

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2018

THESES 2018/TOU3/2075

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance du

MÉMOIRE

du Diplôme d'Études Spécialisées d'Innovation Pharmaceutique et Recherche

Présenté et soutenu publiquement par

Hélène MARTINI

Née le 03 juin 1990, à Angers (49)

**Impact du vieillissement
sur les capacités de différenciation vasculaire
des cellules stromales mésenchymateuses cardiaques**

1 octobre 2018

Directeur de thèse : Dr Victorine DOUIN-ECHINARD, MCU Faculté de Pharmacie, Toulouse

JURY

Président : Pr Brigitte SALLERIN, PU-PH Faculté de Pharmacie, Toulouse

1er assesseur : Dr Frédéric DESCHASEAUX, Directeur de Recherche (DR) EFS, Toulouse

2ème assesseur : Dr Jeanne MIALET-PEREZ, Chargé de Recherche (CR1) INSERM, Toulouse

3ème assesseur : Dr Fabien DESPAS, MCU-PH Faculté de Médecine, Toulouse

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 08 janvier 2018

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme SERONIE-VIVIEN S.	Biochimie	Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. Olichon A.	Biochimie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. Sainte-Marie Y.	Physiologie
		M. Stigliani J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALO A.	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme COOL C.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
M. PERES M.	Immunologie
Mme SALABERT A.S	Biophysique

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres d'avoir accepté de siéger au sein de ce jury et d'avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce travail de thèse.

Pr Brigitte SALLERIN, je vous remercie profondément d'avoir accepté de présider ce jury. Je vous remercie aussi pour votre implication depuis le début de mon internat de pharmacie, d'avoir été ma tutrice pédagogique et de m'avoir permis de réaliser cette expérience de pharmacie hospitalière au sein du CVM qui a été, pour moi, une expérience très enrichissante.

Dr Frédéric DESCHASEAUX, je vous remercie d'être présent au sein de ce jury, ainsi que pour votre aide lors de mon Master 2 au sujet de la différenciation endothéliale. Veuillez trouver l'expression de ma profonde gratitude.

Dr Jeanne MIALET-PEREZ, merci pour ces nombreux échanges scientifiques entretenus tout au long de ma thèse de sciences qui sont toujours agréables et très enrichissants pour moi. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

Dr Fabien DESPAS, je vous remercie d'avoir accepté si rapidement de faire partie de ce jury, veuillez trouver l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'ai réalisé ce travail au sein de l'équipe 6 de l'Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC) et tiens à remercier le **Pr Angelo PARINI** et le **Pr Daniel CUSSAC** de m'avoir accueillie et acceptée dans leur équipe. À toute **l'équipe 6** que j'aurai l'occasion de remercier plus longuement un plus tard (Dimitri, Maylis, Nathalie, Marianne,...) et notamment **Daniel** pour ses discussions interminables dans le bureau, ton accessibilité, et tout ce que tu as fait pour me permettre de continuer avec vous encore un an.

Victorine, merci d'avoir acceptée dès le départ de m'encadrer, lors de mon Master 2, aujourd'hui pour la thèse de pharmacie mais surtout lors de cette thèse de science. Merci pour ta bonne humeur, et notamment le partage de ta passion pour ce métier. Je te remercie aussi de croire en mes capacités et d'essayer de me faire évoluer au mieux. Je garde un peu de remerciements sous le coude pour la thèse suivante.

Parce qu'il faut bien commencer par le début, et ces années pharma ont commencé avec toi, **Marine**. J'ai du mal à imaginer une première année autre que celle passée avec toi, à notre place à gauche de l'amphi, où nous ne faisons pas toujours qu'écouter. À ce trajet à pieds, où je passais te prendre au Tripode et à toutes tes histoires « amour, gloire et beauté » que tu me racontais au sujet de cette petite bande ariégeoise que tu m'as fait rencontrer à la fin de cette première année et qui m'a tout de suite intégrée. À tous ces moments passés avec toi et pour ton amitié, tu restes quelqu'un d'important dans ma vie.

À cette petite bande ariégeoise, **Quentin, Mathias, Coralie, Adrien, Nico, Titi** et **Ludo**, ces innombrables week-ends, dans votre pays, et ces innombrables soirées. Même si, pour certains notre relation s'est perdue avec le temps, je tenais à vous remercier tous pour ces moments passés ensemble et ces vacances, qui resteront des moments importants de ma vie.

Quentin, pour cette relation protectrice que tu as envers moi, mais aussi tous ces chambrages et mon statut de « looseuse ». Tu représentes une sorte de grand frère pour moi.

Mathias, petit colocataire à ses heures, merci pour ces moments ariégeois, mais aussi ces nombreux moments toulousains, nos « nombreuses » sorties piscines, ces soirées bar à vins et les retours à vélo. En espérant retrouver une partie de cette relation avec toi.

Coralie, pour ces Nouvel an « embuscade » à Soulan, tes histoires avec de nombreux protagonistes où, je l'avoue, tu me perdais souvent et nos rires au cours des soirées.

Adrien, mister papouilles, premier à m'avoir mise à l'aise dans cette jolie bande. J'ai du mal à te distinguer dans ces remerciements d'Emma et de ma petite contribution à votre bonheur. **Emma**, la voisine de la fenêtre d'en face, des fous rires des Mignons et du « mais c'est un chien qui paaaaarle ». Merci à vous deux, pour ces repas dans ce petit 19m² (pas toujours officiellement invitée), ces conversations à la fenêtre, Hero Corp et ces autres découvertes qui m'ont fait tant rire avec vous.

À la bande de la série C, **Laure, Nol, Manon, Ludo** et **Dave**, comment faire des remerciements dans une thèse de pharmacie sans parler de vous. Vous qui étiez au cœur de ces riches années. À ces TP à une paillasse d'écart, qui se faisaient presque à 12 mains et à nos nombreux fous rires. À nos vacances septembriennes (oui j'invente toujours des mots, les gars) à la mer, à ces soirées d'inté, soirées pharmas et toutes les autres, à ces apéros à l'appart et toutes ces nombreuses choses qu'on a pu faire et qu'on fera, je l'espère, encore ensemble. Je suis fière d'avoir chacun de vous dans ma vie.

Laure, je commence par toi, ma binôme, ma vanille, mon facteur limitant. Merci pour ces rédactions des comptes rendus de TP, de ce temps que j'ai passé pour réussir à écrire ton nom sans fautes (je l'avoue, je stresse encore à l'idée de l'écrire), pour tous ces bons moments de binômie. Pour ces soirées volley-ball et ces heures passées à discuter dans la voiture, phares allumés, à user la batterie jusqu'à la moelle (petite pensée pour la Corsa !) ou même juste pour tous ces moments passés ensemble, à rire et à parler.

Nol, Mamie Schtroumpf et râleuse invétérée, merci pour cette folie qui a égayé toutes ces années de pharmacie et qui continue encore aujourd'hui. Pour ces conversations sans filtre parfois, cette mémorable soirée karaoké, pour tes bronzages bizarroïdes, tes massages de crânes, tes pouces de doigts de pied, tes râlages chroniques, ces épisodes de séries passés sur dropbox et nos nombreux fous rires.

Manon, pour ta douceur et ton calme à (presque) toute épreuve, ces longues heures sur le *dancefloor*, aux galas et autres soirées, et tes talents culinaires (panna cotta et verrines en tout genre) qui nous ont tant régales.

Ludo, tu es la première personne que j'ai rencontrée de ce groupe (avec Manon, d'ailleurs) lors de cette toute première soirée d'inté, où l'on s'était juré que « la prochaine fois on y rentre au Ramier ». À ces interminables calculs de dilution au tout début des TP (d'ailleurs, j'en fais presque tous les jours maintenant ^^). À ta bonne humeur quotidienne et ton esprit serein. Et à ton fameux « Bonjour Monsieur Vouandou, vendeur de nems », et autres blagues quotidiennes qui ont égayé mes journées.

Dave, bon ok David, toi qui vis parfois dans un monde parallèle, aux « blagues à Dave » qui me font quand même toujours autant rire (bon, ça dépend lesquelles), à ces Bandas à Condom où il peut toujours se passer tout et n'importe quoi (« si vous avez un souci appelez-moi », hein !) et tous ces autres bons moments.

Et les gars, cherchez les fautes d'orthographe dans ces remerciements, c'est votre jeu favori, je le sais, hein ! (PS : j'ai un peu triché, cette fois-ci ;))

À **Elsa**, **Adrien** et **Camille**, amis de galères du concours d'internat avec qui les confs étaient quand même vachement plus drôles.

Elsa pour ces heures passées ensemble à réviser, à stresser et à s'envoyer nos sublimes fiches pleines de couleurs, à ces week-ends sur Paris et aujourd'hui au Mans, et ce fameux voyage en Corse (« Car de vieux, avec... des vieux ») ou à Palavas. À tous ces moments où tu as été là pour moi depuis, tu es vraiment quelqu'un d'exceptionnel. Une petite pensée aussi pour Guillaume.

Adrien, copain de picole dans nos soirées de dîners improvisés, comment vais-je survivre l'année prochaine sans ta mémorable tarte poireaux saumons signature ? Et qui aurait dit qu'on serait copains de galère jusqu'à passer notre thèse à 3 jours d'écart ! Ces soirées rigolades, potins et blabla vont me manquer.

Camille, même si, depuis que tu es devenue bordelaise, nos chemins se croisent beaucoup moins, je n'oublie pas nos cours de Zumba (One Direction, hein !!) et les soirées internat.

À **Mathilde** et **Fanny**, parce que vous étiez là avant et que vous êtes encore là aujourd'hui, votre amitié m'est tellement précieuse. Je vous remercie pour tout ce que l'on a partagé, ces nombreuses margaritas frozen au Texxas Café, notre QG pendant bien 2 ans, ces magiques vacances à Saint-Pierre après le bac, vos squattages de chambre lors de mes anniversaires, nos apéros dans l'appartement de 19m², nos nombreux souvenirs de lycées, votre bonne humeur dès que l'on se voit, vos envies loufoques de soirées déguisées. Sans vous, ma vie serait totalement différente. Merci à vous d'être là.

À **ma petite carte**, même si on se voit beaucoup moins, c'est toujours un plaisir de partager du temps avec toi et merci pour tes roulades dans le talus.

Aux copains du labo, **Mathilde, Damien, Julien**, vous qui m'avez lâchement abandonnée, c'est vraiment beaucoup plus triste maintenant. Je développerai mes remerciements au cours de la seconde, mais sachez que, grâce à vous, ces années de thèse ont été un véritable bonheur.

À la mère **Lise**, toi qui occupes une place particulière au quotidien. Merci d'être là pour mes pauses râleges, mes pauses déprimés, mes pauses potins, mes pauses blabla, mes pauses « attends j't'ai pas dis », mes pauses « attends regarde ça », mes pauses « j'ai faim » et, parfois entre ces pauses, pour tes conseils manips et scientifiques et pour aussi la relecture de cette thèse.

À **Laurent**, même si aujourd'hui nos chemins se sont séparés, tu auras été une partie importante de ma vie et de ces années pharma. À cette vie quotidienne partagée, à nos voyages et à nos repas et à ton soutien durant ces années. Je n'oublie pas tous ces moments et ne regrette pas les avoir partagés avec toi. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite.

À **toi** dont l'entrée dans ma vie a coïncidé avec la réelle écriture de cette thèse, merci pour ton soutien au quotidien durant cette période et pour ces moments d'inefficacité dont tu es responsable mais dont je ne regrette aucunement l'existence.

Parce que **ma famille** est l'un des piliers essentiels de ma vie, je tiens aussi à les remercier.

À **Papa et Maman**, merci de m'avoir inculqué l'importance du travail et de la rigueur. C'est grâce à vous qu'aujourd'hui, j'ai un métier qui me passionne et cette volonté de découvrir tous les jours. Merci de croire en moi, parfois à l'excès : « Tu seras prix Nobel un jour, ma fille. » D'être présents dans les coups durs sans rien demander, de vouloir mon bonheur et ma réussite dans tout ce que j'entreprends. On ne se le dit pas assez mais papa, maman, je vous aime. Merci de faire de moi ce que je suis.

À mon frère **Pierre**, à notre relation chien et chat, depuis le jour où tu as été déçu que maman me ramène de la maternité. Sache que, même si on ne se le dit pas et on ne se le montre pas, tu gardes une place plus qu'importante dans ma vie.

À **Grand-mère**, un modèle de réussite, à ses nombreuses fois où tu as comparé mes études pharmaceutiques aux tiennes (et oui, ce n'est plus la même chose). À ton intérêt pour ce que je fais toutes ces fois où tu m'as demandé de te raconter comment mes recherches avançaient. À ton clic-clic de cœur et tes gling-gling de bijoux. À **Grand-père** qui n'est plus là aujourd'hui, j'essaie de suivre un peu tes pas de réussite.

À mes oncles et tantes, **Manuche** et **Éric** (j'ai presque failli écrire Papuche), **Tic-Tic** et **Loïc**, **Anna**, et à nos interminables repas familiaux et ces marathons de la bouffe qui regroupent 2 autres passions de ma vie : manger (oui mais bien) et boire (oui mais bon). À vos histoires connues depuis des lustres au mariage d'untel ou d'untel, aux demandes ratées ou précipitées, histoires que je ne me lasse d'écouter. Aux parties de belotes digestives, et de Trivial Pursuit jeunes contre vieux, où les réponses géographies sont encore URSS.

À mes cousins, cousines et leurs pièces rapportées ainsi que leurs magnifiques bébés. À nos vacances à Capbreton, nos terrains de foot géants à Saint-Malo, nos goûters au Milkini ensablés, nos tournois de belote et ces nombreux films cultes. À **Mathieu** LE grand cousin « Baby-sitter » à ses heures devant les clips MTV, **Camille** et ses bonnes idées, **Zoé** et la chanson du grand cerf, **François** le grand sensible, blagueur et tricheur hors pair, **Stéphanie** partenaire de belote et de papote, **Tom** le paresseux sur son arbre, **Marion** ma confidente et nos virées shopping (merci pour ton écoute et ses heures au téléphone), **Paf**, ses aventuriers du rail et sa blague du « hum il a une belle robe », **Emma** petite merveille (tyran) potelée, **Charles** le hipster au grand cœur, **Cécile** son tiramisu, ses textos trop rapides et ce lien particulier qui nous unit, **Nico** et sa profonde gentillesse, **Guillaume** discret et sensible, **Sophie** « hôtesse de l'air » ^^, **Arthur** sa tranquillité et son sourire et **Adrien** petit dernier, mais déjà grand, qui a accepté de me faire essayer le skate à 3 g.

À ma **Mamie**, merci d'être là aujourd'hui, et pour ton inébranlable confiance en moi dans mes études, « de toute façon avec toi, ça va toujours bien ». À mon petit **Papy**, qui me manque un peu tous les jours, tu te seras toujours battu dans la vie et jusqu'à la fin, merci de m'avoir montré cette force.

À mes oncles et tantes, **Patrick** et **Véro**, **Monique** et **Bruno**. Merci d'être venus aujourd'hui, ça me touche particulièrement. À mes cousins que je regrette de voir aussi peu **Lucie**, **Audrey**, **Paul**, **Romain**, **Maxime** et **Clément**. À nos moments passés dans le grenier à jouer au ping-pong, à la maîtresse ou à vouloir ABSOLUMENT attendre le père Noël. Merci pour ces moments en famille, qui sont toujours un plaisir pour moi, j'aime la simplicité, la légèreté, et la drôlerie des moments passés avec vous, parfois sortis de nulle part. J'aime l'ambiance de ces repas.

À toutes ces tranches de vies que j'ai vécues et que je vis grâce à vous qui font de moi ce que je suis aujourd'hui.

Merci à tous ceux qui, pendant 4 ans, m'ont demandé sans relâche : « Tu la passes quand ta thèse de pharmacie ? » et à qui j'ai répondu « dans le courant de l'année » ou « là c'est sûr, j'avance cet été ». Donc un NON merci à ma procrastination, de m'avoir donné tort... Malheureusement, on ne peut procrastiner toute sa vie, donc la voici, la voilà.

And

To be continued...

Table des matières

Remerciements.....	5
Table des matières	11
Table des illustrations.....	15
Liste des abréviations	17
I. Vieillesse cardiovasculaire.....	21
A. Généralités	21
1. Définition.....	21
2. Vieillesse de la population.....	21
a) Etat des lieux	21
b) Pathologies liées à l'âge.....	22
i. La fragilité	22
ii. Pathologies chroniques liées à l'âge.....	24
B. Le vieillissement cardiaque	25
1. Modifications fonctionnelles	25
a) Au repos.....	25
b) En réponse à l'effort	26
2. Modifications structurelles	27
3. Modifications cellulaires	27
C. Vieillesse vasculaire	29
1. Rigidité artérielle :.....	30
2. Epaissement de la paroi intinale :.....	30
3. Stress oxydatif et dysfonction endothéliale.....	31
4. Modifications du réseau vasculaire	32
II. Sénescence	33

A.	Marqueurs de la sénescence.....	33
1.	Modifications morphologiques des cellules	34
2.	Arrêt du cycle cellulaire et protéines inhibitrices du cycle	34
a)	Arrêt du cycle cellulaire	34
b)	Voie du p16 ^{INK4a} /pRB.....	36
c)	Voie p53/p21 ^{CIP1}	37
3.	Activité β-galactosidase associée à la sénescence.....	38
4.	Modification de la chromatine : SAHFs et dommages à l'ADN.....	39
5.	Raccourcissement télomérique et dysfonction	39
6.	Senescence Associated Secretory Phénotype (SASP)	41
a)	Caractéristiques du SASP	41
b)	Régulation de la production du SASP	42
c)	Composition du SASP	43
i.	Facteurs solubles de signalisation	43
ii.	Protéases sécrétées.....	44
iii.	Facteurs régulateurs du SASP.....	44
7.	Modifications mitochondriales	44
8.	Résistance à l'apoptose.....	45
B.	Les sénescences.....	46
1.	Sénescence réplivative	46
2.	Sénescence post mitotique.....	47
3.	Sénescence prématurée induite par le stress (SIPS).....	47
a)	Sénescence induite par un stress oncogénique	48
b)	Sénescence induite par des agents génotoxiques.....	49
c)	Sénescence induite par un stress oxydant	50
C.	Les deux facettes de la sénescence.....	51
1.	Effets bénéfiques	52
a)	Embryogenèse	52

b)	Réparation tissulaire et cicatrisation	53
c)	Propriétés anti-tumorales	54
2.	Effets délétères	55
a)	Propriétés pro-tumorales	55
b)	Pathologies liées à l'âge.....	56
D.	Stratégies de lutte contre les cellules sénescents.....	60
1.	Les sénolytiques.....	60
a)	Protéines de la famille de Bcl-2	60
b)	Quercetine et Dasatinib.....	61
c)	Autres	62
2.	Cibler la production du SASP.....	63
a)	Inhibiteurs de NF-κB	63
i.	Inhibition de la voie mTOR	63
ii.	Metformine	64
iii.	Anticorps neutralisants anti IL-1α	64
b)	Autres modes d'action.....	65
III.	Les cellules stromales mésenchymateuses cardiaques et leur potentiel angiogénique	66
A.	Les cellules souches.....	66
B.	Cellules stromales mésenchymateuses cardiaques	67
1.	Les cellules stromales mésenchymateuses.....	67
2.	Caractérisation des MSCs : Difficultés d'une définition claire	69
3.	Cellules stromales mésenchymateuses cardiaques, Sca1+ PDGFRα+	70
a)	Définition	70
b)	Les cMSCs sont elles des péricytes ?	71
C.	Les autres progéniteurs cardiaques	72
1.	Cellules c-Kit+	73
2.	Cellules ISL1+.....	74
3.	Sca1+	75

