



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ROLE DU TRANSFORMING GROWTH FACTOR – BETA 1 (TGF – BETA 1) DANS
LA SENESENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR DES STRESS UVB**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Hélène RIQUIER

Juin 2007

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Rôle du Transforming Growth Factor – beta 1 (TGF – beta 1) dans la Sénescence Induite Prématurément par des stress UVB

RIQUIER Hélène

Résumé

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié la sénescence induite prématurément par des expositions de fibroblastes de derme fœtaux d'origine humaine (AG04431) à des doses sub-létales d'UVB.

Il a été démontré que le Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF-β1) intervient dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence chez les fibroblastes après expositions aux UVB ou à l'H₂O₂.

Nous nous sommes intéressés à l'activation de la principale voie de transduction du signal dépendante du TGF-β1 : la voie des Smads. Nous avons analysé par la technique du Western blot et par des marquages en immunofluorescence l'abondance et la localisation de Smad2, Smad3 et Smad4 après expositions aux UVB induisant la sénescence prématurée des fibroblastes. Nous avons également mis en évidence la phosphorylation de Smad2 et Smad3 après expositions aux UVB.

Nous avons également étudié par Western blot l'abondance et la phosphorylation des MAPKs JNKs, ERKs et p38^{MAPK} après expositions des fibroblastes aux UVB. En effet, la voie des Smads peut également être activée par ces différentes MAPKs. L'analyse des résultats semble indiquer que les ERKs et p38^{MAPK} sont phosphorylées à long terme après la dernière exposition aux UVB alors que les JNKs semblent phosphorylées à court et à long terme.

Enfin, nous avons étudié l'implication de MMP-2 dans l'activation de la forme latente du TGF-β1 après expositions aux UVB. Les résultats obtenus indiquent une implication partielle de MMP-2 dans l'activation du TGF-β1.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur: O. Toussaint

Remerciements

Après ces quelques mois passés au sein de l'URBC, j'adresse tout d'abord mes remerciements au professeur Martine Raes pour m'avoir permis de réaliser mon mémoire dans son département. Je remercie également Olivier Toussaint de m'avoir acceptée au sein de l'équipe des GRAS.

En tous cas, quel plaisir d'être sous la tutelle de Florence Chainiaux. Merci 1000 fois pour tout ces enseignements précieux, pour ta patience, ta bonne humeur coutumière (je remercie d'ailleurs Bono pour cela), tes remarques pertinentes et tes corrections jours et nuits.

Je remercie également les membres de mon jury pour avoir pris le temps de s'intéresser à ce travail.

Ne t'inquiète pas, je ne t'oublie pas Thomas ! Ce fut un réel plaisir de travailler à tes côtés au cours de ces quelques mois. Merci pour tous les petits (et grands) services que tu m'as rendus ainsi que pour ta sympathie. La Gombe nous attend !

Evidement, je ne peux pas oublier Aline pour ses bons conseils, ses solutions de secours, sa bonne humeur. Merci également à Edouard pour ses enseignements concernant le Western blot.

Merci à Emilie, Françoise, Valérie, Manu, Fred, Christelle et ma famille pour leur aide et leurs encouragements.

Je tiens à remercier toute l'équipe GRAS pour leur soutien et leurs conseils. Merci à tous les mémorants et à toutes les personnes qui m'ont aidée à réaliser ce mémoire.

Liste des abréviations

°C	degré celcius
A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	acide désoxyribonucléique mitochondrial
ALKs	activin-receptor-like kinases
AP-I	activated Protein-1
APS	persulfate d'ammonium
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
apo J	apolipoprotéine J
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase-1
ATF-2	activating transcription factor 2
ATP	adenosine tri-phosphate
β-gal	β-galactosidase
BME	basal medium eagle
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovine serum albumine
C	cytosine
CDK	cycline dependent kinase
CDKI	cycline dependent kinase inhibitor
CPDs	doubléments cumulés de population
CTGF	connective tissue growth factor
CTL	contrôle
DMF	dharmafect
DMSO	diméthylsulfoxyde
DTT	dithiothreitol
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ex	exemple
FBS	foetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
FS	fibroblaste de derme AG04431
G	guanine
g	gramme
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
h	heure
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
IF	immunofluorescence
IL-1	interleukine-1
INK4	inhibitors of CdK4
j	joule
JNK	c-Jun N-terminal kinases
kb	kilo paires de bases
kDa	kilo dalton
KIP	kinase inhibitor protein
LAP	latency associated peptide

LTPB	latent TGF- β binding protein
LLC	large latent complex
m	mètre
M	molaire
mA	milliampère
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MEC	matrice extracellulaire
MEK	= MAPKK
MEKK	MEK kinase
MF	mitotic fibroblast
mJ/cm ²	millijoule/centimètre ²
MMPs	métalloprotéinases matricielles
MT-MMP1	membrane-type MMP
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localisation sequence
nm	nanometre
pb	paire de bases
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymerisation chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PFA	paraformaldéhyde
PMF	post mitotic fibroblast
pRb	protéine de retinoblastoma
PVDF	polyvinylidène difluoride
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	reactive oxygene species
rpm	rotation par minute
RT	reverse transcription
S	sérine
S-A β -gal	senescence associated β -galactosidase
SAPK	stress activated protein kinase
SARA	smad anchor for receptor activation
SCP1-3	small polymerase II C-terminal phosphatases
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIPS	sénescence induite prématurément par des stress
Smurf	smad ubiquitination regulatory factor
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
siRNA	small interfering ribonucleic acid
T	thymine
TAK1	TGF- β -activated kinase-1
TBS	tris buffer saline
T β R-I	récepteur au TGF- β de type I
T β R-II	récepteur au TGF- β de type II
t-BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TGF- β	transforming growth factor- β

TIMPs	tissue inhibitors of MMP
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TRF2	telomere repeat factor-2
TSP-1	thrombospondin-1
UCA	acide urocanique
UVA	ultraviolets de type A
UVB	ultraviolets de type B
UVC	ultraviolets de type C
UV	ultraviolets
V	volts
WB	western blot
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactopyranoside

19 juin 2007

Concerne: mémoire de Riquier Hélène

" Rôle du TGF- β 1 dans la sénescence induite prématurément par des stress UVB"

Cher membre du Jury,

Afin de vous rendre la lecture de mon mémoire plus agréable, je vous présente une liste de quelques modifications à prendre en compte lors de la lecture de celui-ci. Ces modifications sont reprises ci-dessous.

Erratum

Dans le matériel et méthodes, à la page 18 au point 2.4.3, les siRNA sont dilués à une concentration finale de 50 nM et non de 20 nM.

Dans la partie résultats, à la figure III.10, il manque la légende d'un des profils protéiques. Le profil sans légende correspond à la forme totale de Smad2.

En ce qui concerne la figure III.20, la légende (nM 20, nM 50 et nM 100) est remplacée par la suivante: 20 nM, 50 nM et 100 nM.

Dans la partie résultats, il manque la légende de l'axe des ordonnées pour les figures III.5, III.6 et III.21. Les légendes manquantes sont les suivantes :

- Figure III.5 : Prop. cellules positives S-A β -gal (%)
- Figure III.6 : Niveau relatif ARN-m (CTL = 1)
- Figure III.21 : Niveau relatif ARN-m MMP-2 (siRNA CTL-/CTL = 1)

Merci de tenir compte de ces modifications.

1. Introduction

1.1. Contexte général

Le 24 avril 2007, le Secrétaire général de l'ONU a publié un rapport concluant qu'entre 2007 et 2050, on s'attend à ce que le nombre de personnes âgées de 60 ans ou plus double pour atteindre 2 milliards d'individus. Aujourd'hui, c'est la population de l'Europe, composée de 21% de personnes âgées et de 15% d'enfants, qui est la plus vieille du monde. Celle de l'Afrique, composée de 5% de personnes âgées et de 41% d'enfants, est la plus jeune (Communiqué de presse POP/953 Département de l'information • Service des informations et des accréditations • New York).

En un peu moins d'un siècle, notre espérance de vie a presque doublé. En effet, pour la Belgique, celle-ci est passée respectivement pour les hommes et pour les femmes, de 44 ans et 47 ans en 1885 à 76 et 82 ans en 2005. En 2050, on devrait atteindre 82 ans pour les hommes et 88 ans pour les femmes (**Figure I.1**) (Source : mention obligatoire: SPF Économie - Direction générale Statistique et Information économique). Nous sommes et nous serons de plus en plus nombreux à atteindre un âge avancé comme l'atteste les pyramides des âges (**Figure I.2**) (Source: U.S. Census Bureau, International Data Base).

Il est impératif que ces années de vie supplémentaires soient, le plus possible, des années de vie active, en pleine santé et en complète possession de nos capacités physiques et intellectuelles. Ces préoccupations conduisent à étudier plus en profondeur les mécanismes du vieillissement.

Il existe un grand nombre de théories du vieillissement biologique dont une nous intéressera tout particulièrement. En 1956, le docteur Harman proposa la théorie du vieillissement appelée la théorie des radicaux libres. Des travaux ultérieurs confirmèrent en partie cette théorie qui propose l'existence d'un lien entre le vieillissement cellulaire et l'augmentation de la production d'espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène (ROS) (de Magalhaes and Church, 2006). En effet, au cours du vieillissement, la quantité de protéines oxydées augmente et les dommages à l'ADN s'accumulent.

Afin de pouvoir comprendre les mécanismes du vieillissement, des modèles *in vivo* ont été mis au point sur différents organismes comme le nématode *Caenorhabditis elegans*, la drosophile *Drosophila melanogaster* et la souris *Mus musculus*. Des études génétiques sur ces organismes ont permis de renforcer en partie la théorie des radicaux libres. Il existe également des modèles *in vitro* de sénescence cellulaire. Nous nous intéresserons dans le cadre de ce mémoire à l'étude d'un modèle *in vitro* de sénescence induite prématurément par des stress.

Introduction

1.2. La sénescence répllicative et la sénescence induite prématurément par des stress

1.2.1. Sénescence répllicative et limite de Hayflick

Plus de 40 ans ont passé depuis que Hayflick et Moorhead ont mis en évidence que des fibroblastes de poumons fœtaux humains cultivés *in vitro* ne peuvent se diviser qu'un certain nombre de fois (Hayflick and Moorhead, 1961). Ainsi, la croissance cellulaire *in vitro* peut se diviser en plusieurs phases (**Figure 1.3**). La première phase correspond à la mise en culture des cellules prélevées d'un tissu particulier. Lors de la seconde phase, les cellules se divisent rapidement et de façon exponentielle. La troisième phase commence lorsqu'un ralentissement des divisions cellulaires est observé. Les cellules entrent alors en dégénérescence, arrêtent de se diviser puis meurent. Ce phénomène, plus connu sous le nom de sénescence répllicative ou limite de Hayflick, a été mis en évidence dans plusieurs autres lignées cellulaires telles que les kératinocytes (Rheinwald and Green, 1975), les lymphocytes (Tice et al., 1979), les cellules endothéliales (Mueller et al., 1980), etc. Seuls certains types de cellules font exception : les cellules souches embryonnaires, les cellules souches adultes, les cellules germinales ainsi que les cellules tumorales (Campisi, 1997).

Bien qu'un arrêt du cycle cellulaire soit observé chez les cellules sénescents, celles-ci restent métaboliquement actives et présentent toute une série d'autres changements cellulaires caractéristiques regroupés sous l'appellation de « biomarqueurs de la sénescence ».

L'étude de la sénescence répllicative *in vitro* permet une meilleure compréhension de certains processus cellulaires *in vivo*. Ainsi, l'étude de l'entrée des cellules en sénescence répllicative apporte de précieuses informations aux recherches portant sur le cancer.

1.2.2. La Sénescence Induite Prématurément par des Stress (SIPS)

Les cellules en culture peuvent être exposées à différents types de stress qui peuvent altérer leur métabolisme. Le stress peut être défini comme toute perturbation de l'homéostasie de la cellule. Par exemple, peuvent être cités comme stress : l'hypoxie, les chocs thermiques, les chocs osmotiques ou encore les rayonnements ultraviolets. Pour s'en protéger, les cellules possèdent de nombreux mécanismes de défense tels que des enzymes antioxydantes, des mécanismes de réparation de l'ADN, des protéines chaperonnes, etc. Lorsque des fibroblastes en culture sont exposés à des agents stressant à dose (ex : UV) ou à concentration (ex : H₂O₂) sub-létales, ceux-ci peuvent entrer prématurément en sénescence et exprimer de façon précoce les biomarqueurs de la sénescence. Cette sénescence prématurée est dénommée sénescence induite prématurément par des stress ou SIPS (Toussaint et al., 2000). Différents modèles de SIPS ont été mis au point et diffèrent par le type cellulaire utilisé, la nature de l'agent stressant (peroxyde d'hydrogène, éthanol, *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), UVB) (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Dumont et al., 2000; Pascal et al., 2005) et le protocole expérimental suivi (Toussaint et al., 2000). Les fibroblastes en sénescence répllicative et en SIPS partagent des caractéristiques identiques qui sont les biomarqueurs de la sénescence.

Introduction

1.2.3. Les biomarqueurs de la sénescence

1.2.3.1. *Les morphotypes*

Les fibroblastes changent de morphologie au cours de leur durée de vie proliférative. Suite à des modifications moléculaires, ils s'étalent de plus en plus (**Figure I.4**). La polymérisation de monomères d'actine forme des filaments d'actine dont l'assemblage résulte en la formation des fibres de stress à l'intérieur de la cellule. Aux extrémités de ces fibres de stress se forment des plaques d'adhésion provenant de l'assemblage de protéines d'adhésion. Ces plaques d'adhésion sont plus nombreuses dans les cellules sénescents et ont une distribution aléatoire. Ces plaques pourraient servir de « charpente » à la cellule étalée et seraient nécessaires à son adhérence (Chen et al., 2000).

1.2.3.2. *Les délétions dans l'ADN mitochondrial*

Les mitochondries sont des organites intracellulaires d'une taille de l'ordre du micromètre qui sont essentielles pour la cellule puisqu'elles assurent la production d'énergie sous forme d'ATP *via* un processus de phosphorylations oxydatives. Elles ont la particularité de posséder leur propre matériel génétique qui code pour des protéines de la chaîne respiratoire ainsi que pour des ARN de transfert et des ARN ribosomiaux. Cet ADN mitochondrial (ADNmt) est bicaténaire, circulaire, présent en plusieurs copies et long de 16.569 paires de bases (pb). Au cours de la sénescence répliquative, de nombreuses délétions peuvent y apparaître mais la délétion la plus commune est une délétion de 4.977 pb (Lee et al., 1997). Il a été démontré que la fréquence de cette délétion augmente lors du vieillissement de la peau *in vivo* (Pang et al., 1994). La même constatation a été faite lors de la sénescence répliquative induite prématurément par des stress sub-létaux répétés au *t*-BHP (Dumont et al., 2000) ou par des doses sub-létales d'UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

1.2.3.3. *L'activité β -galactosidase associée à la sénescence*

La β -galactosidase est une enzyme lysosomale capable d'hydrolyser une liaison osidique faisant intervenir un galactose en position β . Son activité optimale est observée à pH acide (pH 4,0 – 5,0) qui est proche du pH lysosomal. La β -galactosidase peut cliver le substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactopyranoside (x-gal) et donner une coloration bleue aux cellules.

L'activité de la β -galactosidase peut être mise en évidence à pH 4 chez la plupart des cellules de mammifères qu'elles soient jeunes ou sénescents. Par contre, les fibroblastes sénescents présentent une activité β -galactosidase détectable à pH 6 (**Figure I.5**). Cette activité enzymatique qui leur est propre est nommée activité β -galactosidase associée à la sénescence (S-A β -gal). Cela s'explique par le fait que les fibroblastes sénescents possèdent des lysosomes plus grands et plus nombreux tel que la β -galactosidase peut fonctionner à un pH suboptimal de 6 (Kurz et al., 2000).

Cette activité a pu être mise en évidence dans des biopsies de peau humaine (Dimri et al., 1995). De plus, la proportion de cellules qui présentent cette activité S-A β -gal augmente suite à des expositions à des concentrations sub-létales au *t*-BHP (Dumont et al., 2000) ou à des doses sub-létales d'UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005) (**Figure I.6**).

