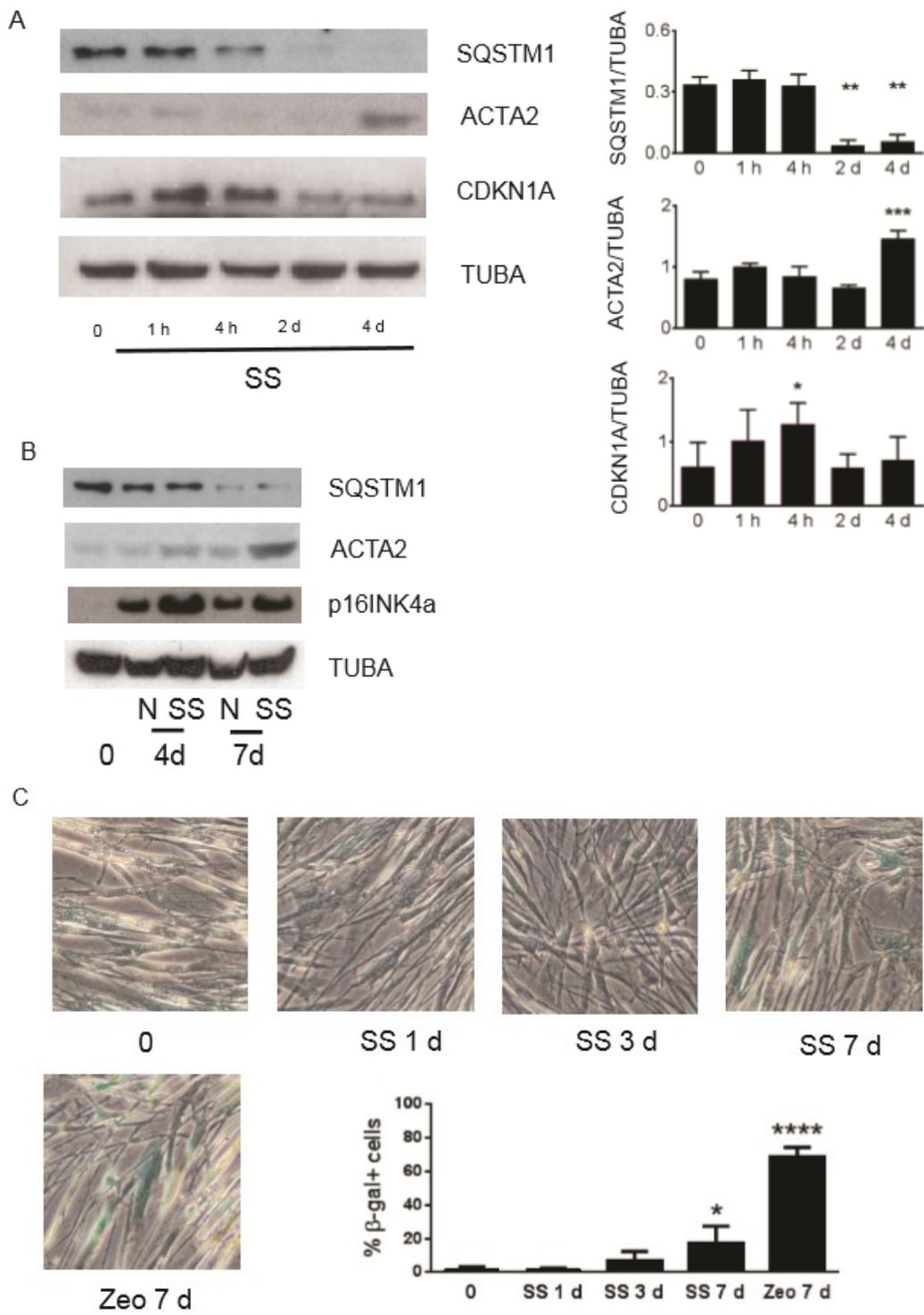


Figure 2

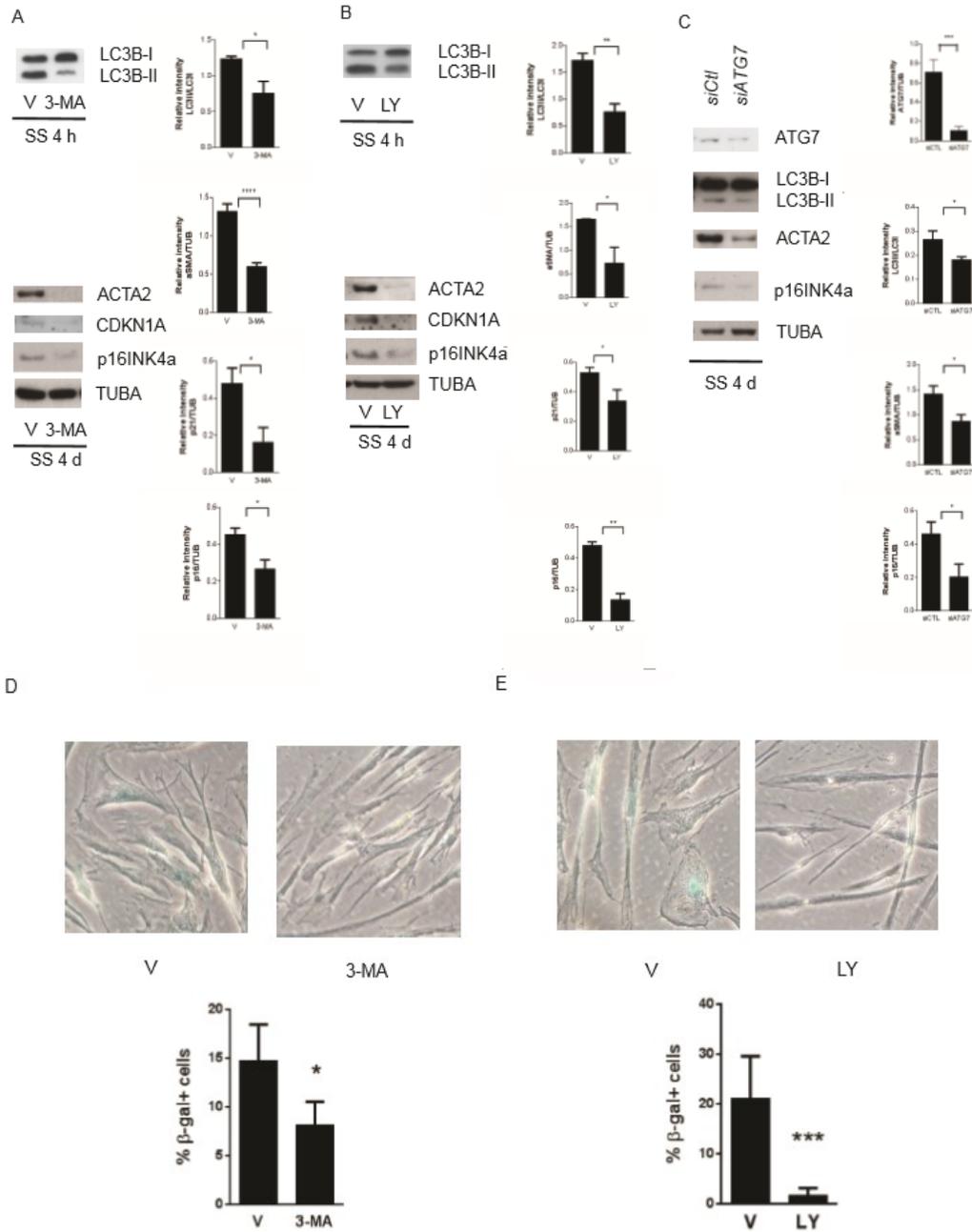


Figure 3

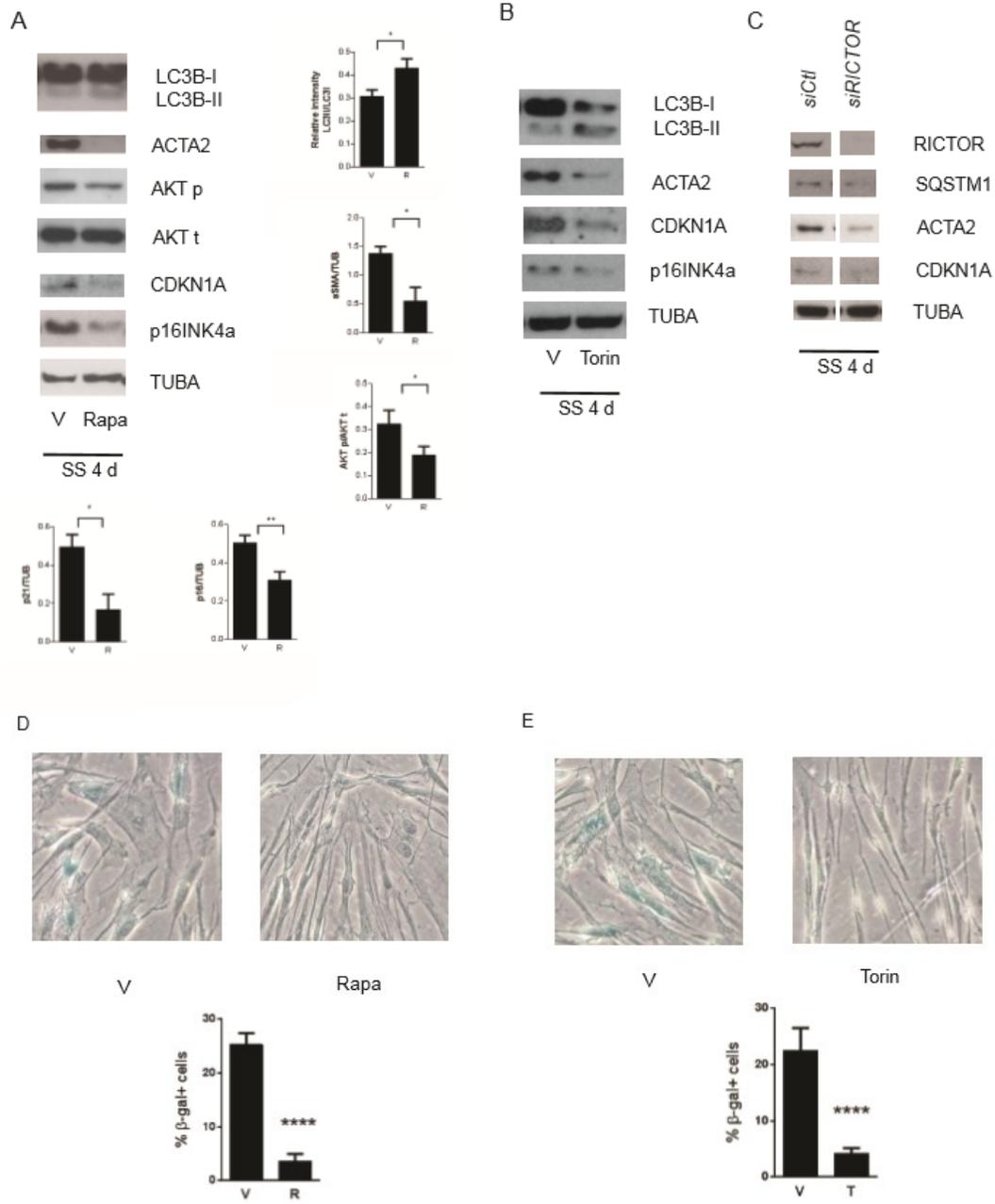
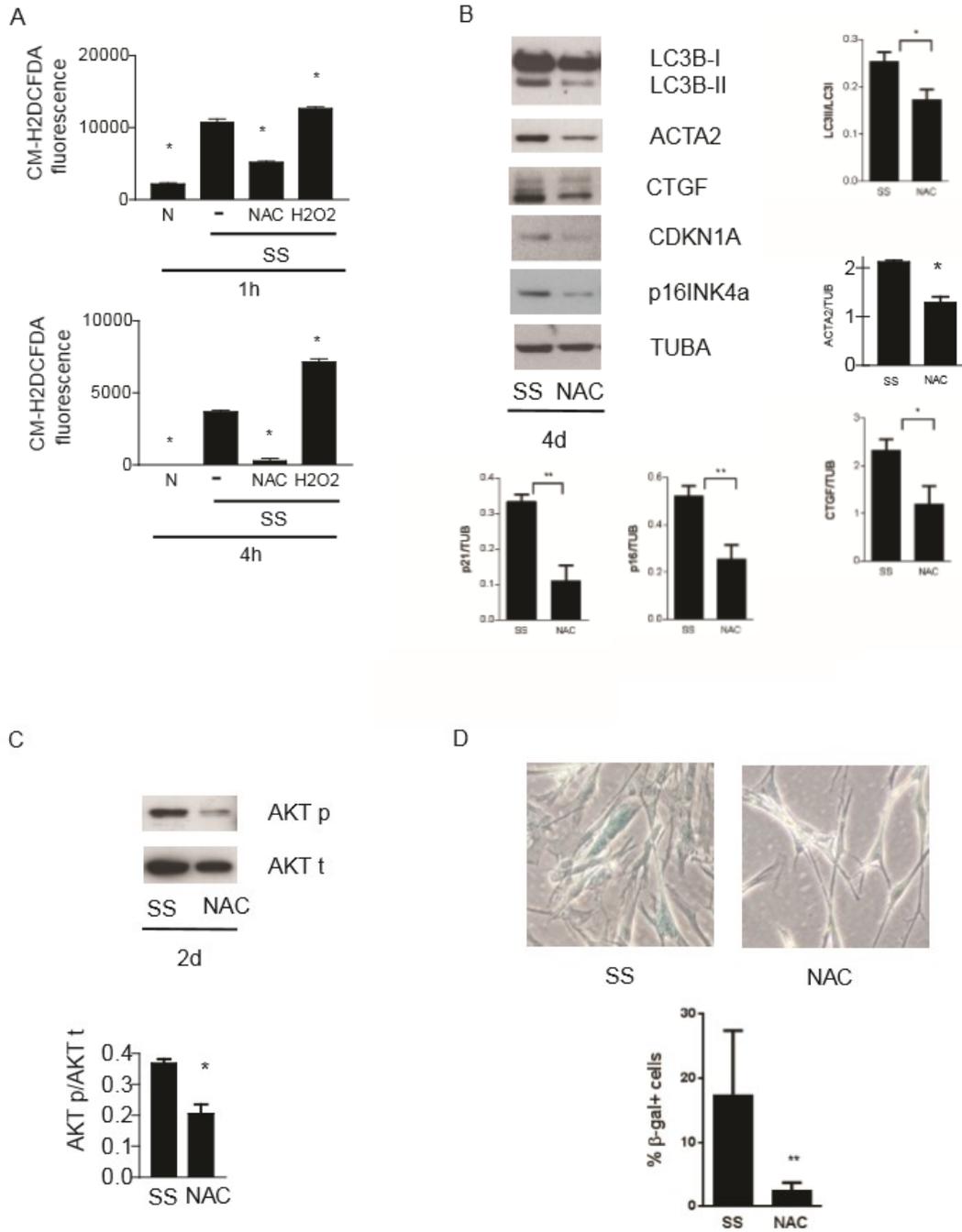


Figure 4



Discussion

7.1 Introduction

La fibrose est considérée comme un mécanisme de réparation tissulaire aberrant. Le myofibroblaste, par la sécrétion soutenue de protéines de la matrice extracellulaire, constitue un acteur de premier plan dans le développement et le maintien du processus fibrotique. La compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste a donc une importance primordiale afin de lutter contre ce processus pathologique qu'est la fibrose. Dans ce travail, nous avons mis en lumière le rôle joué par deux mécanismes d'adaptation au stress, soient l'autophagie et la sénescence, dans la différenciation myofibroblastique.

Tomasek a décrit les processus de réparation tissulaire normaux suite à une insulte comme une coupure de la peau.² Il a aussi décrit comment une insulte constante pouvait entraîner une réponse fibrotique (voir l'**introduction, partie 1**). Wynn¹³ a récemment révisé les connaissances sur le sujet (voir **figure 1**, page 146). Plusieurs stimuli peuvent entraîner la mise en branle du processus de réparation tissulaire, comme certains médicaments et toxines, l'infection ou l'inflammation. Le dommage à l'endothélium et/ou épithélium permet la relâche de facteurs dans l'environnement cellulaire qui favorise l'activation, le recrutement et la prolifération des cellules afin de former le tissu de granulation. Les cytokines, chemokines et facteurs de croissance vont activer les cellules du système immunitaire inné puis adaptif. *In vivo*, l'inflammation est donc nécessaire à la résolution de la plaie mais elle peut avoir des

effets négatifs si elle perdure dans le temps. Par exemple, la synthèse de cytokines comme l'IL-1 ou le TGFB, favorise l'activation cellulaire et la différenciation myofibroblastique.