4.	Side population (SP)	76
5.	Cardiosphères	76
D.	Propriétés angiogéniques des MSCs	78
Résultats		80
I.	Introduction	81
II.	Matériels et Méthodes	83
A.	Animaux.....	83
B.	Isolement des cMSCs et cytométrie de flux	83
C.	Différenciation adipocytaire.....	84
D.	Différenciation endothéliale	84
E.	Différenciation léiomyocytaire.....	84
F.	Immunofluorescence.....	84
G.	Test de clonogenité.....	85
H.	RT-PCR	85
I.	Statistiques	85
III.	Résultats	89
A.	Apparition d'un programme de sénescence dans les cMCSs âgées	89
B.	Différenciation vasculaire des cMSCs jeunes et âgées.....	91
C.	Propriétés des sous-populations CD90 positives et négatives.....	93
D.	Impact du vieillissement sur les sous populations CD90+ et CD90-.....	97
E.	Influence de p16 ^{INK4a} dans la différenciation vasculaire des cMSCs.....	99
IV.	Conclusion et perspectives.....	100
Discussion		102
Bibliographie.....		107

Table des illustrations

Figures :

Figure 1 : Recensement et prévision de la population des 60-79 ans et des plus de 80 ans (ONU, 2015).....	22
Figure 2 : Concept de fragilité : Déclin fonctionnel en fonction de l'âge (Shinmura, 2016)	23
Figure 3 : Evolution de pathologies chroniques avec l'âge et le sexe (Niccoli & Partridge, 2012).....	24
Figure 4 : la révolution cardiaque.....	26
Figure 5 : Composition cellulaire du cœur	28
Figure 6 : Modifications cellulaires et de la matrice extracellulaire d'un cœur âgé (Horn & Trafford, 2016) .	29
Figure 7 : Schéma d'un vaisseau sanguin	30
Figure 8 : Modifications des vaisseaux au cours du vieillissement vasculaire(North & Sinclair, 2012)	31
Figure 9 : Tortuosité vasculaire du tissu cérébral de patients jeunes et âgés (échelle = 200µm) (Thore et al., 2007).....	33
Figure 10 : Schéma du cycle cellulaire ("La régulation du cycle cellulaire : introduction générale RN' Bio," n.d.).....	35
Figure 11 : Voies moléculaires contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire au cours de la sénescence (Herranz & Gil, 2018).....	35
Figure 12 : Mécanisme d'action du p16 ^{INK4a} en tant que CDKI (N. Martin et al., 2014)	36
Figure 13 : Marquage SA-βgalactosidase sur des fibroblastes humain (B. Y. Lee et al., 2006).....	39
Figure 14 : Raccourcissement télomérique au cours des divisions cellulaires et induction de la sénescence .	41
Figure 15 : Dommages télomériques induits par des stress et induction de la sénescence (Victorelli & Passos, 2017).....	50
Figure 16 : Effets bénéfiques de la sénescence (He & Sharpless, 2017a)	52
Figure 17 : Mode d'action des sénolytiques (Ovadya & Krizhanovsky, 2018)	62
Figure 18 : Mode d'action des sénolytiques par inhibition du SASP (Ovadya & Krizhanovsky, 2018).....	65
Figure 19 : Multipotence des BM-MSCs (Uccelli, Moretta, & Pistoia, 2008)	68

Figure 20 : Mode d'action des MSCs (Ying Wang et al., 2014)..... 68

Figure 21 : Différents progéniteurs cardiaques inspiré de T. Nakamura et al., 2016 ; Santini et al., 2016 ;
Yellamilli & van Berlo, 2016..... 73

Tableaux :

Tableau 1 : Prévalence des principales pathologies chez les plus de 70ans en 2014 (OMS, 2014) 24

Tableau 2 : Pathologies liées à l'âge et implications de la sénescence 59

Tableau 3 : Liste des primers..... 86

Tableau 4 : Liste des anticorps 87

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
BM-MSCs : Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CDCs : cardiosphères derived cells
CDK : Cyclin dependant kinase
CDKI : Cyclin dependant kinase inhibitors
CFU-F : Colony Forming Unit Fibroblasts
CML : Cellule Musculaire Lisse
cMSCs : cardiac Mesenchymal Stromal Cells
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DDR : DNA Damage Response
FEVG : Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche
ICFEP : Insuffisance Cardiaque à Fraction d'Ejection Préservée
ICFER : Insuffisance Cardiaque à Fraction d'Ejection Réduite
IL- : Interleukine
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MMP : Matrix Metalloproteinase
MSCs : Mesenchymal Stromal Cells
NO : Oxyde Nictric
OIS : Oncogene Induce Senescence
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PDGFR α : Platelet-derived growth factor receptor alpha
pRB : Protéine du rétinoblastome
ROS : Reactive Oxygen Species
SASP : Senescence Associated Secretory Phenotype
SAHF : Senescence associated Heterochromatine Foci
SA- β gal : Senescence Associated β -galactosidase
SIPS : Sénescence Induite Par un Stress
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

I. Vieillesse cardiovasculaire

A. Généralités

1. Définition

Le vieillissement est défini comme le "Fait de devenir vieux, ensemble des phénomènes qui marquent l'évolution d'un organisme vivant vers la mort." ou "Affaiblissement naturel des facultés physiques et psychiques dû à l'âge." ("Larousse," n.d.)

Le vieillissement est donc un processus naturel et physiologique, universel, complexe, lent et irréversible. C'est une modification, par le temps, de la fonction et de la structure d'un organisme. Le plus souvent, le vieillissement conduit à une diminution voire une perte de fonction d'un organe, en dehors de toute pathologie. Le vieillissement physiologique résulte de l'association de trois composantes (de Jaeger & Cherin, 2011) :

- Le vieillissement intrinsèque conditionné par des facteurs génétiques.
- Le vieillissement extrinsèque influencé par les facteurs environnementaux, lié à l'histoire de vie de chacun.
- Mais aussi le vieillissement induit par les maladies, conduisant à des pertes de fonctions de certains organes de façon précoce.

Le vieillissement possède par ailleurs, un caractère différentiel. Les différents organes, tissus, et cellules de l'organisme ne « vieillissent » pas de la même façon, chacun peut débiter un programme de vieillissement à des moments différents, et évoluer à des rythmes différents. De plus, notre capacité à vieillir n'est pas identique en fonction des individus, l'âge chronologique n'est donc que très peu représentatif de l'âge physiologique.

2. Vieillesse de la population

a) Etat des lieux

Aujourd'hui la population mondiale vieillissante augmente rapidement. Selon les estimations l'OMS, entre 2000 et 2050, la population mondiale des plus de 60 ans, passera de 11% à 22%, soit à peu près 2 milliard de personnes. Sur la même période, la population des plus de 80 ans sera quant à elle multipliée par 4 (Figure 1). Il y a donc aujourd'hui une augmentation de l'espérance de vie. Cependant, il est prédit qu'une part importante de la population mondiale développera une maladie chronique, et l'OMS ne peut pas affirmer actuellement que les personnes âgées d'aujourd'hui vivent en meilleure santé que leurs parents. Bien que

durant les 30 dernières années, les taux de handicaps graves ont baissés dans les pays à revenus élevés, il n'y a eu aucun changement significatif pour les handicaps légers ou modérés. Ce qui est important aujourd'hui, ce n'est plus l'augmentation de l'espérance de vie mais l'augmentation de l'espérance de vie sans pathologies, ou autrement dit « un vieillissement en bonne santé ». « Le vieillissement en bonne santé » est défini comme le processus de développement et de maintien des capacités fonctionnelles qui permet aux personnes âgées de jouir d'un état de bien-être et d'autonomie. Pour cela, l'OMS met en place de 2016 à 2020 puis de 2020 à 2030 une stratégie mondiale visant à améliorer le vieillissement de la population mondiale, qui s'intitule « Vieillir en bonne santé », permettant de promouvoir un environnement favorable pour les personnes âgées, en améliorant les soins de longues durées et adaptant ces soins à cette population.

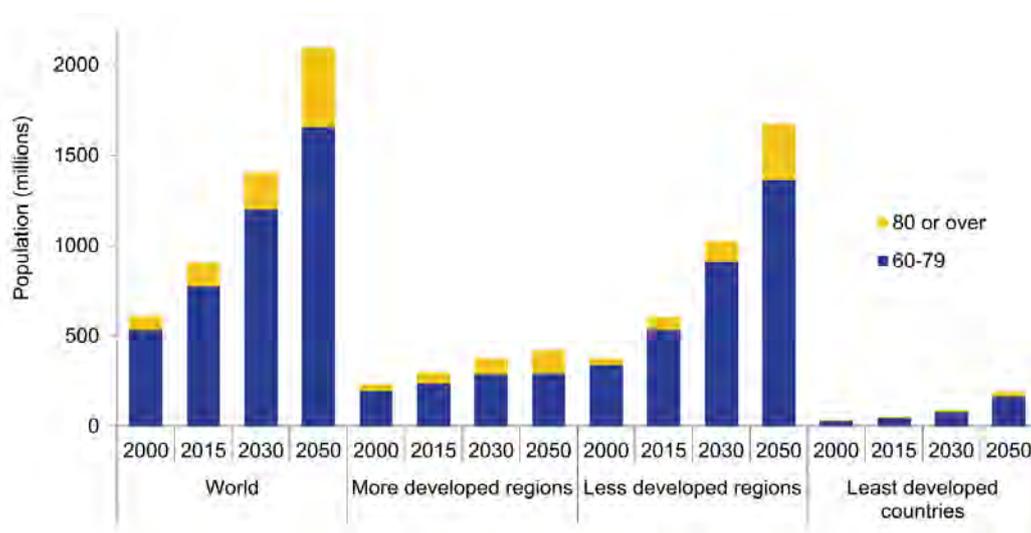


Figure 1 : Recensement et prévision de la population des 60-79 ans et des plus de 80 ans (ONU, 2015)

b) Pathologies liées à l'âge

i. La fragilité

La fragilité fait partie des syndromes gériatriques avec la déficience cognitive légère et le syndrome métabolique (Franceschi et al., 2018a). La fragilité est décrite, chez les personnes âgées, comme un syndrome multidimensionnel caractérisé par une perte des réserves physiologiques et une augmentation de la vulnérabilité face aux stress. Ce syndrome peut être le résultat de nombreuses altérations accumulées au sein des différents organes (Figure2), et peut par exemple conduire à une augmentation de la vulnérabilité face à certaines pathologies. De plus, cette fragilité peut induire des décompensations disproportionnées, des complications, une augmentation du temps de guérison, ou un déclin fonctionnel favorisant la dépendance et est associée à une augmentation de la morbi-mortalité (Franceschi et al., 2018a).

C'est en 2001, que Fried *et al*, mettent en place les 5 critères définissant la fragilité, permettant alors de mieux l'identifier et de mieux la prendre en charge. Ces critères incluent :

- Une perte de poids involontaire
- Un sentiment de fatigue et d'épuisement
- Une vitesse de marche réduite
- Une sédentarité
- Une force de préhension diminuée

Si le patient possède au moins 3 de ces 5 critères, il est classifié comme fragile et présente alors un risque accru de chutes, une diminution de la mobilité ou de l'ADL (Activities of Daily Living), une augmentation du risque d'hospitalisation, ou de mort durant les 3 années suivantes (Fried *et al.*, 2001).

Fried et Ferrucci, ont été les premiers en 2015 à conceptualiser la fragilité comme un syndrome de vieillissement accéléré et ont montré qu'elle pouvait être associée à de multiples pathologies chroniques. A contrario, la présence de pathologies chroniques contribue également à l'apparition de cette fragilité, renforçant alors l'idée d'un continuum entre la santé, les pathologies et les comorbidités. Par exemples, la perte de la masse musculaire liée à l'âge (la sarcopénie), la réduction du volume de la prise alimentaire et une faible activité physique favoriseront le déclenchement de la fragilité. Ils peuvent également favoriser l'apparition de pathologies cardiovasculaires, de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), d'insuffisance rénale chronique et de diabète de type 2. Plus récemment, le statut neuropsychique (la diminution cognitive et la dépression), ainsi que les conditions sociales comme la solitude sont des éléments qui contribuent aussi à l'apparition de cette fragilité (Shinmura, 2016).

De façon surprenante, cette condition de fragilité peut être reversée, notamment par l'augmentation de l'activité physique ou par la prise en charge de certaines pathologies (Franceschi *et al.*, 2018b).

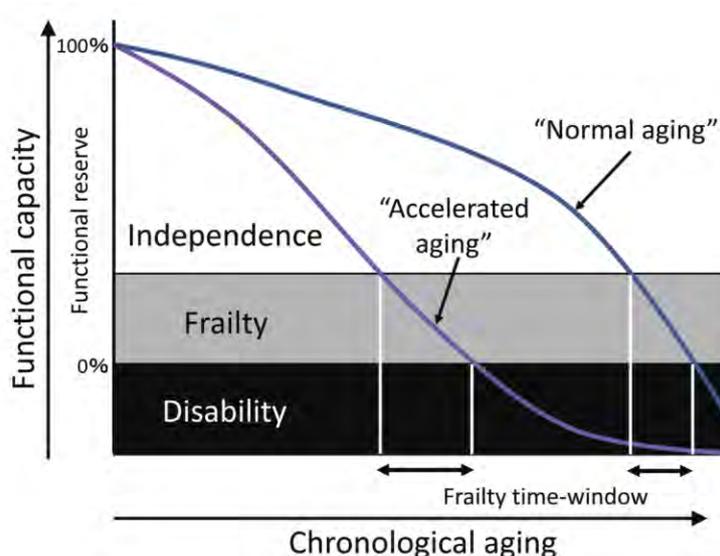


Figure 2 : Concept de fragilité : Déclin fonctionnel en fonction de l'âge (Shinmura, 2016)

ii. Pathologies chroniques liées à l'âge

Il est clairement établi aujourd'hui que le vieillissement est un facteur de risque majeur de développement de pathologies chroniques (Niccoli & Partridge, 2012).

D'après le rapport de l'OMS de 2014, les principales pathologies retrouvées chez les sujets de plus de 70 ans sont les suivantes :

Pathologies	Nombre
Pathologies cardiovasculaires (Infarctus, AVC,...)	162 626 046
Cancers	58 735 642
Pathologies respiratoires (BPCO)	44 263 677
Pathologies des organes des sens (Pertes auditives, cataracte,...)	21 389 341
Pathologies neurologiques (Alzheimer, Parkinson)	20 524 638

Tableau 1 : Prévalence des principales pathologies chez les plus de 70 ans en 2014 (OMS, 2014)

Outre cet état des lieux de prévalence, ces pathologies voient aussi leur incidence augmenter avec l'avancée en âge, notamment en ce qui concerne les maladies neuro-dégénératives, les cancers ou les pathologies cardiovasculaires (Figure 3).

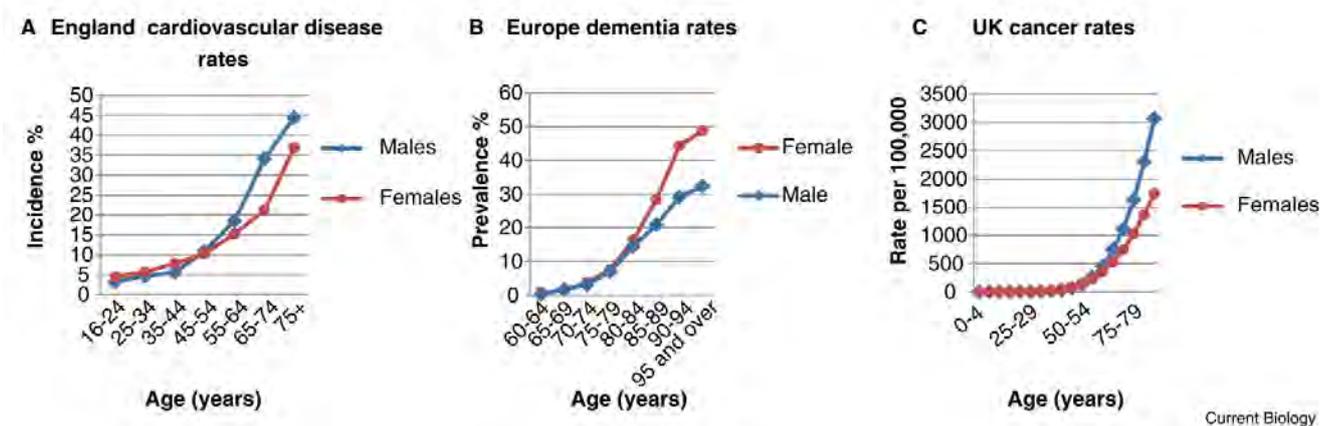


Figure 3 : Evolution de pathologies chroniques avec l'âge et le sexe (Niccoli & Partridge, 2012)

Compte tenu de l'allongement de l'espérance de vie et de l'accroissement de la population âgée des plus de 80 ans, il est impératif d'un point de vue socio-économique et sanitaire, d'étudier et de comprendre les causes d'apparition de ces pathologies chez les personnes âgées et d'en améliorer la prise en charge.

B. Le vieillissement cardiaque

Comme nous avons pu le voir précédemment l'âge est un facteur de risque majeur de développer des pathologies cardiovasculaires (Niccoli & Partridge, 2012), qui sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde regroupant plus de 30% des décès en 2015 (OMS janvier 2015). Parmi ces pathologies cardiovasculaires, l'insuffisance cardiaque et la fibrillation auriculaire sont celles recensant les plus fortes prévalences avec l'âge.

Grâce à sa capacité contractile, le cœur, avec le système vasculaire, assure la perfusion sanguine des organes, l'apport de nutriments et d'oxygène aux tissus et le retour veineux. L'insuffisance cardiaque correspond à l'incapacité du cœur à assurer les besoins métaboliques et fonctionnels de l'organisme. Sur le plan clinique, elle se définit comme un syndrome associant des signes fonctionnels (dyspnée, asthénie...) et des signes cliniques (crépitations pulmonaires, turgescence jugulaire, œdèmes des membres inférieurs) liés à une déficience de la fonction cardiaque (Mcmurray et al., 2012). La prévalence de cette pathologie dans la population adulte des pays développés est de 1-2%, pouvant atteindre les 10% chez les personnes de plus de 70 ans (Mcmurray et al., 2012). Cette population peut être divisée en 2 groupes, les patients avec une fraction d'éjection préservée (ICFEP) (représentant environ 50% des patients), et les patients avec une fraction d'éjection diminuée (ICFER). La fraction d'éjection correspond au pourcentage de sang éjecté du ventricule lors d'un battement cardiaque.

La même tendance apparaît pour la fibrillation auriculaire passant d'une prévalence de 0.12-0.16% chez les moins de 49 ans, à 3.7-4.2% chez les 60-70 ans et à plus de 10-17% chez les plus de 80 ans (Steenman & Lande, 2017; Zoni-Berisso, Lercari, Carazza, & Domenicucci, 2014). La fibrillation auriculaire est un trouble du rythme cardiaque, avec une contraction anarchique et rapide des oreillettes, induisant une détérioration de la fonction mécanique de celles-ci.

1. Modifications fonctionnelles

a) Au repos

Chez une personne âgée en bonne santé et en conditions de repos, la fréquence cardiaque (nombre de battements cardiaques), le volume systolique (volume de sang éjecté à chaque contraction) et le débit cardiaque sont normaux. Mais progressivement une des premières fonctions à diminuer au cours du temps est la fonction diastolique, correspondant à la relaxation du cœur et son remplissage. Ce remplissage en diastole s'effectue en 2 phases : une première phase précoce de remplissage passif (E), et une seconde liée à la contraction de l'oreillette (A). Au cours du vieillissement, la compliance du ventricule gauche est diminuée empêchant alors un remplissage passif convenable. La pression de remplissage et la contraction de

l'oreillette augmentent donc afin de compenser ce défaut de remplissage passif, pour maintenir un débit cardiaque adéquat et une FEVG (Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche) normale (environ 60% du sang présent dans le ventricule). Le rapport E/A, c'est-à-dire le rapport du remplissage passif du ventricule (E) et du remplissage actif par contraction de l'oreillette (A), diminue donc (Niccoli & Partridge, 2012). Ces modifications instaurent un cadre clinique caractéristique chez la personne âgée, « l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée » (ICFEP) représentant environ 50% des insuffisances cardiaques (Berry et al., 2005). A long terme et lorsque les mécanismes compensatoires sont dépassés, le ventricule gauche se dilate progressivement et la FEVG s'abaisse. On parle alors « d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite » (ICFER) qui correspond de manière générale à l'issue finale de toute cardiopathie.