Introduction

1.2.3.4. Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont des séquences répétées non codantes qui se trouvent à l'extrémité des chromosomes. « TTAGGG » est la séquence consensus répétée chez les mammifères. Cette séquence se répète sur 10 à 15 kb, à la naissance chez l'être humain. Ces répétitions forment une structure tridimensionnelle avec laquelle de nombreuses protéines interagissent, ce qu'on appelle le télosome. Au cours du temps, la longueur des télomères chez les cellules somatiques humaines diminue à raison de 15 à 50 pb par an *in vivo* et environ 50 à 150 pb à chaque passage en culture *in vitro* (Harley et al., 1990). Les télomères protègent les chromosomes de fusions et de recombinaisons intempestives ou de dégradations par des exonucléases, tout ces événements pouvant mener à la mort de la cellule. Les télomères participent donc à la stabilité et à l'intégrité du génome (Rodier et al., 2005).

Le raccourcissement progressif des télomères s'explique par le mécanisme de réplication de l'ADN. En effet, l'ADN polymérase a besoin d'une amorce d'ARN pour commencer à polymériser l'ADN à partir du brin parental mais elle ne peut progresser que dans le sens 5'-3'. Ainsi se forme un brin continu et un brin discontinu constitué de fragments d'Okazaki. Les amorces d'ARN seront dégradées, remplacées par de l'ADN et les fragments d'Okazaki pourront être reliés entre eux par une ligase. A chaque réplication, la dernière amorce au niveau du brin discontinu ne pourra pas être remplacée par de l'ADN et sera donc perdue, provoquant un raccourcissement du télomère (**Figure I.7**).

Les mécanismes d'arrêt du cycle cellulaire en sénescence répllicative seraient déclenchés lorsque les télomères atteignent une longueur critique, provoquant une fusion télomérique (Serrano and Blasco, 2001). Ceci serait perçu par la cellule comme un dommage à l'ADN et provoquerait un arrêt du cycle cellulaire par l'activation du facteur de transcription p53 (Vaziri and Benchimol, 1996). Néanmoins, des données récentes ont montré que la sénescence répllicative chez les cellules humaines est causée plus par des changements au niveau de la protection des télomères courts plutôt que par une perte totale des séquences télomériques. En effet, la liaison d'une protéine TRF2 aux télomères pourrait faciliter le recrutement d'autres protéines requises pour la protection des télomères et la suppression de la sénescence. Les télomères trop courts ne seraient plus capables de lier suffisamment de TRF2 pour assurer leur protection et finiraient par déclencher l'arrêt du cycle cellulaire (Karlseder et al., 2002).

Il existe une enzyme capable de rallonger les télomères: la télomérase. Cette enzyme est une ribonucléoprotéine constituée d'une unité catalytique, capable de polymériser des désoxyribonucléotides, et d'une matrice d'ARN complémentaire de la séquence télomérique, qui sert d'amorce. La télomérase est exprimée au cours du développement foetal ainsi que dans les cellules germinales mais également dans 80 à 90% de cancers (Bodnar et al., 1998) (**Figure I.8**). Ces cellules ont alors une capacité de prolifération illimitée.

En ce qui concerne la SIPS, des fibroblastes soumis à un stress sous H₂O₂ à une concentration sub-létale présentent un raccourcissement limité à 300 pb à 18 jours après le stress ce qui n'est pas suffisant pour expliquer l'entrée en sénescence (Dumont et al., 2001). De plus, des cellules exprimant la télomérase sont capables d'entrer en SIPS et présentent les différents biomarqueurs de la sénescence (de Magalhaes et al., 2002; Zdanov et al., 2006). Donc, la SIPS pourrait être induite indépendamment d'un raccourcissement télomérique critique.

Introduction

1.2.3.5. L'arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : la phase G1, la phase S, la phase G2 et la phase M (**Figure I.9**). Une cellule au repos est en phase G0. Au début de la division cellulaire, la cellule synthétise de nouvelles protéines. La cellule est alors en phase G1. Pour pouvoir passer à la phase S, la cellule doit d'abord passer le point de restriction. Le point de restriction passé, la cellule peut entrer en phase S pour répliquer son ADN. Ensuite, en phase G2, la cellule se prépare à se diviser pour enfin entrer en mitose en phase M (Jacks and Weinberg, 1998).

Le passage d'une phase à l'autre nécessite l'activation de protéines particulières que sont les kinases dépendantes de cyclines (CdK). Les CdK font parties de la famille des sérine/thréonine kinases et peuvent être activées par une autre famille de protéines : les cyclines. L'activité kinasique des CdK n'est possible que si les cyclines se lient aux CdK (Hengstschlager et al., 1999). Les CdK activées peuvent alors phosphoryler différents substrats qui permettront à la cellule de progresser dans le cycle cellulaire. En phase G1, suite à des stimulations par des mitogènes, différentes cyclines sont synthétisées dont la cycline E qui se lie principalement à CdK2. Ce complexe possède une activité maximale en phase G1, et hyperphosphoryle la protéine du rétinoblastome (pRb). Lorsque pRb est hyperphosphorylée, sa liaison au facteur de transcription E₂F n'est plus possible et ce dernier peut activer la transcription de gènes impliqués dans la transition G1/S et dans la réplication de l'ADN (Sherr and Roberts, 1999).

Néanmoins, les CdK peuvent être inhibées par des protéines inhibitrices de CdKs (CdKI). Les CdKI peuvent être classées en deux familles distinctes : les INK4 (inhibitors of CdK4) regroupant notamment les protéines p16^{ink4a}, p15^{ink4b}, p14^{ink4c}, p19^{ink4d} et les KIP (kinase inhibitor protein) dont p21^{waf-1}, p27^{kip1} et p57^{kip2} (Gerland et al., 2001).

Lors de dommages à l'ADN ou lorsque les télomères deviennent trop courts, p53 est activée, ce qui déclenche l'expression de p21^{waf-1}, qui inactive le complexe CdK2/cycline E. pRb est alors hypophosphorylée et séquestre E₂F provoquant ainsi un arrêt du cycle cellulaire.

Une autre voie permet d'arrêter le cycle cellulaire lors de la sénescence répllicative et semble indépendante du raccourcissement télomérique : la voie impliquant p16^{ink4a} (Rheinwald et al., 2002). L'activation de cette CdKI va également être responsable de l'hypophosphorylation de pRb *via* l'inactivation d'un complexe CdK/cycline, ce qui provoque un arrêt du cycle cellulaire. Cette voie permettant l'arrêt du cycle cellulaire est irréversible contrairement à la voie impliquant p53 (Beausejour et al., 2003) (**Figure I.10**).

1.2.3.6. Modifications de l'expression génique

Plusieurs études différentes ont démontré que les fibroblastes en sénescence répllicative présentent des modifications au niveau de l'expression de nombreux gènes. Ces études ont montré des modifications de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la régulation du cycle cellulaire, le cytosquelette et dans le métabolisme.

Suite à une étude basée sur la technique de l'hybridation soustractive, l'équipe de Gonos a mis en évidence des gènes dont l'expression est augmentée en sénescence répllicative, comme par exemple l'apolipoprotéine J (apo J), la fibronectine, la protéine SM22, et l'ostéonectine (Gonos et al., 1998).

Introduction

L'apo J est une protéine chaperonne qui est surexprimée dans de nombreuses situations telles que lors d'un stress, une blessure ou pendant le développement. De plus, elle octroie une protection aux fibroblastes contre la sénescence induite prématurément par des stress sub-létaux au *t*-BHP ou à l'éthanol (Dumont et al., 2002). La fibronectine et l'ostéonectine sont des protéines de la matrice extracellulaire. SM22 est une protéine pouvant s'associer aux filaments d'actine et induire des changements dans la morphologie cellulaire. Lors de la sénescence induite prématurément par des stress sub-létaux UVB, une augmentation d'abondance de l'ARN codant pour la fibronectine, SM22, l'apoJ et l'ostéonectine a également été observée (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

De plus, des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire sont également surexprimés ou réprimés (Pour une revue : (Cristofalo et al., 1998)):

- 1) Les gènes de réponse précoce induits immédiatement après une stimulation par des mitogènes sont réprimés lors de la sénescence. Parmi eux, le gène *c-fos* codant pour une des sous-unités du facteur de transcription dimérique AP-1, est réprimé. Son induction par des facteurs de croissance est diminuée chez les fibroblastes sénescents. De plus, les mitogènes activent la voie des MAPK ERK, ce qui active le gène *c-myc*, dont le produit active lui-même SRF (Serum Response Factor). SRF est une protéine capable de se fixer sur le site consensus SRE (Serum Response Element) du promoteur du gène *c-fos*, ce qui déclenche sa transcription. Or, chez les fibroblastes âgés, SRF est hyperphosphorylé, ce qui l'empêche de reconnaître SRE et empêche la transcription de *c-fos*.
- 2) Plusieurs gènes impliqués dans la transition entre la phase G1 et la phase S ne sont plus exprimés chez les cellules sénescents. Le gène d'une des sous-unités d'E₂F (E₂F₁), facteur de transcription essentiel pour la transcription de gènes impliqués dans la transition G1/S, est réprimé chez les fibroblastes sénescents. Cette répression est due à l'hypophosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb). Une hypophosphorylation de pRb a également été observée sur des fibroblastes BJ en sénescence prématurée induite par des stress sub-létaux UVB (de Magalhaes et al., 2002).
- 3) Les gènes des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines voient leur niveau d'expression diminuer chez les cellules sénescents. Les ARNm de Cdk2, la cycline A et la cycline B ne sont, par exemple, plus transcrits chez les fibroblastes sénescents.
- 4) Les gènes d'inhibiteurs de prolifération comme p53 et p21^{waf-1} sont surexprimés chez les cellules sénescents ainsi que chez les fibroblastes en sénescence prématurée induite par des stress sub-létaux UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

1.3. La peau

1.3.1. Structure de la peau

La peau constitue la barrière entre l'environnement et le corps humain, se trouvant ainsi confrontée à des agents externes potentiellement stressants tels que les rayons ultraviolets, l'ozone, des températures externes élevées, etc. Cet organe est divisé en trois parties différentes (**Figure I.11**) (Scharffetter-Kochanek et al., 2000):

- L'épiderme d'origine ectodermique est un épithélium stratifié kératinisé constitué à 90% de kératinocytes. Ceux-ci se différencient et migrent depuis la couche basale

Introduction

jusqu'à la surface où ils desquamment. Cette différenciation est appelée kératinisation et permet de distinguer 4 strates superposées : la couche basale ou *stratum germinatum*, la couche épineuse ou *stratum spinosum*, la couche granuleuse ou *stratum granulosum* et la couche cornée ou *stratum corneum* qui se trouve en surface. L'épiderme n'est pas irrigué par des vaisseaux sanguins, ni par des vaisseaux lymphatiques. Les cellules qui le composent sont alimentées par diffusion depuis le derme. L'épiderme contient par contre de nombreuses terminaisons nerveuses.

Des mélanocytes se trouvent dans la couche basale et peuvent s'associer avec des kératinocytes pour leur fournir de la mélanine. Cette dernière protège contre les rayons ultraviolets.

Dans l'épiderme, se trouvent également des cellules de Langerhans impliquées dans la réponse immunitaire ainsi que des cellules de Merkel agissant comme des mécanorécepteurs.

- Le derme, d'origine mésodermique, est localisé sous la couche basale de l'épiderme et le soutient. Il confère une certaine élasticité et une résistance à la peau. Il est principalement constitué d'une matrice extracellulaire fibreuse et amorphe qui entourent le réseau vasculaire et nerveux ainsi que les cellules dermiques, principalement des fibroblastes. Les fibroblastes sont essentiels pour la synthèse des composants de la matrice extracellulaire (MEC). Ils synthétisent notamment l'élastine, les collagènes, la fibrilline, les glycoprotéines de structure et les protéoglycanes. De plus, ils régulent également la dégradation de la MEC par la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMPs) et de leurs inhibiteurs (TIMPs). Ils sont aussi impliqués dans des processus de cicatrisation et de croissance.
- L'hypoderme, d'origine mésodermique également, est la couche profonde de la peau. Il sert d'interface entre le derme et les structures mobiles sous-jacentes (muscles, tendons, etc). Composé principalement d'adipocytes et de tissu conjonctif, il protège l'organisme des chocs et lui procure une protection thermique.

1.3.2. Le vieillissement de la peau

Le vieillissement de la peau est généralement subdivisé en deux aspects : le vieillissement intrinsèque et le vieillissement extrinsèque.

1.3.2.1. Vieillesse intrinsèque

Le vieillissement intrinsèque est comparable aux mécanismes induisant le vieillissement des organes internes et implique principalement des facteurs génétiques mais également des changements hormonaux ou des réactions métaboliques à l'origine de stress oxydatifs (Scharffetter-Kochanek et al., 2000).

La peau devient fine, dû à un affinement du derme et de l'épiderme, lisse et manque d'élasticité (**Figure I.12**). En effet, les fibres de collagènes se réorganisent et l'abondance des composants de la MEC diminue. De plus, le nombre de fibroblastes diminue et certains présentent une morphologie sénescence (**Figure I.13**).

Introduction

1.3.2.2. *Vieillesse extrinsèque*

Le vieillissement extrinsèque se superpose au vieillissement intrinsèque et correspond à l'impact de l'environnement sur la peau. Les principaux acteurs de ce vieillissement sont les rayonnements ultraviolets (UV), on parle alors de photo-vieillesse.

Lors d'un vieillissement extrinsèque, la peau s'épaissit au niveau de la couche cornée, du derme et de l'épiderme. Au niveau cellulaire, des kératinocytes atypiques apparaissent et les mélanocytes se distribuent de façon hétérogène ce qui provoque une pigmentation irrégulière de la peau. Au niveau du derme, la réorganisation de l'élastine, la fibrilline, de protéoglycane et de l'acide hyaluronique provoque des perturbations fonctionnelles de ces composants (Bernstein and Uitto, 1996) (**Figure I.13**). Des rides profondes apparaissent et la peau prend un aspect tanné (**Figure I.12**).

1.3.3. Effets des ultraviolets

1.3.3.1. *Les rayonnements ultraviolets*

Les rayonnements ultraviolets, responsables du photo-vieillesse, peuvent être classés en trois catégories en fonction de leurs longueurs d'onde :

- Les UVA (320 - 400 nm) représentent 5,1% du rayonnement solaire (95% du rayonnement ultraviolet) et peuvent pénétrer jusque dans le derme profond où ils provoquent un stress oxydatif par des réactions de photosensibilité, définies ci-dessous.
- Les UVB (320 - 290 nm) forment 0,3% du rayonnement solaire et pénètrent jusque dans le derme supérieur où ils occasionnent un stress oxydatif mais aussi des dommages directs à l'ADN.
- Les UVC (< 290 nm) sont normalement arrêtés au niveau de la couche d'ozone mais en cas de contact avec la peau, ils sont stoppés au niveau de l'épiderme et y provoquent des dommages directs à l'ADN (**Figure I.11**).

1.3.3.2. *Réactions de photosensibilité*

Les UVA ainsi que les UVB peuvent réagir avec des molécules photosensibles qui se trouvent dans la cellule. En fonction de la molécule photosensible touchée, deux types de réactions se distinguent : les réactions de type I et les réactions de type II.

Dans les réactions de types I, la molécule photosensible absorbe les photons et entre dans un état excité. Un transfert direct d'électrons énergétiques s'effectue par interaction entre la molécule photosensible et une biomolécule menant ainsi à la formation de radicaux libres. Les radicaux libres formés vont réagir avec d'autres protéines ou l'ADN. Ce mécanisme ne requiert pas d'oxygène pour entraîner ces dommages moléculaires (Svobodova et al., 2006).

Dans les réactions de type II, la molécule photosensible excitée par les ultraviolets va réagir directement avec l'oxygène et entraîner la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène. Ceux-ci vont endommager les protéines mais également causer des dommages à l'ADN.

Les molécules photosensibles principalement touchées sont les acides aminés aromatiques, le NADH et le NADPH, les quinones, les flavines, les porphyrines, les caroténoïdes, le 7-déhydrocholestérol, la mélanine et l'acide urocanique (UCA) (Trautinger, 2001).

Introduction

1.3.3.3. Dommages directs à l'ADN

Le spectre d'absorption de l'ADN s'étale de 260 à 280 nm. L'ADN peut donc absorber directement les photons émis par les UVB et les UVC. Cette absorption d'énergie engendre des modifications au niveau de l'ADN impliquant des pyrimidines. Deux types de produits sont formés : des dimères pyrimidine-cyclobutane et des dimères pyrimidine (6 – 4) pyrimidone, issus de la formation d'un lien covalent entre deux pyrimidines adjacentes (**Figure I.14**) (Ichihashi et al., 2003).

La double hélice d'ADN est soumise alors à des torsions anormales provoquant un ralentissement ou un arrêt de la réplication de l'ADN. De plus, l'absorption directe de photons peut entraîner les mutations suivantes : GC → TA, TA → GC ou TT → CC.