Loin de vouloir minimiser les impacts des relations cellules-cellules et des cocktails de médiateurs qu'elles produisent, le travail présenté caractérise des mécanismes additionnels de réponse au stress chez les fibroblastes permettant de s'adapter à des conditions difficiles et pouvant potentiellement contribuer à la réponse fibrotique (**figure 1**, page 146). Le fibroblaste s'adapte au stress nutritionnel en activant l'autophagie. Si le stress perdure, il y a aussi activation des voies de sénescence. Lors de cette adaptation, le fibroblaste se différencie en myofibroblaste et synthétise des éléments tels les ROS, le CTGF, du collagène, qui ont tous été liés au développement de la fibrose.

Les mécanismes mis en place par le myofibroblaste pour assurer sa survie implique que le myofibroblaste reste présent dans le tissu tout en sécrétant des éléments pro-fibrotiques : ceci pourrait représenter un mécanisme de réponse chronique de réparation tissulaire qui dégénère en fibrose. Nous avons mis en lumière l'activation de voie cellulaire comme MTORC2/AKT dans ces conditions spécifiques. Cela permet d'entrevoir de nouvelles possibilités thérapeutiques ciblant les ROS, le CTGF, l'autophagie et/ou la voie de signalisation MTORC2/AKT. Il devient donc important de pouvoir transposer nos résultats dans un modèle animal afin de confirmer l'importance de ce phénomène *in vivo* et d'étudier les moyens de le contrecarrer.

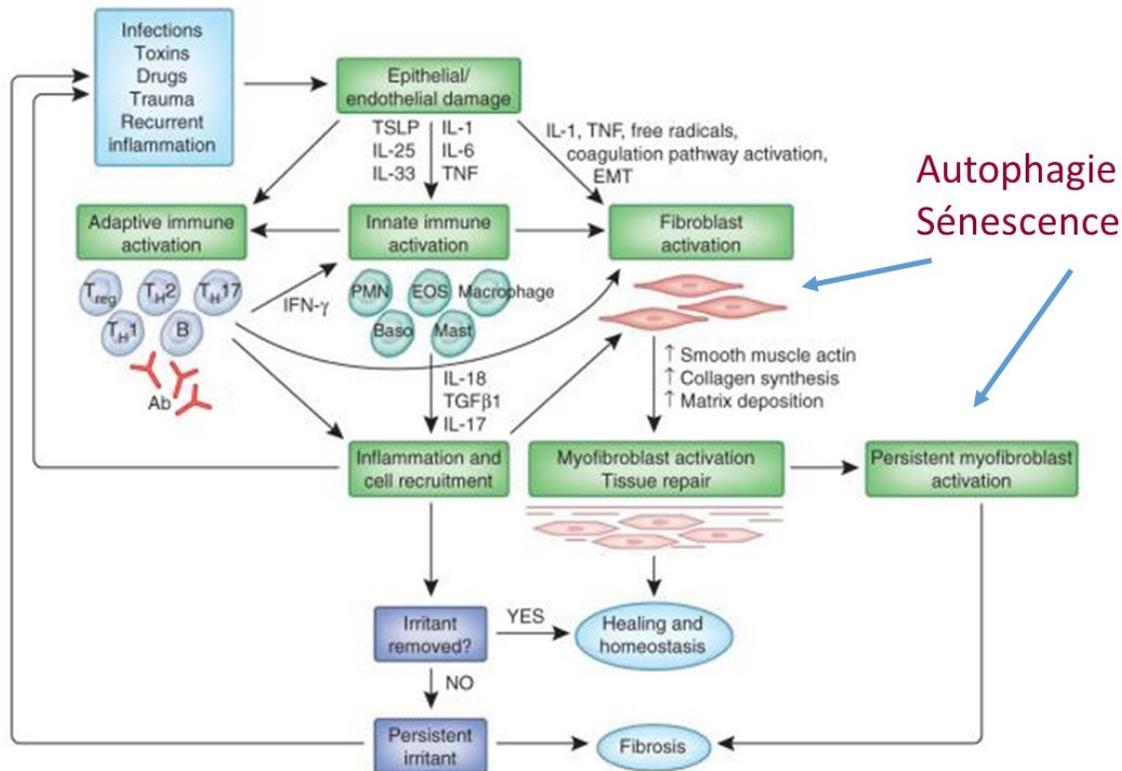


Figure 1. Réparation tissulaire versus fibrose.

Différents types d'insulte peuvent endommager les cellules de l'endothélium et de l'épithélium. Les cellules endommagées libèrent des médiateurs afin d'activer la réparation tissulaire. La réponse inflammatoire est activée ainsi que la réponse immunitaire. Les fibroblastes se multiplient et se différencient afin de produire des protéines de la matrice extracellulaire pour refermer la plaie. Si les facteurs causant le dommage sont persistants ou que les myofibroblastes restent présents, il peut y avoir une réponse chronique de réparation tissulaire qui dégénère en fibrose. Nous proposons que l'autophagie prolongée et la sénescence, en permettant au fibroblaste de s'adapter au stress, participent au processus fibrotique.

Adapté avec permission de Wynn and Ramalingam. Nat Med 2012; 18:1028-40.