La dysfonction diastolique est aussi un problème majeur chez des patients avec une fibrillation auriculaire. Ces patients possèdent une diminution de la contraction atriale due à un remodelage de l'oreillette, et par conséquent ne sont pas capables d'augmenter le remplissage tardif du ventricule gauche durant la diastole pour préserver leur fraction d'éjection. C'est pourquoi ces patients sont à fort risque d'insuffisance cardiaque (Steenman & Lande, 2017).

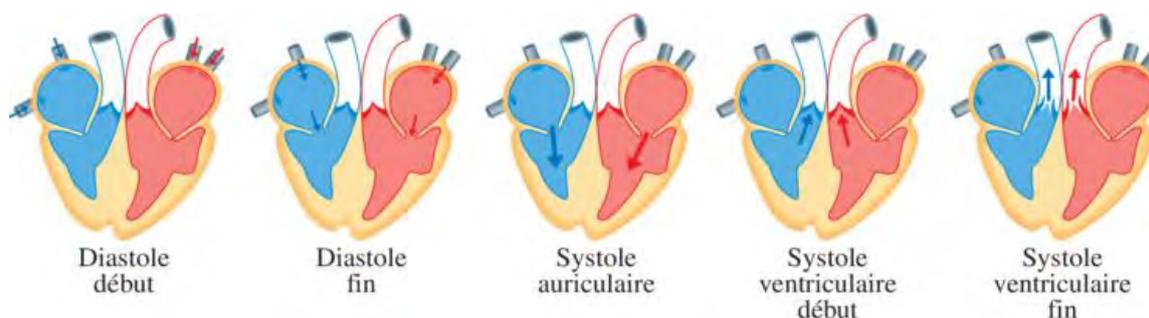


Figure 4 : la révolution cardiaque

b) En réponse à l'effort

C'est avec l'exercice que l'effet du vieillissement sur la fonction cardiaque est le plus évident, lorsque le cœur doit répondre à un stress. Alors que le rythme cardiaque au repos n'est pas affecté par l'âge, le seuil maximum de débit cardiaque atteint durant l'exercice lui diminue, lié à une diminution de la sensibilité du myocarde aux stimulations du système nerveux sympathique. Le débit cardiaque est connu pour diminuer de 25% avec le vieillissement, qui par définition serait lié aux changements de rythme cardiaque et de volume d'éjection. Parce que le volume d'éjection serait maintenu au cours du vieillissement, la diminution du débit cardiaque serait dû à un défaut d'accélération du rythme cardiaque (ou du seuil maximal de rythme cardiaque). Normalement, l'activation du système nerveux sympathique durant l'exercice conduit à une libération des catécholamines (noradrénaline, adrénaline) qui activent les récepteurs β -adrénergiques dans le cœur augmentant le rythme et la force de contraction. Une diminution du seuil maximum de battements cardiaques modifie la capacité du cœur âgé à augmenter son débit durant l'exercice. La diminution de la

sensibilité aux stimulations β -adrénergiques limite aussi directement la force contractile en réponse à l'exercice. Ces changements apparaissent au départ atténués à cause d'une augmentation du volume diastolique du ventricule gauche durant l'exercice et d'une augmentation de sa force de contraction (Keller & Howlett, 2016; Steenman & Lande, 2017).

2. Modifications structurelles

Au niveau structurel, le vieillissement est associé à une augmentation de l'épaisseur du myocarde résultant de l'augmentation de la taille des cardiomyocytes. De plus, le cœur change de forme passant d'une forme elliptique à une forme sphéroïde, avec un épaissement plus importante du septum inter-ventriculaire comparé aux parois libres. Ces modifications d'épaisseur et de forme ont d'importantes implications sur l'efficacité contractile du cœur (Strait & Lakatta, 2012). Par ailleurs, le remodelage atrial est caractérisé par une dilatation et une hypertrophie de l'oreillette pouvant être associée et/ou favoriser l'apparition d'une fibrillation auriculaire (Lam et al., 2017; Steenman & Lande, 2017).

3. Modifications cellulaires

Au niveau cellulaire, le cœur est composé de 2 grandes structures (Figure 5) :

- Le parenchyme qui est le tissu fonctionnel du cœur, composé des cardiomyocytes et des cellules cardionectrices assurant l'activité contractile. Les cardiomyocytes représentent la majorité du tissu, soit 67 à 80% du volume total du tissu, mais ne représentent que 30% à 50% de la population cellulaire totale (Banerjee, Fuseler, Price, Borg, & Baudino, 2007; Jugdutt, 2003).
- Le stroma cardiaque forme le tissu de soutien du parenchyme. Sa composition cellulaire très hétérogène représente 70 à 50% des cellules du cœur. Son rôle principal est de participer à l'homéostasie tissulaire et au soutien du parenchyme par la production de matrice extracellulaire. Les différents types cellulaires composant ce stroma sont les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses (CML), les cellules immunitaires résidentes et les cellules progénitrices.

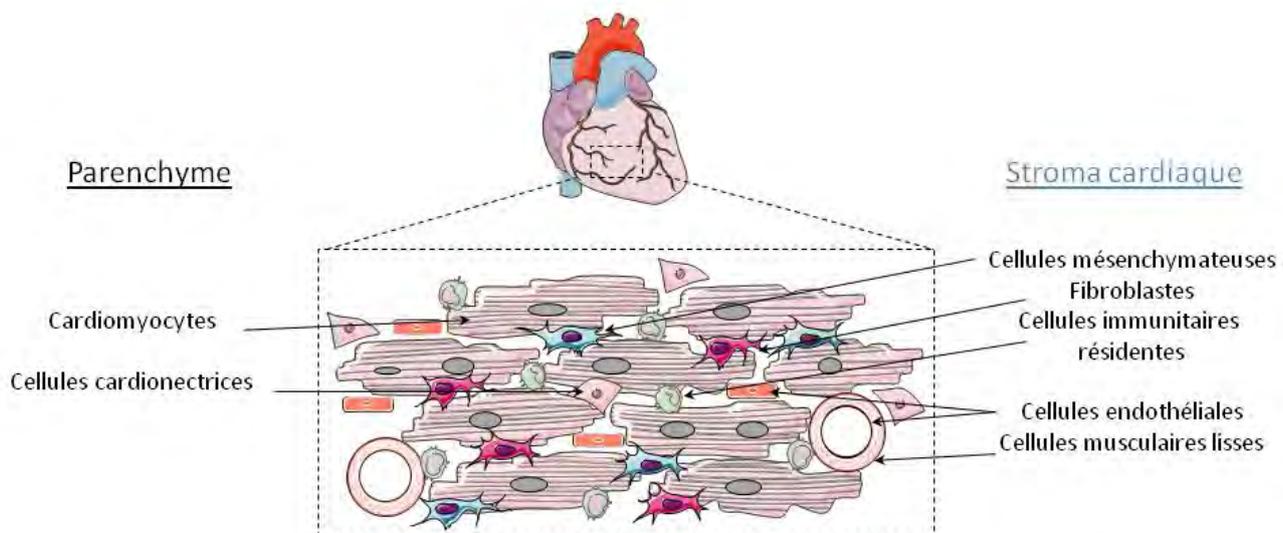


Figure 5 : Composition cellulaire du cœur

Le vieillissement cardiaque conduit, au niveau du parenchyme, à une perte importante de cardiomyocytes par nécrose et/ou apoptose, ainsi qu'une perte des cellules pacemaker des nœuds sinoatriaux (Keller & Howlett, 2016). Cette perte cellulaire conduit à une hypertrophie compensatoire des cardiomyocytes résiduels (Olivetti, Melissari, Capasso, & Anversa, 1991). Ce remodelage compensatoire induit aussi la prolifération de fibroblastes cardiaques du stroma, producteurs de collagène et de matrice extracellulaire, modifiant la composition de la matrice préexistante (Horn & Trafford, 2016). La fonction de la matrice extracellulaire est de maintenir la structure myocardique durant le cycle cardiaque. Elle joue un rôle important dans les propriétés élastiques et visqueuses du ventricule gauche. Les modifications simultanées de la quantité de fibres de la matrice et du type de collagène conduisent à l'installation d'une fibrose lors du vieillissement dans le cœur humain. L'augmentation de cette fibrose a été trouvée dans le système de conduction cardiaque, mais aussi dans le myocarde du ventricule gauche. Il est facile d'imaginer que les modifications de l'élasticité du ventricule gauche causées par la fibrose pourraient éventuellement mener à une dysfonction diastolique décrite précédemment. En effet, chez des patients hypertendus avec une ICPEP, les dysfonctions diastoliques les plus sévères sont associées à un processus fibrotique plus actif (Martos et al., 2007). Le développement et la progression de la fibrose atriale est aussi fortement associé à la fibrillation auriculaire. La prolifération des fibroblastes cardiaques et le dépôt de collagène dans l'atrium avec l'âge affecte les propriétés électrophysiologiques du myocarde et diminue le seuil de développement d'arythmies atriales (Steenman & Lande, 2017).

De plus, le vieillissement cardiaque est aussi associé à une augmentation de la réponse basale inflammatoire, responsable de l'apparition de ce remodelage cardiaque, et de l'activation des fibroblastes (M. Wang & Shah, 2015). Les macrophages, cellules phagocytaires immunitaires, pourraient être des contributeurs majeurs de ces processus. En effet, leur nombre au sein du tissu augmente lors du

vieillessement et produisent des molécules pro-inflammatoires telles que le $TNF\alpha$, l'IL-6, les MMPs et le MCP1. La production de MMP9 et de MCP1 par les macrophages sont tout 2 positivement corrélés avec le remodelage cardiaque induit par le vieillissement (Chiao et al., 2011; Ma, Mouton, & Lindsey, 2018).

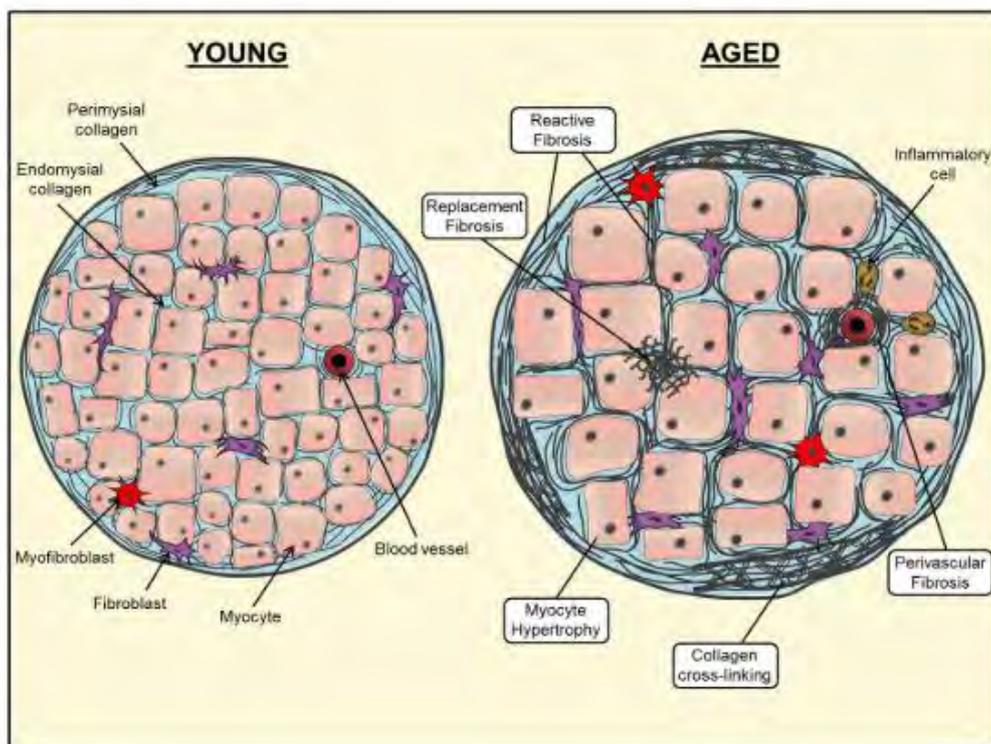


Figure 6 : Modifications cellulaires et de la matrice extracellulaire d'un cœur âgé (Horn & Trafford, 2016)

C. Vieillessement vasculaire

Au cours du vieillissement, l'aspect morphologique des artères change. Au niveau des grosses artères élastiques, le diamètre et la longueur du vaisseau tend à augmenter progressivement, indépendamment de la pression artérielle, pouvant induire une tortuosité artérielle (Wappler et al., 2013). Pour les petites artères, c'est l'épaisseur pariétale qui sera modifiée et qui entrainera une diminution du diamètre interne, sans modification du calibre externe. De façon générale, il est observé, avec l'âge, un épaississement de la paroi artérielle notamment au niveau de l'intima (Tedgui, 1993). Il est aussi constaté d'autres altérations pathologiques telles qu'une augmentation de la rigidité artérielle et une dysfonction endothéliale. Cliniquement, ces changements induisent une augmentation de la pression systolique et représentent un des facteurs de risque majeurs pour le développement de l'athérosclérose, l'hypertension, les accidents vasculaires et la fibrillation atriale (Lakatta & Levy, 2003)(North & Sinclair, 2012).

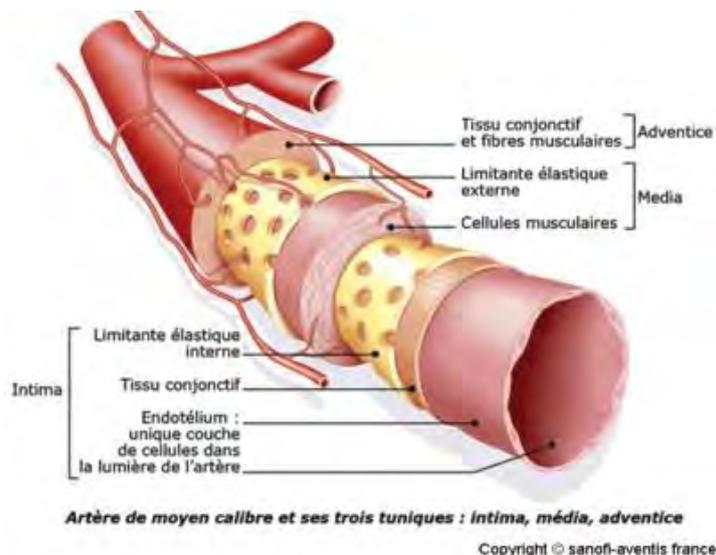


Figure 7 : Schéma d'un vaisseau sanguin

1. Rigidité artérielle :

L'épaississement de la paroi artérielle est accompagné d'une dilatation de la lumière vasculaire, d'une diminution de la compliance ou de sa capacité de distension et d'une augmentation de la rigidité artérielle. La vitesse de l'onde de pouls (ou Pulse wave velocity (PWV) en anglais) est l'index utilisé pour l'étude de la rigidité artérielle et se trouve augmentée lors du vieillissement. L'augmentation de la PWV est habituellement corrélée à des altérations de la paroi vasculaire avec une augmentation du collagène, une diminution de la teneur en élastine et des calcifications (Lakatta & Levy, 2003).

2. Epaississement de la paroi intimale :

L'épaississement de la paroi intimale est typiquement retrouvé dans les grosses artères comme l'aorte, tandis que dans les artères coronaires cet épaississement est plutôt excentrique et apparaît préférentiellement au niveau des bifurcations. C'est un phénomène lent et progressif lié à une hyperplasie des cellules musculaires lisses, mais aussi à une accumulation de fibres élastiques, de microfibrilles de collagène et de substance fondamentale. L'analyse de l'ultrastructure de l'intima a pu mettre en évidence la présence de glycosaminoglycanes (GAGs) associés à la membrane des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses de l'intima, qui reste très rare chez les sujets jeunes. L'accumulation au niveau de l'intima de cellules musculaires lisses s'accompagne d'un changement de leur phénotype avec passage d'un phénotype différencié à un phénotype sécrétoire ou synthétique. Ce dernier se caractérise par une augmentation de la capacité de prolifération, une susceptibilité à l'apoptose et une réponse accrue aux facteurs de croissance et pourrait rendre compte des modifications de la matrice extracellulaire observées avec l'âge (Orlandi, Bochaton-Piallat, Gabbiani, & Spagnoli, 2006).

3. Stress oxydatif et dysfonction endothéliale

La fonction des cellules endothéliales est déterminée par les changements du flux sanguin et du diamètre artériel en réponse à leur stimulation. De nombreuses études ont mis en évidence, avec l'âge, une diminution progressive de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Ces observations chez l'humain sont supportées par de nombreuses autres études de la réponse vasomotrice chez l'animal. Cette réponse est diminuée même sans modifications structurelles du vaisseau (Brandes, Fleming, & Busse, 2005). Par ailleurs, au cours du vieillissement, il apparaît une augmentation de la production de ROS (Reactive Oxygen Species) notamment due à une augmentation de l'activité NADPH oxydase qui conduit à une dysfonction endothéliale. L'oxyde nitrique (NO) est un des principaux facteurs de fonctionnement endothélial. L'augmentation du stress oxydant a pour conséquence une inactivation du NO qui se couple aux fortes concentrations d' O_2^- pour produire du peroxy-nitrite. De plus, l'enzyme productrice de NO dans les cellules endothéliales, la eNOS (endothelial Nitrite Oxyde Synthase) est aussi diminuée avec l'âge (Csiszar et al., 2002). Cela conduit à une dysfonction vasomotrice perturbant l'ajustement du flux sanguin en fonction des besoins en oxygène des tissus. De plus le NO produit par l'endothélium possède d'autres propriétés protectrices comme l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et du micro-environnement inflammatoire (inhibition de l'adhérence de cellules inflammatoires aux cellules endothéliales et de la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que de leurs voies de signalisation), la préservation des progéniteurs endothéliaux, et la régulation du métabolisme énergétique du tissu. D'autres études montrent que la diminution de la production endothéliale de NO au cours du vieillissement induirait l'apoptose des cellules endothéliales conduisant à une raréfaction de la micro-vascularisation (Ungvari, Kaley, De Cabo, Sonntag, & Csiszar, 2010; Vasa, Breitschopf, Zeiher, & Dimmeler, 2000).