1.4. Transduction du signal et SIPS

1.4.1. La voie du Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1)

La superfamille du TGF-β regroupe des facteurs de croissance contrôlant le développement et l'homéostasie d'un grand nombre de tissus. Ils interviennent notamment dans les processus de différenciation, d'apoptose, de prolifération, de mobilité et d'adhésion (Pour une revue : (Massague, 1998)). Ces facteurs jouent également un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire pour la guérison des blessures (Schiller et al., 2004). Les membres de cette superfamille sont classés en plusieurs sous-familles : les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), les activines et la famille du TGF-β. Ces facteurs de croissance peuvent avoir des effets très différents d'une condition expérimentale à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre. Chez les mammifères, la famille du TGF-β comprend trois isoformes : le TGF-β1, le TGF-β2 et le TGF-β3. Ces trois isoformes sont synthétisées sous forme d'un précurseur qui sera clivé dans le trans Golgi avant sa sécrétion sous une forme latente appelée LTGF-β.

1.4.1.1. Le TGF-β1 et son activation

- Généralités et structure :

Le LTGF est en fait composé du TGF-β lié de façon non covalente à un peptide LAP (latency associated peptide) qui retient le TGF-β sous une forme latente incapable de se lier aux betaglycanes ou à ses récepteurs (Pour une revue : (Massague, 1998)). De plus, le peptide LAP se lie *via* des ponts dissulfures à une glycoprotéine connue sous le nom de LTBP (latent TGF-β-binding protein) pour former ainsi le grand complexe latent du TGF-β ou LLC (Large Latent Complex) (**Figure I.15**). En fait, LTBP n'est pas requis pour garder le TGF-β sous forme latente mais il est associé à la matrice extracellulaire et impliqué dans la sécrétion, le stockage et l'activation de ce complexe. Les trois composants du LLC (TGF-β, LAP et LTBP) constituent un senseur. Ce senseur est constitué d'un effecteur (TGF-β), d'un localisateur (LTBP) et d'un détecteur (LAP). LTBP est le localisateur puisqu'il permet l'interaction avec la MEC et LAP est le détecteur car tout mécanisme d'activation doit agir sur LAP. En effet, LAP suffit à lui seul à inhiber la bioactivité du TGF-β (Pour une revue : (Annes et al., 2003)).

Introduction

- Mécanismes d'activation, les métalloprotéinases matricielles (MMPs) :

En conditions physiologiques, la quantité de TGF- β libre et actif est négligeable par rapport à sa forme latente liée au peptide LAP. Donc, la libération et l'activation de la forme latente sont des événements clés dans la régulation de la réponse au TGF- β .

Plusieurs mécanismes d'activation de la forme latente du TGF- β sont connus: des protéases, TSP-1, l'intégrine $\alpha v \beta 6$, un faible pH ou encore des ROS (Koli et al., 2001). Il a également été démontré *in vitro* que les métalloprotéinases matricielles MMP-2 et MMP-9 peuvent activer par protéolyse la forme latente du TGF- β (Yu and Stamenkovic, 1999).

Les métalloprotéinases matricielles sont des endopeptidases à zinc fonctionnellement et structurellement apparentées et classées en 5 familles : les collagénases interstitielles, les gélatinases (dont font partie MMP-9 et MMP-2), les stromélysines, les MT-MMPs (Membrane-Type MMP) et l'élastase. Les MMPs sont des enzymes clés du remodelage et de la dégradation de la MEC. Par exemple, MMP-2 et MMP-9 peuvent dégrader la gélatine, les collagènes de type I, IV et V mais aussi l'élastine et la fibronectine. L'activité des MMPs est hautement régulée au niveau de l'expression génique, de l'activation de la forme latente de la protéine et par leurs inhibiteurs (TIMPs).

MMP-2 fait exception dans le sens où elle est exprimée constitutivement et contrôlée par un mécanisme d'activation unique impliquant MT-MMP1 et TIMP2. Son expression est également contrôlée par des stabilisations post-transcriptionnelles de son ARNm et par le facteur de transcription AP-1 (Sternlicht and Werb, 2001).

1.4.1.2. Les récepteurs cellulaires et leur activation

La famille des récepteurs cellulaires pour le TGF- β est divisée en deux sous-familles: les récepteurs de type I (T β R-I) et les récepteurs de type II (T β R-II), aussi appelés Activin-receptor-like kinases (ALKs). Chez les mammifères, il existe 5 récepteurs de type I et 7 récepteurs de type II qui font partie de la famille des récepteurs sérine/thréonine kinase. Pour chaque membre de la famille du TGF- β , il existe une combinaison caractéristique de T β R-I et T β R-II. En absence de ligand, ces récepteurs se trouvent sous forme d'homodimères à la surface de la cellule.

Le TGF- β 1 se lie à T β R-II avec une haute affinité et ceci permet le recrutement de T β R-I. L'hétérodimérisation de T β R-I et T β R-II permet une transphosphorylation de T β R-I par T β R-II. T β R-I phosphorylé peut alors activer les protéines Smads, ce qui permettra la transduction du signal jusqu'au noyau (Shi and Massague, 2003).

1.4.1.3. Les Smads

- Généralités et structure :

Les Smads se subdivisent en 3 familles: les R-Smads qui sont les substrats directs des récepteurs kinase de la famille du TGF- β , les Co-Smads qui participent à la transduction du signal en s'associant avec les R-Smads et les I-Smads ou Inhibitory Smads qui inhibent la signalisation des deux autres groupes. Les R-Smads regroupent Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 et Smad8 mais seuls Smad2 et Smad3 sont impliqués dans la voie du TGF- β . En ce qui concerne les I-Smad, Smad6 et Smad7, seul Smad7 intervient dans la voie du TGF- β . Pour les Co-Smads, l'unique protéine connue dans cette famille est Smad4.

Introduction

Les Smads sont constituées de deux domaines: le domaine MH1 et le domaine MH2 correspondant respectivement à la partie N et C terminale de la protéine et reliés par une région de liaison (linker) de taille variable. En condition basale, le domaine MH1 inhibe l'activité transcriptionnelle et biologique du domaine MH2 et *vice versa*. Le domaine MH1 contient une NLS (Nuclear Localisation Sequence) permettant la translocation nucléaire de la protéine et sa liaison à l'ADN. Le domaine MH2 est, quant à lui, responsable des interactions protéines-protéines, des fonctions effectrices et permet la reconnaissance de T β R-1 (Pour une revue : (Massague, 1998)).

- Activation par le TGF- β :

Lorsque le TGF- β se lie à T β R-II, T β R-I est activé et propage le signal dans la cellule par phosphorylations de deux sérines dans un motif SSXS du domaine MH2 de Smad2 et Smad3. L'accessibilité des R-smads au récepteur est facilitée par une protéine auxiliaire SARA (Smad Anchor for Receptor Activation). Une fois les R-smads activées, elles forment un complexe hétérodimérique avec Smad4. Le complexe peut être transloqué dans le noyau. Là, le domaine MH2 de Smad2 va permettre d'interagir avec des facteurs de transcription (comme ATF-2, un facteur de transcription de la famille d'AP-1), des coactivateurs et des corépresseurs alors que Smad4 va permettre la liaison du complexe à l'ADN. La transcription est activée grâce au domaine MH2 de Smad4 (Pour une revue : (ten Dijke and Hill, 2004)) (**Figure I.16**).

- Localisation et mouvements des Smads dans la cellule :

Les Smads 2, 3 et 4 ne sont pas statiques dans la cellule mais effectuent la navette entre le cytoplasme et le noyau. Chez les cellules au repos, Smad2 et Smad3 sont essentiellement cytoplasmiques alors que Smad4 est distribué entre le noyau et le cytoplasme. Lors de la stimulation au TGF- β , les complexes Smads sont formés et s'accumulent dans le noyau où ils restent apparemment quelques heures. Toutefois, il a été démontré récemment que la phosphatase PPM1A/PP2C α , par sa déphosphorylation de Smad2/3, joue un rôle critique dans la fin de la réponse au TGF- β . En effet, cette déphosphorylation permet à Smad2/3 de se dissocier de Smad4 et favorise ainsi l'export de Smad2/3 dans le cytoplasme. Là, si les récepteurs sont encore actifs, les R-Smads peuvent être phosphorylées à nouveau. Donc la durée pendant laquelle les complexes Smads restent dans le noyau dépend directement du temps d'activation des récepteurs (Lin et al., 2006).

Le transport de Smad4 dans le noyau requiert un transport actif *via* des récepteurs de transport nucléaires. Dans la région linker de Smad4 se trouve une séquence NES (Nuclear Export Signal) reconnue par le transporteur nucléaire CRM1. Cependant, Smad4 contient également une séquence NLS se liant à l'importine- α , qui grâce à son interaction avec l'importine- β , permet l'importation de Smad4. Smad3 contient une séquence NLS dans son domaine MH1 lui permettant d'interagir directement avec l'importine- β . Pour Smad2, sa séquence NLS semble inhibée par la présence d'un insert encodé dans son exon 3. L'importation et l'exportation de Smad2/Smad3 peuvent se faire par interaction directe entre leur domaine MH2 et les nucléoporines et cela indépendamment de leur état de phosphorylation. Il semble également que l'exportation de ces deux Smads soit dépendante de l'ATP suggérant la présence d'un transport actif *via* des récepteurs. D'autres modèles sont proposés pour expliquer la localisation des Smads comme l'existence de facteurs de rétention cytoplasmique ou nucléaire. Une autre possibilité serait que les Smads monomériques sont préférentiellement exportées du noyau alors que les complexes Smads y sont préférentiellement importés. Ces différents modèles de transport ne sont bien sûr pas mutuellement exclusifs (Pour une revue : (ten Dijke and Hill, 2004)) (**Figure I.17**).

Introduction

En ce qui concerne l'I-Smad Smad7, elle participe à une boucle de rétroaction négative qui régule l'intensité et la durée de la réponse au TGF- β . En effet, en réponse au TGF- β , l'expression de Smad7 augmente rapidement (Pour une revue : (Massague, 1998)). Smad7 peut se lier à T β R-I et entre ainsi en compétition avec les R-Smads pour la liaison à T β R-I activé, ce qui inhibe la phosphorylation des R-Smads. Par la suite, il a été démontré que Smad7 recrute des E3-ubiquitin ligases connues sous le nom de Smurf1 et Smurf2 (Smad ubiquitination regulatory factor) capables d'ubiquitiner les récepteurs et induire ainsi leur dégradation et la fin du signal. Smad7 peut également recruter un complexe GADD34 et la sous-unité catalytique de la phosphatase 1 pour activer la déphosphorylation de T β R-I. De plus, en ce qui concerne l'arrêt de la réponse au TGF- β , des travaux récents ont montré que les récepteurs au TGF peuvent être internalisés par différentes voies résultant finalement en l'accélération du turn-over de ceux-ci (ten Dijke and Hill, 2004).

1.4.1.4. Les voies du TGF- β Smads-indépendantes

Les réponses au TGF- β ne sont pas uniquement le résultat de l'activation de la voie des Smads mais dépendent du type de cellule touchée et des interactions de la voie des Smads avec une grande variété d'autres cascades de signalisation. Qu'elles soient initiées ou non par le TGF- β , ces autres voies peuvent potentialiser, inhiber ou entrer en synergie avec la voie des Smads. Parmi ces voies, les MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) peuvent réguler l'activité des Smads. Il a été démontré que les Smads ne sont pas uniquement les premiers substrats des récepteurs kinases du TGF- β . En effet, elles peuvent également être phosphorylées par les MAPKs en réponse au TGF- β lui-même ou en réponse à d'autres cytokines. La phosphorylation des R-Smads par les MAPKs pourrait réguler à la fois l'activité transcriptionnelle des Smads et leur capacité à transloquer dans le noyau. Les Smads peuvent aussi interagir physiquement avec des facteurs de transcription eux-mêmes substrats des MAPKs (Pour une revue : (Javelaud and Mauviel, 2005)).

- Les voies des MAPKs:

La famille des MAPKs est divisée en trois sous-familles: les ERK1 et ERK2 (Extracellular Signal-regulated Kinases), les SAP kinases (Stress-Activated Protein kinases) connues comme JNK1, JNK2 et JNK3 (c-Jun N-terminal kinase) et les p38/MAPKs (α , β , γ et δ). ERK5, un autre membre de la famille des MAPKs, n'a pas été montré comme pouvant être activé par le TGF- β ou interférer avec la voie des Smads.

L'activation des voies MAPKs se fait de façon séquentielle. Tout d'abord, suite à une stimulation par des cytokines ou des facteurs de croissance, des récepteurs à activité tyrosine kinases ou des récepteurs couplés à des protéines G associés à la membrane activent des MAPK kinase kinase (MAPKKK). Les MAPKKK activent des MAPKK (MAPK kinase) menant à l'activation par phosphorylation de MAPKs qui pourront alors phosphoryler toute une série de facteurs de transcriptions.

Les ERKs sont phosphorylées par les MAPKKs MEKK1 et MEKK2 qui sont elles-mêmes les substrats de la MAPKKK Raf-1. Raf-1 peut être activée, par exemple, par la petite protéine G liée à la membrane suite à une stimulation par un stimulus mitogène comme l'EGF (Epidermal Growth Factor).

Les JNKs sont les substrats de MKK4 et MKK7 alors que p38^{MAPK} est phosphorylée par MKK3 et MKK6, eux-mêmes activés par plusieurs MAPKKKs incluant ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) et TAK1 (TGF- β -activated kinase-1).

Introduction

Les voies activées par les ERKs sont surtout impliquées dans la prolifération, la différenciation et sont généralement considérées comme anti-apoptotiques. Les voies JNK et p38^{MAPK} sont souvent activées par des stress induisant l'apoptose, mais dans certaines lignées cellulaires elles sont aussi impliquées dans la prolifération et la différenciation (**Figure I.18**) (Pour une revue: (Javelaud and Mauviel, 2005)).

- Activation des MAPKs par le TGF- β :

Il a été démontré dans de nombreux types cellulaires que le TGF- β peut activer les ERKs, p38^{MAPK} et les JNK MAPKs. L'activation d'une combinaison de MAPKs par le TGF- β dépend du type cellulaire étudié. De plus, cette activation peut être caractérisée par des cinétiques lentes résultant de réponses transcriptionnelles dépendantes des Smads ou par des cinétiques rapides similaires à celles observées en aval de récepteurs à cytokines. Dans ce dernier cas, l'activation rapide (5 à 15 minutes) des MAPKs par phosphorylation suggère à la fois que cela se produise indépendamment de transcriptions induites par les Smads mais également que cela soit une activation directe par les MAPKKKs (Pour une revue: (Javelaud and Mauviel, 2005)).

1.4.2. Le TGF- β 1 et la SIPS

Frippiat *et al.* ont montré que le TGF- β 1 joue un rôle important lors de la sénescence induite prématurément par une exposition à une concentration sub-létale d'H₂O₂ sur des fibroblastes de poumon IMR-90. En effet, les biomarqueurs de la sénescence apparaissent chez des fibroblastes stimulés avec du TGF- β 1. De plus, après exposition à l'H₂O₂, l'abondance de l'ARNm du TGF- β 1 est augmenté à 24 à 72 heures après le stress. L'abondance protéique du TGF- β 1 suit un profil similaire. Enfin, en utilisant des anticorps neutralisants dirigés contre le TGF- β 1 ou T β RII, ils ont démontré que ce dernier était essentiel pour l'apparition des biomarqueurs de la sénescence (Frippiat et al., 2001).

L'équipe a ensuite poursuivi ses recherches en étudiant la voie de transduction du signal permettant l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après un stress à l'H₂O₂ à concentration induisant la SIPS. Ils ont démontré que suite à un stress à l'H₂O₂, p38^{MAPK} est activée en deux temps. Tout d'abord, le stress active p38^{MAPK} en induisant sa phosphorylation. p38^{MAPK} activée va phosphoryler le facteur de transcription ATF-2. ATF-2 actif va provoquer l'arrêt du cycle cellulaire et la surexpression du TGF- β 1 au niveau ARNm et protéique. La sécrétion du TGF- β 1 va engendrer la deuxième phase d'activation de p38^{MAPK} qui semble indispensable pour l'apparition des biomarqueurs de la sénescence. Ce mécanisme nécessite une interaction entre ATF-2 et pRb hypophosphorylée (**Figure I.19**) (Frippiat et al., 2002).