7.2 ROS

Nous savons que les ROS nous sont indispensables. Ils sont le produit de la respiration cellulaire. De plus, ils sont de plus en plus considérés comme une réponse physiologique normale nécessaire à l'accomplissement de réactions biologiques. L'oxydation de molécules serait une autre forme du contrôle cellulaire sur ses voies métaboliques, au même titre que la phosphorylation des enzymes ou l'ubiquitination des protéines. Par exemple, ATG4 est une protéine essentielle à l'autophagie. Elle est normalement active dans la cellule : elle permet le clivage du groupement PE du LC3BII. Lorsqu'il y a carence en éléments nutritifs, des ROS sont produits et il y a oxydation d'ATG4, donc inactivation, ce qui permet l'accumulation du LC3BII et l'élongation du phagofore.¹⁹⁴

Nous avons montré dans notre étude que les ROS sont nécessaires au maintien de l'autophagie à long terme, pour l'activation du complexe MTORC2, pour l'expression des marqueurs de sénescence ainsi que pour la différenciation myofibroblastique. L'emploi de NAC en carence de sérum¹⁹⁵, un chélateur de ROS, inhibe tous ces événements. Il serait possible que l'activité d'AKT ou de MTORC2 soit directement régulée par leur niveau d'oxydation. Dans la littérature, il y a de plus en plus d'évidences que les phosphatases ainsi que les kinases pourraient être régulées par leur niveau d'oxydo-réduction. Les rapports sont divergents quant à l'effet de l'oxydation d'AKT, certains trouvent un effet activateur alors que d'autres trouvent l'effet inverse.¹⁹⁶

Une étude récente montre que l'activité du complexe MTORC2 serait sensible au niveau d'oxydo-réduction.¹⁹⁷ Cette étude a été réalisée dans une lignée tumorale de cancer du rein

(Renal Cell Carcinoma ou RCC) déficiente en protéine VHL (van Hippel-Lindau). Dans ce type de cancer, la protéine HIF2a est stabilisée car il y a absence de VHL qui normalement permet la dégradation de HIF au protéasome. HIF peut alors activer la transcription du VEGF, ce qui favorise la progression tumorale et la formation de métastases. Dans la lignée RCC, l'inhibition de l'activité NOX par silençage de la sous-unité p22phox entraîne une diminution de l'activité MTORC2. Ceci est constaté par diminution de la phosphorylation d'AKT Ser473. Il y a moins de complexe MTORC2 formés dans les cellules p22phox- après co-immunoprécipitation. L'expression de HIF2a dans les cellules RCC silencées est aussi diminuée, suggérant le contrôle de l'expression de HIF2a par MTORC2 dans ces cellules. Les auteurs suggèrent que la quantité élevée de ROS dans les cellules RCC stabilise l'expression de RICTOR et donc la formation de complexes MTORC2. Les cellules RCC sont donc vulnérables à une diminution de ROS. Pourrait-il en être de même chez les myofibroblastes? La régulation du CTGF, l'agent pro-fibrotique initiateur de la différenciation myofibroblastique lors de l'autophagie prolongée pourrait-elle être influencée par les niveaux d'activité de la NADPH Oxydase?

Dans notre étude, nous n'avons pas encore déterminé comment se fait la réactivation du complexe MTORC2 constatée après 2 jours d'incubation dans le milieu sans sérum. Une piste intéressante à investiguer serait la possibilité d'un changement de régulation de l'activité MTORC2 produit par des changements dans les niveaux (quantité) ou les types (qualité) de ROS présents. La NOX4 a été montrée comme produisant des ROS nécessaires à la différenciation myofibroblastique induite par le TGFB.¹⁶⁵ Est-ce que cet enzyme pourrait aussi contribuer à la différenciation médiée par l'autophagie prolongée? Pour vérifier cette

hypothèse, nous pourrions silencer la sous-unité NOX4 de la NADPH oxydase qui est retrouvée dans les fibroblastes et analyser l'effet sur MTORC2 et l'expression du CTGF.

Les ROS peuvent aussi avoir des effets délétères s'ils se retrouvent en trop grande quantité pendant trop longtemps. On parle alors de stress oxydant. Le stress oxydant est un stimulus de la sénescence. On croit que le stress oxydant cause des dommages à l'ADN comme l'oxydation des bases (surtout la guanine), la création de liaisons entre les brins d'ADN, des bris simple brin ou double brin.¹⁹⁸ Ces modifications peuvent causer des mutations et être très dommageables pour l'organisme, car pouvant entraîner la formation de tumeurs. Heureusement, il existe un système pour alerter le génome de ces attaques et permettre la réparation de l'ADN. p53 est décrit comme le gardien du génome. Il représente un checkpoint métabolique car ce facteur de transcription est au sommet de plusieurs voies de signalisation qui détermine le devenir de la cellule.¹⁴¹ Lorsque la cellule est endommagée, p53 commandera un arrêt du cycle cellulaire, il mettra en branle les mécanismes de réparation de l'ADN. Si le dommage est trop important, il choisira si la cellule mourra par apoptose ou dirigera l'entrée en sénescence.

p53 dirige l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence en activant la kinase inhibitrice de cyclines p21 (se référer à l'**introduction, figure 5**). Dans notre étude, la carence en sérum provoque un arrêt du cycle cellulaire avec augmentation des niveaux de p21 à court terme suivi d'une diminution à plus long terme. Ces résultats sont en accord avec ceux du groupe de Dr Campisi qui avait décrit ce phénomène chez les cellules WI-38 et son contrôle par p53 en 2002.¹⁴⁵ L'arrêt du cycle peut entraîner la mise en branle de processus de réparation de

l'ADN. Si des dommages importants sont présents, par exemple, après irradiation ou un stress génotoxique, il y a activation de la DDR. Il y aura formation de foci de réparation de l'ADN qui pourront être détectés par immunofluorescence à la suite d'un marquage par un anticorps spécifique à une protéine de réparation. Lorsque les dommages sont importants, comme des cassures double brin, les foci de réparation deviennent permanents et on les appelle des DNA-scars.¹⁴⁸ C'est ce qui se produit lorsque les cellules WI-38 sont traitées à la zéocine, un antibiotique qui cause des cassures double brin à l'ADN.¹⁹⁹ Les cellules WI-38 traitées à la zéocine pendant 7 jours sont sénescents, comme nous avons pu le constater après coloration pour le marqueur SA-beta-galactosidase (environ 70% de cellules positives i.e. bleues). Comparativement, les cellules WI-38 carencées en sérum pour 7 jours montrent une coloration bleutée à environ 20%. Cela semble suggérer que les dommages causés par le stress oxydant n'est pas un inducteur aussi puissant de dommage à l'ADN que l'agent génotoxique zéocine.

Dans notre étude, la carence en sérum induit la formation de ROS qui active l'autophagie. Comme les mitochondries représentent une source élevée de ROS dans les cellules, on peut penser que l'autophagie aurait pour fonction de réguler la quantité de ROS présents en diminuant la quantité de mitochondrie. On parle alors d'une autophagie tournée vers le contrôle des mitochondries, qui est dénommée mitophagie. Comme décrit par Filomeni,¹⁹⁸ les ROS produisent également du dommage à l'ADN mitochondrial. Les mitochondries endommagées produiraient alors plus de ROS par la mise en place d'une boucle de rétroaction positive. L'autophagie, ou mitophagie dans le cas présent, pourrait être insuffisante pour contrôler les niveaux de ROS et cela entraînerait à long terme la mise en place du programme de sénescence et de différenciation myofibroblastique.

Cependant, cela ne semble pas être le cas dans notre système puisque : 1- Les ROS sont en amont de l'autophagie (**Figure 4 B**, article 2). 2- L'inhibition de l'autophagie en carence de sérum ne produit pas une augmentation de la différenciation myofibroblastique mais plutôt son inhibition. Il semble donc que la mitophagie ne soit pas la seule façon que possède le fibroblaste pour réguler son niveau de ROS. Lorsque l'autophagie est inhibée biochimiquement dans les WI-38 en SS, il semble y avoir des mécanismes de compensation empêchant un changement dans les niveaux de ROS (résultats non montrés). Cela peut suggérer aussi que la mitophagie ne régule pas les niveaux de ROS tout simplement dans notre système. 3- Nous avons montré que MTORC2 contrôle la différenciation. Les ROS et l'autophagie sont nécessaires pour ce phénomène (NAC ou inhibition de l'autophagie bloque la phosphorylation d'AKT). Quel est la part de chacun et de la combinaison des deux pour le phénotype étudié reste à déterminer.

Nous pourrions investiguer le rôle des mitochondries et de la mitophagie dans notre système en nous inspirant des travaux du groupe du Dr Zvulun Elaza.¹⁹⁴ En analysant les cellules par co-marquage avec un colorant qui devient fluorescent après liaison avec un ROS (DCFDA) et un colorant spécifique pour les mitochondries (Mitotracker) on serait à même de déterminer si les ROS produits dans les myofibroblastes proviennent des mitochondries et donc de déterminer d'où viennent les ROS.

Comme la NOX4 est un enzyme retrouvé à la membrane plasmique²⁰⁰ et que nous suspectons qu'elle soit impliquée dans la différenciation myofibroblastique induite par une autophagie prolongée, nous devons considérer que plusieurs types de ROS produits par plusieurs

mécanismes pourraient être impliqués dans le phénomène à l'étude. On peut suggérer que les niveaux d'autophagie ou d'induction de la sénescence pourraient être reliés à ces différents mécanismes de production de ROS. Il serait possible de faire des co-marquages afin de déterminer quelles cellules produisent les ROS, les cellules autophagiques et/ou sénescents car il pourrait y avoir hétérogénéité au sein de la population de WI-38 quant au statut des cellules (voir la page 157 pour plus de détails).

De plus, il serait intéressant de déterminer qu'elles sont les voies qui sont impliquées dans l'activation de la sénescence par la carence en sérum puisqu'il ne semble pas que les cassures double brin de l'ADN soit une voie majeure dans le système étudié ici. Comme discuté plus haut, les cellules carencées en sérum sont à 20% positives pour le marqueur de sénescence SA-b-gal alors que le contrôle positif (cellules traitées par un agent causant des cassures double brin) est à 70%. La voie p38MAPK a été montrée comme pouvant jouer un rôle dans la sénescence induite par divers stimuli.²⁰¹ Il a été démontré depuis longtemps qu'une brève exposition de fibroblastes à du peroxyde dans du milieu Normal induit un arrêt irréversible du cycle cellulaire.²⁰² Plus récemment, Luo et al²⁰³ ont montré que l'autophagie est nécessaire à l'induction de la sénescence par le peroxyde dans les WI-38. Une exposition des WI-38 à 250 uM H₂O₂ dans du milieu Normal pendant 2 hres permet l'observation des marqueurs de sénescence 6 jours après le traitement. La pré-incubation des cellules avec un siRNA *ATG5* abolit le développement de la sénescence. Il y a diminution du niveau protéique de p21 dans les cellules *ATG5*-. L'autophagie serait ainsi responsable de l'augmentation de l'expression de p21. Le peroxyde activerait la production de ROS endogènes qui eux induiraient l'autophagie et l'activation de la p38MAPK. Dans leur étude, l'ajout de NAC après le traitement au

peroxyde est capable d'inhiber l'induction de l'autophagie et de la sénescence, montrant l'importance des ROS endogènes dans leur système. Le peroxyde induit la phosphorylation de la p38MAPK et le SB203580, un inhibiteur de p38MAPK, bloque l'autophagie et l'augmentation de l'expression de p21. En regard des similitudes entre les résultats obtenus entre leur système d'étude et le nôtre (implication de ROS endogènes), il serait intéressant d'évaluer l'état d'activation de la p38MAPK (phosphorylation par Western Blot) ainsi que l'effet du SB203580. Est-ce que la p38MAPK est un intermédiaire entre les ROS et l'induction de l'autophagie dans notre système? Son action est-elle en amont de MTORC2?