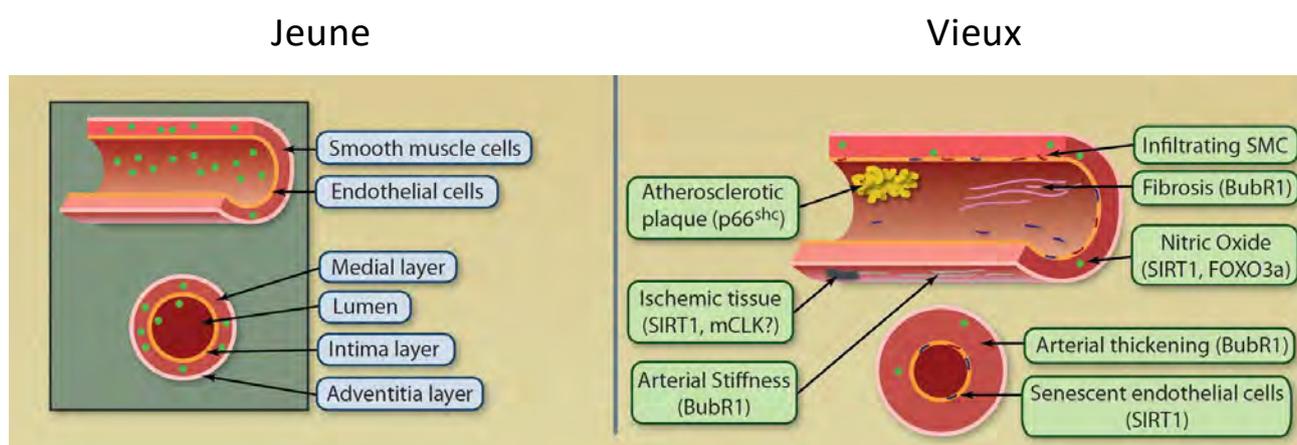
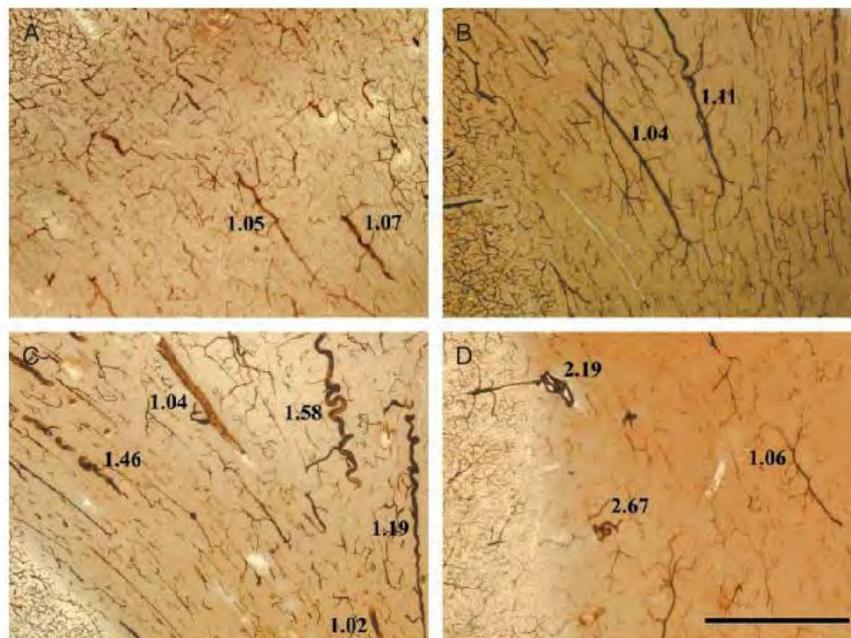


Figure 8 : Modifications des vaisseaux au cours du vieillissement vasculaire (North & Sinclair, 2012)

4. Modifications du réseau vasculaire

Outre ces modifications du vaisseau en lui-même, il existe aussi des modifications du réseau vasculaire avec le vieillissement. Il est plutôt admis dans la littérature qu'il existe un défaut d'angiogenèse avec l'avancée en âge (Lähteenvuo & Rosenzweig, 2012). L'angiogenèse est la capacité de l'organisme à former des vaisseaux de petits calibres à partir de vaisseaux existants. L'augmentation de l'incidence des pathologies ischémiques (AVC, infarctus du myocarde, claudication,...) chez les personnes âgées est le reflet de ce défaut d'angiogenèse. En effet, il y aurait moins de formation de nouveaux vaisseaux permettant de compenser ces pathologies ischémiques. De plus, il a été démontré chez l'Homme et chez la souris, que le vieillissement induisait une raréfaction de la densité capillaire (Gavin et al., 2007; Parízková, Eiselt, Sprynarová, & Wachtlová, 1971; Sadoun & Reed, 2003). Mais fait intéressant, les vaisseaux résiduels seraient de plus gros calibres, évoquant une modification du réseau vasculaire plutôt en faveur d'une artériogenèse, correspondant à la maturation et à la stabilisation des gros vaisseaux préexistants (Sadoun & Reed, 2003; Wappler et al., 2013).

Pour finir, les modifications de ce réseau vasculaire passeraient aussi par une augmentation de la longueur et de la tortuosité des vaisseaux de petits calibres (Han, 2012). Par exemple, dans une étude anatomopathologique de cerveaux de patients jeunes, âgés ou avec des démences tels que Alzheimer, on retrouve un plus grand nombre de vaisseaux présentant de fortes courbures chez les patients âgés ou déments (Thore et al., 2007). De plus, des études coronarographiques ont montré que la tortuosité des vaisseaux serait un indicateur du remodelage se produisant après un infarctus. Plus l'occlusion est ancienne plus les vaisseaux sont gros et tortueux (Hutchins, Miner, & Bulkley, 1978). L'apparition de cette tortuosité avec l'âge peut être un signe d'un réseau dysfonctionnel et d'une angiogenèse inefficace. Ce remodelage et cet accroissement de la tortuosité vasculaire est fortement lié à l'apparition ou l'existence de nombreuses pathologies dont certaines sont des pathologies liées à l'âge, telles que la dysfonction ventriculaire, l'infarctus du myocarde, le diabète de type 2,... (Han, 2012).



A : 25 ans, B : 57 ans, C : 61ans et D : 87 ans

Figure 9 : Tortuosité vasculaire du tissu cérébral de patients jeunes et âgés (échelle = 200 μ m) (Thore et al., 2007)

II. Sénescence

La sénescence dérive du mot latin *senex*, signifiant « vieil homme » ou « grand âge ». En biologie, la sénescence est décrite comme un arrêt stable du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

A. Marqueurs de la sénescence

Il existe un grand nombre de modifications et de marqueurs reconnus associés à la sénescence, tels que des modifications morphologiques, un phénotype sécrétoire et un arrêt du cycle cellulaire. Le problème aujourd'hui est que la plupart des marqueurs associés à la sénescence sont largement mais non uniformément retrouvés dans les cellules sénescents, et ne sont pas toujours spécifiques de ce phénomène. De plus, ces marqueurs ont souvent été établis sur des cellules en culture, et il est parfois difficile de les retrouver lors d'une sénescence *in vivo*. La caractérisation des cellules sénescents *in vivo* est d'autant plus complexe que les marqueurs de sénescence peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre et évoluer au cours du temps. Du fait de ces phénotypes hétérogènes, il est indispensable de combiner l'expression de multiples marqueurs pour définir cet état de sénescence (Sharpless & Sherr, 2015). Dans ce paragraphe seront développés les différents marqueurs aujourd'hui reconnus et utilisés pour définir une cellule sénescence.

1. Modifications morphologiques des cellules

L'apparition d'un programme de sénescence s'accompagne d'une modification morphologique des cellules, celles-ci s'élargissent, s'aplanissent, se vacuolisent et présentent une accumulation de granules de stress (Kuilman, Michaloglou, Mooi, & Peeper, 2010; Rodier & Campisi, 2011). Cette augmentation de la taille fut décrite pour la première fois par Hayflick and Moorhead dans leurs travaux sur la sénescence répliquative en 1961 (Hayflick & Moorhead, 1961). Ces modifications morphologiques pourraient être expliquées par l'association d'un arrêt du cycle cellulaire et l'augmentation ou la présence de signaux de croissance cellulaire. La cellule active des voies de croissance sans parvenir à se diviser, elle s'hypertrophie et devient hyperactive augmentant alors sa production d'ARN et de protéines (propriétés développées plus loin) (Blagosklonny, 2003).

2. Arrêt du cycle cellulaire et protéines inhibitrices du cycle

a) Arrêt du cycle cellulaire

Un des premiers marqueurs de la sénescence cellulaire à avoir été décrit est l'arrêt du cycle cellulaire. Or dans un organisme adulte et sain, la plupart des cellules ne prolifèrent pas, mais ne sont pas pour autant sénescents. Il faut donc distinguer 2 types d'arrêt du cycle cellulaire : la quiescence et la sénescence.

La quiescence est un état d'arrêt transitoire du cycle cellulaire, pouvant être dû à un manque de facteurs de croissance et de nutriments. Les cellules diminuent alors leur métabolisme, leur synthèse protéique ainsi que leurs fonctions cellulaires. Cet arrêt est réversible en réponse à un signal mitogénique avec la reprise d'un cycle cellulaire normal. Généralement cet état de quiescence est caractérisé par un arrêt en phase G0 (Sharpless & Sherr, 2015).

L'arrêt du cycle cellulaire d'une cellule sénescente survient malgré la présence de facteurs de croissance et de nutriments, et est causé par l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire, les CDKIs (Inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines) tels que p21^{CIP1}, p16^{INK4a}, ou p57^{Kip2} (Jia et al., 2015; Sharpless & Sherr, 2015). Contrairement à la quiescence, cet arrêt est permanent, car ces cellules ne répondent plus aux stimuli mitogéniques physiologiques (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). L'arrêt du cycle cellulaire se produit le plus souvent en phase G1, voire parfois en phase G2 (Blagosklonny, 2003). Les cellules sénescents expriment en même temps des facteurs mitogéniques et anti-mitogéniques (Blagosklonny, 2011).

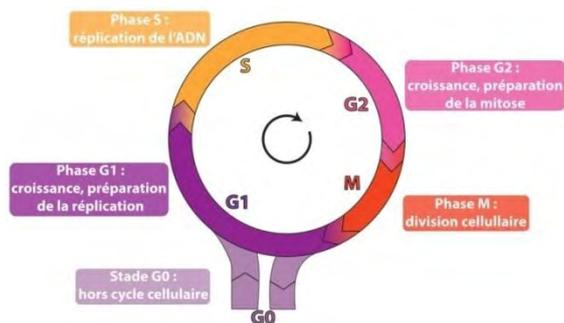


Figure 10 : Schéma du cycle cellulaire (“La régulation du cycle cellulaire : introduction générale | RN’ Bio,” n.d.)

Selon les différents stimuli inducteurs de sénescence, deux voies de signalisation principales peuvent être activées, simultanément ou non, aboutissant à cet arrêt du cycle cellulaire. La voie de réponse aux dommages à l'ADN (ou DDR pour DNA Damage Response) entraîne l'activation de la voie p53/p21^{CIP1}, alors que la voie p16^{INK4a} sera elle initiée par activation du locus INK4/ARF (Herranz & Gil, 2018). Cependant, les mécanismes précis d'activation de ce locus restent aujourd'hui encore vagues, pouvant faire intervenir des complexes répresseurs de polycomb (PRC1 et PRC2) ou des régulations épigénétiques. Malgré tout, les stimuli communs, tels que les oncogènes, le raccourcissement télomérique ou le stress oxydant peuvent activer l'expression de la voie du p16^{INK4a} (Herranz & Gil, 2018).

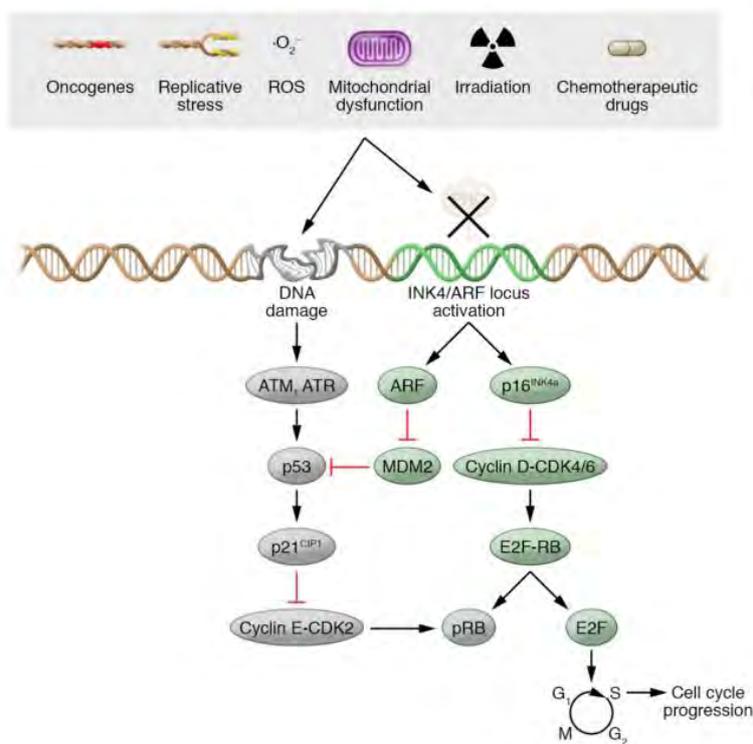


Figure 11 : Voies moléculaires contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire au cours de la sénescence (Herranz & Gil, 2018)

b) Voie du p16^{INK4a}/pRB

Cette voie repose notamment sur l'expression du locus INK4a/ARF, situé chez l'homme sur le chromosome 9p21.3 et mesurant 35kb. Ce complexe génétique comprend 3 gènes CDKN2A, CDKN2B et ARF, codant respectivement pour 2 inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKIs) p16^{INK4a} et p15^{INK4b}, et la protéine p14/p19^{ARF}. P16^{INK4a} est une petite protéine possédant un rôle d'inhibiteur du cycle par liaison aux kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6) bloquant ainsi leur activité. Cette inhibition empêche la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB) piégeant ainsi E2F, facteur de transcription permettant l'expression de gènes du cycle cellulaire et le passage de la phase G1 en phase S (Figure 12). Les cellules sont alors bloquées en phase G1 du cycle cellulaire (N. Martin, Beach, & Gil, 2014).

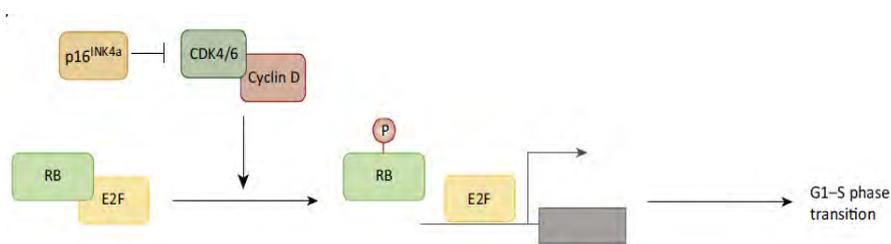


Figure 12 : Mécanisme d'action du p16^{INK4a} en tant que CKI (N. Martin et al., 2014)

Des études ont suggéré que p16^{INK4a} est un régulateur clé de la sénescence dans la plupart des cellules humaines. Par exemple dans les cultures primaires de fibroblastes humains, la sénescence répliquative conduit à la combinaison d'un raccourcissement des télomères ainsi à qu'une dé-répression du locus INKA4/ARF, induisant alors l'expression de p16^{INK4a}. Par ailleurs, dans la majorité des types cellulaires humains, la sénescence répliquative est caractérisée par l'augmentation progressive de l'expression de p16^{INK4a} durant les divisions cellulaires aboutissant à un arrêt du cycle. Par conséquent, on peut conclure que p16^{INK4a} a un rôle clé dans la mise en œuvre d'une sénescence en réponse à une répliquative excessive ou en réponse à d'autres stress (N. Martin et al., 2014). En plus de sa fonction de régulateur de sénescence et du cycle cellulaire dépendant des CDK4/6, d'autres fonctions ont pu être décrites pour p16^{INK4a}. Par exemple, elle peut induire la répression de gène hTERT, qui code pour la sous unité catalytique de la télomérase. Il a été également montré dans des cellules épithéliales mammaires humaines, que l'expression de p16^{INK4a} induisait la mise sous silence du promoteur hTERT par la triméthylation d'une histone (H3K27) (Bazarov et al., 2010). C'est aussi le cas pour d'autres CKIs tels que p21^{CIP1} ou p27^{Kip1} qui possèdent des propriétés de régulateurs de la transcription par liaison directe à la chromatine, notamment pour le facteur de transcription SOX2 (H. Li et al., 2012; Marqués-Torrejón et al., 2013).

c) Voie p53/p21^{CIP1}

Les activateurs les plus connus de la voie du p53/p21^{CIP1} sont généralement les stimuli générant des dommages à l'ADN induisant une réponse à ces dommages ou DDR (DNA Damage Response). Les radiations ionisantes ou le stress oxydant en sont des exemples, permettant l'induction d'une sénescence, et l'arrêt du cycle cellulaire (Fagagna et al., 2003; Wahl & Carr, 2001). Cette voie peut être activée par de nombreux autres stimuli, comme les oncogènes ou l'attrition télomérique (Kuilman et al., 2010). La protéine p53 est un facteur de transcription tétramérique, fortement régulé par des modifications post traductionnelles (J. H. Jung et al., 2011; Toledo & Wahl, 2006). En effet, elle possède 23 sites de phosphorylation déphosphorylation différents, ainsi que des sites d'ubiquitylation, d'acétylation, de méthylation, ... (Toledo & Wahl, 2006). Ces multiples modifications post traductionnelles pourraient expliquer la multitude de fonctions physiologiques impliquant p53, comme par exemples dans le développement, la reproduction, le métabolisme et la longévité (Rufini, Tucci, Celardo, & Melino, 2013).

Dans des conditions normales sans stress, la protéine p53 est ubiquitylée par une E3 ubiquitine protéine ligase (MDM2), induisant alors sa dégradation. Sous conditions de stress, tels que les dommages à l'ADN, la protéine ARF (alternative-reading-frame protéine) inhibe MDM2 et empêche ainsi l'ubiquitylation de la protéine et induit son accumulation (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). En fonction du type de stimulus, les kinases ATM/ATR phosphorylent la protéine p53 qui pourra alors être transloquée dans le noyau et exercer son activité transcriptionnelle, ou interagir directement dans le cytosol avec des protéines anti-apoptotiques tels que BCL-2 ou BCL-XL et induire alors une apoptose (Bode & Dong, 2004). Un des premiers gènes cibles identifié de p53 est p21^{CIP1}, une CDKI de la famille des CIP/KIP induisant l'arrêt du cycle cellulaire, par inhibition d'un très large spectre de CDKs à toutes les phases du cycle (Y. S. Jung, Qian, & Chen, 2010).

Cette voie est souvent retrouvée augmentée lors de la sénescence et son implication dans ce processus a beaucoup été étudiée. En effet, la perte de fonction de p53 peut retarder ou abroger la sénescence répliquative des cellules humaines (Itahana, Dimri, & Campisi, 2001) voir même la reverser, induisant alors une reprise des divisions mitotiques jusqu'à atteindre un état d'instabilité génomique aigue (Beauséjour et al., 2003). De plus, l'absence de p21^{CIP1} dans des fibroblastes embryonnaires de souris induit l'incapacité de ces cellules à subir un arrêt du cycle cellulaire en G1 après des dommages à l'ADN (Brugarolas et al., 1995). Bien que p21^{CIP1} contribue à l'arrêt du cycle cellulaire des cellules sénescents, il est peu probable qu'il soit entièrement responsable de l'ensemble des changements liés à la sénescence (Rufini et al., 2013). De plus, il pourrait participer tout comme p53 à de nombreux autres phénomènes physiologiques (Y. S. Jung et al., 2010).

3. Activité β -galactosidase associée à la sénescence

En 1995, il a été découvert que les cellules sénescents exprimaient une activité β -galactosidase particulière à pH 6.0, appelée Senescence Associated β -galactosidase activity ou SA- β gal. Etant facilement détectable, elle devient un des principaux marqueurs des cellules sénescents. Cependant, il existe déjà une activité β -D-galactosidase dans les cellules des tissus sains, à l'intérieur des lysosomes, se produisant à un pH optimal de 4.0. Une des méthodes utilisées pour détecter l'activité SA- β gal utilise un substrat chromogénique le 5-bromo-4-chloro-3-indoyl β -D-galactopyranoside (X-gal) qui lorsqu'il est clivé par l'enzyme produit un composé insoluble bleu. Cette activité SA- β gal peut être spécifiquement testée en mesurant l'activité enzymatique à pH 6.0.

En 1995, on ne savait pas si la SA- β gal était une enzyme distincte qui était induite durant la sénescence et active à pH 6.0, ou si elle était la conséquence de l'augmentation de l'expression et/ou de l'altération de l'activité lysosomale de la β -galactosidase. En 2000, il a été démontré que cette activité SA- β gal était due à une augmentation de l'abondance des enzymes lysosomales probablement liée à l'augmentation de la biogenèse lysosomale observée dans les cellules sénescents (Kurz, Decary, Hong, & Erusalimsky, 2000). En 2006, Lee et al confirment l'origine lysosomale de l'activité SA- β gal, en montrant qu'elle est le résultat de l'augmentation de l'expression de *GLB1*, un gène classique des enzymes des lysosomes (B. Y. Lee et al., 2006). Lors de la sénescence, l'activité SA- β gal augmente en réponse à l'accumulation de molécules endommagées non dégradables dans les lysosomes secondaires, induisant alors une augmentation des ARNm de *GLB1* et de sa protéine. Par conséquent, bien que le pH optimal pour l'activité de la β -D-galactosidase est de 4.0, l'importance de l'augmentation de l'activité lysosomale lors de la sénescence est suffisante pour être détectée à pH 6.0. Aujourd'hui, il n'existe pas d'évidence de l'implication physiologique de cette enzyme dans le mécanisme de sénescence (Kuilman et al., 2010). Il existe tout de même des limitations à ce test, bien que l'activité SA- β gal soit associée à la sénescence, elle est aussi retrouvée dans d'autres circonstances. Par exemple, des cellules confluentes peuvent l'exprimer, tout comme des cellules différenciées telles que les mélanocytes. Il est important de noter, qu'elle n'est pas détectée dans les cellules en quiescence ou dans la plupart des cellules en différenciation terminale (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky, Campisi, & Toussaint, 2009).