Il a été démontré que des fibroblastes de derme en sénescence induite prématurément par des stress sous UVB expriment les biomarqueurs de la sénescence. L'expression du TGF- β 1 y est augmentée au niveau ARNm et protéique, et celle-ci est également responsable de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

Introduction

1.4.3. Les voies de transduction du signal induites par les UV

Les rayonnements ultraviolets sont responsables de l'activation de plusieurs voies de transduction du signal. Les UV sont capables d'activer plusieurs types de récepteurs membranaires de cytokines et de facteurs de croissance. Parmi ces récepteurs, il y a le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), le récepteur à l'IL-1 (Interleukine-1), le récepteur au PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et le récepteur au TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α). L'activation de ces récepteurs par les UV résulte en un regroupement (clustering) et une internalisation de ceux-ci. Les récepteurs activés vont alors recruter des petites protéines adaptatrices telles que Ras, Rac et cdc42 qui sont des régulateurs importants pour les voies des MAPKs ERKs, JNKs et p38^{MAPK}. Ras active la voie des MAPKs ERK *via* le recrutement de la kinase Raf-1. Rac-1 engendre la production de ROS dont surtout des anions superoxydes qui activent les différentes voies de MAPKs. Finalement, cdc42 et Rac-1 peuvent réguler MEKK1 qui va à son tour activer les voies des MAPKs ERKs, JNKs et p38. L'activation de la voie des JNKs et de la voie de p38 va mener à l'activation du facteur transcription AP-1 qui régule l'expression de MMP-2. Notons que l'expression d'AP-1 augmente lors du vieillissement de la peau *in vivo* et dans les fibroblastes de peau *in vitro* (**Figure 20**) (Rittie and Fisher, 2002).

Introduction

1.5. Objectifs du mémoire

Au cours de ce travail, nous avons étudié la sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques répétés aux UVB sur des fibroblastes humains de derme de la souche AG04431.

Afin de vérifier que la sénescence prématurée a bien été induite, nous analyserons les biomarqueurs de la sénescence tels que l'activité SA β -galactosidase et l'induction de gènes associés à la sénescence (fibronectine, p21^{waf-1}, ostéonectine, apo J).

Il est communément admis que la voie de transduction du signal du TGF- β 1 implique la voie des Smads et que celle-ci peut être régulée par les MAPKs JNKs, p38^{MAPK} et ERKs. Toutefois, ceci n'a pas encore été démontré dans la SIPS. Nous étudierons donc leur activation lors de la sénescence induite prématurément par des stress UVB.

Pour ce faire, nous étudierons tout d'abord l'abondance protéique et la phosphorylation de Smad2, Smad3 et Smad4 en utilisant les techniques du Western Blot et d'immunofluorescence. Pour mettre en évidence la translocation des Smads dans le noyau, nous effectuerons l'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques afin de voir les modifications d'abondance des Smads dans le cytoplasme et dans le noyau, en utilisant la technique du Western Blot.

Ensuite, nous étudierons l'activation des MAPKs JNKs, ERKs et p38^{MAPK}. Pour cela, nous utiliserons la technique du Western Blot afin de savoir si on peut observer une augmentation de la forme phosphorylée de ces protéines.

Enfin, nous nous intéresserons à l'activation de la forme latente du TGF- β 1. Nous évaluerons l'impact de MMP-2 sur l'activation du TGF- β 1 en inhibant son expression par l'utilisation de siRNA spécifiques. Nous évaluerons par immunofluorescence l'activation du TGF- β 1 et nous testerons l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après avoir soumis les cellules à des stress UVB induisant la sénescence prématurée.

2. Matériel et méthodes

2.1. Conditions de culture des fibroblastes

2.1.1. Principe

Les cellules sont cultivées en atmosphère humide à 37°C et en présence de 5% de CO₂ dans un incubateur Heraeus HeraCell 240 (Germany). La culture cellulaire s'effectue de manière stérile grâce à l'utilisation de hottes à flux stérile (Esco class II Biohazard Safety Cabinet Airstream, Singapore).

2.1.2. Matériel et solutions

Voir tableau 1

2.1.3. Méthode d'ensemencement

Les fibroblastes sont cultivés dans 15 ml de BME + 10% sérum par T75. Lorsque les cellules sont proches de la confluence, celles-ci sont repiquées dans de nouvelles boîtes de culture stériles.

Lors du repiquage, les cellules sont d'abord rincées deux fois avec 10 ml de PBS. Après avoir décanté le PBS, les cellules sont détachées à l'aide de 500 µl de trypsine pendant 5 à 10 min à 37 °C. Ensuite, après avoir ajouté 10 ml de BME + 10% sérum, la suspension cellulaire est homogénéisée à l'aide d'une pipette Pasteur. La suspension cellulaire est alors répartie dans deux boîtes stériles à raison de 5 ml de suspension par T75. Après avoir ajouté 10 ml de BME + 10% sérum, les boîtes de culture sont replacées dans l'incubateur.

2.1.4. Congélation et décongélation des fibroblastes

2.1.4.1. Congélation

Sous hotte, le milieu de culture est décanté. Après avoir rincé deux fois les cellules à l'aide de PBS, celles-ci sont incubées avec 500 µl de trypsine pendant 5 à 10 min à l'étuve. Une fois les cellules détachées, 8 ml de BME + 10% sérum sont ajoutés par T75. Après homogénéisation de la suspension cellulaire, celle-ci est transférée dans des tubes de 10 ml afin d'effectuer une centrifugation pendant 10 min à 1.000 RPM. Après la centrifugation, le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans un mix de congélation (1 ml) (voir tableau 1). Les cryotubes sont d'abord placés dans un système de congélation progressive à – 80°C une nuit et ensuite placés à – 196°C dans de l'azote liquide.

2.1.4.2. Décongélation

Le cryotube est plongé immédiatement dans un bain à 37°C pendant 1 à 2 min afin de décongeler rapidement les cellules. Après une centrifugation de 10 min à 1000 rpm, le culot est resuspendu dans du BME + 10% puis transféré dans une nouvelle boîte de culture. Le lendemain, afin d'éliminer toute trace de DMSO toxique pour les cellules, le milieu de culture est changé.

Matériel et méthodes

2.2. Stimulation avec du TGF- β 1

Des cellules ont été stimulées avec du TGF- β 1 afin de nous servir de contrôle interne à l'activation de la voie de transduction du signal des Smads.

2.2.1. Matériel et solutions

Voir tableau 2

2.2.2. Méthode

Les fibroblastes sont stimulés pendant 3 jours à raison d'une stimulation par jour avec du TGF- β 1 (5 ng/ml). Sous hotte, après avoir décanté le milieu, les T75 sont rincées une fois avec du PBS puis 15 ml de BME + 10% sérum contenant le TGF- β 1 (5 ng/ml) sont ajoutés. Les boîtes sont ensuite replacées dans l'incubateur. Les cellules sont lysées ou repiquées 24 heures après la dernière stimulation afin d'étudier les différents biomarqueurs. Pour les cellules contrôles, celles-ci subissent le même traitement à part qu'il n'y a pas de TGF- β 1 dans le milieu utilisé.

2.3. Stress sub-létaux avec des UVB

2.3.1. Principe

Les doses d'UVB utilisées ne doivent pas entraîner de mortalité cellulaire, c'est pourquoi on appelle ces stress sub-létaux. Le modèle de stress utilisé nous permet d'induire une sénescence prématurée des fibroblastes sans augmenter la mortalité de ces derniers. Les fibroblastes sont stressés lorsqu'ils sont jeunes soit environ à 60% de leur durée de vie proliférative (passage 28 à 30).

2.3.2. Matériel et solutions

Voir tableau 3

2.3.3. Méthode

Les stress des fibroblastes aux UVB (312 nm) se déroulent sur 5 jours à raison de deux stress par jour (**Figure II.1**). Sous hotte, après avoir décanté le milieu des boîtes de culture, les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS pour les T75 et 3 ml pour les T25. Ensuite, une fois le PBS décanté, 3 ml de PBS sont ajoutés par T75 et 1 ml par T25. Les boîtes à stresser sont placées dans un caisson contenant trois néons UVB. Les boîtes sont mises de part et d'autre d'une boîte témoin contenant un capteur relié à un radiomètre qui permet de mesurer la dose d'UVB que les cellules reçoivent. Pendant que les boîtes sont exposées à une dose de 250 mJ/cm², les boîtes contrôles restent sous hotte. Après le stress, toutes les boîtes sont décantées et 10 ml de BME + 1% sérum sont rajoutés par T75 (3 ml par T25).

Matériel et méthodes

2.4. Utilisation de siRNA

2.4.1. Principe

Un siRNA est un long ARN doubles brins (21 à 23 pb) qui, après association avec un complexe RISC (RNA-induced silencing complex), cible spécifiquement un ARNm et induit sa dégradation. L'utilisation de siRNA permet ainsi d'inhiber spécifiquement l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel.

2.4.2. Matériel et solutions

Voir tableau 3

2.4.3. Méthode

La transfection s'effectue la veille du premier stress sous UVB. Les siRNA sont dilués à une concentration finale de 20 nM dans de l'eau distillée filtrée. Le siRNA dilué est ajouté à un premier tube contenant du BME sans sérum alors que dans un second tube contenant du BME sans sérum, on ajoute l'agent transfectant (1 μ l Dharmafect/65 μ l BME). Après 5 min d'incubation à température ambiante, le premier tube est mélangé au second et incubé 20 min à température ambiante. Ensuite, on y additionne du BME + 1% sérum pour obtenir un volume final de 15 ml qui sera incubé pendant 18 à 24 heures avec les cellules dont le milieu a préalablement été décanté.

2.5. Détection de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence

2.5.1. Principe

Les cellules sénescents ont une activité β -galactosidase associée à la sénescence détectable grâce à une coloration histochimique utilisant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactopyranoside (x-gal). Une coloration bleue apparaît chez les cellules sénescents à pH 6 suite au clivage du x-gal par la β -galactosidase.

2.5.2. Matériel et solutions

Voir tableau 4

2.5.3. Méthode

A 48 heures après le dernier stress, les cellules sont repiquées à faible densité (700 cellules/cm²) dans des boîtes 6-puits. Le lendemain, les cellules sont rincées une fois au PBS puis elles sont incubées pendant 5 min dans la solution de fixation. Après deux rinçages au PBS, 2 ml de solution de coloration sont ajoutés aux cellules. Les cellules sont alors incubées durant 12 à 16 heures à 37°C et sans CO₂. Quand la coloration est nette, les puits sont rincés deux fois avec du PBS puis deux fois avec du méthanol pour les sécher. Une fois séchées pendant quelques min à température ambiante, les cellules peuvent être comptées afin de déterminer la proportion de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (devenues bleues) par rapport à l'ensemble de la population cellulaire.

Matériel et méthodes

2.6. Extraction des protéines totales et des protéines nucléaires

2.6.1. Principe

Grâce à l'utilisation d'un tampon de lyse, le contenu des cellules est libéré, ce qui nous permet de récupérer un lysat contenant les protéines.

2.6.2. Matériel et solutions

Voir tableau 5

2.6.3. Méthode pour l'extraction des protéines totales

Les boîtes sont déposées sur glace pour inhiber l'action des protéases. Les T75 sont rincées une fois avec 10 ml de PBS froid (stocké à 4°C) puis celui-ci est décanté. Ensuite, les cellules sont lysées avec 120 µl de tampon de lyse par T75. Après avoir raclé les cellules, le lysat est récupéré dans un tube microtube et les agrégats sont cassés en effectuant des allers-retours à l'aide d'une pipette Pasteur. Après une centrifugation de 10 min à 13.000 RPM, le surnageant est récupéré et congelé à -80 °C.

2.6.4. Méthode pour l'extraction des protéines nucléaires

Les boîtes sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS froid. Les cellules sont lysées avec 750 µl de tampon de lyse complet pour trois T75 à pooler. Le lysat est passé au Dounce A puis centrifugé 3 min à 3.000 RPM à 4°C. Ensuite, le surnageant, correspondant au cytoplasme, est récupéré et congelé à -20°C. Le culot est lavé avec 200 µl de tampon de lyse complet puis centrifugé 3 min à 3.000 RPM à 4°C. Après avoir décanté le surnageant, le culot est resuspendu dans 200 µl de tampon de lyse complet et à nouveau centrifugé 3 min à 3.000 RPM à 4°C. Une fois le surnageant décanté, le culot est lavé dans 40 µl de tampon de lyse complet, vortexé et enfin soniqué 7 min. Après une agitation de 30 min à 1.400 RPM à 4°C, le lysat est soniqué 10 min à 3.000 RPM puis centrifugé 3 min à 3.000 RPM. Le surnageant récupéré contient les protéines nucléaires et peut être congelé à -20 °C.

2.7. Dosage protéique par la méthode de Bradford

2.7.1. Principe

Cette technique d'analyse spectrophotométrique permet d'estimer la concentration protéique de lysats cellulaires ou nucléaires grâce aux propriétés de la Coomassie. En effet, une fois liée à un acide aminé hydrophobe, la Coomassie devient anionique et son spectre d'absorption maximum passe de 470 à 595 nm. Ce changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de Coomassie liée, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

2.7.2. Matériel et solutions

Voir tableau 6

Matériel et méthodes

2.7.3. Méthode

Tout d'abord, le réactif Bradford doit être dilué 5 fois dans de l'eau et filtré. Après avoir placé 1 ml de réactif Bradford dans le tube, 2 µl d'échantillons y sont ajoutés. La mesure de l'absorbance est réalisée 5 min après avoir ajouté l'échantillon car à ce moment-là, la réaction colorimétrique est optimale. La mesure se fait à 595 nm au spectrophotomètre.

L'étalon utilisé est de la BSA (albumine de sérum de boeuf ; 2,5 µl à 2 mg/ml). Toutes les mesures sont réalisées en duplicats. Ainsi, pour chaque condition, une moyenne des absorbances est calculée.

La concentration protéique (µg/µl) des échantillons est calculée de la façon suivante:

$$\frac{((\text{Moyenne Test} - \text{Moyenne blanc}) / (\text{Moyenne étalon} - \text{Moyenne blanc étalon})) \times (\text{Concentration étalon} \times \mu\text{l étalon})}{\text{Volume des échantillons}}$$

2.8. Western blot

2.8.1. Principe

Le Western blot permet de détecter une protéine d'intérêt d'un extrait cellulaire grâce à l'utilisation d'un anticorps qui lui est spécifique.

Tout d'abord, les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire. Pour cela, celles-ci sont chargées sur un gel de polyacrylamide (d'un pourcentage donné) en présence de SDS (sodium dodécyl sulfaté). Le SDS est un détergent anionique qui dénature les protéines et leur confère une charge négative. Les protéines, soumises à un courant électrique, migrent alors dans le gel vers l'anode et leur vitesse de migration sera inversement proportionnelle à leur taille. Afin d'évaluer la position de la protéine d'intérêt, un marqueur de poids moléculaires contenant des protéines de poids moléculaires connus migre en parallèle. Une fois la migration terminée, les protéines coincées dans le gel sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF). Cette membrane est ensuite bloquée au moyen d'une solution contenant du lait afin de minimiser la liaison aspécifique des anticorps à la membrane. L'étape suivante consiste à la mettre en présence de l'anticorps dirigé contre notre protéine d'intérêt. Le fragment Fc de cet anticorps dit primaire, sera lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une peroxydase qui permettra de révéler notre protéine d'intérêt. En effet, en ajoutant le substrat de la peroxydase (peroxyde d'hydrogène) ainsi qu'un amplificateur (luminol), des photons sont émis et impriment un film autoradiographique.

2.8.2. Matériel et solutions

Voir tableau 7

2.8.3. Méthode

2.8.3.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Le gel est constitué de deux parties :

- un stacking gel permettant de concentrer les échantillons au fond des puits
- un running gel dans lequel les protéines seront séparées en fonction de leur poids moléculaire.

Matériel et méthodes

Préparation du running gel :

Pour la préparation d'un gel 10% dans une cuve mini VE (Amersham), le mélange suivant est réalisé:

- 1,87 ml de Tris HCl à pH 8.8,
- 2,5 ml d'acrylamide 30%/Bisacrylamide,
- 2,75 ml d'eau distillée,
- 7,5 µl de Temed,
- 375 µl de persulfate d'ammonium 1% (APS).

La solution est coulée entre les deux plaques en verre du montage puis une couche d'isobutanol saturé en eau est directement coulée au-dessus du gel. La polymérisation s'effectue pendant minimum une heure.