7.3 CTGF

Le TGFB est la cytokine pro-fibrotique par excellence. Elle est sécrétée par plusieurs types cellulaires dont le fibroblaste. Le TGFB était donc un candidat de choix à considérer comme pouvant être à l'origine de la différenciation myofibroblastique induite lors d'une autophagie prolongée. À l'aide d'anticorps neutralisant l'activité des 3 différents isoformes du TGFB, nous avons montré que la différenciation myofibroblastique observée en absence de sérum était indépendante du TGFB. Nous avons aussi analysé l'état de phosphorylation des SMADs dans notre système d'étude afin de déterminer le niveau d'activation de cette voie. La voie SMAD régule directement la différenciation myofibroblastique en activant la synthèse d'aSMA. La voie SMAD peut être activée par le TGFB mais aussi par d'autres membres de la famille des TGFs comme les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) et les activines. Les SMADs n'étant pas phosphorylés dans notre système, nous nous sommes tournés vers d'autres

médiateurs et voies de signalisation connus comme étant impliqués dans la différenciation myofibroblastique.

Nous avons alors considéré le CTGF comme un médiateur potentiel dans la différenciation initiée par l'autophagie prolongée. Le CTGF est une autre cytokine pro-fibrotique majeure. Le TGFB peut activer la synthèse du CTGF car le promoteur du CTGF contient un Smad Binding Element. Cependant, le CTGF peut aussi être produit indépendamment du TGFB. Le CTGF a été montré comme pouvant activer AKT, dans les cellules mésangiales du moins.⁶⁹ Des travaux du groupe de Dr Hébert ont montré que le CTGF ainsi que le milieu conditionné de cellules endothéliales apoptotiques (contenant du CTGF) activaient la différenciation myofibroblastique par une voie PI3K/AKT dépendante. Cette activité pro-fibrotique est indépendante du TGFB.⁵⁶ Ces résultats laissent suggérer que la voie AKT pourrait être activée dans notre système d'étude et que le CTGF pourrait y jouer un rôle important.

Après avoir vérifié que le CTGF était bien synthétisé dans les fibroblastes en conditions pro-autophagiques (par q-PCR), nous avons montré que son expression intracellulaire ainsi que extracellulaire augmentaient lors de l'incubation en milieu sans sérum par Western Blot. L'inactivation génique du *CTGF* a montré hors de tout doute l'importance du CTGF pour la différenciation lors d'une autophagie prolongée. Cependant, cela ne veut pas dire qu'il n'y a pas d'autres joueurs impliqués. Il est connu que le TGFB a besoin de ROS pour une action optimale sur la différenciation myofibroblastique.^{167, 168} Nous avons montré que les ROS sont nécessaires à la différenciation myofibroblastique lors d'une autophagie prolongée par l'utilisation de NAC. Est-ce que les ROS peuvent moduler le CTGF directement? Il a été montré que l'ajout de peroxyde induisait l'expression du CTGF de façon TGFB indépendante

dans une lignée de cellule épithéliale.²⁰⁴ Cependant, l'ajout de ROS exogène comme du peroxyde amplifie la réponse TGF β dépendante chez les fibroblastes.²⁰⁵

Il ne serait pas surprenant que d'autres facteurs puissent avoir un rôle dans la différenciation médiée par la carence en éléments nutritifs. Nous n'avons pas analysé de manière exhaustive le contenu du milieu conditionné par les cellules WI-38 autophagiques. Il est possible qu'une analyse par spectrométrie de masse, comme celle réalisée par Dr Sirois sur le milieu conditionné par les cellules endothéliales apoptotiques²⁰⁶ nous en apprendrait beaucoup sur les médiateurs présents. Les médiateurs identifiés jusqu'à présent jouent un rôle sur la différenciation myofibroblastique (CTGF, ROS) mais aussi sur la sénescence. Les WI-38 incubés en absence de sérum en présence de NAC ne développent pas de coloration SA-beta-galactosidase et ne montrent pas une augmentation de l'expression de p21 et p16.

Les cellules sénescents ont un sécrétome particulier identifié, en outre, par le groupe du Dr Campisi¹⁴⁹ et dénommé SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype, voir section **3.1.5**). Le CTGF a été identifié dans le SASP. Les fibroblastes sénescents sécrètent les Interleukines 1, 6 et 8. Ce sont des cytokines pro-inflammatoires qui sont aussi liées à la fibrose.¹³ Il serait intéressant de doser ces interleukines dans le milieu conditionné sans sérum des WI-38 et de comparer ces niveaux avec ceux de cellules dont la sénescence est obtenue par d'autres voies (exemple : zéocine qui cause un stress génotoxique). Nous pourrions être en mesure de définir un nouveau type de SASP : l'ASASP pour Autophagy and Senescence Associated Secretory Phenotype. Le sécrétome des cellules autophagiques commence aussi à être étudié et des différences sont trouvées entre les protéines sécrétées par des cellules dont les niveaux d'autophagie varient.²⁰⁷

Le SASP est capable d'induire la sénescence par un effet paracrin.²⁰⁸ Nous savons déjà que le milieu sans sérum conditionné par les WI-38 augmente la différenciation myofibroblastique comparativement à des WI-38 incubés en milieu sans sérum (résultats non montrés). En-est-il de même pour les marqueurs de sénescence? Le CTGF est-il important pour cet effet? Nous pourrions vérifier cela en invalidant le CTGF dans des WI-38 à l'aide de siRNA, en produisant du milieu conditionné en incubant les cellules sans sérum et en incubant des WI-38 naïves avec ce milieu conditionné dépourvu de CTGF. Nous nous attendons à ce que la différenciation et la sénescence soient moindres avec l'utilisation d'un milieu conditionné produit à l'aide de fibroblastes CTGF-.

Il faut noter que l'équipe du Dr Hébert a déjà démontré l'importance du CTGF contenu dans le milieu conditionné de cellules endothéliales apoptotique pour le développement de la fibrose cutanée chez la souris. Le milieu conditionné de cellules endothéliales apoptotique immunodéplété en CTGF induit beaucoup moins la fibrose cutanée que le contrôle. Nous pourrions nous servir du même modèle afin de démontrer l'effet de l'ASASP *in vivo*. Nous nous attendons à ce que le milieu conditionné sans sérum par des fibroblastes (autophagiques et sénescents) soit inducteur de la fibrose cutanée chez la souris. Nous nous attendons à ce que le CTGF contenu dans ce milieu joue un rôle primordial pour le développement de la fibrose, ce qui serait vérifié par immunodéplétion du CTGF dans ce milieu avant injection. Il serait aussi intéressant de bloquer l'effet des ROS dans le milieu conditionné par l'ajout de NAC et ainsi vérifier l'importance des ROS dans l'établissement de la fibrose cutanée. Si ce milieu est capable d'induire la sénescence paracrine, il serait intéressant de le vérifier dans ce modèle. Par analyse immunohistochimique de la peau au site d'injection, il serait possible de déterminer si il y a augmentation de cellules positives pour les marqueurs de sénescence (p16,

p21, SA-beta-galactosidase). Il serait ainsi possible de transposer nos découvertes dans un modèle *in vivo* et de répondre à une question : est-ce que la production d'un ASASP peut être liée à la fibrose?

Nos résultats de WB montrent que l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence sont induits dans les fibroblastes en carence de sérum. L'analyse de l'activité SA-beta-galactosidase montre un % de cellules positives autour de 20 pour ce marqueur à 7 jours. Cela suggère que l'acquisition de marqueurs de sénescence ce fait selon un continuum, au gré de l'accumulation de dommage causés par les ROS par exemple. Comme le marqueur SA-beta-galactosidase n'est pas 100% positif, cela permet de supposer qu'il peut en être de même pour les autres marqueurs étudiés (p16, p21). Cela permet aussi de supposer qu'il pourrait y avoir hétérogénéité au sein de la population de WI-38 quant au statut des cellules : y-a-t-il des cellules autophagiques, d'autres sénescents? À ce moment-là, qu'elles seraient les cellules responsables de la sécrétion accrue de CTGF? Une étude récente parue dans *Autophagy*²⁰⁹ démontre que les résultats observés au niveau d'une population de cellules quant au niveau de sénescence et d'autophagie ne représentent pas nécessairement ce qui se passe au niveau des cellules si on les regarde de façon individuelle.

Dans leur étude, Filippi-Chiela et al.²⁰⁹ définissent la sénescence par morphométrie. Par microscopie, ils prennent des photos à intervalles réguliers et analyses les cellules de façon individuelle à l'aide d'un logiciel qu'ils ont créé. Ils mesurent la surface de la cellule (la cellule sénescence étant plus étendue) ainsi que la surface et la forme du noyau: un gros noyau régulier étant signe de sénescence. Les cellules, plus spécifiquement une lignée de gliome, ont été préalablement infectées par lentivirus exprimant GFP-LC3. L'autophagie est évaluée par

dénombrement des puncta GFP par cellule ou par Western Blot. Suite à l'ajout d'un agent génotoxique, des mesures des cellules sont prises par microscopie à différents jours et l'analyse par WB est faite en parallèle. Au niveau de la population, les marqueurs d'autophagie utilisés sont rapidement induits (3 jours) et diminuent par la suite. Les changements morphologiques ne commencent à apparaître qu'après 3 jours. Cependant, si on regarde les cellules de façon individuelle, il n'y a pas la même cinétique : des cellules GFP positives ou négatives sont présentes à tous les temps étudiés (jusqu'à 7 jours) et les marqueurs de sénescence n'apparaissent pas seulement lorsque le GFP disparaît.

Il serait possible d'étudier les fibroblastes de façon individuelle lors de leur incubation en milieu sans sérum en suivant une démarche expérimentale similaire. Nous pourrions marquer les cellules par immunofluorescence et les analyser par microscopie confocale. Les fibroblastes seraient infectés avec le baculovirus GFP-LC3 déjà utilisé dans nos études²¹⁰ pour suivre l'autophagie. Des anticorps p16 et p21 couplés à des fluorophores seraient utilisés pour évaluer la sénescence et bien sûr, l'anticorps CTGF serait utilisé en parallèle. Quelles seraient alors les cellules responsables de la synthèse du CTGF? Les cellules autophagiques, sénescents ou les deux? Cela nous permettrait de déterminer si le CTGF, dans nos conditions est bien un marqueur de sénescence ou bien d'autophagie. Cela a aussi des implications si on pense à l'ASASP. On suppose que la constitution du sécrétome des fibroblastes incubés dans le milieu sans sérum va varier avec le temps et donc que l'effet de l'ASASP sur les cellules avoisinantes pourrait aussi évoluer dans le temps. Il est déjà connu que le SASP peut avoir des effets différents dépendant du type cellulaire en cause.¹⁹ Notre approche permettrait de

déterminer les effets de l'ASASP de façon contexte dépendant (effet différent dépendant des proportions de cellules autophagiques/sénescentes).

Les résultats de ces expériences auraient aussi des répercussions pour notre étude *in vivo*. Comme nous l'avons montré, la quantité de CTGF sécrété par les WI-38 incubés en absence de sérum augmente avec le temps. On s'attendrait à ce que le milieu conditionné sans sérum produit à 7 jours et injecté sous-cutané à des souris possède des effets pro-fibrotiques plus importants que celui produit à 2 jours. Cela reste à confirmer. On peut supposer que les autres cytokines pro-inflammatoires seraient augmentées aussi et qu'elles agiraient de concert avec le CTGF pour augmenter le processus fibrotique.