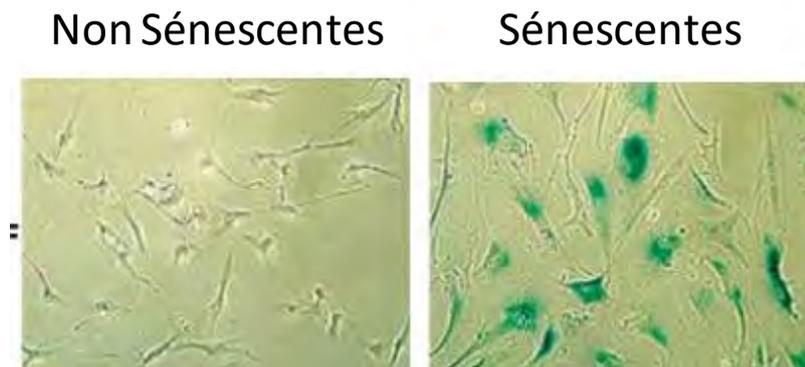


Figure 13 : Marquage SA-βgalactosidase sur des fibroblastes humain (B. Y. Lee et al., 2006)

4. Modification de la chromatine : SAHFs et dommages à l'ADN

La sénescence peut être également associée à des modifications nucléaires comme l'apparition de foci d'hétérochromatine : les SAHFs (Senescence associated Heterochromatine Foci) (Narita et al., 2003). Ces foci possèdent des modifications protéiques spécifiques pouvant être mises en évidence par un marquage nucléaire tel que le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Après coloration, ces foyers d'hétérochromatine apparaissent en taille et en forme similaires au chromosome X inactif trouvé dans les cellules XX (corpuscule de Barr). Le rôle de ces SAHFs serait de réprimer l'expression de gènes cibles du facteur de transcription E2F et de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ces foci se formeraient relativement tardivement au cours de la sénescence, ne seraient pas présents dans toutes les cellules sénescents ni dans tous les types cellulaires et ne seraient pour le moment pas décrits *in vivo* (Swanson, Rapkin, Bazett-Jones, & Lawrence, 2015). Ce serait donc plus un marqueur d'activation oncogénique ou de sénescence induite par les oncogènes, qu'un marqueur de sénescence en général (Kosar et al., 2011; Rayess, Wang, & Srivatsan, 2012).

D'autres foci, plus associés à la sénescence, sont détectables chez la souris ou l'Homme. Ces foci sont associés aux dommages à l'ADN, et sont localisables grâce à 2 protéines : le γH2AX et p53-binding protein 1 (53BP1) (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). La forme phosphorylée de l'histone H2AX (γH2AX) est impliquée dans le recrutement de facteurs de réparation de l'ADN. Le γH2AX est utilisé comme marqueur de cassures double brin qui augmentent dans les cellules sénescents de nombreux tissus (A. J. Nakamura et al., 2008). La protéine 53BP1 est un régulateur clé de la réparation des cassures doubles brins, permettant d'orienter le choix de la voie de réparation utilisée.

5. Raccourcissement télomérique et dysfonction

Comme décrit précédemment, Hayflick en 1961 a mis en évidence pour la première fois la sénescence répliquative. Une des explications à cette capacité limitée de prolifération des cellules lors de cette

sénescence est le raccourcissement télomérique qui induit une instabilité génétique (Olovnikov, 1996). Les télomères sont localisés à l'extrémité des chromosomes et sont formés de la répétition de séquences TTAGGG assurant leur stabilité. Ces télomères ne sont pas linéaires mais forment, grâce à leur extrémité 3' simple-brin, une structure en épingle à cheveux appelée « t-loop », stabilisée par un complexe protéique dénommé « complexe shelterin » composé de 6 protéines dont TRF1 et TRF2 (Palm & de Lange, 2008). L'ADN polymérase ne possède pas la capacité de répliquer la partie terminale simple brin des molécules d'ADN, c'est pourquoi au cours des divisions cellulaires la réplication des télomères ne se fait pas en totalité induisant la perte progressive de la séquence terminale protectrice (Harley, Futcher, & Greider, 1990). Cette perte d'ADN peut être compensée par l'activation d'une polymérase spécifique appelée télomérase, permettant alors le maintien de leur longueur (Greider & Blackburn, 1985). La plupart des cellules somatiques des mammifères n'expriment pas cette enzyme, seules les cellules germinales possèdent cette activité et sont donc protégées de la sénescence induite par le raccourcissement des télomères. De nombreuses études ont pu mettre en évidence que la réintroduction de la sous unité catalytique de la télomérase (hTERT) permet l'immortalisation des cellules comme les fibroblastes humains (Bodnar, 1998). Ces modifications au niveau des télomères induisent l'activation d'une DDR et ainsi une entrée en sénescence. Il faut aujourd'hui distinguer 2 mécanismes d'induction de la DDR au niveau des télomères. Le premier est lié à l'attrition télomérique qui par déstabilisation et/ou perte du complexe shelterin ne protège plus les extrémités libres des télomères alors reconnues comme des cassures doubles brins activant la DDR et la voie du p53 (D'Adda Di Fagagna, Teo, & Jackson, 2004; Fagagna et al., 2003; Passos, Simillion, Hallinan, Wipat, & Von Zglinicki, 2009). Le second mécanisme est lié à la présence de cassures doubles brins au niveau des télomères. A cause des faibles possibilités de réparation d'ADN, du fait de la présence du complexe shelterin qui empêche l'accès des protéines réparatrices de l'ADN, les dommages aux télomères sont persistants et activent la voie de la DDR et l'entrée en sénescence (Fumagalli et al., 2012).

De nombreuses études ont pu mettre en évidence une relation étroite entre la perte télomérique, la sénescence cellulaire et le vieillissement physiologique chez l'homme et la souris (Blasco, 2007). Par exemple, des souris avec de courts télomères ont une espérance de vie diminuée, et inversement, de longs télomères permettraient d'augmenter la longévité des souris (Armanios et al., 2009; Tomás-Loba et al., 2008).

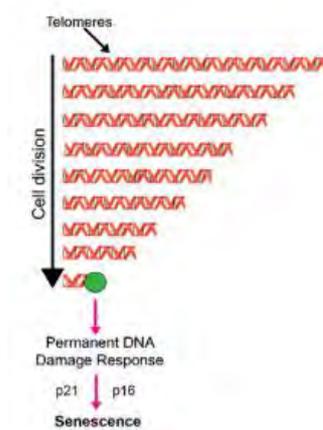


Figure 14 : Raccourcissement télomérique au cours des divisions cellulaires et induction de la sénescence
(Vitorelli & Passos, 2017)

6. Senescence Associated Secretory Phénotype (SASP)

La sénescence était initialement considérée comme un programme intrinsèque à la cellule. Mais de nombreux travaux ont démontrés que les cellules sénescents ont les capacités d'influencer leur microenvironnement. Bien qu'en arrêt de cycle cellulaire, une cellule sénescents reste tout de même métaboliquement active et subit de nombreux changements dans l'expression et la sécrétion protéique permettant l'acquisition d'un nouveau phénotype sécrétoire appelé SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype). Ce SASP est une des principales caractéristiques permettant de distinguer les cellules sénescents des cellules quiescentes ou pré-sénescents.

a) Caractéristiques du SASP

L'apparition du SASP représente une des caractéristiques majeures des cellules sénescents. Il est caractérisé par la production de cytokines, chimiokines, protéases et facteurs de croissance. La sécrétion de ces nombreuses protéines permet de moduler le microenvironnement et peut impacter positivement ou négativement de nombreux processus physiologiques impliquant une signalisation paracrine comme par exemple la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'inflammation, la transition épithélio-mésenchymateuse, la cicatrisation cutanée ou d'autres processus de réparation tissulaire (J.-P. Coppé, Desprez, Krtolica, & Campisi, 2010a; J.-P. Coppé et al., 2008; Demaria et al., 2014). De plus, certains éléments du SASP tels que Cyr61 ou l'IL-1 α , peuvent propager la sénescence aux cellules voisines (sénescence paracrine). Cette boucle amplificatrice augmenterait le nombre de cellules sénescents au sein d'un tissu et l'inflammation associée à ce SASP participerait à la progression de maladies chroniques (Tchkonia, Zhu, Deursen, Campisi, & Kirkland, 2013). Par ailleurs, la composition de ce SASP n'est pas fixe, elle peut varier en fonction du temps (sécrétion transitoire de certains facteurs), du type cellulaire, mais aussi des différents inducteurs de sénescence

(Hernandez-Segura et al., 2017; Wiley et al., 2016). Cette plasticité dans la composition du SASP, pourrait prédire la variabilité de son impact sur les différents processus biologiques par les différents types de cellules sénescentes. Les cytokines pro-inflammatoires et les chimiokines, sont parmi les composants les plus conservés entre les différents types cellulaires et les inducteurs de sénescence, suggérant que l'attraction des cellules immunes et les inducteurs locaux d'inflammation sont des propriétés communes des cellules sénescentes. Néanmoins, l'accumulation de cellules sénescentes n'est pas toujours accompagnée d'une infiltration de cellules immunes et d'inflammation, comme par exemple dans le nævus mélanocytaire (van Deursen, 2014).

Le SASP peut être considéré comme un élément de la DDR. En effet, la production d'un SASP apparaîtrait lorsqu'il y a une accumulation et une persistance de dommages à l'ADN. En 2011, Coppé et al. (J. P. Coppé et al., 2011) ont démontré que des fibroblastes humains surexprimant p16^{INK4a} ou p21^{CIP1} mais ne pouvant pas activer la voie de la DDR, ne produisaient pas de SASP. Cependant, d'autres stimuli peuvent induire une sénescence et la production d'un SASP indépendamment des dommages à l'ADN, comme par exemple dans certains modèles oncogéniques, suggérant aussi l'existence de mécanismes inducteurs du SASP indépendants de la DDR (Bielak-Zmijewska, Mosieniak, & Sikora, 2017; Kuilman et al., 2010; van Deursen, 2014).

b) Régulation de la production du SASP

Le SASP est très hétérogène (Hernandez-Segura et al., 2017) et peut être induit et régulé par de nombreux facteurs. La principale source du SASP provient du programme transcriptionnel dépendant du facteur de transcription NF- κ B. Le déclencheur majeur de ce programme de transcription est la DDR, mais d'autres initiateurs sont aussi connus, comme la voie de l'IL1R, la voie mTOR ou plus récemment la voie cGAS/STING (Orjalo, Bhaumik, Gengler, Scott, & Campisi, 2009; Yang, Wang, Ren, Chen, & Chen, 2017). Par ailleurs, l'activation du CCAAT/enhancer-binding protein- β (C/EBP β) est aussi impliquée dans la production de ce SASP. L'activation des voies NF- κ B et C/EBP β conduisent à la production d'IL-8 et d'IL-6 qui en retour agissent comme une boucle autocrine d'amplification permettant l'activation de ses propres facteurs de transcription et ainsi enrichir la production du SASP (Jeon et al., 2017; Ovadya & Krizhanovsky, 2018).

La cytokine pro-inflammatoire IL-1 α agit comme un régulateur majeur et initiateur de ce SASP (Acosta et al., 2013). Lorsqu'elle se lie à son récepteur, elle induit l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et ainsi la boucle de production du SASP. L'inhibition de cette voie de signalisation, par inhibition du récepteur, suffit à réduire la production d'IL-6 et d'IL-8 dans des modèles de SIPS *in vitro* (Freund, Orjalo, Desprez, & Campisi, 2010; Orjalo et al., 2009).

Récemment, l'inflammasome, complexe protéique oligomérique impliqué dans l'immunité innée, conduit à l'activation de la caspase-1 qui permet le clivage et l'activation de l'IL-1 β . Cette production d'IL-1 β participe aussi à la production d'un SASP (Acosta et al., 2013).

Pour finir, il existe aussi de nombreuses régulations au niveau épigénétique. Par exemple, l'inhibition de MLL1 (mixed-lineage leukemia 1), molécule critique pour l'expression de gènes régulant la prolifération cellulaire lors d'une DDR, diminue la production de cytokines. En effet, cette histone méthyl transférase est nécessaire au maintien de la boucle d'amplification positive du SASP. Par ailleurs, la régulation du domaine BRD4 (bromodomain-containing protein 4) peut aussi moduler ce sécrétome par liaison directe à des régions amplificatrices à proximité de gènes pivots du SASP, amplifiant alors la transcription et la production de ces différentes cytokines/chimiokines (Hernandez-Segura et al., 2018; Watanabe, Kawamoto, Ohtani, & Hara, 2017).

c) Composition du SASP

Ce SASP peut globalement être divisé en 3 catégories :

- Les facteurs solubles de signalisation : interleukines, chimiokines et facteurs de croissance
- Les protéases sécrétées
- Les facteurs régulateurs du SASP

i. Facteurs solubles de signalisation

Ces facteurs comprennent les interleukines, chimiokines et les facteurs de croissance. Ces facteurs initient généralement leurs fonctions en se liant à leur récepteur respectif exprimé à la surface des cellules cibles permettant l'activation des voies de signalisation.

Les interleukines sont des cytokines (soit des facteurs solubles de signalisation intercellulaire) agissant sur le système immunitaire, soit en l'activant ou l'inhibant. Les interleukines les plus connues dans la sénescence sont l'IL-6, l'IL-8 (chez l'Homme), et l'IL-1 α (J.-P. Coppé et al., 2010a; Tchkonja et al., 2013).

Les chimiokines permettent, grâce à leur gradient de concentration, de recruter des cellules du système immunitaire dans les cas les plus fréquents, tels que les lymphocytes, les macrophages ou les neutrophiles par activation des récepteurs aux chimiokines. L'étude du SASP a permis d'identifier de nombreuses chimiokines sécrétées par les cellules sénescents telles que GRO α (CXCL-1), GRO β (CXCL-2), MCP-1 (CCL-2), RANTES (CCL-5), HCC-4 (CCL-16), l'eotaxin-3 (CCL-26), and MIP-3 α (CCL-20) (J.-P. Coppé et al., 2010a).

Le SASP de diverses cellules sénescents contient également de nombreux facteurs de croissance tels que le HGF, le FGF2, le TGF β 1, l'IGF-1, le VEGF et le GM-CSF. La cellule cible exprimant les récepteurs de ces facteurs peut être la cellule sénescence elle-même, conduisant à l'aggravation de la progression de la sénescence, ou des cellules normales environnantes, qui pourront être modifiées.

ii. Protéases sécrétées

De nombreuses metalloprotéinases (MMPs) appartiennent à ce groupe. Par exemple la stromelysine 1 et 2 (MMP3 et 10) et la collagénase (MMP1), sont augmentées dans des cellules sénescents. Une autre famille de protéases est produite lors de la sénescence, les sérines protéases : urokinase-type ou tissue-type plasminogène activateurs (uPA, tPA). Leur action directe passe par leur activité protéolytique, dont les substrats majoritaires sont les protéines de la matrice extracellulaire, pouvant alors induire une dégradation ou une modification de cette matrice.

iii. Facteurs régulateurs du SASP

Les membres de ce groupe comprennent les TIMPs, PAIs, et IGFbps. Ces facteurs n'ont pas d'activité enzymatique ou d'activation de voies de signalisation *per se*, mais ils modulent les activités des autres composants du SASP. Les TIMPs inhibent les MMPs, et sont connus pour être fortement induits en réponse à des cytokines ou des hormones, suggérant alors que l'augmentation de leur expression dans les cellules sénescents pourrait être le résultat d'une activité autocrine des cytokines du SASP.

PAI1 fait partie de la famille des inhibiteurs des sérines protéases (serpin), il est aussi connu sous le nom de SERPINE1. C'est l'inhibiteur majeur des tPA et uPA, régulant la fibrinolyse, mais il bloque aussi l'activité de MMPs.

Les IGFbps se comportent comme des protéines de transport pour l'IGF, et leur interaction avec l'IGF-1 modifie sa biodisponibilité et limite l'activation des voies de signalisation dépendante d'IGF-1R (D'Amario, Cabral-Da-Silva, et al., 2011).

7. Modifications mitochondriales

Les cellules sénescents présentent des modifications mitochondriales pouvant elles même entretenir l'apparition de cette sénescence. Il est constaté au cours de la sénescence, une accumulation de mitochondries défectueuses avec une diminution du potentiel membranaire qui conduit à la libération d'enzymes mitochondriales, telles que l'endonucléase G et une intensification de la production de ROS (Passos et al., 2007). Une des raisons principales de cette accumulation de mitochondries dysfonctionnelles est la réduction ou un défaut de la mitophagie, qui permet le recyclage des mitochondries endommagées (Korolchuk, Miwa, Carroll, & von Zglinicki, 2017). Ce défaut est dû en partie à la réduction de la fission mitochondriale et à l'augmentation de leur fusion (Dalle Pezze et al., 2014). Ce mécanisme pourrait participer à la protection des cellules sénescents vis-à-vis de l'apoptose. Une étape majeure menant à la fission mitochondriale est le recrutement et la translocation de la protéine parkin dans les mitochondries endommagées. Il a été découvert que p53 interagissait avec parkin permettant d'inhiber sa translocation dans les mitochondries endommagées des cardiomyocytes sénescents induits par la doxorubicine (Hoshino

et al., 2013). Une étude récente a également montré l'implication de cette régulation de parkin par p53 dans un modèle de sénescence induite par l'activation d'une enzyme mitochondriale pro-oxydante (MAO-A) dans des H9C2 et des cardiomyocytes nouveaux-nés. Ce modèle induit l'accumulation de p53 au niveau du cytosol qui peut alors se lier à la protéine parkin et inhiber la mitophagie, entraînant alors une sénescence induite par dysfonction mitochondriale (Manzella et al., 2018).

Par ailleurs, Il est peu probable que la biogenèse mitochondriale joue un rôle significatif dans l'augmentation du contenu mitochondrial durant la sénescence. Les cellules sénescents ne présentent qu'une régulation transitoire positive de PGC-1 α et PGC-1 β , deux régulateurs importants de la biogenèse mitochondriale, suivie d'une régulation négative (Hernandez-Segura et al., 2018).

Il a récemment été établi que cette dysfonction mitochondriale induisait l'apparition d'un phénotype sécrétoire (Wiley et al., 2016), caractérisé par la production d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire), mais pas d'IL-6 (une des cytokines majoritaires du SASP), nommé MiDAS (Mitochondrial dysfunction-associated senescence).

D'autres arguments permettant de lier une dysfonction mitochondriale à la sénescence ont pu être établis par une déplétion mitochondriale des cellules. Cette déplétion empêche le développement d'une sénescence, par diminution des phénotypes pro-inflammatoires et pro-oxydants, et par diminution de l'expression des CDKs p21^{CIP1} et p16^{INK4a}. Cependant, il y a un maintien de l'arrêt du cycle cellulaire et une résistance à la tumorigénèse (Correia-Melo et al., 2016).

On peut donc conclure, que le lien entre mitochondries et apparition d'une sénescence est largement associé à son rôle dans la génération de dommages à l'ADN lié à la production de ROS. L'impact d'un stress oxydant sur le développement d'une sénescence sera décrit plus en détail dans un des paragraphes suivants.