Préparation du stacking gel :

Pour la préparation d'un stacking gel dans une cuve mini VE (Amersham), le mélange suivant est réalisé:

- 625 µl de Tris HCl à pH 6.8,
- 250 µl d'acrylamide 30%/Bisacrylamide,
- 1,375 ml d'eau distillée,
- 2,5 µl de Temed,
- 250 µl de persulfate d'ammonium 1% (APS).

La solution est coulée au-dessus du running gel en ayant préalablement retiré l'isobutanol et rincé le gel à l'eau distillée. Dès que le stacking gel est coulé, un peigne y est glissé et la polymérisation s'effectue pendant minimum une heure.

Remarque : pour les gels coulés dans les cuves SE 600 Ruby (Amersham), les volumes sont quadruplés.

Préparation, dépôt et migration des échantillons :

On prépare le mix suivant pour un volume final de 25 µl:

- 9 à 15 µg de protéines,
- Tris HCl pH 6,8
- bleu de charge dilué 5 fois.

On chauffe les échantillons 4 min à 100°C, puis ils sont centrifugés 5 min à 13.000 RPM et peuvent alors être chargés dans les puits du stacking gel. Un des puits est réservé pour le marqueur de poids moléculaire (10 µl) (Seebblue, Amersham). La cuve est remplie de tampon d'électrophorèse et la migration s'effectue pendant une heure à 200 volts.

Remarque : pour les cuves SE 600 Ruby, le protocole est identique mis à part que la migration s'effectue pendant 30 min à 25 mA par gel puis pendant 2h30 à raison de 40 mA par gel.

2.8.3.2. Transfert des protéines sur membrane PVDF

La membrane de polyvinylidène difluoride est baignée dans un bain de méthanol pendant une minute puis placée dans un bain de tampon de transfert pendant 5 à 15 min. Quatre morceaux de papier Whatmann sont découpés aux mêmes dimensions que la membrane puis trempés dans le bain de tampon de transfert. Le système sandwich suivant est alors préparé sur l'anode :

Matériel et méthodes

- 2 éponges
- 2 papiers Whatmann
- la membrane PVDF
- le ou les gels
- 2 papiers Whatmann
- 2 éponges.

Le transfert s'effectue pendant 2h à 3h à 150 mA ou toute la nuit à 30 mA.

2.8.3.3. Blocking et traitement de la membrane

Une fois le sandwich démoulé et les excès de membrane coupés, celle-ci est bloquée pendant deux heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C avec du TBS-Tween (1x) contenant 2% d'agent bloquant (Amersham). Ensuite, la membrane est incubée pendant une à deux heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué dans du TBS-Tween (1x) + 2% d'agent bloquant. Les dilutions des anticorps sont reprises au tableau 7. Après trois rinçages de 15 min avec du TBS-Tween (1x), l'anticorps secondaire dilué 200 000 fois dans du TBS-Tween contenant 2% d'agent bloquant peut être mis en présence de la membrane pendant une heure à RT. Enfin, trois rinçages de 15 min avec du TBS-Tween (1x) vont permettre d'éliminer les excès d'anticorps secondaires avant la révélation.

2.8.3.4. Révélation

La solution de révélation est constituée d'une solution A et d'une solution B (Lumigen™ TMA-6, GE Healthcare Amersham, UK) qui doivent être mélangées dans un rapport 1:1 juste avant la révélation. La solution de révélation est alors versée sur une plaque en verre et la membrane y est déposée (côté protéines) pendant 5 min. En chambre noire, un film autoradiographique est mis en contact avec la membrane. Le film est ensuite placé dans une solution de révélation jusqu'à l'apparition des bandes attendues puis rincé brièvement dans de l'eau distillée, fixé dans une solution de fixation pendant quelques min et enfin rincé à l'eau de ville.

2.9. Détection de protéines par immunofluorescence

2.9.1. Principe

La technique de l'immunofluorescence permet d'obtenir une localisation subcellulaire et d'estimer l'abondance d'une protéine d'intérêt. Sa détection s'effectue par l'utilisation d'un anticorps primaire qui lui est spécifique. Cet anticorps sera ensuite reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome pouvant être excité à une certaine longueur d'onde. Celui-ci réémet alors de la fluorescence à une longueur d'onde précise qui pourra être détectée au moyen d'un microscope confocale. Généralement, pour localiser les cellules, celles-ci sont marquées au moyen de TO-PRO3 qui est un agent intercalant permettant de visualiser le noyau des cellules.

2.9.2. Matériel et solutions

Voir tableau 8

Matériel et méthodes

2.9.3. Méthode

Les cellules sont repiquées à une densité de 15.000 cellules par puits sur des couvre-objets qui ont été préalablement passés à la flamme et déposés dans une plaque 24 puits.

Le lendemain, les cellules sont fixées 10 min dans une solution de PBS + paraformaldéhyde (PFA) 4%. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois au PBS. La perméabilisation des cellules s'effectue par une incubation de 5 min dans 1 ml de PBS-triton X-100 0,3%. Ensuite, les puits sont rincés trois fois pendant 10 min avec du PBS + BSA 3% (1 ml).

Les couvre-objets sont ensuite mis en contact avec les anticorps primaires dilués dans du PBS + BSA 3% et placés dans un système de « chambre humide » et incubés toute la nuit à 4°C. Le lendemain, trois rinçages de PBS/BSA 3% sont réalisés. Les couvre-objets contenant les cellules sont ensuite incubés une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés au fluorochrome et dilués dans du PBS + BSA 3%. Trois rinçages de PBS + BSA 3% sont ensuite effectués, ainsi qu'un rinçage au PBS. Afin de visualiser les cellules, les noyaux sont marqués 35 min grâce à un agent intercalant, le TO-PRO3 dilué dans une solution de PBS + RNase (2mg/ml). Après trois rinçages au PBS, les couvre-objets peuvent être « montés » sur des lames de microscope grâce à du Mowiol préalablement chauffé à 56°C

2.10. *Extraction d'ARN total*

2.10.1. Matériel et solutions

Voir tableau 9

2.10.2. Méthode

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de pétri de 25 cm² dans lesquelles elles sont lysées, au moyen de 300 µl de solution de dénaturation (RNagents) en ayant préalablement décanté le milieu de culture. Une fois la solution bien répartie sur toute la surface, les cellules sont raclées. Le lysat est récupéré et peut être congelé.

Toutes les étapes de l'extraction se réalisent dans des conditions dites « RNase Free » (traitement du matériel au SDS 0,1%, utilisation de tips autoclavés etc). A chaque lysat sont ajoutés 30 µl de Sodium Acétate 2M (pH 4.0). Les microtubes sont alors retournés 4 à 5 fois pour mélanger la solution. Ensuite, sous hotte, 300 µl de Phenol chlorophorme :isoamyl alcohol sont ajoutés dans chacun des microtubes qui sont alors retournés 4 à 5 fois puis mélangés vigoureusement. Après les avoir refroidis sur glace pendant 15 min, ceux-ci sont centrifugés pendant 20 min à 12 000 rpm et à 4°C. La phase supérieure est récupérée dans un microtube et son volume mesuré. Un volume égal d'isopropanol y est additionné et le tout incubé pendant 30 min à -20°C. Suite à une centrifugation de 10 min à 12 000 rpm et à 4°C, le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans 1 ml d'éthanol 75% glacé. Une fois le culot ainsi lavé, une nouvelle centrifugation est réalisée à 12 000 rpm pendant 10 min. Après avoir décanté l'éthanol, le culot d'ARN est séché à l'air libre puis resuspendu dans 12 µl d'eau distillée d'où 2 µl sont prélevés et resuspendus dans 98 µl d'eau distillée pour dosage au spectrophotomètre.

Matériel et méthodes

2.11. *Transcription inverse ou reverse transcription (RT)*

2.11.1.Principe

La transcription inverse permet de rétrotranscrire de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) à partir duquel il sera possible d'effectuer une analyse par PCR en temps réel. Des amorces polyT vont venir s'hybrider aux queues polyA des ARNm et permettre ainsi la synthèse d'un brin d'ADNc par ARNm grâce à la transcriptase inverse.

2.11.2.Matériel et solutions

Voir tableau 10

2.11.3.Méthode

A partir des concentrations en ARN obtenues lors du dosage au spectrophotomètre, un mix de RT est préparé contenant de 500 ng à 2 µg d'ARN total, 1 µl d'oligo dT et de l'eau distillée. Ce mix est chauffé 10 min à 70°C puis refroidi sur glace. Les tubes sont incubés à 42°C pendant 2 min avec le mélange : RNAsine, dNTP, DTT et tampon. On ajoute ensuite 1 µl de Superscript II par tube. Une incubation est réalisée à 42°C pendant une heure. Une fois la réaction stoppée grâce à un passage à 70°C pendant 15 min, 1 µl de RNase H peut être ajouté et les tubes sont incubés à 37°C pendant 20 min.

2.12. *Real time PCR*

2.12.1.Principe

La real time PCR ou PCR en temps réel est basée sur la technique classique de PCR (Polymerisation Chain Reaction). A chaque cycle, la quantité d'ADN amplifiée est mesurée grâce à l'utilisation d'un fluorochrome comme le SYBR green. Le SYBR green est un agent intercalant qui vient s'insérer dans le petit sillon de l'ADN double brin et émet ainsi un signal fluorescent à 520 nm. La fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'ADN. Donc, plus la quantité d'ADN de départ est importante, plus le signal fluorescent sera fort.

Le cycle seuil (ou cycle treshold) correspond au cycle de PCR où la fluorescence émise peut se distinguer du bruit de fond. A ce moment, la phase exponentielle d'amplification débute. Ce cycle seuil est inversement proportionnel à la quantité d'ADN de départ.

Le gène de référence utilisé est le gène de la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) qui est une enzyme de la glycolyse dont l'expression n'est pas modifiée lors de la sénescence induite prématurément par des stress UVB.

La vérification de la spécificité de la réaction s'effectue lors d'une étape de dissociation. Grâce à une augmentation progressive de la température jusque 95°C, les amplicons vont se dissocier et le signal fluorescent va fortement diminuer. Etant donné que chaque amplicon a une température de dissociation qui lui est propre dû à sa séquence, en cas de contamination, plusieurs chutes de fluorescence pourront être observées au cours de l'augmentation de température.

Matériel et méthodes

2.12.2. Matériel et solutions

Voir tableau 11

2.12.3. Méthode

On prépare le mix suivant par puits : 5 μ l d'ADNc dilué 100 fois, 2,5 μ l d'amorce sens, 2,5 μ l d'amorce anti-sens, 12,5 μ l de mix SYBERGreen et 2,5 μ l d'eau distillée. Ensuite la plaque est placée dans le 7900HT Fast Real-Time PCR system et les conditions et paramètres étudiés sont encodés. La PCR se déroule de la façon suivante : deux min à 50°C, 10 min à 95°C et 40 fois un cycle de 15 secondes à 95°C suivi d'une minute à 60°C. Pour l'étape de dissociation, la température augmente progressivement de 60°C à 95°C.

3. Résultats

3.1. Introduction

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié la sénescence induite prématurément par des stress sous UVB des fibroblastes humains foetaux de derme de la souche AG04431.

Afin d'induire une sénescence prématurée des fibroblastes AG04431 par des stress sous UVB, nous les avons exposés à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux stress par jour. A 72 heures après la dernière exposition aux UVB, nous avons analysé différents biomarqueurs de la sénescence afin de vérifier que la SIPS avait bien été induite. Ce modèle est étudié depuis plusieurs années dans notre laboratoire.

Il a été montré précédemment que le TGF-β1 était impliqué dans l'apparition de différents biomarqueurs de la sénescence dans ce modèle (Debacq-Chainiaux et al., 2005). Toutefois, la voie de transduction du signal en aval des récepteurs au TGF-β1 n'a pas encore été étudiée.

Il est communément admis que la voie de transduction du signal dépendante du TGF-β1 implique la voie des protéines Smads et que celle-ci peut avoir des interconnexions avec la voie des MAPKs (JNKs, p38^{MAPK} et ERKs). Lors de ce mémoire, nous avons étudié l'activation de ces protéines après des expositions aux UVB aux doses connues pour entraîner une sénescence prématurée.

Nous avons tout d'abord étudié l'expression protéique et la phosphorylation de Smad2, Smad3 et Smad4 par Western Blot et par immunofluorescence à différents temps au cours de la phase de récupération suivant les 10 expositions aux UVB.

Ensuite, nous avons étudié la phosphorylation des MAPKs JNKs, ERKs et p38^{MAPK} par Western blot au cours de cette phase après 10 expositions aux UVB.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'activation de la forme latente du TGF-β1. Nous avons évalué l'impact de la métalloprotéinase-2 sur l'activation du TGF-β1 lors de la sénescence induite prématurément par des stress sous UVB. Pour cela nous avons étudié les effets de l'inhibition de l'expression de MMP-2 par l'utilisation d'un siRNA dirigé contre MMP-2.

3.2. Résultats

3.2.1. Induction de la sénescence prématurée des fibroblastes de derme AG04431 par les UVB

Afin d'induire la sénescence prématurée des fibroblastes AG04431 par les UVB, ceux-ci ont été stressés à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux stress par jour. Après deux jours de récupération, nous avons analysé deux biomarqueurs de la sénescence afin de vérifier que la SIPS avait bien été induite.

Comme contrôle nous avons utilisé des fibroblastes au même nombre de passages en culture que les cellules exposées aux UVB. Ceux-ci ont été soumis aux mêmes conditions de culture mais n'ont pas été exposés aux UVB.

Résultats

3.2.1.1. Détection de l'activité S-A β -galactosidase

Afin de vérifier que la SIPS avait bien été induite, nous avons effectué un marquage histochimique permettant de détecter l'activité S-A β -galactosidase chez des fibroblastes exposés aux UVB (UVB) ou non (CTL) (**Figure III.1**).

Nous constatons que la proportion de cellules positives pour l'activité S-A β -galactosidase est 1,3 fois plus importante chez les cellules qui ont été stressées sous UVB que chez les cellules contrôles (**Figure III.2**).

3.2.1.2. Mise en évidence de modifications d'abondance de l'ARNm de gènes associés à la sénescence

Lorsque les cellules entrent en SIPS, la variation d'expression de toute une série de gènes peut être utilisé comme biomarqueur de la sénescence, dont l'*apolipoprotéine J*, l'*ostéonectine*, la *fibronectine*, le *CTGF*, la *MMP-2*, *p21^{waf-1}* et le *TGF- β 1* (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Dumont et al., 2000; Pascal et al., 2005). Nous avons comparé le niveau relatif en ARNm entre les cellules stressées et les cellules contrôles pour ces gènes. Nous utilisons l'abondance de l'ARNm de la GAPDH, dont l'expression ne varie pas lors de ces stress sous UVB, comme abondance de référence.

En règle générale, nous plaçons le seuil de changement d'expression à 0,8 pour considérer qu'on a une répression et à 1,2 pour une surexpression.

Nous constatons que, chez les cellules stressées sous UVB, le niveau relatif en ARNm des différents gènes associés à la sénescence augmente par rapport aux cellules contrôles (**Figure III.3**). L'importance des modifications d'abondances de ces ARNm correspond à ce qui avait été montré précédemment.

L'analyse de ces deux biomarqueurs de la sénescence, à savoir l'activité SA β -galactosidase et la modification d'expression de gènes associés à la sénescence, chez les fibroblastes stressés sous UVB montre que ceux-ci entrent bien en sénescence prématurée.

3.2.2. Induction de la sénescence prématurée des fibroblastes de derme AG04431 par stimulation avec du TGF- β 1

Nous avons stimulé des fibroblastes pendant 3 jours à raison d'une stimulation par jour avec 5 ng/ml de TGF- β 1. Ces stimulations seront aussi utilisées comme contrôle positif dans les expériences ultérieures sur le rôle du TGF- β 1 dans la SIPS.

Afin de vérifier qu'une sénescence prématurée avait bien été induite par les stimulations avec du TGF- β 1, nous avons analysé les mêmes biomarqueurs de la sénescence : l'activité S-A β -galactosidase ainsi que la modification d'expression des gènes associés à la sénescence.

Résultats

3.2.2.1. Détection de l'activité S-A β -galactosidase

Afin de vérifier qu'une sénescence prématurée avait bien été induite, nous avons effectué un marquage histochimique permettant de détecter l'activité S-A β -galactosidase chez des fibroblastes stimulés avec du TGF- β 1 (TGF) ou non (CTL/TGF) (**Figure III.4**).

Nous constatons que la proportion de cellules positives pour l'activité S-A β -galactosidase est 1,6 fois plus importante chez les cellules qui ont été stimulées avec du TGF- β 1 que chez les cellules contrôles (**Figure III.5**).