7.4 MTORC2

Nos travaux soulèvent plusieurs questions. Par exemple, comment MTORC2 régule-t-il la synthèse des protéines liées à la sénescence et à la différenciation myofibroblastique? Il est reconnu que la synthèse protéique est sous le contrôle de MTORC1¹¹⁹. MTORC1 est inactif dans nos conditions (**Figure 5B et Figure supp. 7 A et B de l'article 1**). Pourtant nous observons bien la synthèse de protéines. Qui plus est, nous observons la mise en place d'un programme d'expression protéique différent de celui des cellules en milieu Normal. Nous observons la synthèse d'aSMA, l'augmentation du CTGF, des collagènes, etc. L'expression de ces protéines diminue avec les inhibiteurs de MTORC2 comme le *siRICTOR*, le Torin1 et la rapamycine utilisée à long terme. Les connaissances sur MTORC2 sont actuellement limitées. On sait que l'activité de MTORC2 nécessite la présence de ribosomes.¹²⁶ On sait aussi que

dans des cellules tumorales RCC déficientes en VHL, la synthèse de HIF2a est sous le contrôle de MTORC2. De plus, dans les cellules RCC, il semble que la formation du CAP nécessaire à la traduction de l'ARN messager HIF2a est activée de manière indépendante de MTORC1 mais dépendante des ROS et de MTORC2.¹⁹⁷ Est-ce que la formation du CAP nécessaire à la traduction des protéines impliquées dans le programme de différenciation myofibroblastique en autophagie prolongée est aussi dépendante de MTORC2? Il est fort à parier qu'un nouveau rôle pour MTORC2 pointe à l'horizon: celui du contrôle de la synthèse protéique lorsque TORC1 est inactif.

Au cours de nos travaux, nous avons mis en lumière de nouveaux rôles du complexe MTORC2 : le contrôle de la sénescence et de la différenciation myofibroblastique en des conditions d'autophagie prolongée. Un nouveau rôle pour TORC2 (l'équivalent de MTORC2 chez la levure) a aussi été identifié au même moment chez la levure. Des travaux du groupe de Powers^{211, 212} ont identifié TORC2 comme un régulateur de l'autophagie et du métabolisme des acides aminés en des conditions de carence drastique en éléments nutritifs. TORC2 agit comme un activateur de l'autophagie dans ces conditions. Il promeut l'activation de la voie de contrôle du métabolisme des acides aminés. TORC2 et MTORC2, et pas seulement TORC1 et MTORC1, semblent donc avoir une importance considérable dans la capacité des êtres vivants à s'adapter à un stress nutritionnel.

Une autre question soulevée par nos travaux demeure non résolue pour l'instant. Comment l'autophagie active MTORC2? Des travaux du groupe de Dr Friedman¹⁰⁴ ont démontré que les HSC (Hepatic Stellate Cells) avaient la capacité de dégrader les lipides qu'elles ont stockés

dans des gouttelettes lipidiques par autophagie. L'activation de l'autophagie est nécessaire à la différenciation myofibroblastique et au développement de la fibrose dans leur modèle murin de fibrose hépatique. Dans leur modèle, la fibrose hépatique est causée par un agent chimique, le CCl₄ (carbon tetrachloride). La fibrose est dépendante de l'induction de l'autophagie dans les HSC car des souris dont le gène *ATG7* est invalidé spécifiquement dans les HSC ne développent pas la fibrose. *In vitro*, l'inhibition de l'autophagie dans les HSC amène une augmentation des gouttelettes lipidiques et une diminution de l'ATP. Les niveaux d'ATP peuvent être restaurés par l'addition exogène d'acide gras. De plus, l'inhibition de l'oxydation des acides gras par l'étomoxire bloque la différenciation des HSC. Est-ce que les lipides ont un rôle à jouer dans l'activation de MTORC2 dans notre système? Si nous utilisons l'étomoxire, qui est un inhibiteur spécifique d'un enzyme essentiel à l'oxydation des acides gras, lors de l'incubation sans sérum des fibroblastes, allons-nous bloquer la différenciation myofibroblastique? Serait-il possible que l'oxydation des acides gras soit une source de ROS dans notre système? En effet, il est décrit que l'oxydation des acides gras est une source de ROS mitochondriaux.²¹³ La lipophagie, ou autophagie des lipides, commence à être caractérisée. Des colorants spécifiques pour les lipides sont utilisés (BODIPY 493/503, HCS LipidTOX), en accompagnement des marqueurs traditionnels de l'autophagie pour évaluer les niveaux de lipophagie dans les cellules.¹⁰⁹ La réalisation de ces marquages dans nos fibroblastes carencés en sérum nous permettrait donc d'évaluer la présence et le rôle de la lipophagie dans notre système.

7.5 Implication pour études *in vivo* et pour traitements

Une autophagie soutenue induite par une carence en éléments nutritifs favorise la sénescence du fibroblaste et sa différenciation en myofibroblaste. L'autophagie soutenue entraîne la mise en branle de processus d'adaptation au stress dans les fibroblastes eux-mêmes mais aussi la sécrétion d'un SASP qui pourrait aussi influencer les cellules avoisinantes (effet paracrin). Il est évident que nous pourrions tester l'effet du milieu conditionné par les fibroblastes carencés en sérum sur tous les types de cellules impliqués dans le processus fibrotique. Est-ce qu'il favorise l'EMT, l'EndoMT, etc. Mais il serait encore plus intéressant de tester son effet *in vivo*, comme par exemple dans un modèle de fibrose cutanée développé au laboratoire du Dr Hébert décrit ci-haut.

L'importance de l'apoptose endothéliale et du dommage vasculaire pour le développement de la fibrose n'est plus à démontrer (**voir introduction partie 1.4**). Une mauvaise irrigation du tissu pourrait entraîner la mise en place de programmes d'adaptation au stress dans les différentes cellules le composant. Nous avons démontré *in vitro* que le fibroblaste est capable de grande adaptation au stress en activant l'autophagie. Une autophagie soutenue entraîne cependant des effets possiblement maladaptés à long terme comme l'induction de la sénescence^{214, 215} accompagnée de la différenciation myofibroblastique. Cependant, il faut rappeler que la sénescence n'est pas seulement fibrogénique.^{216, 217} Dépendant du contexte, elle peut jouer un rôle positif dans la réparation tissulaire.^{20, 21, 218-220}

Il serait intéressant de vérifier si l'autophagie et la sénescence des fibroblastes participent au processus fibrotique dans des modèles animaux où la fibrose est connue pour se développer

dans un contexte de dommage vasculaire. Par exemple, dans des modèles de rejet chronique de l'allogreffe ou d'ischémie/reperfusion. Est-ce que l'analyse de biopsie de tissus fibrotiques ferait état de la présence de cellules α SMA⁺ (myofibroblastes), CTGF⁺ qui seraient sénescents et/ou autophagiques? Le groupe du Dr Hébert est présentement en train de mettre en place le modèle d'I/R du rein chez la souris afin d'y étudier le développement de la fibrose.

De plus, la réponse à cette question pourrait avoir des répercussions thérapeutiques. En effet, nous avons mis en lumière un processus qui est dépendant du contexte, soit la réactivation de MTORC2 lors d'une autophagie prolongée et son inhibition par la rapamycine. La rapamycine employée sur des fibroblastes incubés en milieu Normal montre un effet inverse, soit une augmentation de la phosphorylation AKT Ser473 et une augmentation de la différenciation myofibroblastique due à l'inhibition de la rétroaction négative de p70S6K sur la voie PI3K/AKT (**Figure suppl 5 B, article 1**). La rapamycine a montré des effets anti-fibrotiques dans certains modèles animaux.²²¹⁻²²³ Nous pourrions évaluer l'effet de la rapamycine dans notre modèle d'I/R. Serait-elle en mesure d'atténuer le processus fibrotique et si oui à quel stade? Serait-elle en mesure de diminuer la sécrétion du CTGF et du collagène? La rapamycine a aussi montré des effets anti-fibrotiques dans certaines études effectuées chez l'humain. Dans une étude pilote, l'utilisation de rapamycine chez des patients atteints de sclérose systémique a permis une réduction de leur score de Rodnan, une mesure de l'épaisseur et de la dureté de la peau.²²⁴ Serait-il possible de lier la présence de marqueurs de myofibroblastes autophagiques et/ou sénescents dans des biopsies de tissus fibrotiques de patients à une réponse positive à un médicament comme la rapamycine?

Comme mentionné dans l'introduction (**partie 4**), les médicaments n'auront pas nécessairement la même efficacité en fonction des stades de la fibrose. La rapamycine, utilisée comme immunosuppresseur possède un effet bénéfique sur la composante immunitaire de la maladie.¹⁸⁶ Mais, en même temps, la rapamycine pourrait augmenter la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et la sécrétion de matrice extracellulaire en activant MTORC2 en présence des grandes quantités de facteurs de croissance et cytokines produits en début de maladie (conditions se rapprochant du milieu Normal) (**Figure suppl 5 B, article 1**). En revanche, si des myofibroblastes sénescents/autophagiques s'accumulent en phase tardive, la rapamycine pourrait alors y inhiber MTORC2 (conditions se rapprochant du milieu Sans Sérum) et être utile contre la fibrose. Notre travail contribue à expliquer l'hétérogénéité des résultats des études *in vitro* et *in vivo* sur la rapamycine.²²⁵ Il illustre bien le fait que l'efficacité d'un médicament soit contexte-dépendant. Nos résultats sont en accord avec la proposition du Dr Leask qui vise à mieux décrire les patients et la forme de leur maladie afin de leur fournir un traitement optimal.²²⁶ Bien que Dr Leask soit un spécialiste de la sclérodémie, ce principe s'applique à tous les types de fibrose.

Nos résultats suggèrent aussi que l'utilisation d'un inhibiteur de MTORC1 et MTORC2 comme le Torin 1 pourrait être envisagée comme traitement de la fibrose. Cette drogue inhibe la boucle de rétroaction positive sur MTORC2 causée par la perte de l'activité MTORC1 chez les fibroblastes en phase proliférative.^{128, 129} En milieu Normal, comme attendu,^{131, 227} le Torin 1 inhibe les deux complexes MTOR et bloque la différenciation (résultats non montrés). Le Torin 1 inhibe la différenciation myofibroblastique et les marqueurs de sénescence en milieu carencé en sérum (**Figure suppl 6 C, article 1 et figure 3 B, article 2**). L'inhibition de

MTORC1 et MTORC2 pourrait ainsi être efficace à plusieurs stades de la fibrose. Là aussi, il serait intéressant de tester l'effet du Torin 1 dans un modèle animal. Récemment, un inhibiteur de MTORC1 et MTORC2, le MLN0128, a montré des effets anti-fibrotiques *in vivo* dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine.²²⁸ De plus, la voie de signalisation PI3K/AKT/MTOR peut être induite de façon non-classique (SMAD indépendante) par le TGF β ou lors de l'activation de récepteurs tyrosines kinases (ex : PDGFR).^{189, 229} Un inhibiteur des deux complexes MTOR pourrait là aussi avoir un effet favorable.

Le Torin 1 ou autres inhibiteurs des deux complexes MTOR sont aussi des activateurs de l'autophagie comme la rapamycine.²³⁰ Dans notre système d'étude *in vitro*, la carence de sérum induit l'autophagie qui est « néfaste » car elle soutient la différenciation myofibroblastique ainsi qu'un phénotype pro-fibrotique. Bien que le Torin 1 augmente l'autophagie (**Figure suppl 6 B, article 1**), son effet sur MTORC2 est prédominant et permet l'inhibition de la différenciation.