8. Résistance à l'apoptose

Lorsqu'une cellule est endommagée, différentes réponses sont possibles en fonction de la gravité de ces dommages. Si les dommages à l'ADN sont peu importants, l'inhibition du cycle cellulaire est transitoire et les processus de réparation sont suffisamment efficaces pour permettre à la cellule de repartir dans le cycle. Si les dommages sont trop importants, la réparation de l'ADN ne pourra pas être effective, et dans ce cas, la cellule va entrer en apoptose. Lorsque les dommages sont trop grands pour une réparation, mais pas assez pour enclencher l'entrée en apoptose, le cycle cellulaire sera inhibé et la cellule entrera en sénescence. On peut donc voir ici, que sénescence et apoptose sont 2 destins possibles pour une cellule. De façon intéressante, il a été découvert que de nombreux types cellulaires acquièrent une résistance face à certains signaux pro-apoptotiques lorsqu'ils deviennent sénescents, empêchant alors leur élimination des tissus (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). La résistance des cellules sénescents aux signaux pro-apoptotiques est variable en fonction du type cellulaire et du signal inducteur. Par exemple, les fibroblastes humains

sénescents résistent à l'apoptose causée par l'absence de facteurs de croissance ou par un stress oxydant, mais ne résistent pas à ceux induit par un engagement de la voie Fas (Q. M. Chen, Liu, & Merrett, 2000; Tepper, Seldin, & Mudryj, 2000). D'un point de vue moléculaire, cette résistance à l'apoptose peut être expliquée par 2 mécanismes : une modification des effecteurs de la voie de signalisation p53-dépendante, et/ou une surexpression de protéines de survie de la famille de Bcl-2 (B. G. Childs, Baker, Kirkland, Campisi, & van Deursen, 2014).

En 2001, Seluanov *et al*, par stimulation de fibroblastes humains jeunes ou sénescents avec différents stress génotoxiques montrent que les fibroblastes jeunes entrent en apoptose par des voies p53 dépendantes ou indépendantes, alors que les fibroblastes sénescents n'entrent en apoptose que par des voies p53 indépendantes, et que l'activation des voies p53 dépendantes induisent une entrée en nécrose. De plus, une expression exogène de p53 dans ces fibroblastes sénescents, restaurerait leur capacité à entrer en apoptose de façon p53-dépendante. Ces résultats indiquent qu'au cours de la sénescence, la voie de signalisation de p53 est modifiée et induirait alors une augmentation d'une réponse nécrotique face aux stimuli p53-dépendant (Seluanov et al., 2001).

Un autre mécanisme de résistance des cellules sénescentes à l'apoptose est la surexpression de molécules anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Yosef et al., 2016). Les protéines les plus connues sont Bcl-2, Bcl-W et Bcl-XL. Ces protéines se retrouvent le plus souvent à la membrane mitochondriale et parfois dans le cytosol. Leur mode d'action passe par l'inhibition directe de protéines effectrices pro-apoptotiques Bax et Bak, et celles de la famille BH3-only, permettant de contrôler la perméabilité de la membrane externe mitochondriale et la libération d'autres protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome C (Cory, Huang, & Adams, 2003).

B. Les sénescences

1. Sénescence répllicative

En 1961, L. Hayflick a observé sur des cultures primaires de fibroblastes humains, après un certain nombre de divisions cellulaires, un arrêt de leur prolifération, malgré la présence de nutriments et de facteurs de croissance (Hayflick & Moorhead, 1961). Ces cellules ne peuvent donc pas proliférer indéfiniment. Leur capacité de prolifération consiste en 3 phases : phase I, période de faible prolifération avant le premier passage ; phase II, caractérisée par une prolifération rapide ; et la phase III, durant laquelle la prolifération diminue jusqu'à un arrêt complet. Hayflick émet alors l'hypothèse suivante : « la durée de vie limitée de l'expansion de cellules diploïdes *in vitro* pourrait être l'expression du vieillissement ou de la sénescence à l'échelon cellulaire ». Le terme de sénescence cellulaire décrit par conséquent une perte à long terme de la capacité proliférative, malgré une viabilité cellulaire et une activité métabolique. Cette

sénescence, liée à la capacité de prolifération des cellules, est donc appelée sénescence répliquative et semble concerner la grande majorité des cellules de l'organisme.

2. Sénescence post mitotique

Une partie des cellules de mammifères sont des cellules dites post-mitotiques c'est-à-dire celles ne sont plus capables de se diviser. Elles ne peuvent donc pas subir le phénomène de sénescence répliquative. On sait, par exemple, que les neurones sont des cellules post mitotiques qui accumulent une grande quantité de dommages à l'ADN (Sedelnikova et al., 2004). Des études récentes ont révélé que ces neurones expriment plusieurs propriétés associées à la sénescence incluant l'hétérochromatisation, la production de cytokines pro-inflammatoires, et une activité SA-βgalactosidase (Jurk et al., 2012). De façon similaires aux cellules répliquatives, l'installation de ce phénotype requiert la voie p21^{CIP1}-dépendante en réponse aux dommages à l'ADN. De plus, des marqueurs de sénescence ont aussi pu être retrouvés dans les adipocytes de souris sous régime gras (D. J. Baker et al., 2011; Minamino et al., 2009; van Deursen, 2014).

3. Sénescence prématurée induite par le stress (SIPS)

Les phénomènes de sénescence cellulaire peuvent être induits ou accélérés par différents stress tels que le stress oxydatif, oncogénique ou des agents génotoxiques. Dans ce cas, on parle de « sénescence prématurée induite par le stress » (SIPS) (Toussaint, Medrano, & Von Zglinicki, 2000). Ce type de sénescence est rapidement induit, dans les jours qui suivent l'exposition à l'agent inducteur, tandis que la sénescence répliquative a besoin de plusieurs semaines, voire plusieurs mois pour se mettre en place. De nombreux marqueurs et caractéristiques de la sénescence sont retrouvés lors d'une SIPS (Bielak-Zmijewska et al., 2017). Néanmoins, certains marqueurs peuvent différer. Une SIPS peut être induite en l'absence de dysfonctions télomériques (Bielak-Zmijewska et al., 2014; Kuilman et al., 2010), et la phase d'arrêt du cycle cellulaire peut être différente de celle associée à la sénescence répliquative (G1 pour la sénescence répliquative, et G2 pour la sénescence induite par le stress) (Bielak-Zmijewska et al., 2014).

In vitro, la SIPS peut être provoquée par différents stimuli tels que les radiations ionisantes, un stress osmotique ou mécanique, les ROS, un choc thermique, la présence de composés génotoxiques ou au cours de conditions de cultures inadaptées (Fridlyanskaya, Alekseenko, & Nikolsky, 2015; Kuilman et al., 2010). En effet, lors d'une culture primaire, les cellules doivent s'adapter à un environnement artificiel, caractérisé par des concentrations en nutriments, en facteurs de croissance et en O₂ différentes de celles retrouvées dans les tissus. Par ailleurs, les cellules ne sont plus en contact avec les cellules environnantes et les composés de la matrice extracellulaire. La mise en culture des cellules dans ces conditions peut conduire à un stress suffisant nommé "culture shock" responsable de l'apparition d'une sénescence (Sherr & DePinho, 2000).

In vivo, l'organisme peut être exposé à des stress permanents externes et internes, comme la production de ROS par la mitochondrie, conduisant à l'accumulation de cellules sénescents induites par le stress. L'exposition répétée et chronique de ces stress contribue à l'accumulation de cellules sénescents et peut alors accélérer le vieillissement tissulaire (Toussaint, Dumont, et al., 2000).

a) Sénescence induite par un stress oncogénique

En 1997, Serrano et al, ont démontrés pour la première fois l'existence d'une sénescence induite par un stress oncogénique ou OIS (Oncogene-induced senescence) (Serrano, Lin, McCurrach, Beach, & Lowe, 1997). Lors de la surexpression d'un mutant de RAS (H-RASV12), les cellules de rongeurs ou humaines subissent un arrêt de cycle cellulaire associé à l'acquisition de nombreux marqueurs de la sénescence réplivative. Comparé à la sénescence réplivative, l'OIS est une réponse dite aigue car sous l'exposition continue d'un oncogène les cellules cessent de proliférer dans un temps court, bien avant qu'un raccourcissement télomérique ne survienne et n'induisse l'arrêt du cycle (Serrano et al., 1997). Ce phénomène n'est pas observé exclusivement pour l'oncogène RAS ; certain de ses effecteurs dont les mutants de RAF, MEK et BRAF causent aussi l'apparition d'une sénescence (A. W. Lin et al., 1998; Michaloglou et al., 2005; J. Zhu, Woods, McMahon, & Bishop, 1998). La sénescence induite par les oncogènes implique la présence de dommages à l'ADN pouvant résulter d'une hyper réplification de l'ADN (Di Micco et al., 2006), d'une déplétion du pool de nucléotides (Aird & Zhang, 2015), et/ou de l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (A. C. Lee et al., 1999). L'OIS serait un mécanisme protecteur, permettant de limiter l'expansion tumorale par un arrêt du cycle cellulaire.

De la même façon que pour la sénescence réplivative, l'arrêt du cycle cellulaire se produit par l'implication des voie du p16^{INK4a}, p19^{ARF} ou du p53 (Palmero, Pantoja, & Serrano, 1998; Peeper, Dannenberg, Douma, te Riele, & Bernards, 2001; Serrano et al., 1997). Par exemple, dans des cellules murines, l'inactivation de p53 ou de son régulateur direct p19^{ARF} est suffisante pour court-circuiter la sénescence induite par RASV12 (Kamijo et al., 1997; López-Otín, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013; Palmero et al., 1998) (Kamijo et al. 1997; Serrano et al. 1997). Par ailleurs, dans les cellules humaines, p16^{INK4a} est un des gènes les plus inactivés dans les cellules tumorales (Ben-Porath & Weinberg, 2005) et dans certains mélanomes humains, des mutations spécifiques de p14ARF (forme humaine du p19^{ARF}) sont retrouvés (Freedberg et al., 2008).

En outre, les voies d'induction d'une OIS ne semblent pas être universelles entres les différents types cellulaires et les contextes génétiques. Par exemple, la sénescence induite par RASV12 peut être court-circuité par l'inactivation de la voie de p16^{INK4a}/pRB (Serrano et al. 1997), tandis que cette inactivation ne stoppe pas la sénescence induite par BRAF (V600E) (Michaloglou et al. 2005).

De récentes évidences suggèrent l'implication d'une OIS dans un contexte de pluripotence induite *in vitro*. Au moins 2 protéines oncogéniques, c-MYC et KLF4, sont nécessaires à la génération des IPS (induces

pluripotent stem cells). Comme les protéines INK4A/ARF et p53 limitent la formation des cellules iPS, il a été suggéré que la sénescence cellulaire empêcherait la conversion induite des cellules primaires en cellules souches pluripotentes (Banito et al., 2009; Kuilman et al., 2010; Utikal et al., 2009).

La sénescence cellulaire pourrait alors supprimer la formation de tumeurs non seulement par l'induction d'un arrêt de cycle cellulaire persistant mais aussi par limitation de la génération de cellules souches cancéreuses (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Kuilman et al., 2010; Prieur & Peeper, 2008).

b) Sénescence induite par des agents génotoxiques

Les agents génotoxiques sont des facteurs capables d'induire des dommages au niveau de l'ADN. Comme développé précédemment, certains marqueurs de la sénescence sont des modifications de la chromatine, tels que les SAHF, ou le raccourcissement télomérique. Il est alors concevable que d'autres types de dommages à l'ADN puissent mener à la sénescence.

Une première observation de l'impact des dommages à l'ADN sur l'apparition d'une SIPS est l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire permanent et irréversible dans des fibroblastes humains irradiés. Par exemple, les UV-B ayant pour cible principale les acides nucléiques sont connus pour être de puissants inducteurs de SIPS. D'autres types de dommages à l'ADN comme par exemple le stress oxydant ou certaines chimiothérapies conduisent également à une sénescence prématurée (Serrano & Blasco, 2001). Au niveau fonctionnel, il est intéressant de noter que des ces différents stress peuvent accélérer l'attrition télomérique dans les cellules répliquatives, induisant alors une diminution des capacités répliquatives ainsi que l'apparition d'un phénotype sénescence (Figure 15). En effet, certaines pathologies liées à l'âge, telles que la maladie d'Alzheimer et les pathologies cardiovasculaires sont associées à une dysfonction mitochondriale et à une accélération de ce raccourcissement télomérique (Vitorelli & Passos, 2017). Par ailleurs, ces dommages aux télomères ne sont pas retrouvés seulement dans les cellules répliquatives, mais sont aussi observés dans les cellules post mitotiques telles que les neurones. Ces dommages aux télomères induisent alors une DDR persistante conduisant ainsi à l'apparition d'une sénescence (Vitorelli & Passos, 2017). Un mécanisme potentiel pour la SIPS, ou contribuant à la SIPS, pourrait donc être l'induction des dommages à l'ADN télomérique par des ROS ou par des rayonnements ionisants, pouvant rendre les télomères dysfonctionnels (Bürkle, 2017). Ces résultats démontrent que la sénescence peut être induite par différents types de dommages à l'ADN, et plus particulièrement au niveau télomérique conduisant à leur dysfonction (Serrano & Blasco, 2001).

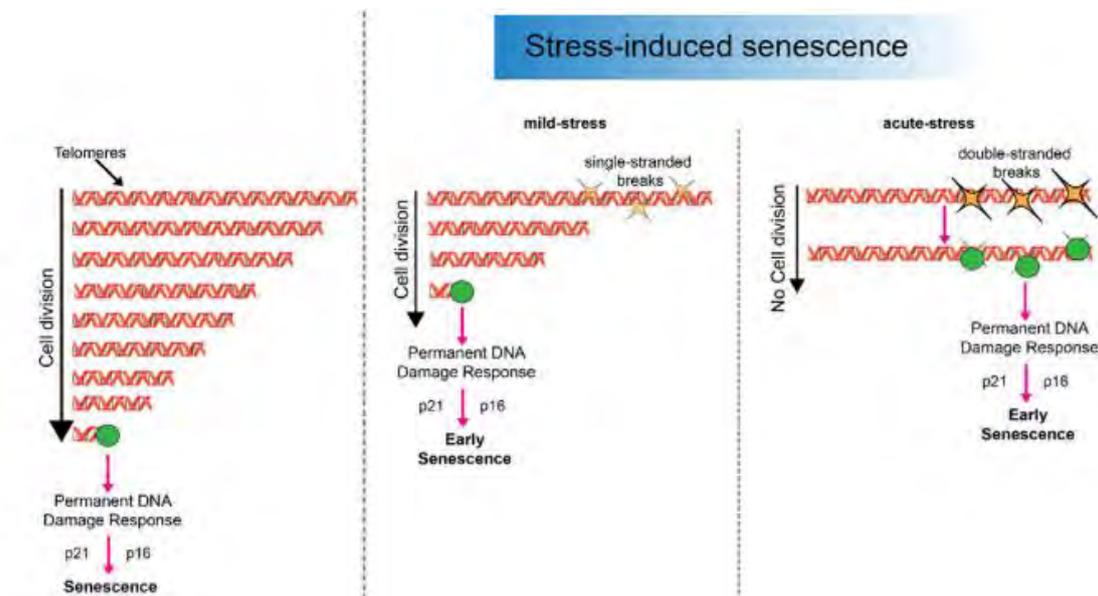


Figure 15 : Dommages télomériques induits par des stress et induction de la sénescence (Vitorelli & Passos, 2017)

c) Sénescence induite par un stress oxydant

Il est aujourd'hui bien connu que le stress oxydant est un inducteur de la SIPS (Toussaint, Medrano, et al., 2000). La culture cellulaire en présence de 20% d'O₂ (concentration atmosphérique) est une source évidente de stress oxydant pour la plupart des types cellulaires, car cette concentration reste beaucoup plus élevée que celle retrouvée dans les tissus (environ 5% chez l'Homme). Des études ont pu mettre en évidence une augmentation de la prolifération des cellules cultivées en hypoxie (3% O₂) par rapport à celles cultivées en hyperoxie (20% O₂) (Ott, Jung, Grune, & Höhn, 2017), reflétant un arrêt du cycle cellulaire dans ces conditions. Par ailleurs, chaque type cellulaire aurait son propre degré de sensibilité à l'accumulation de dommages produits par une exposition chronique à de hauts taux d'oxygène (Serrano & Blasco, 2001). Il est admis que ce n'est pas l'oxygène lui-même mais la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), en particulier par les mitochondries, qui serait impliquée dans cette sénescence (Correia-Melo et al., 2016; Lu & Finkel, 2008; Moiseeva, Bourdeau, Roux, Deschênes-Simard, & Ferbeyre, 2009). En effet, la production de ROS par les mitochondries induit des dommages génomiques (Parrinello et al., 2003), une accélération de l'attrition télomérique (von Zglinicki, 2002), et participe directement aux voies de signalisation permettant le maintien d'un phénotype sénescé (Passos et al., 2010). De nombreux stress induisent une augmentation de cette production de ROS incluant les chimiothérapies, les dommages à l'ADN et l'activation oncogénique (Passos et al., 2009). Le rôle de ces composés dans la sénescence a été démontré par l'utilisation de traitements anti-oxydants permettant de retarder ou prévenir la sénescence (Q. Chen, Fischer, Reagan, Yan, & Ames, 1995; Lu & Finkel, 2008; Macip et al., 2002). De plus, l'activation de la DDR et de p21^{CIP1} permet l'apparition d'une dysfonction mitochondriale et la production de ROS, qui peut alors en réponse, amplifier ce phénomène de sénescence par l'induction de foci de dommages à l'ADN (Passos et al., 2010). Il a été

suggéré que les ROS affectent directement et indirectement la cascade de transduction liée à p53 et p16^{INK4a}/pRB. Par exemple la voie de p38^{MAPK} est activée dans ce type de sénescence et contrôle l'activation de p16^{INK4a} et p53 ainsi que p21^{CIP1} (Iwasa, Han, & Ishikawa, 2003; Kuilman et al., 2010; Sun et al., 2007). Pour finir, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), bien que n'étant pas un ROS par lui-même, peut par réaction enzymatique produire des ROS tels que le radical hydroxyle (HO[•]) et l'anion superoxyde (O₂⁻), et ainsi induire une SIPS, notamment lorsqu'il est administré à des doses sub cytotoxiques (Ott et al., 2017; Petrova, Velichko, Razin, & Kantidze, 2016). Par exemple, le traitement de MSCs issues de la gelée de Wharton par de l'H₂O₂ à 200µM induit l'arrêt du cycle cellulaire après 3-4 passages, les cellule s'élargissent et s'aplanissent, acquièrent une activité SA-βGal et expriment les inhibiteurs du cycle p53, p21^{CIP1}, p16^{INK4a} (Choo et al., 2014).