3.2.2.2. Mise en évidence de modifications d'expressions des gènes associés à la sénescence

Sur des fibroblastes stimulés avec du TGF- β 1, nous avons mesuré le niveau relatif en ARNm pour les gènes suivants : *apolipoprotéine J*, *ostéonectine*, *fibronectine*, *CTGF*, *MMP-2*, *p21^{waf-1}* et *TGF- β 1*. L'abondance de l'ARNm de la GAPDH a été utilisée comme abondance de référence.

Nous constatons que chez les cellules stimulées avec du TGF- β 1, le niveau relatif en ARNm de l'apolipoprotéine J, de l'ostéonectine, de la fibronectine, du CTGF et de MMP-2 augmentent de l'ordre de 4,1x, 1,6x, 1,6x, 2,3x et 1,3x respectivement. Toutefois, nous n'observons pas ou peu d'augmentation du niveau relatif en ARNm de *p21^{waf-1}*. Ceci est en accord avec ce qui avait déjà été démontré précédemment puisque le TGF- β 1 ne semble pas impliqué dans l'arrêt de la prolifération (**Figure III.6**) (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Fripiat et al., 2001). Contrairement à ce qui avait été montré sur des fibroblastes de poumon fœtal, une stimulation au TGF- β 1 n'entraîne pas une augmentation d'abondance de l'ARNm du TGF- β 1.

Ceci confirme à nouveau que la sénescence prématurée a bien été induite chez les fibroblastes stimulés avec du TGF- β 1.

3.2.3. Etude de l'abondance protéique et de la phosphorylation des Smads après expositions aux UVB des fibroblastes AG04431

L'implication du TGF- β 1 dans l'apparition de biomarqueurs de la sénescence a clairement été démontrée dans différents modèles de SIPS (Debacq-Chainiaux et al., 2005; Fripiat et al., 2001).

Il est communément admis que la voie de transduction du signal du TGF- β 1 implique la voie des Smads (Pour une revue : (ten Dijke and Hill, 2004)). Toutefois, ceci n'a pas encore été démontré dans la SIPS. Nous avons donc étudié l'abondance et la phosphorylation des Smads lors de la sénescence induite prématurément par des stress sous UVB.

Résultats

3.2.3.1. Profil d'abondance et de phosphorylation de Smad2 au cours de la récupération après expositions aux UVB

Tout d'abord, des fibroblastes AG04431 ont été exposés à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux expositions par jour. Après 2, 24, 48 et 72 heures de récupération, nous avons extrait les protéines totales et réalisé un Western blot (**Figure III.7**). L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge étant donné que son abondance n'est pas modifiée dans nos conditions.

Nous n'observons pas de modification de l'abondance de Smad2 au cours du temps. De plus, nous ne détectons pas de différence entre les cellules stressées et les cellules contrôles. On observe une légère diminution de l'abondance protéique de la forme phosphorylée de Smad2 à 72 heures après les expositions aux UVB. Aucune modification de l'abondance de la protéine phosphorylée n'est détectable entre les cellules stressées et les cellules contrôles. Par contre, en ce qui concerne les cellules stimulées au TGF- β 1, on observe une augmentation de la forme phosphorylée de Smad2 comparativement aux cellules contrôles.

3.2.3.2. Profil d'abondance de Smad4 au cours de la récupération après expositions aux UVB

Des fibroblastes AG04431 ont été exposés à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux expositions par jour. A 24, 48 et 72 heures après la dernière exposition aux UVB, nous avons extrait les protéines totales et réalisé un Western blot (**Figure III.8**).

Nous n'observons pas de modification de l'abondance de Smad4 à 24 heures et 72 heures. Par contre, une forte diminution a été mise en évidence à 48 heures. Aucune différence notable n'a pu également être remarquée chez les cellules stimulées au TGF- β 1 par rapport aux cellules contrôles.

3.2.3.3. Mises au point de l'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques chez des fibroblastes AG04431 stimulés ou non au TGF- β 1

Lorsque les Smads 2 et 3 sont activées, elles sont phosphorylées et puis elles se lient à Smad4 et sont dirigées vers le noyau où elles vont pouvoir s'associer avec des facteurs de transcription. Afin de mettre en évidence une éventuelle translocation nucléaire des Smads après les stress sous UVB, nous avons réalisé des extractions protéiques nucléaires et cytoplasmiques.

Pour mettre au point les conditions de Western blot, nous avons d'abord étudié des fibroblastes AG04431 stimulés (TGF) ou non (CTL) au TGF- β 1 (5 ng/ml) pendant 3 jours à raison d'une stimulation par jour. L'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques a été effectuée 72 heures après la dernière stimulation. Nous avons mis en évidence aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme une augmentation de la forme phosphorylée de Smad2 et de Smad3 chez les cellules stimulées avec du TGF- β 1 par rapport aux cellules contrôles (**Figure III.9a et b**).

Résultats

En ce qui concerne les formes totales, on observe une légère augmentation de l'abondance de Smad2, dans les noyaux et une très forte augmentation de l'abondance de Smad3 dans les noyaux.

En ce qui concerne Smad4, nous n'observons pas de différence d'abondance dans le cytoplasme mais dans le noyau, nous constatons que Smad4 est plus abondant chez les cellules stimulées avec du TGF- β 1 par rapport aux cellules contrôles (**Figure III.9c**).

Deux contrôles de charge ont été réalisés. L' α -tubuline a été utilisée comme protéine de contrôle de charge pour les échantillons cytoplasmiques et la TATA binding protéine (TBP) a été utilisée pour les échantillons nucléaires. Nous ne remarquons pas de marquage de l' α -tubuline dans les noyaux, ce qui montre que nous n'avons pas de contamination cytoplasmique dans les échantillons nucléaires. Par contre, nous détectons TBP dans les échantillons cytoplasmiques mais beaucoup plus faiblement que dans les échantillons nucléaires. Nous avons donc une légère contamination nucléaire dans nos échantillons cytoplasmiques. Ceci ne devrait donc pas nous gêner pour étudier la translocation des Smads dans le noyau. Mais nous devons rester prudents sur l'interprétation des résultats obtenus à partir des échantillons cytoplasmiques.

Au vu de ces résultats encourageants, nous avons donc décidé d'étudier l'abondance et la phosphorylation des Smads en effectuant l'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques.

3.2.3.4. Profil d'abondance et de phosphorylation de Smad2 après expositions aux UVB et extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques

Nous avons donc exposé les fibroblastes AG04431 à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux expositions par jour avant d'en extraire les protéines nucléaires et cytoplasmiques à 1, 2, 24, 48 et 72 heures après la dernière exposition aux UVB (**Figure III.10**).

D'une part, dans les extraits cytoplasmiques, on observe une légère diminution de l'abondance de Smad2 à 1 heure après le dernier stress chez les cellules exposées aux UVB. Une diminution de l'abondance de Smad2 est également détectée chez les cellules stimulées au TGF- β 1. En ce qui concerne la forme phosphorylée de Smad2, on observe une légère augmentation de l'abondance à une heure chez les cellules stressées ainsi qu'une augmentation plus marquée chez les cellules stimulées au TGF- β 1. Aucune phosphorylation n'est détectée entre 24 heures et 72 heures.

D'autre part, dans les extraits nucléaires, on n'observe pas de modification de l'abondance de Smad2 dans les différentes conditions testées. Par contre, on observe une augmentation de sa forme phosphorylée à une heure et deux heures après la dernière exposition aux UVB ainsi que chez les cellules stimulées au TGF- β 1. Nous pouvons donc en conclure que Smad2 est essentiellement sous forme phosphorylée chez les cellules stimulées au TGF- β 1 et présente aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau.

Quant aux cellules exposées aux UVB, la forme totale de Smad2 est détectée dans le cytoplasme à tous les temps et sa forme phosphorylée est détectée et plus abondante à 1 heure et à 2 heures dans les noyaux chez les cellules stressées.

Résultats

3.2.3.5. Profil d'abondance et de phosphorylation de Smad3 au cours de la récupération après expositions aux UVB lors de l'extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques

Nous avons exposés les fibroblastes AG04431 à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux expositions par jour pour ensuite en extraire les protéines nucléaires et cytoplasmiques à 1, 2, 24, 48 et 72 heures après la dernière exposition aux UVB (**Figure III.11**).

Tout d'abord, en ce qui concerne les échantillons cytoplasmiques, nous observons une diminution de l'abondance de la forme totale de Smad3 à 1 heure et à 48 heures chez les cellules stressées. Nous observons également une diminution quasi totale de l'abondance de Smad3 chez les cellules stimulées au TGF- β 1. Nous observons une augmentation de la forme phosphorylée de Smad3 (Smad3-P) à 48 heures après le stress chez les cellules soumises aux UVB ainsi que chez les cellules stimulées au TGF- β 1.

Dans les échantillons nucléaires, nous n'observons pas de modification de la forme totale de Smad3 dans les différentes conditions. Par contre, une augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée est détectée chez les échantillons stressés sous UVB à 1 heure, 2 heures, 24 heures et 48 heures après le dernier stress. Une forte augmentation de Smad3-P est également présente dans les extraits nucléaires des cellules stimulées au TGF- β 1. Nous pouvons donc en conclure que, en ce qui concerne les cellules stimulées au TGF- β 1, on détecte une augmentation de l'abondance de Smad3-P aussi bien dans le cytoplasme que dans les noyaux. En ce qui concerne les cellules exposées aux UVB, on observe des différences de l'abondance de Smad3-P principalement dans les noyaux et ce de 1 heure à 48 heures après la dernière exposition aux UVB.

3.2.3.6. Profil d'abondance de Smad4 après expositions aux UVB et extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques

Les mêmes conditions de stress ont été réalisées afin d'en extraire les protéines nucléaires et cytoplasmiques à 1, 2, 24, 48 et 72 heures après la dernière exposition aux UVB (**Figure III.12**).

En ce qui concerne les échantillons cytoplasmiques, aucune différence de l'abondance de la forme totale de Smad4 n'est révélée chez les cellules exposées aux UVB par rapport aux cellules contrôles. Une légère diminution est détectée chez les cellules stimulées au TGF- β 1. Par contre, dans les échantillons nucléaires, on observe une augmentation de l'abondance de Smad4 à 1, 2, 48 et 72 heures après la dernière exposition aux UVB.

En conclusion, une augmentation des formes phosphorylées de Smad2 et de Smad3 a été observée chez les cellules exposées aux UVB, principalement à court terme après la dernière exposition aux UVB (1 et 2 heures). Ceci est particulièrement marqué dans les noyaux, ce qui reflèterait la translocation de ces protéines. L'abondance de Smad4 est augmentée, quant à elle, également à court terme (1 et 2 heures) mais aussi à plus long terme (48 et 72 heures) après la dernière exposition aux UVB. L'activation des Smads pourrait ainsi être décrite en deux phases. Tout d'abord, une phase importante d'activation à court terme où Smad2-P, Smad3-P et Smad4 seraient activées et transloquées dans le noyau. Ensuite, une phase plus longue où les différences d'abondance de Smad4 sont présentes.

Résultats

3.2.3.7. *Analyse par immunofluorescence du profil d'abondance et de la localisation cellulaire des Smads après stimulation avec du TGF- β 1 ou expositions aux UVB*

Afin de confirmer les résultats obtenus par Western blot, nous avons réalisé des marquages immunocytochimiques des différentes Smads étudiées.

- Abondance et localisation cellulaire des Smads après stimulation avec du TGF- β 1:

Tout d'abord, nous avons analysé après marquage en immunofluorescence, l'abondance et la localisation cellulaire des Smads chez des fibroblastes stimulés avec du TGF- β 1 (TGF) ou non (CTL). Après 72 heures de stimulation, les Smads sont mises en évidence en vert par un marquage immunocytochimique grâce à des anticorps spécifiques, eux-mêmes reconnus par des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome émettant dans le vert. Les noyaux sont marqués au TO-PRO3 et apparaissent en bleu (**Figure III.13a, b et c**).

Smad2 est détecté au niveau du cytoplasme et au niveau du noyau. Nous observons une augmentation de son abondance dans le cytoplasme mais aussi dans le noyau des fibroblastes stimulés avec du TGF- β 1 par rapport aux fibroblastes contrôles. Smad2-P est détectée uniquement dans les noyaux, et son abondance augmente chez les fibroblastes stimulés avec du TGF- β 1 par rapport aux fibroblastes contrôles (**Figure III.13a**).

En ce qui concerne Smad3 et Smad3-P, nous les détectons aussi bien au niveau du cytoplasme qu'au niveau du noyau. Nous observons une augmentation de son abondance aussi bien de la forme totale que de sa forme phosphorylée chez les cellules stimulées au TGF- β 1 (**Figure III.13b**).

Enfin, pour Smad4, nous ne parvenons pas à la mettre en évidence dans les cellules contrôles. Cependant, chez les cellules stimulées avec du TGF- β 1, nous détectons Smad4 dans le cytoplasme et dans le noyau (**Figure III.13c**).

Ces résultats confirment que les stimulations avec du TGF- β 1 activent la voie des Smads par phosphorylation et que celles-ci sont transloquées dans le noyau.

- Abondance et localisation cellulaire des Smads après expositions aux UVB:

Nous avons analysé par marquage en immunofluorescence, l'abondance et la localisation cellulaire des Smads chez des fibroblastes exposés 10 fois aux UVB (UVB) ou non (CTL). A 72 heures après la dernière exposition aux UVB, les Smads sont mises en évidence en vert par un marquage immunocytochimique grâce à des anticorps spécifiques, eux-mêmes reconnus par des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome émettant dans le vert. Les noyaux sont marqués au TO-PRO3 et apparaissent en bleu (**Figure III.14a, b et c**).

Pour Smad2, le marquage est visible à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme mais nous ne détectons pas de différence évidente entre les cellules exposées aux UVB et les cellules contrôles. Par contre, Smad2-P se localise essentiellement dans le noyau et le marquage semble légèrement plus intense chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles (**Figure III.14a**).

Résultats

L'abondance de Smad3 et Smad3-P augmente chez les cellules exposées aux UVB par rapport aux cellules contrôles. Smad3 se localise à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau alors que Smad3-P est plutôt localisé dans le noyau (**Figure III.14b**).

En ce qui concerne Smad4, nous détectons une augmentation de l'abondance de Smad4 dans le noyau chez les cellules exposées aux UVB par rapport aux cellules contrôles (**Figure III.14c**).

En conclusion, en ce qui concerne les marquages par immunofluorescence réalisés chez les cellules exposées aux UVB, nous constatons une augmentation de l'abondance de Smad3, Smad3-P et Smad4. Ces résultats confirment donc en partie l'activation de la voie des Smads lors de la sénescence induite prématurément par des stress. Rappelons toutefois que ces marquages en immunofluorescence ont été réalisés à 72 heures après la dernière exposition aux UVB. Il serait donc intéressant de réaliser des marquages en immunofluorescence à plus court terme après le stress puisque par Western blot, on détecte une activation des Smads 2 et 3 principalement à court terme.

3.2.4. Etude de l'expression protéique et de la phosphorylation des MAPKs p38^{MAPK}, JNKs et ERKs chez des fibroblastes AG04431 après expositions aux UVB

L'activation des voies des MAPKs peut avoir un effet régulateur positif ou négatif sur les Smads en fonction de la nature de l'activation des MAPKs (pour une revue : (Javelaud and Mauviel, 2005)). Nous avons donc étudié l'expression et l'activation des MAPKs JNKs, p38^{MAPK} et ERKs lors de la sénescence induite prématurément par des stress sous UVB.

3.2.4.1. Profil d'abondance et de phosphorylation de p38^{MAPK} au cours de la récupération après expositions aux UVB

Des fibroblastes AG04431 ont été exposés à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux stress par jour. Après 1, 2, 24, 48 et 72 heures après la dernière exposition aux UVB, nous avons extrait les protéines totales et réalisé un Western blot (**Figure III.15**). Un contrôle de charge (α -tubuline) a également été réalisé. La forme phosphorylée de p38^{MAPK} est peu détectée mais on observe toutefois une augmentation de son abondance à 48 et 72 heures après la dernière exposition aux UVB par rapport aux cellules contrôles. On ne détecte pas de phosphorylation de p38^{MAPK} chez les cellules stimulées au TGF- β 1.

3.2.4.2. Profil d'abondance et de phosphorylation des JNKs après expositions aux UVB

Des fibroblastes AG04431 ont été exposés à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux expositions par jour. Après 1, 2, 24, 48 et 72 heures après la dernière exposition sous UVB, nous avons extrait les protéines totales et réalisé un Western blot (**Figure III.16**). L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. Nous observons une augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée de JNK à 1, 2 et 48 heures après la dernière exposition sous UVB. Nous ne détectons pas de phosphorylation chez les cellules stimulées au TGF- β 1.