Des drogues ciblant l'autophagie sont présentement à l'étude pour le traitement du cancer. Serait-il possible d'inhiber l'autophagie qui comme nous et d'autres groupes avons démontré^{104, 210} est un mécanisme de survie pour le myofibroblaste afin de lutter contre la fibrose? Pour répondre à cette question, il faudra tenir compte des effets de l'autophagie sur tous les types cellulaires en cause. Par exemple, l'autophagie est essentielle à l'homéostasie des hépatocytes.²³¹ L'effet net de l'autophagie et de son inhibition sur l'organe complet et sur

les cellules immunitaires doit être évalué. Une autre option serait de développer un inhibiteur de l'autophagie très sélectif pour les myofibroblastes.

Nous avons identifié le CTGF comme médiateur de la différenciation en autophagie prolongée, ce qui en fait une cible thérapeutique dans ces conditions. Le CTGF est présentement en évaluation comme marqueur et prédicteur du rejet de l'allogreffe rénale. Des anti-CTGF sont déjà en essais cliniques pour différents types de maladie fibrotique.

Nous avons également identifié les ROS comme acteurs indispensables à la différenciation en autophagie prolongée. Des inhibiteurs de ROS (vitamine E, cystéamine, inhibiteurs de NOX) sont actuellement à l'étude pour le traitement de la fibrose.²³² La NAC a été testée chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique, avec des résultats très décevants.⁸⁰ Cependant, dans une petite étude, la NAC en combinaison avec un agent anti-fibrotique, la pirféridone, a démontré des effets bénéfiques.²³³ Dans cette dernière étude, les patients souffraient d'IPF avancée. Est-ce que l'analyse des biopsies de poumon réalisées chez ces patients avant le traitement dévoilerait des signes de sénescence/autophagie chez les myofibroblastes en association avec une phosphorylation d'AKT à la Ser473?

Les résultats de notre étude soulignent l'importance de l'analyse des voies de signalisation pro-fibrotiques activées chez le patient afin de déterminer la meilleure option thérapeutique. Ici, il faut souligner que la thérapie optimale pourrait être une combinaison d'agents ciblant plusieurs voies signalétiques. C'est ce que représente le concept de médecine personnalisée, qui espérons-le, sera accessible un jour aux patients souffrant de fibrose.

7.6 Conclusion et perspectives

Le travail décrit dans cette thèse met en lumière **des liens entre l'autophagie, la sénescence et la différenciation myofibroblastique**. À l'aide d'un modèle simple d'étude *in vitro*, nous avons montré que la carence en éléments nutritifs du fibroblaste entraîne une série d'évènements mettant en branle des mécanismes d'adaptation au stress cellulaire. Nous avons constaté la production de ROS et l'induction de l'autophagie, l'autophagie prolongée entraînant l'augmentation des marqueurs de sénescence et de différenciation myofibroblastique. Nous avons identifié des médiateurs importants pour ces processus, soit les ROS et le CTGF. Nous avons identifié une nouvelle voie de signalisation permettant l'établissement des caractères de sénescence et de différenciation myofibroblastique, soit l'activation de MTORC2 et la phosphorylation d'AKT. Il sera intéressant de continuer ce travail afin d'établir si les nouvelles cibles thérapeutiques que nous avons mises à jour peuvent avoir des implications translationnelles.

La fibrose est un phénomène complexe. Plusieurs stratégies sont évaluées actuellement pour favoriser sa régression ou, du moins, freiner sa progression. La panoplie des agents étudiés (plus de 500 essais pour la fibrose hépatique seulement²³² démontre bien la variété des voies de signalisation et les différents types cellulaires pouvant être impliqués (se rapporter à la **Figure 1 de la discussion**). Ces facteurs **extrinsèques** au fibroblaste agissent sur sa capacité de différenciation ou de résistance à l'apoptose.

En introduction (**partie 1.4**), il a été décrit comment une insulte tissulaire causant du dommage à l'endothélium entraîne la raréfaction des microvaisseaux et favorise le développement de maladies fibrotiques. Pour donner un exemple de facteurs extrinsèques agissant sur le fibroblaste, rappelons comment l'apoptose des cellules endothéliales génère des médiateurs, comme le CTGF, qui induisent la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste.⁵⁶ Nous avons souligné aussi comment la perte du réseau microvasculaire entraîne l'hypo-perfusion du tissu causant une carence en oxygène, éléments nutritifs et facteurs de croissance. Nous avons suggéré que cette situation pouvait enclencher des mécanismes protecteurs pour favoriser la survie de la cellule.

L'originalité des résultats présentés dans cette thèse repose sur de nouveaux mécanismes fibrogéniques, **intrinsèques** au fibroblaste, soient l'autophagie et la sénescence. L'autophagie prolongée et la sénescence permettent au fibroblaste de s'adapter au stress mais participent également au processus fibrotique en favorisant la différenciation myofibroblatique. Ces résultats nous permettent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires participant à la fibrogénèse et au remodelage tissulaire pathologique. Ils jettent un nouvel éclairage sur le problème de la fibrose : le fibroblaste survie et s'adapte à un milieu très pauvre ou peu vascularisé. Il sera alors encore plus difficile de le traquer et de s'en débarrasser.

Nous avons identifié des médiateurs importants pour la différenciation médiée par l'autophagie : les ROS et le CTGF. Ces médiateurs font partie du sécrétome des fibroblastes autophagiques et sénescents que nous avons dénommé ASASP. L'ASASP contient probablement d'autres médiateurs profibrotiques, comme par exemple les Interleukines 1, 6 et

8. Ces médiateurs pourront à leur tour agir sur d'autres cellules et participer à la chronicité de l'insulte tissulaire. L'analyse de l'ASASP et l'identification de nouveaux médiateurs profibrotiques pourront sans nul doute permettre le développement d'approches thérapeutiques innovantes.

Notre étude a aussi démontré l'importance de MTORC2 pour la résistance au stress du fibroblaste. MTORC2, en contrôlant la phosphorylation d'AKT, régit l'organisation du cytosquelette, l'apoptose et le métabolisme cellulaire. MTORC2 pourrait ainsi être considéré comme un « checkpoint » métabolique, au même titre que MTORC1 ou p53.¹⁴¹ Un checkpoint métabolique est un point de rencontre de voies de signalisation qui va dicter le destin de la cellule en réponse aux fluctuations métaboliques. Agir sur ce point peut changer le destin cellulaire. Le fibroblaste pourrait alors mourir par apoptose, devenir sénescence ou même subir un phénomène de réversion: revenir en arrière dans son processus de différenciation.¹⁸⁹ Nous avons déjà observé que l'inhibition de MTORC2 lors d'une autophagie prolongée entraîne une diminution des marqueurs de différenciation myofibroblastique et de sénescence. La mise au point d'un agent capable de freiner MTORC2 et de changer le destin cellulaire semble prometteur pour bloquer le processus fibrotique.

Bibliographie

1. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008; 453:314-21.
2. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2002; 3:349-63.
3. Van De Water L, Varney S, Tomasek JJ. Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; 2:122-41.
4. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003; 83:1689-707.
5. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117:524-9.
6. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007; 127:526-37.
7. Hinz B, Gabbiani G. Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. *F1000 biology reports* 2010; 2:78.
8. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117:539-48.
9. Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21:1819-34.
10. Sivakumar P, Ntoliou P, Jenkins G, Laurent G. Into the matrix: targeting fibroblasts in pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18:462-9.
11. Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *American journal of physiology Cell physiology* 2013; 304:C216-25.
12. Duffield JS. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest* 2014; 124:2299-306.
13. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 2012; 18:1028-40.
14. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008; 9:231-41.
15. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146:56-66.
16. Aarabi S, Bhatt KA, Shi Y, Paterno J, Chang EI, Loh SA, Holmes JW, Longaker MT, Yee H, Gurtner GC. Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB J* 2007; 21:3250-61.

17. Horowitz JC, Rogers DS, Sharma V, Vittal R, White ES, Cui Z, Thannickal VJ. Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell Signal* 2007; 19:761-71.
18. Douglass A, Wallace K, Parr R, Park J, Durward E, Broadbent I, Barelle C, Porter AJ, Wright MC. Antibody-targeted myofibroblast apoptosis reduces fibrosis during sustained liver injury. *J Hepatol* 2008; 49:88-98.
19. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 2011; 192:547-56.
20. Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature cell biology* 2010; 12:676-85.
21. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008; 134:657-67.
22. Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int* 2015; 87:297-307.
23. Yang HC, Zuo Y, Fogo AB. Models of chronic kidney disease. *Drug discovery today Disease models* 2010; 7:13-9.
24. Eddy AA, Lopez-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol* 2012; 27:1233-47.
25. Asada N, Takase M, Nakamura J, Oguchi A, Asada M, Suzuki N, Yamamura K, Nagoshi N, Shibata S, Rao TN, et al. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:3981-90.
26. Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS. Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2010; 176:85-97.
27. Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 Suppl 2:65-8.
28. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews Molecular cell biology* 2014; 15:178-96.
29. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-beta signaling in fibrosis. *Growth Factors* 2011; 29:196-202.
30. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:99-146.
31. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126:1121-33.
32. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* 2014; 219:172-8.
33. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113:685-700.
34. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7:d793-807.
35. Boor P, Floege J. Chronic kidney disease growth factors in renal fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38:441-50.

36. Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit B, Krieg T. Co-localization of transforming growth factor beta 2 with alpha 1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1990; 86:917-22.
37. Sime PJ, O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment. *Clin Immunol* 2001; 99:308-19.
38. Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999; 181:153-9.
39. Wang Q, Usinger W, Nichols B, Gray J, Xu L, Seeley TW, Brenner M, Guo G, Zhang W, Oliver N, et al. Cooperative interaction of CTGF and TGF-beta in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis & tissue repair* 2011; 4:4.
40. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996; 7:469-80.
41. Leask A, Sa S, Holmes A, Shiwen X, Black CM, Abraham DJ. The control of *ccn2* (*ctgf*) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *Mol Pathol* 2001; 54:180-3.
42. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nature cell biology* 2002; 4:599-604.
43. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis & tissue repair* 2012; 5 Suppl 1:S24.
44. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996; 107:404-11.
45. Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)--a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Experimental nephrology* 2010; 114:e83-92.
46. Chen XM, Qi W, Pollock CA. CTGF and chronic kidney fibrosis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2009; 1:132-41.
47. Leask A. CCN2: a bona fide target for anti-fibrotic drug intervention. *Journal of cell communication and signaling* 2011; 5:131-3.
48. Ponticos M, Holmes AM, Shi-wen X, Leoni P, Khan K, Rajkumar VS, Hoyles RK, Bou-Gharios G, Black CM, Denton CP, et al. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. *Arthritis and rheumatism* 2009; 60:2142-55.
49. Sonnylal S, Shi-Wen X, Leoni P, Naff K, Van Pelt CS, Nakamura H, Leask A, Abraham D, Bou-Gharios G, de Crombrughe B. Selective expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis. *Arthritis and rheumatism* 2010; 62:1523-32.
50. Liu S, Shi-wen X, Abraham DJ, Leask A. CCN2 is required for bleomycin-induced skin fibrosis in mice. *Arthritis and rheumatism* 2011; 63:239-46.

51. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 2003; 130:2779-91.
52. Liu S, Leask A. CCN2 is not required for skin development. *Journal of cell communication and signaling* 2011; 5:179-82.
53. Liu S, Thompson K, Leask A. CCN2 expression by fibroblasts is not required for cutaneous tissue repair. *Wound Repair Regen* 2014; 22:119-24.
54. Li G, Xie Q, Shi Y, Li D, Zhang M, Jiang S, Zhou H, Lu H, Jin Y. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *The journal of gene medicine* 2006; 8:889-900.
55. Yokoi H. Reduction in Connective Tissue Growth Factor by Antisense Treatment Ameliorates Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2004; 15:1430-40.
56. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, Beliveau A, Prat A, Pshezhetsky AV, Hebert MJ. Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell death and differentiation* 2010; 17:291-303.
57. Xiao R, Liu FY, Luo JY, Yang XJ, Wen HQ, Su YW, Yan KL, Li YP, Liang YS. Effect of small interfering RNA on the expression of connective tissue growth factor and type I and III collagen in skin fibroblasts of patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2006; 155:1145-53.
58. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR, Takehara K. Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 1996; 106:729-33.
59. Huang G, Brigstock DR. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012; 17:2495-507.
60. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000; 27:149-54.
61. Allen JT, Knight RA, Bloor CA, Spiteri MA. Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:693-700.
62. Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratzu V, et al. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999; 30:968-76.
63. Cheng O, Thuillier R, Sampson E, Schultz G, Ruiz P, Zhang X, Yuen PS, Mannon RB. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2006; 6:2292-306.
64. Metalidis C, van Vuuren SH, Broekhuizen R, Lerut E, Naesens M, Bakker SJ, Wetzels JF, Goldschmeding R, Kuypers DR. Urinary connective tissue growth factor is associated with human renal allograft fibrogenesis. *Transplantation* 2013; 96:494-500.

65. Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *American journal of physiology Renal physiology* 2004; 287:F1223-32.
66. Hong KH, Yoo SA, Kang SS, Choi JJ, Kim WU, Cho CS. Hypoxia induces expression of connective tissue growth factor in scleroderma skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 2006; 146:362-70.
67. Braig S, Wallner S, Junglas B, Fuchshofer R, Bosserhoff AK. CTGF is overexpressed in malignant melanoma and promotes cell invasion and migration. *Br J Cancer* 2011; 105:231-8.
68. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AMJ, Langelier Y, Bernard M, Raymond Y, Hebert MJ. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: Implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005; 174:5740-9.
69. Crean JK, Finlay D, Murphy M, Moss C, Godson C, Martin F, Brady HR. The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277:44187-94.
70. Wang W, Huang XR, Canlas E, Oka K, Truong LD, Deng C, Bhowmick NA, Ju W, Bottinger EP, Lan HY. Essential role of Smad3 in angiotensin II-induced vascular fibrosis. *Circ Res* 2006; 98:1032-9.
71. Oga T, Matsuoka T, Yao C, Nonomura K, Kitaoka S, Sakata D, Kita Y, Tanizawa K, Taguchi Y, Chin K, et al. Prostaglandin F(2alpha) receptor signaling facilitates bleomycin-induced pulmonary fibrosis independently of transforming growth factor-beta. *Nat Med* 2009; 15:1426-30.
72. Kaviratne M, Hesse M, Leusink M, Cheever AW, Davies SJ, McKerrow JH, Wakefield LM, Letterio JJ, Wynn TA. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol* 2004; 173:4020-9.
73. Murray LA, Zhang H, Oak SR, Coelho AL, Herath A, Flaherty KR, Lee J, Bell M, Knight DA, Martinez FJ, et al. Targeting interleukin-13 with tralokinumab attenuates lung fibrosis and epithelial damage in a humanized SCID idiopathic pulmonary fibrosis model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50:985-94.
74. Tang J, Huang H, Ji X, Zhu X, Li Y, She M, Yan S, Fung M, Li Z. Involvement of IL-13 and tissue transglutaminase in liver granuloma and fibrosis after schistosoma japonicum infection. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:753483.
75. O'Reilly S. Role of interleukin-13 in fibrosis, particularly systemic sclerosis. *Biofactors* 2013; 39:593-6.
76. Kok HM, Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ. Targeting CTGF, EGF and PDGF pathways to prevent progression of kidney disease. *Nature reviews Nephrology* 2014; 10:700-11.
77. Noskovicova N, Petrek M, Eickelberg O, Heinzlmann K. Platelet-derived growth factor signaling in the lung. From lung development and disease to clinical studies. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015; 52:263-84.
78. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int* 2011; 79:944-56.

79. Grygiel-Gorniak B, Puszczewicz M. Oxidative damage and antioxidative therapy in systemic sclerosis. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:389582.
80. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research N, Martinez FJ, de Andrade JA, Anstrom KJ, King TE, Jr., Raghu G. Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370:2093-101.
81. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 1996; 98:785-92.
82. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 1992; 166:255-63.
83. Andriqueti FV, Arismendi MI, Ebbing PC, Kayser C. Decreased numbers of endothelial progenitor cells in patients in the early stages of systemic sclerosis. *Microvasc Res* 2015; 98:82-7.
84. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Persistent rejection of peritubular capillaries and tubules is associated with progressive interstitial fibrosis. *Kidney Int* 2002; 61:1867-79.
85. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine. *Lab Invest* 2002; 82:673-86.
86. Choy JC, Kerjner A, Wong BW, McManus BM, Granville DJ. Perforin mediates endothelial cell death and resultant transplant vascular disease in cardiac allografts. *Am J Pathol* 2004; 165:127-33.
87. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *American journal of physiology Renal physiology* 2001; 281:F887-99.
88. Ishii Y, Sawada T, Kubota K, Fuchinoue S, Teraoka S, Shimizu A. Loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc* 2005; 37:981-3.
89. Ishii Y, Sawada T, Kubota K, Fuchinoue S, Teraoka S, Shimizu A. Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67:321-32.
90. Babu AN, Murakawa T, Thurman JM, Miller EJ, Henson PM, Zamora MR, Voelkel NF, Nicolls MR. Microvascular destruction identifies murine allografts that cannot be rescued from airway fibrosis. *J Clin Invest* 2007; 117:3774-85.
91. Steegh FM, Gelens MA, Nieman FH, van Hooff JP, Cleutjens JP, van Suylen RJ, Daemen MJ, van Heurn EL, Christiaans MH, Peutz-Kootstra CJ. Early loss of peritubular capillaries after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22:1024-9.
92. Molitoris BA. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J Clin Invest* 2014; 124:2355-63.
93. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int* 2007; 72:151-6.
94. Horbelt M, Lee SY, Mang HE, Knipe NL, Sado Y, Kribben A, Sutton TA. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *American journal of physiology Renal physiology* 2007; 293:F688-95.

95. Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2006; 6:247-53.
96. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, Marini P, Wiedig C, Zobywalski A, Baksh S, et al. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003; 113:717-30.
97. McDonald PP, Fadok VA, Bratton D, Henson PM. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol* 1999; 163:6164-72.
98. Sirois I. Les Signaux Post Mortem (SPM) de l'apoptose endothéliale : des acteurs du remodelage vasculaire. [Montréal] : Université de Montréal.
99. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007; 13:952-61.
100. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nature reviews Molecular cell biology* 2005; 6:439-48.
101. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013; 368:651-62.
102. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132:27-42.
103. Del Principe D, Lista P, Malorni W, Giammarioli AM. Fibroblast autophagy in fibrotic disorders. *J Pathol* 2013; 229:208-20.
104. Hernandez-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, Gordon R, Fiel MI, Yue Z, Czaja MJ, Friedman SL. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 2012; 142:938-46.
105. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Autophagy fuels tissue fibrogenesis. *Autophagy* 2012; 8:849-50.
106. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8:445-544.
107. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140:313-26.
108. Longatti A, Orsi A, Tooze SA. Autophagosome formation: not necessarily an inside job. *Cell Res* 2010; 20:1181-4.
109. Klionsky DJ, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy In revision*.
110. Nazio F, Strappazon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, Gretzmeier C, Dengjel J, Piacentini M, Fimia GM, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature cell biology* 2013; 15:406-16.
111. Sahani MH, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 2014; 10:431-41.

112. Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarova H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1997; 243:240-6.
113. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285:10850-61.
114. Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275:992-8.
115. Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 2005; 169:425-34.
116. Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer biology & therapy* 2003; 2:222-32.
117. Morselli E, Marino G, Bennetzen MV, Eisenberg T, Megalou E, Schroeder S, Cabrera S, Benit P, Rustin P, Criollo A, et al. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J Cell Biol* 2011; 192:615-29.
118. Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* 2013; 9:124-37.
119. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; 149:274-93.
120. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004; 14:1296-302.
121. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; 22:159-68.
122. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; 30:214-26.
123. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 2010; 141:290-303.
124. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002; 22:7004-14.
125. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284:12297-305.
126. Zinzalla V, Stracka D, Oppliger W, Hall MN. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 2011; 144:757-68.
127. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307:1098-101.

128. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006; 66:1500-8.
129. Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol* 2010; 30:908-21.
130. Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, Do KA, Sangai T, Adkins F, Gonzalez-Angulo AM, Rashid A, Crosby K, Dong M, et al. PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin Cancer Res* 2012; 18:1777-89.
131. Dufour M, Dormond-Meuwly A, Demartines N, Dormond O. Targeting the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Cancer Therapy: Lessons from Past and Future Perspectives. *Cancers* 2011; 3:2478-500.
132. Rangwala R, Chang YC, Hu J, Algazy KM, Evans TL, Fecher LA, Schuchter LM, Torigian DA, Panosian JT, Troxel AB, et al. Combined MTOR and autophagy inhibition: phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* 2014; 10:1391-402.
133. Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 2008; 415:333-44.
134. Gross DN, Wan M, Birnbaum MJ. The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Current diabetes reports* 2009; 9:208-14.
135. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rugg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology* 2004; 6:1122-8.
136. Liu L, Parent CA. Review series: TOR kinase complexes and cell migration. *J Cell Biol* 2011; 194:815-24.
137. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nature reviews Cancer* 2006; 6:472-6.
138. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1965; 37:614-36.
139. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 1997; 33:703-9.
140. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, 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; 92:9363-7.
141. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science* 2014; 345:1250256.
142. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S, Mak TW. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 2001; 8:317-25.
143. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006; 66:4795-801.
144. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 2014; 509:439-46.
145. Itahana K, Dimri GP, Hara E, Itahana Y, Zou Y, Desprez PY, Campisi J. A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277:18206-14.

146. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols* 2009; 4:1798-806.
147. Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP, et al. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 2000; 406:207-10.
148. Rodier F, Munoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, Coppe JP, Campeau E, Beausejour CM, Kim SH, et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* 2011; 124:68-81.
149. Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology* 2008; 6:2853-68.
150. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology* 2013; 15:978-90.
151. Effros RB, Dagarag M, Valenzuela HF. In vitro senescence of immune cells. *Exp Gerontol* 2003; 38:1243-9.
152. Chen J, Huang X, Halicka D, Brodsky S, Avram A, Eskander J, Bloomgarden NA, Darzynkiewicz Z, Goligorsky MS. Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2006; 290:H1575-86.
153. Muangchant C, Pope JE. The significance of interleukin-6 and C-reactive protein in systemic sclerosis: a systematic literature review. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31:122-34.
154. Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV, Roninson IB. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:4291-6.
155. Kim KH, Park GT, Lim YB, Rue SW, Jung JC, Sonn JK, Bae YS, Park JW, Lee YS. Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318:819-25.
156. Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z. IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. *Aging (Albany NY)* 2012; 4:932-51.
157. Senturk S, Mumcuoglu M, Gursoy-Yuzugullu O, Cingoz B, Akcali KC, Ozturk M. Transforming growth factor-beta induces senescence in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth. *Hepatology* 2010; 52:966-74.
158. Wu J, Niu J, Li X, Wang X, Guo Z, Zhang F. TGF-beta1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC developmental biology* 2014; 14:21.
159. Yoon YS, Lee JH, Hwang SC, Choi KS, Yoon G. TGF beta1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. *Oncogene* 2005; 24:1895-903.

160. Dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature chemical biology* 2011; 7:504-11.
161. Besse-Patin A, Estall JL. An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease. *International journal of cell biology* 2014; 2014:519153.
162. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 2003; 552:335-44.
163. Lambeth JD, Neish AS. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annual review of pathology* 2014; 9:119-45.
164. Chuang SY, Lin CH, Fang JY. Natural compounds and aging: between autophagy and inflammasome. *BioMed research international* 2014; 2014:297293.
165. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 2009; 15:1077-81.
166. Hecker L, Logsdon NJ, Kurundkar D, Kurundkar A, Bernard K, Hock T, Meldrum E, Sanders YY, Thannickal VJ. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Science translational medicine* 2014; 6:231ra47.
167. Jain M, Rivera S, Monclus EA, Synenki L, Zirk A, Eisenbart J, Feghali-Bostwick C, Mutlu GM, Budinger GR, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry* 2013; 288:770-7.
168. Bracey NA, Gershkovich B, Chun J, Vilaysane A, Meijndert HC, Wright JR, Jr., Fedak PW, Beck PL, Muruve DA, Duff HJ. Mitochondrial NLRP3 protein induces reactive oxygen species to promote Smad protein signaling and fibrosis independent from the inflammasome. *The Journal of biological chemistry* 2014; 289:19571-84.
169. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; 408:239-47.
170. Vina J, Borras C, Abdelaziz KM, Garcia-Valles R, Gomez-Cabrera MC. The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxidants & redox signaling* 2013; 19:779-87.
171. Blagosklonny MV. Aging: ROS or TOR. *Cell cycle* 2008; 7:3344-54.
172. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009; 460:392-5.
173. Chang CP, Su YC, Hu CW, Lei HY. TLR2-dependent selective autophagy regulates NF-kappaB lysosomal degradation in hepatoma-derived M2 macrophage differentiation. *Cell death and differentiation* 2013; 20:515-23.
174. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature immunology* 2011; 12:222-30.
175. Iyer SN, Gurujeyalakshmi G, Giri SN. Effects of pirfenidone on transforming growth factor-beta gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291:367-73.

176. Nakazato H, Oku H, Yamane S, Tsuruta Y, Suzuki R. A novel anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses tumor necrosis factor-alpha at the translational level. *Eur J Pharmacol* 2002; 446:177-85.
177. King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, Gorina E, Hopkins PM, Kardatzke D, Lancaster L, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370:2083-92.
178. Costabel U, Albera C, Bradford WZ, Hormel P, King TE, Jr., Noble PW, Sahn SA, Valeyre D, Du Bois RM. Analysis of lung function and survival in RECAP: An open-label extension study of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2014; 31:198-205.
179. Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, Cottin V, Flaherty KR, Hansell DM, Inoue Y, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370:2071-82.
180. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler KE, Stowasser S, Kolb M. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 45:1434-45.
181. Oku H, Shimizu T, Kawabata T, Nagira M, Hikita I, Ueyama A, Matsushima S, Torii M, Arimura A. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis. *Eur J Pharmacol* 2008; 590:400-8.
182. Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, Holweg A, Ryffel B. Antifibrotic and anti-inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 349:209-20.
183. Peng R, Sridhar S, Tyagi G, Phillips JE, Garrido R, Harris P, Burns L, Renteria L, Woods J, Chen L, et al. Bleomycin induces molecular changes directly relevant to idiopathic pulmonary fibrosis: a model for "active" disease. *PloS one* 2013; 8:e59348.
184. Trautwein C, Friedman SL, Schuppan D, Pinzani M. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol* 2015; 62:S15-24.
185. Manno R, Boin F. Immunotherapy of systemic sclerosis. *Immunotherapy* 2010; 2:863-78.
186. McMahan ZH, Wigley FM. Novel investigational agents for the treatment of scleroderma. *Expert opinion on investigational drugs* 2014; 23:183-98.
187. Fernandes das Neves M, Oliveira S, Amaral MC, Delgado Alves J. Treatment of systemic sclerosis with tocilizumab. *Rheumatology (Oxford)* 2015; 54:371-2.
188. Tampe D, Zeisberg M. Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis. *Nature reviews Nephrology* 2014; 10:226-37.
189. Lee SY, Kim SI, Choi ME. Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2015; 165:512-30.
190. Chen MF, Hwang TL, Hung CF. Human liver regeneration after major hepatectomy. A study of liver volume by computed tomography. *Ann Surg* 1991; 213:227-9.
191. Schuppan D. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 2015.
192. Marcellin P, Gane E, Buti M, Afdhal N, Sievert W, Jacobson IM, Washington MK, Germanidis G, Flaherty JF, Schall RA, et al. Regression of cirrhosis during treatment with

- tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet* 2013; 381:468-75.
193. D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, Ronchi G, Donato MF, Paradis V, Colombo M, Bedossa P. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology* 2012; 56:532-43.
194. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; 26:1749-60.
195. Gibson SB. Investigating the role of reactive oxygen species in regulating autophagy. *Methods Enzymol* 2013; 528:217-35.
196. Corcoran A, Cotter TG. Redox regulation of protein kinases. *The FEBS journal* 2013; 280:1944-65.
197. Nayak BK, Feliers D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, Fitzgerald JP, Eid A, Denapoli T, Parekh DJ, et al. Stabilization of HIF-2alpha through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* 2013; 32:3147-55.
198. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell death and differentiation* 2015; 22:377-88.
199. Oliva-Trastoy M, Defais M, Larminat F. Resistance to the antibiotic Zeocin by stable expression of the *Sh ble* gene does not fully suppress Zeocin-induced DNA cleavage in human cells. *Mutagenesis* 2005; 20:111-4.
200. von Lohneysen K, Noack D, Wood MR, Friedman JS, Knaus UG. Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization. *Mol Cell Biol* 2010; 30:961-75.
201. Debacq-Chainiaux F, Boilan E, Dedessus Le Moutier J, Weemaels G, Toussaint O. p38(MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts. *Adv Exp Med Biol* 2010; 694:126-37.
202. Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:4130-4.
203. Luo Y, Zou P, Zou J, Wang J, Zhou D, Liu L. Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPKalpha dependent manner. *Exp Gerontol* 2011; 46:860-7.
204. Park SK, Kim J, Seomun Y, Choi J, Kim DH, Han IO, Lee EH, Chung SK, Joo CK. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:966-71.
205. Fripiat C, Dewelle J, Remacle J, Toussaint O. Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:1334-46.
206. Sirois I, Raymond MA, Brassard N, Cailhier JF, Fedjaev M, Hamelin K, Londono I, Bendayan M, Pshezhetsky AV, Hebert MJ. Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for antiapoptotic intercellular communication. *Cell death and differentiation* 2011; 18:549-62.
207. Kraya AA, Piao S, Xu X, Zhang G, Herlyn M, Gimotty P, Levine B, Amaravadi RK, Speicher DW. Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy* 2015; 11:60-74.

208. Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M, Rodier F. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Frontiers in genetics* 2015; 6:94.
209. Filippi-Chiela EC, Bueno ESMM, Thome MP, Lenz G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy* 2015:0.
210. Bernard M, Dieude M, Yang B, Hamelin K, Underwood K, Hebert MJ. Autophagy fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF. *Autophagy* 2014; 10:2193-207.
211. Vlahakis A, Graef M, Nunnari J, Powers T. TOR complex 2-Ypk1 signaling is an essential positive regulator of the general amino acid control response and autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:10586-91.
212. Vlahakis A, Powers T. A role for TOR complex 2 signaling in promoting autophagy. *Autophagy* 2014; 10:2085-6.
213. Rosca MG, Vazquez EJ, Chen Q, Kerner J, Kern TS, Hoppel CL. Oxidation of fatty acids is the source of increased mitochondrial reactive oxygen species production in kidney cortical tubules in early diabetes. *Diabetes* 2012; 61:2074-83.
214. Gewirtz DA. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy* 2013; 9:808-12.
215. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23:798-803.
216. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, et al. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2011; 121:3343-56.
217. Shivshankar P, Brampton C, Miyasato S, Kasper M, Thannickal VJ, Le Saux CJ. Caveolin-1 deficiency protects from pulmonary fibrosis by modulating epithelial cell senescence in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47:28-36.
218. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dolle ME, et al. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell* 2014; 31:722-33.
219. Kim KH, Chen CC, Monzon RI, Lau LF. Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Mol Cell Biol* 2013; 33:2078-90.
220. Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR, Park SC. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PloS one* 2011; 6:e23367.
221. Chen G, Chen H, Wang C, Peng Y, Sun L, Liu H, Liu F. Rapamycin ameliorates kidney fibrosis by inhibiting the activation of mTOR signaling in interstitial macrophages and myofibroblasts. *PloS one* 2012; 7:e33626.
222. Patel AS, Lin L, Geyer A, Haspel JA, An CH, Cao J, Rosas IO, Morse D. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. *PloS one* 2012; 7:e41394.
223. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Takenaka M, Shimizu K, Asano Y, Hasegawa M, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis and rheumatism* 2010; 62:2476-87.

224. Su TI, Khanna D, Furst DE, Danovitch G, Burger C, Maranian P, Clements PJ. Rapamycin versus methotrexate in early diffuse systemic sclerosis: results from a randomized, single-blind pilot study. *Arthritis and rheumatism* 2009; 60:3821-30.
225. Xu XF, Dai HP. Rapamycin in fibrotic diseases: beneficial or detrimental agent? *Chin Med J (Engl)* 2013; 126:1364-9.
226. Leask A. Toward personalized medicine in scleroderma: classification of scleroderma patients into stable "inflammatory" and "fibrotic" subgroups. *J Invest Dermatol* 2012; 132:1329-31.
227. Liu Q, Chang JW, Wang J, Kang SA, Thoreen CC, Markhard A, Hur W, Zhang J, Sim T, Sabatini DM, et al. Discovery of 1-(4-(4-propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-9-(quinolin-3-yl)benz o[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one as a highly potent, selective mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for the treatment of cancer. *J Med Chem* 2010; 53:7146-55.
228. Chang W, Wei K, Ho L, Berry GJ, Jacobs SS, Chang CH, Rosen GD. A critical role for the mTORC2 pathway in lung fibrosis. *PloS one* 2014; 9:e106155.
229. Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nature reviews Nephrology* 2010; 6:643-56.
230. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nature reviews Drug discovery* 2012; 11:709-30.
231. Czaja MJ, Ding WX, Donohue TM, Jr., Friedman SL, Kim JS, Komatsu M, Lemasters JJ, Lemoine A, Lin JD, Ou JH, et al. Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy* 2013; 9:1131-58.
232. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut* 2015; 64:830-41.
233. Sakamoto S, Muramatsu Y, Satoh K, Ishida F, Kikuchi N, Sano G, Sugino K, Isobe K, Takai Y, Homma S. Effectiveness of combined therapy with pirfenidone and inhaled N-acetylcysteine for advanced idiopathic pulmonary fibrosis: a case-control study. *Respirology* 2015; 20:445-52.