C. Les deux facettes de la sénescence

Le SASP peut avoir, en fonction du contexte, des effets positifs ou négatifs. Ce serait surtout la nature de ce SASP, son étendu au sein du tissu ainsi que sa durée qui confèrent ses aspects positifs ou négatifs (Malaquin, Martinez, & Rodier, 2016). En effet, un SASP localisé ou limité dans le temps, peut permettre une résolution de dommages tissulaires, peut participer à l'embryogénèse, peut alerter les cellules environnantes d'un potentiel danger et promouvoir une clairance immunitaire des cellules endommagées ou même limiter une fibrose réactionnelle après une lésion tissulaire (Demaria et al., 2014; He & Sharpless, 2017a; Storer et al., 2013). Tandis qu'un SASP persistant associé à l'accumulation des cellules sénescents, comme retrouvé dans le vieillissement, par perturbation du microenvironnement peut causer et potentialiser une inflammation systémique, perturber l'architecture tissulaire, stimuler par une action paracrine la croissance de cellules tumorales et par ces différentes actions participer à l'installation de nombreuses pathologies liées à l'âge (J.-P. Coppé et al., 2010a; D Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

1. Effets bénéfiques

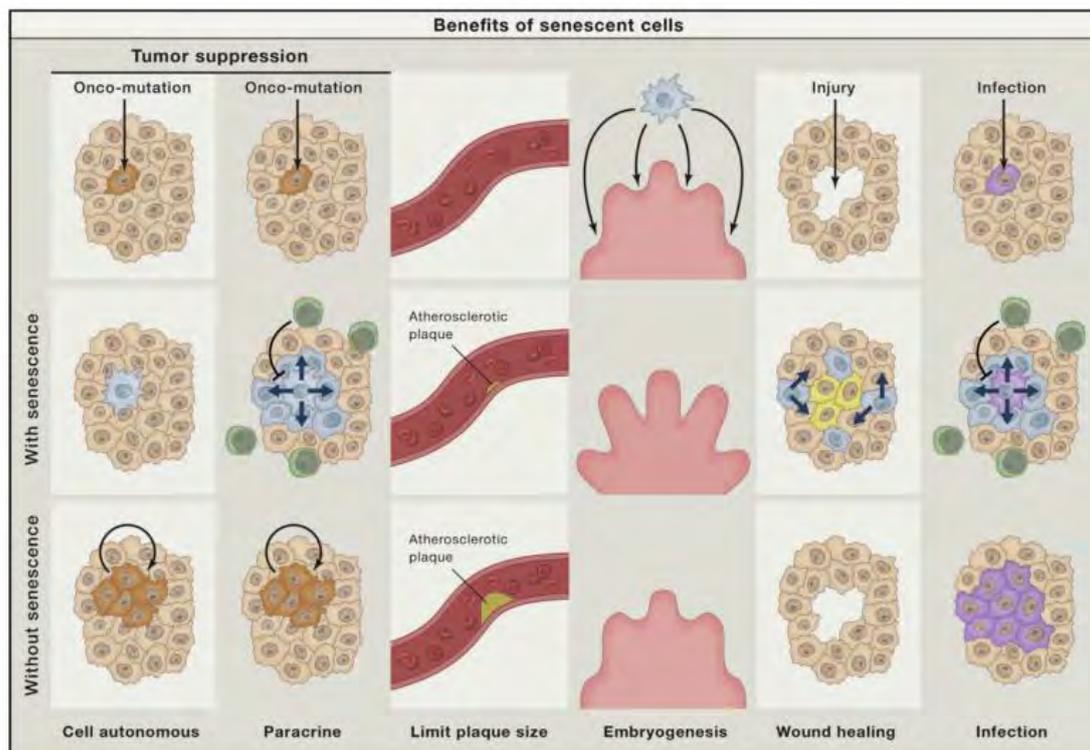


Figure 16 : Effets bénéfiques de la sénescence (He & Sharpless, 2017a)

a) Embryogenèse

Récemment, deux publications ont décrit au cours du développement embryonnaire, l'apparition transitoire de marqueurs de sénescence, dans certaines structures anatomiques tels que les membres, la partie caudale, la zone de fusion des vésicules corticales ou le tube neural (Daniel Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). Cette sénescence, nommée « sénescence du développement » n'est détectable qu'au cours d'une courte fenêtre de temps, serait différente en fonction des structures étudiées et apparaîtrait importante durant l'organogenèse. Elle est définie par la présence d'une activité SA- β gal, des marqueurs de l'hétérochromatine et un arrêt de prolifération cellulaire. D'autres effecteurs de la sénescence ont été retrouvés tels que p53, p21^{CIP1}, p27^{KIP1} et p15^{INK4b}, mais il semblerait que seul p21^{CIP1} soit indispensable à l'installation de cette « sénescence du développement » dans les structures étudiées. Cette sénescence est initiée en l'absence de signaux de dommages à l'ADN, de DDR ou d'activation de la voie p16^{INK4a}. Chez des embryons de souris p21KO, le nombre de cellules positives pour la SA- β gal est diminué, mais ce marquage ne disparaît pas complètement, suggérant que la voie du p21^{CIP1} ne soit pas la seule impliquée dans l'acquisition du phénotype sénescence.

Par ailleurs, le phénotype de cette « sénescence du développement » possède des caractéristiques différentes de celles retrouvées dans la sénescence répliquative. Les cellules conservent leur potentiel

apoptotique et la composition du SASP est légèrement différente du fait de l'absence d'IL-6 et d'IL-8, deux facteurs caractéristiques. Storer *et al.*, suggèrent qu'elle représenterait une forme plus primitive de sénescence (Storer *et al.*, 2013). Elle accomplirait son rôle physiologique durant le développement embryonnaire, et serait ensuite mise sous silence par la répression de certains gènes. Cependant, en réponse à différents stimuli externes, ces voies de signalisation pourraient être réactivées à l'âge adulte afin de protéger les cellules contre certains stress et induire un remodelage tissulaire. Ces découvertes suggèrent que la sénescence possède une fonction physiologique durant l'embryogenèse et ne serait donc pas seulement synonyme de vieillissement (Triana-Martínez, Pedraza-Vázquez, Maciel-Barón, & Königsberg, 2016).

b) Réparation tissulaire et cicatrisation

L'effet bénéfique de la sénescence sur la réparation tissulaire et la cicatrisation passerait essentiellement par les facteurs sécrétés du SASP. En effet, de nombreux facteurs sont connus pour être importants dans ces processus, tels que les facteurs de croissance et les protéases qui participent à la cicatrisation, les chimiokines permettant le recrutement des cellules immunitaires, ainsi que des facteurs permettant la mobilisation des cellules souches et progénitrices. Les travaux de Krizhanovsky *et al.* en 2008 ont mis en évidence pour la première fois une sénescence cellulaire au cours d'une réparation tissulaire (Krizhanovsky *et al.*, 2008b). Cette étude montre qu'après une lésion hépatique chez la souris, les cellules stellaires du foie vont dans un premier temps proliférer et sécréter des composés de la matrice extracellulaire (MEC), produisant alors une fibrose sur la zone lésée. Peu de temps après la phase proliférative, les cellules stellaires acquièrent des marqueurs caractéristiques de la sénescence tels que l'activité SA- β gal et l'expression de p16^{INK4a}, p21^{CIP1} et p53. L'apparition d'un phénotype sénescents dans ces cellules induit un déclin de la production de composés de la MEC, mais aussi la production de métalloprotéinases (MMPs), dégradant la MEC. De façon similaire en 2010, dans un modèle murin de cicatrisation cutanée, une accumulation de fibroblastes et de myofibroblastes sénescents a été retrouvée. Dans ce modèle, si la protéine de la MEC, CCN1, ne peut plus se lier au fibroblaste, il n'y a pas d'induction de sénescence permettant de contrôler la fibrose au sein de la cicatrice (Jun & Lau, 2010). L'application topique de cette protéine permet la réapparition d'une sénescence cellulaire, l'expression de MMPs et ainsi la résolution de la fibrose. Par ailleurs, en 2014, l'utilisation de souris p16-3MR possédant un gène suicide sous promoteur p16^{INK4a} associé à un gène rapporteur, permettant la visualisation de l'activation du promoteur de p16^{INK4a} et la suppression des cellules exprimant p16^{INK4a}, a permis de mettre en évidence son activation précoce suite à une lésion et durant la cicatrisation (Demaria *et al.*, 2014). Cette étude propose aussi l'implication d'une autre molécule du SASP, le PDGFAA, sécrétée par les fibroblastes et les cellules endothéliales sénescents dans la résolution de la fibrose cicatricielle. Pour finir, la sénescence jouerait un rôle important pour une

guérison optimale puisque la clairance des cellules sénescents p16^{INK4a} positives retarde la cicatrisation (D. J. Baker, Childs, Durik, Wijers, Sieben, Zhong, A. Saltness, et al., 2016; Demaria et al., 2014), et que la déficience en p53 ou p16^{INK4a} amplifie la fibrose cicatricielle (Krizhanovsky et al., 2008b). L'ensemble de ces études suggèrent que la sénescence cellulaire et plus particulièrement le SASP seraient nécessaires à la résolution des lésions tissulaires (He & Sharpless, 2017a; Rodier & Campisi, 2011). En accord avec cette idée, quand les cellules stellaires ne peuvent pas entrer en sénescence par déficience en p53 ou en p16^{INK4a}, les souris développent une fibrose sévère lors d'une lésion hépatique aigüe (Krizhanovsky et al., 2008b).

c) Propriétés anti-tumorales

Un dernier exemple des propriétés bénéfiques de la sénescence, est son activité anti-tumorale, ou du moins permettant de limiter l'expansion tumorale. Il est bien connu que l'intensité du signal oncogénique augmente progressivement durant les premiers temps de la tumorigenèse jusqu'à atteindre un seuil activant les voies impliquant les gènes suppresseurs de tumeurs p16^{INK4a} et p53. Lorsque cela arrive, les inhibiteurs du cycle contrebalancent les signaux oncogéniques et les cellules entrent en sénescence, permettant de prévenir l'expansion des cellules précancéreuses. De plus, pour former une tumeur létale, les cellules doivent acquérir un fort potentiel prolifératif, or l'expression d'un programme de sénescence contrecarre ce potentiel prolifératif (Hanahan & Weinberg, 2000). L'identification des cellules sénescents, par l'expression de la SA- β gal et de la DDR, a été observée dans de nombreuses lésions précancéreuses tels que l'adénocarcinome du poumon, les néoplasies du pancréas, les néoplasies intra-épithéliales de la prostate et les nævi mélanocytaires (Bartkova et al., 2005; Z. Chen et al., 2005; Michaloglou et al., 2005). Ces cellules sénescents ne sont plus retrouvées dans ces lésions à l'état cancéreux. Par conséquent, la sénescence n'est détectable qu'à des niveaux bénins de la tumorigenèse (Collado & Serrano, 2010). Toutes ces évidences suggèrent un rôle de la sénescence comme une barrière à la progression tumorale.

Chez l'Homme et la souris, la plupart des cancers arborent des mutations sur une ou les 2 voies de signalisation typiques de la sénescence p16^{INK4a} ou p53. De plus, des défauts sur chacune de ces voies compromettent l'apparition d'un phénotype sénescents et augmentent fortement la susceptibilité de l'organisme aux cancers. Par exemple, l'inactivation de la voie p53 empêchant alors une réponse sénescents induit une accélération du développement des tumeurs malignes (Z. Chen et al., 2005)(Rodier & Campisi, 2011).

Pour finir, les cellules tumorales peuvent être éliminées par reconnaissance directe par les cellules immunitaires telles que les lymphocytes T cytotoxiques et grâce au recrutement des cellules phagocytaires inflammatoires, qui seraient très probablement attirées par les facteurs du SASP (tels que MCP1, CX3CL1,...) (D Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

Cet effet anti-tumoral passerait donc par une action directe d'arrêt de prolifération, mais aussi par augmentation de la clairance des cellules tumorales par les cellules inflammatoires grâce au SASP.

2. Effets délétères

a) Propriétés pro-tumorales

D'un premier abord, l'idée que la sénescence cellulaire, un mécanisme anticancéreux connu, pourrait promouvoir le cancer semble paradoxal. Cependant, la théorie de la pléiotropie antagoniste stipule qu'un processus biologique peut être à la fois bénéfique et délétère en fonction de l'âge de l'organisme (Giaino & D'Adda di Fagagna, 2012). Il n'y a pas encore aujourd'hui d'explications concrètes à cet effet pléiotropique antagoniste, mais de nombreuses hypothèses et évidences supportent cette idée. Dans un premier temps, il est important de noter que le cancer peut être décrit comme une pathologie liée à l'âge. Dans un second temps, les cellules sénescents possèdent un nouveau phénotype sécrétoire le SASP, permettant de fournir un microenvironnement permissif à la tumorigenèse maligne (Liotta & Kohn, 2001). En effet, le SASP est riche en facteurs de croissance, qui peuvent stimuler et entretenir la prolifération de cellules cancéreuses ou précancéreuses voisines. Entretenir cette croissance pourrait éventuellement surpasser les capacités d'élimination de ces cellules par l'hôte, faisant pencher ainsi la balance en faveur de la progression tumorale. Par ailleurs, d'autres facteurs du SASP sont connus pour stimuler les phénotypes associés aux cellules cancéreuses agressives. Par exemples, les fibroblastes sénescents sécrètent de l'amphiréguline et du growth-related oncogene (GRO), qui dans des modèles de culture cellulaire, stimulent la prolifération de cellules épithéliales précancéreuses (Bavik et al., 2006; J. P. Coppé et al., 2010). De plus, la production de fort taux d'IL-6 et l'IL-8 peuvent stimuler des cellules épithéliales précancéreuses ou faiblement malignes, qui pourront alors envahir la membrane basale (J.-P. Coppé et al., 2008). Les fibroblastes sénescents et les cellules mésenchymateuses sécrètent aussi du VEGF qui stimule la migration et l'invasion des cellules endothéliales (une étape cruciale pour une angiogenèse initiée par les tumeurs), et cette invasion tumorale peut aussi être facilitée par la sécrétion de MMPs (Rodier & Campisi, 2011). Chez des souris xénogreffées, les cellules sénescents peuvent promouvoir la progression des cellules précancéreuses en cellules malignes (Bhatia et al., 2008; J. P. Coppé et al., 2010; Krtolica, Parrinello, Lockett, Desprez, & Campisi, 2001). Les cellules sénescents peuvent donc stimuler la tumorigenèse *in vivo*, mais il reste encore à confirmer que l'apparition naturelle de cellules sénescents *in vivo* stimule la formation de tumeurs. Pour finir, les derniers mécanismes pouvant promouvoir la progression tumorale sont l'immunosénescence et l'immuno-editing. Lors de l'immunosénescence, il y a une diminution du nombre et une modification des cellules immunitaires, pouvant réduire la capacité du corps à éliminer les cellules tumorales, et ainsi promouvoir le développement de cellules cancéreuses. Par ailleurs, du fait de l'exposition continue aux cellules immunitaires, les tumeurs

peuvent s'adapter et échapper à l'immunosurveillance, et ainsi favoriser l'émergence de cellules cancéreuses faiblement immunogéniques, c'est l'immuno-editing (Chow, Möller, & Smyth, 2012; Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002). Des cellules tumorales isolées de souris immunocompétentes, mais pas celles isolées de souris immunodéficientes, sont capables de développer des tumeurs quand elles sont transplantées dans un hôte immunocompétent (Shankaran et al., 2001). Ce résultat suggère que les tumeurs formées en l'absence d'un système immunitaire intact sont davantage reconnues et éliminées par le système immunitaire que celles se développant chez des hôtes immunocompétents. Par ailleurs, si les tumeurs se développent dans un environnement immunodéficient, elles seront moins bien éliminées et progresseront de façon plus efficace (Shankaran et al., 2001). La présence d'un SASP autour des cellules tumorales pourrait exacerber l'immuno-editing tumoral et éventuellement permettre la croissance de cellules cancéreuses résistantes au système immunitaire (Velarde, Demaria, & Campisi, 2013).

b) Pathologies liées à l'âge

La présence de cellules sénescents au niveau de lésions tissulaires a pu être rapportée de nombreuses fois, mais savoir si elles sont responsables des pathologies ou si elles en sont la conséquence est plus difficile à déterminer. Dans certains cas, la perte de prolifération des cellules fonctionnelles peut être responsable de l'apparition de la pathologie, comme dans le glaucome, la cataracte ou l'ostéoarthrose (D. J. Baker et al., 2011; Liton et al., 2005; J. A. Martin, Brown, Heiner, & Buckwalter, 2004). Dans d'autres cas, c'est l'inflammation induite par le SASP qui joue un rôle causal dans les pathologies, comme dans l'athérosclérose, le diabète de type II et les cancers (Bennett G Childs et al., 2016; Collado, Blasco, & Serrano, 2007; Shimizu et al., 2012). Finalement, le remodelage de la matrice extracellulaire induit par le SASP peut être responsable de la progression d'une pathologie ou de sa limitation. Par exemple, des cellules sénescents ont été identifiées comme responsables d'une fibrose pulmonaire, mais peuvent aussi réduire la fibrose hépatique (Krizhanovsky et al., 2008a; Schafer et al., 2017). Afin de déterminer la réelle contribution de la sénescence dans l'apparition des pathologies liées à l'âge, plusieurs approches ont été développées. Le lien de causalité a pu être démontré en bloquant l'apparition de la sénescence cellulaire par inactivation d'un composant clé de la sénescence tel que $p16^{\text{INK4a}}$, ou de façon plus concluante en éliminant sélectivement les cellules sénescents dans le tissu et en observant l'impact dans le processus pathologique (D. J. Baker, Childs, Durik, Wijers, Sieben, Zhong, A. Saltness, et al., 2016; D. J. Baker et al., 2011; Jeon et al., 2017). Deux modèles de souris transgéniques ont été développées afin d'éliminer spécifiquement les cellules sénescents : le modèle INK-ATTAC (D. J. Baker et al., 2011) et le modèle p16-3MR (Jeon et al., 2017). Tous deux utilisent un gène suicide permettant l'élimination des cellules sénescents à un temps déterminé. Dans le modèle INK-ATTAC, la construction comprend la production d'une protéine de fusion entre FK506-binding-protein et la caspase 8 (FKBP-Casp8) sous promoteur $p16^{\text{INK4a}}$. Lors de l'administration de la molécule AP20187, une dimérisation de

la protéine de fusion myristoylée induit l'activation de la voie apoptotique dépendant de la caspase 8 et la mort des cellules par apoptose (D. J. Baker et al., 2011). Dans le modèle p16-3MR, une thymidine kinase virale est exprimée dans les cellules sénescents p16^{INK4a} positives, pouvant alors phosphoryler la prodrogue ganciclovir et convertir cette molécule en un métabolite toxique conduisant à la mort cellulaire (Demaria et al., 2014). Grâce à ces modèles, un lien de causalité a donc été démontré pour l'ostéoarthrose (Jeon et al., 2017), la cataracte, la sarcopénie, la glomérulosclérose, l'apparition d'une hypertrophie cardiomyocytaire et la diminution de la tolérance cardiaque au stress, ainsi que sur la longévité et la durée de vie sans pathologies (D. J. Baker, Childs, Durik, Wijers, Sieben, Zhong, A. Saltness, et al., 2016; D. J. Baker et al., 2011). Par ailleurs, les études GWAS (Genome Wide Association Studies) ont permis de relier le locus INK4/ARF à de nombreuses pathologies liées à l'âge, incluant la susceptibilité à la fragilité et l'augmentation du risque de maladies coronariennes, d'infarctus du myocarde, de diabète de type 2, et de maladie d'Alzheimer. De plus, une méta-analyse identifie le locus INK4/ARF comme le locus génétiquement le plus corrélé aux pathologies liées à l'âge (Jeck, Siebold, & Sharpless, 2012). Cela explique alors, pourquoi les stratégies d'élimination des cellules sénescents reposent essentiellement sur l'expression de p16^{INK4a}. Cependant, on ne peut pas restreindre l'expression de p16^{INK4a} à des effets néfastes et délétères, rendant alors l'étude beaucoup plus complexe. Par exemple dans un modèle murin possédant une double copie du locus INK4/ARF, une diminution de marqueurs du vieillissement (amélioration de la coordination neuromusculaire, diminution perte des cheveux,...) et un accroissement de la longévité ont été rapportés (Matheu et al., 2009). De plus, une autre étude montre que la délétion de p16^{INK4a} chez des souris déficientes en Pot1B (protection of telomeres 1B) ne permettrait pas l'inhibition du phénotype sénescents, mais accélérerait plutôt la dysfonction d'organes (l'intestin, les testicules et le système hématopoïétique) et raccourcirait la durée de vie (Yang Wang, Sharpless, & Chang, 2013). Ces modèles démontrent aussi un rôle protecteur de p16^{INK4a} durant le vieillissement.