Résultats

3.2.4.3. Profil d'abondance et de phosphorylation des ERKs après expositions aux UVB

Des fibroblastes AG04431 ont été exposées à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux expositions par jour. Après 1, 2, 24, 48 et 72 heures après la dernière exposition aux UVB, nous avons extrait les protéines totales et réalisé un Western blot (**Figure III.17**). L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge.

Nous observons une abondance similaire des ERKs phosphorylées de 1 heure à 24 heures après le dernier stress chez les cellules stressées et les cellules contrôles. Par contre, à 48 et 72 heures, on peut noter une forte diminution de la phosphorylation des ERKs chez les cellules contrôles et en contrepartie, une augmentation de leur abondance chez les cellules stressées. Notons que la présence d'ERK-P chez les cellules contrôles est le reflet d'une activation de ces MAPKs à court terme après le stress et dans les deux conditions étudiées (CTL et stress). On ne détecte pas de phosphorylation des ERKs chez les cellules contrôles et stimulées au TGF- β 1.

En conclusion de cette partie, il semble que la voie des p38^{MAPK} et la voie des ERKs soient activées plutôt à long terme après le dernier stress chez les cellules soumises aux UVB. Par contre, en ce qui concerne les JNKs, on remarque une activation à court terme (une heure et deux heures) mais également à plus long terme (48 heures) chez les cellules stressées. Ces activations à long terme sont très intéressantes puisqu'on sait qu'elles interviennent au moment où apparaissent les différents biomarqueurs de la sénescence.

3.2.5. Etude de l'implication de MMP-2 dans l'activation de la forme latente du TGF- β 1 après expositions aux UVB

Il a été observé par immunofluorescence que le TGF- β 1 était présent sous sa forme active lors de la sénescence induite prématurément par des stress sous UVB (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

Il a été démontré *in vitro* que les métalloprotéinases matricielles MMP-2 et MMP-9 peuvent activer par protéolyse la forme latente du TGF- β (Yu and Stamenkovic, 1999). Etant donné que le niveau relatif d'ARNm de MMP-2 est augmenté après ces stress, nous avons étudié l'impact d'MMP-2 sur l'activation du TGF- β 1 dans la SIPS.

3.2.5.1. Abondance de MMP-2 après expositions aux UVB

Tout d'abord, nous avons mesuré le niveau relatif en ARNm pour MMP-2 chez des fibroblastes ayant subi la SIPS (UVB) et chez des fibroblastes contrôles non exposés aux UVB (CTL) (**Figure III.18**). Ces résultats montrent que le niveau relatif en ARNm pour MMP-2 est deux fois plus important chez les cellules stressées que chez les cellules contrôles.

Ensuite, par marquage en immunofluorescence, nous observons une augmentation de l'abondance de la protéine MMP-2 chez les cellules stressées sous UVB par rapport aux cellules contrôles (**Figure III.19**).

Résultats

Au vu de ces résultats, nous pouvons proposer que l'abondance de l'ARNm et de la protéine MMP-2 sont augmentées chez les fibroblastes en SIPS. Cette augmentation pourrait expliquer l'activation de la forme latente du TGF- β 1.

3.2.5.2. Mise au point d'un modèle d'inhibition de MMP-2 par l'utilisation de siRNA

Afin d'étudier l'activation de la forme latente du TGF- β 1 par MMP-2, nous avons utilisé un siRNA dirigé contre MMP-2 dans le but de déterminer si l'invalidation de MMP-2 a un effet sur l'apparition de la sénescence prématurée après expositions répétées aux UVB.

Les fibroblastes AG04431 ont été transfectés avec différentes concentrations de siRNA dirigé contre MMP-2 : 20, 50 ou 100 nM (SMARTpool, Dharmacon). L'agent transfectant utilisé est le Dharmafect. Le niveau relatif en ARNm de MMP-2 a été mesuré à 24, 48, 120 ou 168 heures après la transfection (**Figure III.20**). Les résultats montrent que l'inhibition de MMP-2 est presque totale et ce, dès le premier jour après la transfection et quelque soit la concentration en siRNA utilisée. L'inhibition de l'expression est maintenue jusqu'à 168 heures post-transfection. Par la suite, les transfections avec le siRNA MMP-2 seront effectuées à une concentration de 50 nM.

Afin de déterminer l'impact de l'expression de MMP-2 sur l'activation du TGF- β 1, nous avons soumis des fibroblastes transfectés avec le siRNA à une série de 10 stress sub-létaux aux UVB induisant la sénescence prématurée.

Afin de vérifier que le siRNA dirigé contre MMP-2 a bien invalidé l'expression de MMP-2, nous avons mesuré le niveau relatif de l'ARNm de MMP-2 chez des fibroblastes à 72 heures après la dernière exposition aux UVB (UVB) et chez des fibroblastes contrôles non stressés (CTL). De plus, des cellules ont été transfectées avec un siRNA dit « contrôle » (Eurogentec) (siRNA CTL-) qui ne s'appartient avec aucun ARNm. Enfin, afin de contrôler que le protocole de transfection n'a pas d'impact en lui-même sur les biomarqueurs, des cellules ont également été incubées avec l'agent transfectant Dharmafect (DMF). Nous observons une disparition quasi-totale de l'ARNm de MMP-2 chez les cellules transfectées avec du siRNA MMP-2 (**Figure III.21**).

Ces résultats confirment que l'utilisation du siRNA dirigé contre MMP-2 permet une inhibition presque totale de l'expression de MMP-2.

3.2.5.3. Etude des effets du siRNA dirigé contre MMP-2 dans l'activation de la forme latente du TGF- β 1

Détection de l'activité S-A β -galactosidase associée à la sénescence :

Afin de voir si l'utilisation d'un siRNA dirigé contre MMP-2 a un effet ou non sur la SIPS, nous avons mesuré la proportions de cellules positives pour l'activité S-A β -galactosidase (%) chez des fibroblastes ayant subi 10 stress sub-létaux sous UVB (UVB) ou chez des fibroblastes non exposés aux UVB (CTL). Dans la condition DMF, les cellules ont été incubées avec l'agent transfectant Dharmafect (DMF). Dans la condition siRNA CTL-, les

Résultats

cellules ont été transfectées avec le siRNA CTL- (50 nM). Dans la condition siRNA MMP-2, les cellules ont été transfectées avec le siRNA MMP-2 (50 nM) (**Figure III.22**). Nous constatons que dans chacune des conditions, la proportion de cellules positives pour l'activité S-A β -galactosidase augmente chez les cellules stressées par rapport aux cellules contrôles. L'inhibition de l'expression de MMP-2 ne semble donc pas avoir d'impact sur ce biomarqueur. Il semble cependant que la transfection des cellules a un effet sur le niveau basal de la proportion de cellules présentant une activité S-A β -galactosidase.

- Mise en évidence de modifications d'expression des gènes associés à la sénescence :

Nous avons mesuré le niveau relatif en ARNm des gènes associés à la sénescence chez des fibroblastes à 72 heures après une série de 10 stress sous UVB à la dose sub-létale de 250 mJ/cm² (UVB). Les cellules « contrôles » (CTL) n'ont pas été exposées aux UVB mais ont subi les mêmes conditions de culture. Dans la condition DMF, les cellules ont été incubées avec l'agent transfectant (Dharmafect). Dans la condition siRNA CTL-, les cellules ont été transfectées avec un siRNA CTL- (50 nm). Dans la condition siRNA MMP-2, les cellules ont été transfectées avec le siRNA MMP-2 (50 nM).

Nous observons une surexpression de l'apoJ, de l'ostéonectine, de la fibronectine et du CTGF chez les cellules n'ayant pas été transfectées avec le siRNA MMP-2 (DMF et siRNA CTL-) ayant été stressées (**Figure III.23a, b, c et d**). Ceci confirme les résultats obtenus précédemment (**Figure III.3**). Aucune modification de la surexpression de l'apoJ et de l'ostéonectine n'est détectable chez les cellules transfectées avec le siRNA MMP-2. L'inhibition de l'expression de MMP-2 ne semble donc pas avoir d'impact sur la surexpression de ces deux gènes. Par contre, nous n'observons plus de surexpression de la fibronectine et du CTGF chez les cellules transfectées avec le siRNA MMP-2, ce qui semble démontrer que l'expression de MMP-2 serait impliquée dans leur surexpression.

- Analyse par marquage en immunofluorescence de l'abondance de MMP-2 chez des fibroblastes stimulés ou non au TGF- β 1

Lorsque les cellules sont soumises à des stress sub-létaux d'UVB induisant la sénescence prématurée, la forme latente ainsi que la forme active du TGF- β 1 sont augmentées. Ceci peut être mis en évidence par marquage immunocytochimique en utilisant des anticorps spécifiques de la forme latente (LAP) et de la forme active (TGF- β 1).

Nous avons réalisé un marquage immunocytochimique de ces deux formes après 10 stress sous UVB chez les cellules transfectées avec le siRNA CTL- (**Figure III.24a**) ou le siRNA MMP-2 (**Figure III.24b**). La forme latente (LAP) est détectée en vert et la forme active (TGF- β 1 actif) en rouge. Nous pouvons constater chez les cellules transfectées avec le siRNA CTL- une augmentation de la forme latente et de la forme active après les stress. Par contre, chez les cellules transfectées avec le siRNA MMP-2, on ne détecte pas ou peu d'augmentation de la forme active après les stress alors qu'on observe toujours une augmentation de la forme latente. Notons toutefois que le niveau basal d'abondance du TGF- β 1 actif paraît plus élevé en condition contrôle chez les cellules transfectées avec le siRNA MMP-2 que chez les cellules transfectées avec le siRNA CTL-.

4. Discussion et perspectives

4.1. Induction de la sénescence prématurée des fibroblastes de derme AG04431 par les UVB

Lorsque des cellules sont soumises à des stress sub-létaux *in vitro*, celles-ci peuvent entrer prématurément en sénescence et exprimer de façon précoce des biomarqueurs de la sénescence.

Lors de ce mémoire, nous avons utilisé le modèle de sénescence prématurée induite par les UVB sur des fibroblastes de derme humain (Debacq-Chainiaux et al., 2005).

Dans un premier temps, nous avons vérifié que les fibroblastes AG04431 stressés à une dose sub-létale de 250 mJ/cm² pendant 5 jours à raison de deux stress par jour entrent bien en sénescence prématurée.

Nous avons également induit la sénescence prématurée de ces fibroblastes en les stimulant à une concentration de 5 ng/ml de TGF- β 1 durant 72 heures. En effet, il a été montré précédemment dans l'équipe que le TGF- β 1 était impliqué dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence induits par des stress sub-létaux sous UVB et sous H₂O₂ (Debacq-Chainiaux et al., 2005, Fripiat et al., 2001).

4.2. Etude de l'expression protéique et de l'activation des Smads au cours de la récupération des fibroblastes AG04431 après expositions aux UVB

Etant donné l'importance du TGF- β 1 dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence lors de la SIPS, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude de la voie de transduction du signal principale déclenchée par le TGF- β 1 : la voie des Smads. Nous nous sommes donc intéressés à l'abondance, à la phosphorylation et à la localisation des Smads chez des fibroblastes AG04431 lors de leur récupération après 10 stress sous UVB.

Lorsque le TGF- β 1 se lie à son récepteur T β R-II, T β R-I est activé et propage le signal dans la cellule par phosphorylations de deux sérines dans un motif SSXS du domaine MH2 de Smad2 et Smad3. Une fois les R-smads activées, elles forment un complexe hétérodimérique avec Smad4. Le complexe peut être transloqué dans le noyau (Pour une revue : (ten Dijke and Hill, 2004)).

En premier lieu, nous avons effectué l'extraction des protéines totales des fibroblastes après 1, 2, 24, 48 et 72 heures de récupération. Dans ces conditions, nous ne sommes pas parvenus à montrer l'activation des Smads. Nous avons alors décidé de changer notre protocole d'extraction en effectuant l'extraction séparée des protéines nucléaires et cytoplasmiques.

L'analyse de ces résultats révèle que les Smads 2 et 3 semblent être activées à court terme (1 heure et 2 heures après la dernière exposition aux UVB). Ceci se révèle par la présence des formes phosphorylées de Smad2 et Smad3 dans les échantillons nucléaires.

Une augmentation de l'abondance de Smad4 est également détectable dans les échantillons nucléaires des cellules exposées aux UVB à court terme (1 et 2 heures) mais aussi à long terme après les stress (48 et 72 heures). Ceci a été confirmé par des analyses utilisant un marquage en immunofluorescence sur les Smads où nous avons détecté une légère

Discussion et perspectives

augmentation de l'abondance de Smad2, Smad3 (sous leur forme phosphorylée et totale) et Smad4 chez les cellules exposées aux UVB.

Toutefois, il faut noter que les analyses par marquage en immunofluorescence ont été réalisées à 72 heures après le dernier stress, ce qui expliquerait que nous n'ayons pas pu montrer de plus fortes phosphorylation de Smad2 et Smad3 puisqu'elles semblent, d'après les résultats obtenus par western-blot, s'effectuer à court terme. Pour Smad4, nous détectons par western blot sa présence dans le noyau et son augmentation d'abondance à court terme mais également à long terme. Des analyses par marquage en immunofluorescence ont confirmé la présence de Smad4 dans le noyau et une augmentation de son abondance à 72 heures après la dernière exposition aux UVB.

Notons que lors de notre étude de l'activation des Smads suite aux UVB, nous avons réalisé en parallèle les mêmes analyses sur les fibroblastes de derme stimulés au TGF- β 1. Les résultats obtenus nous ont servi de contrôle de l'activation de la voie des Smads. Par western blot, nous avons pu mettre en évidence une activation et une translocation nucléaire de Smad2, Smad3 et Smad4. Ces résultats ont été confirmés par marquage en immunofluorescence.

La phosphorylation principalement à court terme après le stress, est très intéressante. En effet, à ce moment-là, les trois types de Smads sont activées et sont présentes dans le noyau. Cette réponse disparaît à 24 h, puis on distingue une deuxième « vague » de phosphorylation marquée par une augmentation de l'abondance nucléaire de Smad4 chez les cellules exposées aux UVB. Une réponse biphasique a déjà été mise en évidence dans la sénescence induite par l'H₂O₂ chez des fibroblastes de poumon IMR-90 (Fripiat et al., 2001). En effet, on y distingue une activation à court terme suivie d'une activation à long terme de p38^{MAPK}.

De plus, les Smads 2, 3 et 4 ne sont pas statiques dans la cellule mais effectuent la navette entre le cytoplasme et le noyau. Chez les cellules au repos, Smad2 et Smad3 sont essentiellement cytoplasmiques alors que Smad4 est distribuée entre le noyau et le cytoplasme. Il a été démontré que, lors de la stimulation avec du TGF- β 1, les complexes Smads sont formés et s'accumulent dans le noyau où ils restent apparemment quelques heures. La phosphatase PPM1A/PP2Calpha, en déphosphorylant Smad2/3, joue un rôle critique dans la fin de la réponse au TGF- β 1. En effet, cette déphosphorylation permet à Smad2/3 de se dissocier de Smad4 et favorise ainsi l'export de Smad2/3 dans le cytoplasme (Lin et al., 2006). Il serait pertinent d'analyser l'abondance protéique de cette phosphatase dans nos conditions de stress.

Il serait aussi intéressant d'étudier si des facteurs de transcription dépendants de l'activation des Smads sont transactivés à court terme après les stress. Les protéines R-Smads peuvent interagir avec de nombreux facteurs de transcription. Notamment, les facteurs de transcription de la famille d'AP-1, qui se trouvent en aval de la cascade des MAPKs, peuvent interagir avec les complexes R-Smads/Smad4 dans le noyau. C-jun et JunB, tous deux substrats des JNKs, sont des composants du complexe AP-1. Ils sont régulés au niveau de la transcription par la voie des Smads dont l'activité est ainsi régulée par une boucle de rétroaction. La coopération transcriptionnelle dépend de la structure du promoteur cible. En effet, Smad et AP-1 coopèrent pour activer les promoteurs dépendants d'AP-1 alors qu'ils s'opposent pour la transcription Smads-spécifique de gènes possédant un site de liaison aux Smads.

c-Jun et JunB peuvent empêcher Smad3 de reconnaître sa séquence d'ADN cible et les JNKs actives ont le même effet. La voie des JNKs régule également la transcription dépendante de Smad2/3 en facilitant l'association de c-Jun avec des activateurs ou des répresseurs. De plus, la voie des JNKs pourrait contribuer à réguler l'expression autocrine du TGF- β 1 puisque les

Discussion et perspectives

fibroblastes déficients en JNKs expriment le TGF- β 1 de façon constitutive, expression qui peut-être réprimée par complémentation des cellules avec les JNKs. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation du niveau relatif en ARNm du TGF- β 1 lors des stimulations au TGF- β 1.

ATF-2, un substrat qui est en aval à la fois des JNKs et de p38, participe à certains complexes AP-1. Son expression est induite par le TGF- β et régulée au niveau de la transcription à la fois par des mécanismes dépendants des Smads et de TAK1. De plus, ATF-2 peut s'associer avec des complexes transcriptionnels en s'association avec les Smads (Pour une revue : (Javelaud and Mauviel, 2005)). De plus, chez des fibroblastes soumis à un stress sous H₂O₂ à une concentration sub-létale, il a été démontré qu'ATF-2 est phosphorylé et qu'il interagit avec pRb (Fripiat et al., 2002). Bien que ceux-ci ne soient que quelques exemples de la complexité du contrôle transcriptionnel par AP-1 et les complexes Smads, cela suggère que l'intégration des signaux provenant de ces deux voies conduit soit à l'amplification soit à l'inhibition par une boucle de rétroaction négative des effets du TGF- β (**Figure IV.1**).

4.3. Etude de l'expression protéique et de l'activation des MAPKs p38^{MAPK}, JNKs et ERKs chez des fibroblastes AG04431 après expositions aux UVB

Dans la seconde partie de ce mémoire, nous avons étudié l'activation des MAPKs JNKs, p38^{MAPK} et ERKs lors de la sénescence induite prématurément par des stress sous UVB chez des fibroblastes AG04431 car il a été démontré que les Smads ne sont pas uniquement les premiers substrats des récepteurs kinases du TGF- β . En effet, elles peuvent également être phosphorylées par les MAPKs en réponse au TGF- β lui-même ou en réponse à d'autres cytokines. La phosphorylation des R-Smads par les MAPKs pourrait réguler à la fois l'activité transcriptionnelle des Smads et leur capacité à transloquer dans le noyau. Les Smads peuvent aussi interagir physiquement avec des facteurs de transcription eux-mêmes substrats des MAPKs (Pour une revue : (Javelaud and Mauviel, 2005)).

Dans notre modèle de SIPS, la phosphorylation de p38^{MAPK} et des ERKs ne semble s'effectuer qu'à long terme étant donné que nous sommes parvenus à montrer leur phosphorylation qu'après 48 ou 72 heures de récupération.

Par contre, en ce qui concerne les JNKs, on remarque une phosphorylation à court terme (une heure et deux heures) mais également à plus long terme (48 heures) chez les cellules stressées. Ces phosphorylations à long terme sont très intéressantes puisqu'on sait qu'elles interviennent au moment où on détecte les différents biomarqueurs de la sénescence.

Il a été démontré dans de nombreux types cellulaires que le TGF- β 1 peut activer les ERKs, p38^{MAPK} et les JNK MAPKs. L'activation d'une combinaison de MAPKs par le TGF- β dépend du type cellulaire étudié. De plus, cette activation peut être caractérisée par des cinétiques lentes résultant de réponses transcriptionnelles dépendantes des Smads ou par des cinétiques rapides similaires à celles observées en aval de récepteurs à cytokines. Dans ce dernier cas, l'activation rapide (5 à 15 minutes) des MAPKs par phosphorylation suggère à la fois que cela se produise indépendamment de transcriptions induites par les Smads mais également que

Discussion et perspectives

cela soit une activation directe par les MAPKKs (Pour une revue: (Javelaud and Mauviel, 2005)).

Afin de déterminer si les MAPKs jouent un rôle dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence, on pourrait étudier l'impact de leur inactivation par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou de siRNA spécifiques. Notons que des études préliminaires sur le modèle de sénescence induite par des stress UVB a montré que l'utilisation de SB203580, un inhibiteur chimique spécifique de p38^{MAPK} limitait l'augmentation de la proportion de cellules montrant une activité S-A β -galactosidase.

- Régulation de l'activité des Smads par les MAPKs:

L'activation de Ras est capable d'inhiber la voie du TGF- β via la voie des ERKs. En effet, les ERKs peuvent phosphoryler Smad2 et Smad3 dans leur région linker bloquant ainsi leur translocation dans le noyau (Derynck and Zhang, 2003). Toutefois, il a également été démontré que lors de la différenciation des cellules en cellules tumorales, la voie Ras/MAPK et la voie du TGF- β semblent coopérer, ce qui semble incompatible avec l'hypothèse que Ras bloque la voie du TGF- β . Le problème de savoir si la phosphorylation des MAPKs favorise ou non la translocation nucléaire des Smads est très complexe. Toutefois, il a été démontré récemment, à la fois *in vivo* (embryons de *Xenopus*) et *in vitro* (cellules mammaliennes), que les phosphatases SCP1-3 (Small polymerase II C-terminal Phosphatases) déphosphorylent continuellement mais lentement la région « linker » de Smad2/3. Ceci se produit si la phosphorylation de la région « linker » a été induite par le TGF- β lui-même dans le contexte d'une boucle de rétroaction négative déclenchée par le TGF- β . Il semble que le rôle des SCPs soit limité à cette désinhibition de la voie du TGF- β par le retrait de la phosphorylation inhibitrice dans la région linker (Sapkota et al., 2006).

Les JNKs sont capables de phosphoryler Smad2 et Smad3 en réponse au TGF- β mais sans que cela empêche la translocation nucléaire ou l'activation des gènes cibles.

La voie de p38^{MAPK} peut coopérer avec la voie du TGF- β pour arrêter le cycle cellulaire. Ceci se réalise grâce à la phosphorylation des R-Smads dans leur région « linker » résultant en une augmentation de la transactivation des R-Smads menant finalement à l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, la voie de p38^{MAPK} est impliquée dans les modifications post-traductionnelles des Smads. Plus particulièrement, il a été démontré que p38^{MAPK} régule la sumoylation de Smad4 ce qui contribue à augmenter la transcription Smad4 dépendante (pour une revue : (Javelaud and Mauviel, 2005)).

Les MAPKs peuvent affecter indirectement la voie de signalisation des Smads en contrôlant l'expression de Smad7. Des premières observations ont indiqué que l'expression de Smad7 induite par le TGF- β dépend d'interactions coopératives entre AP-1, Sp1 et les protéines Smads (Brodin et al., 2000). Plus récemment, il a été montré qu'à la fois la voie des JNKs et la voie TAK1/p38 régulent l'expression de Smad7 mais que ceci dépend du type cellulaire. Tout ceci indique que l'activation des voies des MAPKs peut avoir un effet régulateur positif ou négatif sur les R-Smads en fonction de la nature de l'activation des MAPKs (pour une revue : (Javelaud and Mauviel, 2005)).

Discussion et perspectives

Afin de déterminer si les MAPKs interviennent dans l'activation des Smads, il serait également intéressant d'étudier l'effet d'inhibiteurs chimiques ou de siRNA spécifiques de ces MAPKs sur l'abondance et la localisation des différentes Smads après les expositions aux UVB. D'autre part, on pourrait également analyser si l'inhibition du TGF- β 1 ou de son récepteur de type II par l'utilisation d'anticorps neutralisants spécifiques a un impact sur l'abondance et la localisation des Smads après les expositions aux UVB.

4.4. Etude de l'implication de MMP-2 dans l'activation de la forme latente du TGF- β 1 après expositions aux UVB

Dans la dernière partie de ce mémoire, nous avons étudié l'implication de MMP-2 dans l'activation de la forme latente du TGF- β 1 après expositions aux UVB. Il a été démontré *in vitro* que les métalloprotéinases matricielles MMP-2 et MMP-9 peuvent activer par protéolyse la forme latente du TGF- β 1 (Yu and Stamenkovic, 1999). C'est pourquoi nous avons étudié l'impact de MMP-2 sur l'activation du TGF- β 1 dans la SIPS.

En premier lieu, nous avons vérifié que MMP-2 est bien surexprimé lors des stress sous UVB. Les résultats obtenus par RT-PCR en temps réel et par marquage en immunofluorescence confirment que MMP-2 est bien surexprimé lors des stress sous UVB.

Afin d'étudier l'activation de la forme latente du TGF- β 1 par MMP-2, nous avons mis au point un modèle d'inhibition de MMP-2 par l'utilisation d'un siRNA dirigé contre MMP-2. Ces résultats montrent que l'utilisation du siRNA dirigé contre MMP-2 à une concentration de 50 nM permet une inhibition presque totale de MMP-2 jusqu'à 7 jours après la transfection. L'efficacité du siRNA a également été démontrée chez des fibroblastes AG04431 exposés ou non aux UVB.

Ensuite, dans le but de déterminer si cette inhibition a un effet sur le déroulement de la SIPS, nous avons étudié différents biomarqueurs de la sénescence lors de l'utilisation du siRNA MMP-2. Nous n'avons pas observé d'effet de cette inhibition sur la proportion de cellules positives pour l'activité S-A β -galactosidase. Quant aux modifications du niveau relatif en ARNm pour les gènes associés à la sénescence, nous observons un effet de l'inhibition de MMP-2 uniquement pour les gènes fibronectine et CTGF. Pour les autres gènes, à savoir apoJ et ostéonectine, nous n'observons pas d'effet de l'inhibition de MMP-2.

MMP-2 est exprimée constitutivement et contrôlée par un mécanisme d'activation unique impliquant MT-MMP1 (membrane-type MMP1) et TIMP2 (tissue inhibitors of MMP 2). Son expression est également contrôlée par des stabilisations post-transcriptionnelles de son ARNm et par le facteur de transcription AP-1 (Sternlicht and Werb, 2001). L'activation de la voie des JNKs va mener à celle du facteur de transcription AP-1 qui régule l'expression de MMP-2. Notons que l'expression d'AP-1 augmente lors du vieillissement de la peau *in vivo* et dans les fibroblastes de peau *in vitro* (Rittie and Fisher, 2002). L'activation de la voie des JNKs pourrait expliquer l'augmentation d'expression de MMP-2 chez les cellules stressées sous UVB.

Discussion et perspectives

Il existe d'autres mécanismes d'activation de la forme latente du TGF- β 1: des protéases, TSP-1, l'intégrine α v β 6, un faible pH ou encore des ROS (Koli et al., 2001). Etant donné que de nombreux mécanismes d'activation de la forme latente du TGF- β 1 existent, il se peut que la seule inhibition de MMP-2 ne soit pas suffisante pour empêcher l'activation du TGF- β 1.

Il serait donc intéressant d'étudier l'expression et l'impact de l'inhibition de ces autres candidats afin de mettre en évidence le mécanisme d'activation du TGF- β 1.

5. Bibliographie

- Annes, J. P., Munger, J. S. and Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* **116**, 217-24.
- Beausejour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P. and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* **22**, 4212-22.
- Bernstein, E. F. and Uitto, J. (1996). The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clin Dermatol* **14**, 143-51.
- Brodin, G., Ahgren, A., ten Dijke, P., Heldin, C. H. and Heuchel, R. (2000). Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J Biol Chem* **275**, 29023-30.
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. and Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-52.
- Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* **33**, 703-9.
- Chen, Q. M., Tu, V. C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O. and Dilley, T. (2000). Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. *J Cell Sci* **113 (Pt 22)**, 4087-97.
- Cristofalo, V. J., Volker, C., Francis, M. K. and Tresini, M. (1998). Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **8**, 43-80.
- de Magalhaes, J. P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002). Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett* **523**, 157-62.
- de Magalhaes, J. P. and Church, G. M. (2006). Cells discover fire: employing reactive oxygen species in development and consequences for aging. *Exp Gerontol* **41**, 1-10.
- Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S. et al. (2005). Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci* **118**, 743-58.
- Derynck, R. and Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-84.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-7.

Bibliographie

Dumont, P., Burton, M., Chen, Q. M., Gonos, E. S., Frippiat, C., Mazarati, J. B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* **28**, 361-73.

Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E. S. and Toussaint, O. (2002). Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones* **7**, 23-35.

Dumont, P., Royer, V., Pascal, T., Dierick, J. F., Chainiaux, F., Frippiat, C., de Magalhaes, J. P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001). Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence. *FEBS Lett* **502**, 109-12.

Frippiat, C., Chen, Q. M., Zdanov, S., Magalhaes, J. P., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001). Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 2531-7.

Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002). Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **33**, 1334-46.

Gerland, L. M., Ffrench, M. and Magaud, J. P. (2001). [Cyclin dependent kinase inhibitors and replicative senescence]. *Pathol Biol (Paris)* **49**, 830-9.

Gonos, E. S., Derventzi, A., Kveiborg, M., Agiostratidou, G., Kassem, M., Clark, B. F., Jat, P. S. and Rattan, S. I. (1998). Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res* **240**, 66-74.

Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-60.

Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.

Hengstschlager, M., Braun, K., Soucek, T., Miloloza, A. and Hengstschlager-Ottnd, E. (1999). Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat Res* **436**, 1-9.

Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. and Horikawa, T. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**, 21-39.

Jacks, T. and Weinberg, R. A. (1998). The expanding role of cell cycle regulators. *Science* **280**, 1035-6.

Javelaud, D. and Mauviel, A. (2005). Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* **24**, 5742-50.

Bibliographie

- Karlseder, J., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* **295**, 2446-9.
- Koli, K., Saharinen, J., Hyytiainen, M., Penttinen, C. and Keski-Oja, J. (2001). Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc Res Tech* **52**, 354-62.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**, 3613-22.
- Lee, C. M., Weindruch, R. and Aiken, J. M. (1997). Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic Biol Med* **22**, 1259-69.
- Lin, X., Duan, X., Liang, Y. Y., Su, Y., Wrighton, K. H., Long, J., Hu, M., Davis, C. M., Wang, J., Brunicaudi, F. C. et al. (2006). PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* **125**, 915-28.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**, 753-91.
- Mueller, S. N., Rosen, E. M. and Levine, E. M. (1980). Cellular senescence in a cloned strain of bovine fetal aortic endothelial cells. *Science* **207**, 889-91.
- Pang, C. Y., Lee, H. C., Yang, J. H. and Wei, Y. H. (1994). Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure. *Arch Biochem Biophys* **312**, 534-8.
- Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chretien, A., Bastin, C., Dabee, A. F., Bertholet, V., Remacle, J. and Toussaint, O. (2005). Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett* **579**, 3651-9.
- Rheinwald, J. G. and Green, H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-43.
- Rheinwald, J. G., Hahn, W. C., Ramsey, M. R., Wu, J. Y., Guo, Z., Tsao, H., De Luca, M., Catricala, C. and O'Toole, K. M. (2002). A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol* **22**, 5157-72.
- Rittie, L. and Fisher, G. J. (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* **1**, 705-20.
- Rodier, F., Kim, S. H., Nijjar, T., Yaswen, P. and Campisi, J. (2005). Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 977-90.
- Sapkota, G., Knockaert, M., Alarcon, C., Montalvo, E., Brivanlou, A. H. and Massague, J. (2006). Dephosphorylation of the linker regions of Smad1 and Smad2/3 by small C-terminal domain phosphatases has distinct outcomes for bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* **281**, 40412-9.

Bibliographie

Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C. and Wlaschek, M. (2000). Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* **35**, 307-16.

Schiller, M., Javelaud, D. and Mauviel, A. (2004). TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* **35**, 83-92.

Serrano, M. and Blasco, M. A. (2001). Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 748-53.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12.

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

Sternlicht, M. D. and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 463-516.

Svobodova, A., Walterova, D. and Vostalova, J. (2006). Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **150**, 25-38.

ten Dijke, P. and Hill, C. S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* **29**, 265-73.

Tice, R. R., Schneider, E. L., Kram, D. and Thorne, P. (1979). Cytokinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin. *J Exp Med* **149**, 1029-41.

Toussaint, O., Dumont, P., Dierick, J. F., Pascal, T., Frippiat, C., Chainiaux, F., Magalhaes, J. P., Eliaers, F. and Remacle, J. (2000). Stress-induced premature senescence as alternative toxicological method for testing the long-term effects of molecules under development in the industry. *Biogerontology* **1**, 179-83.

Trautinger, F. (2001). Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clin Exp Dermatol* **26**, 573-7.

Vaziri, H. and Benchimol, S. (1996). From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol* **31**, 295-301.

Yu, Q. and Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* **13**, 35-48.

Zdanov, S., Debacq-Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2006). Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H2O2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett* **580**, 6455-63.