Pour finir, contrairement aux pathologies chez la personne jeune, les désordres liés à l'âge se produisent dans un contexte de tissu déjà dysfonctionnel, avec une accumulation de cellules sénescents. Ces cellules sont nommées cellules sénescents primaires, puisqu'elles résultent de lésions normales intrinsèques à la maintenance du tissu. La sénescence diminue la résistance tissulaire aux stress et favorise l'apparition de pathologies via un arrêt de prolifération de progéniteurs ou par dysfonction des cellules souches et des cellules stromales induites par le SASP. Comme la pathologie progresse, une seconde vague de cellules sénescents est générée au site de la pathologie. Ces cellules sénescents secondaires, tout comme les premières, peuvent amplifier la progression de la pathologie. (Bennett G. Childs, Gluscevic, Baker, Laberge, Marquess, Dananberg, & van Deursen, 2017; Bennett G Childs, Durik, Baker, & Deursen, 2015; N. Martin et al., 2014)

Table 1 | Age-related diseases linked to cellular senescence

Condition or disease	Pro-senescence stress	Location of SNCs	Markers used	Senescence intervention method	Effect of SNCs
Senescence markers only					
Alzheimer disease	Human disease state	Astrocytes	• Expression levels of p16 ^{INK4A} and MMP1	NA	NA
Aneurysm	Kawasaki disease	Endothelial cells	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	NA	NA
Cystic fibrosis	Human disease state	Airway epithelial cells	• SA-β-Gal • Expression level of γH2AX • Phospho-CHK2 levels	NA	NA
Fibrosis in pancreatitis	Mouse disease model	Pancreatic stellate cells	SA-β-Gal	NA	NA
Glaucoma	Human disease state	Outflow tract	SA-β-Gal	NA	NA
Hypertension	Human disease state	Arterial wall	• Expression levels of p53 and p21 • Telomere uncapping	NA	NA
Idiopathic pulmonary fibrosis	Human disease state	Fibroblasts	• SA-β-Gal • Larger cell size	NA	NA
	Bleomycin-induced model	Alveolar epithelial cells	• SA-β-Gal • Larger cell size • Expression levels of p21, p38 MAPK, γH2AX and SASP factors	NA	NA
Inflammatory bowel disease	Human disease state	Crypt cells	Immunostaining for HP1γ and γH2AX	NA	NA
Intervertebral disc degeneration	Human disease state	Nucleus pulposus	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	NA	NA
Macular degeneration	Human disease state	RPE cells	• Expression levels of p53 and p21 • Phospho-p38 MAPK levels	NA	NA
Osteoarthritis	Human disease state	Articular cartilage	• Reduced proliferation • SA-β-Gal • Telomere length	NA	NA
Type 2 diabetes mellitus in obesity	Human disease state	White adipose tissue	• Expression levels of HMG2, p14 ^{ARF} (p19 ^{ARF}) and p53 • SA-β-Gal	NA	NA
Senescence markers and intervention by senescence pathway inactivation					
Adipose atrophy	Progeria	Pre-adipocytes	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	p16 ^{INK4A} deficiency	• Detrimental • Drives atrophy
Atherosclerosis	Dyslipidemia	Smooth muscle cells	None	Tp53 knockout	• Beneficial • Blocks apoptosis
		Unclear	None	Cdn1b knockout	• Beneficial • Restricts proliferation
		Unclear	None	Cdkn1a knockout	• Beneficial • Restricts proliferation
		Smooth muscle cells	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and p19 ^{ARF}	9p21 (Cdkn2a locus) deletion	• Beneficial • Restricts proliferation
Cataracts	Advanced age	Unclear	Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	p16 ^{INK4A} deficiency or Cdkn1a knockout	Detrimental
COPD	LPS-induced model	Clara cells	SA-β-Gal	Clara cell-specific Tp53 knockout	• Detrimental • Drives disease
Idiopathic pulmonary fibrosis	Bleomycin-induced model	Alveolar epithelial cells	• SA-β-Gal • Phospho-RB levels	Cav1 knockout	• Detrimental • Drives fibrosis
Kidney transplant failure	Ischaemia	Tubular epithelial cells	Proliferative arrest	p16 ^{INK4A} deficiency	Detrimental

Table 1 (cont.) | Age-related diseases linked to cellular senescence

Condition or disease	Pro-senescence stress	Location of SNCs	Markers used	Senescence intervention method	Effect of SNCs
<i>Senescence markers and intervention by senescence pathway inactivation (cont.)</i>					
Liver fibrosis	Carbon tetrachloride	Hepatic stellate cells	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and p21 • Proliferation	Tp53/Cdkn2a double knockout	• Beneficial • Restricts fibrosis
Loss of bone mass	Advanced age	Mesenchymal stem cells	p16 ^{INK4A} expression	p16 ^{INK4A} deficiency	• Detrimental • Drives bone ageing
Myocardial infarction	Infarct	Cardiac fibroblasts	• SA-β-Gal • Expression levels of CDKI and p53	Tp53 knockout	• Beneficial • Restricts fibrosis
Sarcopenia	Advanced age	Satellite cells	• SA-β-Gal • Expression level of p16 ^{INK4A}	p38 MAPK inhibition	Satellite cell dysfunction
	Progeria	Fibroblastogenic progenitors	Expression levels of SASP factors	p16 ^{INK4A} deficiency	• Detrimental • Drives sarcopenia
Type 2 diabetes mellitus	Mouse hypercaloric model	White adipose tissue	• SA-β-Gal • Expression levels of γH2AX and SASP factors	Tp53 knockout	• Detrimental • Drives disease
Wound healing	CCN1 (also known as CYR61)	Wound fibroblasts	• SA-β-Gal • Expression level of p16 ^{INK4A}	Cyr61 mutant	• Beneficial • Restricts fibrosis
<i>Senescence markers and intervention by SNC clearance</i>					
Adipose atrophy	Advanced age	Pre-adipocytes	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	INK-ATTAC model	Detrimental
Allopecia	p19 ^{ARF} overexpression	Skin	Expression level of p19 ^{ARF}	ABT-737 treatment	Detrimental
Atherosclerosis	Dyslipidemia	Intraplaque foam cells	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	• INK-ATTAC model • INK-NTR model* • p16-3MR model • Navitoclax treatment	Detrimental
Cancer	Advanced age	Unclear	None	INK-ATTAC model	Detrimental
Cardiomyocyte hypertrophy	Advanced age	Pericardial epithelium	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	INK-ATTAC model	Detrimental
Cataracts	Progeria	Unclear	Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	INK-ATTAC model	Detrimental
Glomerulosclerosis	Advanced age	Kidney proximal tubules	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	INK-ATTAC model	Detrimental
Idiopathic pulmonary fibrosis	Bleomycin-induced model	Multiple	Expression levels of p16 ^{INK4A} , p21 and SASP factors	• INK-ATTAC model • Dasatinib plus quercetin treatment	Detrimental
Osteoarthritis	• Joint trauma • Ageing	Joint articular surface	• SA-β-Gal • Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	• p16-3MR model • UBX-101 treatment	Detrimental
Sarcopenia	Progeria	Fibroblastogenic progenitors	Expression levels of p16 ^{INK4A} and SASP factors	INK-ATTAC model	Detrimental
Wound healing	Dermal wound	• Myofibroblasts • Endothelium	Expression levels of p16 ^{INK4A} and p21	• p16-3MR model • INK-ATTAC model	Beneficial

Tableau 2 : Pathologies liées à l'âge et implications de la sénescence
(Bennett G. Childs, Gluscevic, Baker, Laberge, Marquess, Dananberg, & van Deursen, 2017)

D. Stratégies de lutte contre les cellules sénescences

A cause de ce lien de causalité de plus en plus étudié entre sénescence, vieillissement et pathologies liées à l'âge, un engouement fort se développe pour explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de lutter contre le vieillissement pathologique (De Cabo, Carmona-Gutierrez, Bernier, Hall, & Madeo, 2014; Longo et al., 2015; Ovadya & Krizhanovsky, 2018).

Aujourd'hui, le bénéfice de certaines interventions non thérapeutiques, telles que la modification du régime alimentaire (restriction calorique) ou la modification du mode de vie (exercice), a été démontrée sur l'allongement de l'espérance de vie et l'apparition d'un vieillissement en bonne santé (De Cabo et al., 2014). Bien qu'elles apparaissent efficaces, ces stratégies sont difficiles à envisager à grande échelle dans notre société du 21^e siècle. Serait-il possible de reverser notre mode de vie sédentaire et nos habitudes alimentaires ? C'est pourquoi, aujourd'hui les recherches se focalisent sur l'identification de voies de signalisation pouvant être modulées par l'utilisation de composés pharmacologiques (Schmitt, 2017).

1. Les sénolytiques

La première stratégie développée aujourd'hui afin de lutter contre le vieillissement pathologique, est l'élimination sélective des cellules sénescences. Comme décrit précédemment, de nombreuses publications ont démontré le bénéfice de cette élimination pour prévenir ou retarder l'apparition de nombreuses pathologies liées à l'âge (D. J. Baker, Childs, Durik, Wijers, Sieben, Zhong, A. Saltness, et al., 2016; D. J. Baker et al., 2011; Bennett G. Childs, Gluscevic, Baker, Laberge, Marquess, Dananberg, & Van Deursen, 2017; Bennett G Childs et al., 2016; Demaria et al., 2014; Xu, Palmer, et al., 2015; Xu et al., n.d.). Cette nouvelle stratégie thérapeutique, qui reste encore à être validée chez l'homme, se nomme la sénothérapie ou sénolyse (Schmitt, 2017).

Une des principales caractéristiques des cellules sénescences utilisées dans cette stratégie est leur résistance à l'apoptose. A la différence des autres cellules, les cellules sénescences sont protégées des signaux pro-apoptotiques intrinsèques et extrinsèques (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Cette propriété leur permet de persister et de promouvoir divers processus physiologiques en condition de stress. Cibler les voies de résistance à l'apoptose spécifiques des cellules sénescences, à travers différentes approches thérapeutiques permettrait une mort sélective de ces cellules et ainsi la prévention de leurs effets délétères. (Ovadya & Krizhanovsky, 2018).

a) Protéines de la famille de Bcl-2

Les membres la famille protéique Bcl-2, en particulier Bcl-W et Bcl-XL sont des protéines anti-apoptotiques et sont surexprimés dans les cellules sénescences (Yosef et al., 2016). Outre leur surexpression par les

cellules sénescences, c'est leur implication dans les processus cancéreux, notamment dans les lymphomes et certaines tumeurs solides qui a permis de développer des inhibiteurs forts et sélectifs de ces protéines (Croce & Reed, 2016).

La première molécule ABT-737 mime un domaine BH3, permettant ainsi de bloquer l'interaction des protéines de la famille de Bcl-2 avec le domaine BH3 de protéines pro-apoptotiques. Ce domaine alors libre, les protéines pro-apoptotiques peuvent être activées et conduire à la mort cellulaire (Oltersdorf et al., 2005). Son successeur, permettant une administration orale, ABT-263 ou navitoclax est aujourd'hui une des molécules les plus étudiées dans cette sénolyse et permet l'élimination des cellules sénescences *in vitro* et *in vivo* (Chang et al., 2016; Ovadya & Krizhanovsky, 2018; Y. Zhu et al., 2016). Malheureusement, l'utilisation de ces inhibiteurs des protéines Bcl-2 causent divers effets indésirables notamment par toxicité hématopoïétique (neutropénie ou thrombocytopénie) (Cang, Iragavarapu, Savooji, Song, & Liu, 2015; Levenson et al., 2015). Ces problèmes de toxicité nécessitent le développement de nouvelles molécules. Deux nouveaux candidats spécifiques de la protéine Bcl-XL (A1331852 and A1155463) sont aujourd'hui étudiés, et causeraient moins de neutropénies que le navitoclax. Cependant, ces 2 molécules induiraient toujours une thrombocytopénie puisque la survie plaquettaire serait dépendante de l'activité de Bcl-XL. De plus, elles seraient aussi moins efficaces sur l'élimination des cellules sénescences, car trop spécifiques, et les cellules exprimant les protéines Bcl-2 ou Bcl-W seraient épargnées (Y. Zhu et al., 2017). Une alternative pourrait être une utilisation locale de ces composés afin de limiter leurs effets indésirables, comme par exemple en injection intra-articulaire. Cette injection locale permet de réduire les signes d'ostéoarthrose chez la souris âgée (Jeon et al., 2017).

Cibler les cellules sénescences par inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, reste aujourd'hui une solution limitée pour son implication en thérapie humaine à cause des effets indésirables et son utilisation possiblement restreinte.

b) Quercetine et Dasatinib

Basés sur la dépendance des cellules sénescences aux mécanismes de défense anti-apoptotique, d'autres composés sénolytiques ont été identifiés. Une combinaison de 2 molécules, la quercetin (un inhibiteur naturel des kinases de la famille des flavonoïdes) avec le dasatinib (un inhibiteur de tyrosine kinases), serait prometteuse. L'action synergique de ces 2 composés permet de diminuer les doses de chacune des molécules et ainsi réduire leur toxicité (Y. Zhu et al., 2015). Cette association réduit le nombre de cellules sénescences *in vivo*, et permet de diminuer l'apparition de pathologies associées à la sénescence dans certains modèles pathologiques murins (résumé dans (Ovadya & Krizhanovsky, 2018)). De plus, le traitement de souris âgées par cette association a montré des effets bénéfiques avec une amélioration de la fonction

cardiaque et de la réactivité vasculaire (Y. Zhu et al., 2015), ainsi qu'une augmentation de l'espérance de vie et de la qualité de vie (Xu et al., 2018).

Ces deux molécules ont déjà été utilisées en clinique, ce qui en fait de sérieux candidats comme sénolytiques. Cependant, du fait du large impact de ces molécules sur de nombreuses voies biologiques, il reste à ce jour à déterminer les mécanismes moléculaires exacts conduisant à leurs effets sénolytiques. Il se pose également la question des effets indésirables probables d'une administration à long terme, remettant en cause leur possible utilisation en clinique dans cette indication.

c) Autres

D'autres caractéristiques des cellules sénescents peuvent être utilisées comme cibles thérapeutiques permettant leur élimination, comme l'activation de la voie p53/p21^{CIP1} ou l'augmentation de l'activité β -galactosidase.

Les récents travaux de Baar *et al.* ont permis d'identifier une interaction spécifique de la protéine p53 avec le facteur de transcription FOXO4 dans les cellules sénescents. L'utilisation d'un peptide modifié de FOXO4 inhibe l'interaction de p53/FOXO4 natif, et permet la libération de ce p53 hors du noyau induisant alors l'apoptose des cellules. Son utilisation chez la souris a démontré des effets bénéfiques comme la restauration d'une condition physique, ou de la fonction rénale dans un modèle progéroïde et de vieillissement (Baar et al., 2017).

Récemment, l'utilisation de la surexpression de l'activité β -galactosidase dans les cellules sénescents a permis de mettre en place un nouveau système de délivrance des médicaments. En effet, les médicaments sont encapsulés dans une matrice capable d'être dégradée par la β -galactosidase. Comme cette activité est plus importante dans les cellules sénescents, la libération du composé reste ciblée à ces cellules (Muñoz-Espín et al., 2018).

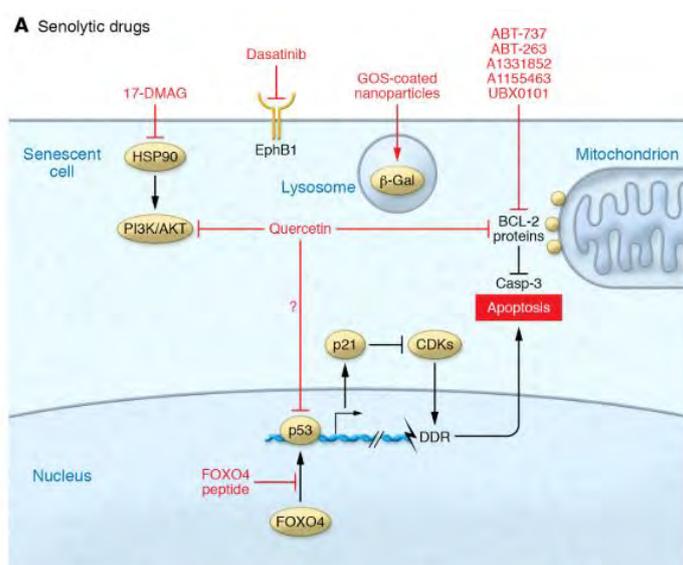


Figure 17 : Mode d'action des sénolytiques (Ovadya & Krizhanovsky, 2018)

2. Cibler la production du SASP

Alors que l'élimination des cellules sénescentes apparaît comme une bonne stratégie, il existe aussi d'autres moyens de limiter les effets délétères de ces cellules et d'améliorer la qualité du vieillissement. Ces stratégies alternatives ont pour but de cibler leur activité la plus néfaste : la production du SASP. Le SASP, malgré ses côtés bénéfiques (recrutement de cellules immunitaires pour la clairance des cellules endommagées, réparation tissulaire,...), lorsqu'il est produit de façon chronique, perturbe l'homéostasie tissulaire et favorise le développement des pathologies associées au vieillissement (J.-P. Coppé et al., 2010a; Ovadya & Krizhanovsky, 2014). Il est connu que la production de ce SASP est relié à l'activation des voies de signalisation du NF- κ B et du C/EBP β , qui sont aujourd'hui largement étudiées et peuvent être modulées par un grand nombre de molécules thérapeutiques déjà sur le marché (J.-P. Coppé et al., 2010a; Longo et al., 2015; Salminen, Kauppinen, & Kaarniranta, 2012).

a) Inhibiteurs de NF- κ B

i. Inhibition de la voie mTOR

La voie de signalisation mTOR aurait un impact sur l'espérance de vie dans de nombreux organismes et espèces (Bitto et al., 2016; Johnson, Rabinovitch, & Kaeberlein, 2013). Un des inhibiteurs de cette voie, aujourd'hui connu et autorisé par les autorités de santé est la rapamycine. Son utilisation permet l'allongement de la durée de vie des souris de plus 18% chez les femelles et 10% chez les mâles (Miller et al., 2014). Par ailleurs, l'inhibition de la voie mTORC1 permet de diminuer l'apparition de nombreuses pathologies liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer, la progression de certains cancers ou l'insuffisance cardiaque dans un contexte de constriction de l'aorte transverse (TAC) (Johnson et al., 2013). Très récemment, des travaux réalisés en collaboration ont pu mettre en évidence que l'inhibition de la voie mTOR par la rapamycine permet une restauration de la mitophagie et prévient une dysfonction mitochondriale ainsi que l'induction d'une sénescence dans des modèles de cardiomyocytes chez le rat (Manzella et al., 2018). De plus, la rapamycine et ses analogues, peuvent abolir la production du SASP en diminuant par des mécanismes indirects l'expression et la traduction de l'IL-1 α , diminuant ainsi l'activité transcriptionnelle de NF- κ B connue pour être responsable de la production de nombreuses cytokines telles que l'IL-6 ou l'IL-8 (Laberge et al., 2015).

Par ailleurs, la rapamycine possède de nombreux effets indésirables dont l'apparition de dérégulations métaboliques (hyperglycémie, insulino-résistance,...), une perte musculaire (sarcopénie), ou des défauts de prolifération de la lignée hématopoïétique (Soefje, Karnad, & Brenner, 2011). Les défauts métaboliques et la sarcopénie sont déjà de lourds problèmes chez les personnes âgées. Des études supplémentaires sont alors nécessaires avant de permettre son utilisation à long terme en tant que traitement anti-vieillessement.

ii. Metformine

La metformine est un médicament déjà couramment utilisé dans le diabète de type 2. De la famille des biguanides, il augmente la sensibilité à l'insuline, augmente la glycolyse et supprime la néoglucogenèse hépatique. Chez la souris, le traitement par la metformine limite les processus inflammatoires, préserve la fonction mitochondriale et réduit l'apparition de différentes pathologies liées à l'âge tout en prolongeant la durée de vie (Martin-Montalvo et al., 2013). Une récente méta-analyse a étudié l'impact d'un traitement par metformine sur l'apparition de pathologies liées à l'âge et des causes de mortalité chez l'Homme. Les patients traités par metformine ont une plus faible mortalité que ceux non traités et même que ceux traités par d'autres anti-diabétiques. Par ailleurs, ce traitement induit un effet géoprotecteur en retardant ou prévenant l'apparition de pathologies liées à l'âge, notamment les cancers, et les pathologies cardiovasculaires, qui sont les deux causes majeures de mortalités chez les personnes âgées (Campbell, Bellman, Stephenson, & Lisy., 2017).

D'un point de vue mécanistique, ce médicament empêche la translocation de NF- κ B au noyau et restreint ainsi son activité transcriptionnelle, induisant alors une diminution de la production des cytokines du SASP, et le phénomène de contexte inflammatoire chronique (Moiseeva et al., 2013).

iii. Anticorps neutralisants anti IL-1 α

L'IL-1 α est aujourd'hui connue comme une cytokine initiatrice de la production du SASP. En effet, par la liaison à son récepteur IL1R, l'IL-1 α active l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, qui induira la production des cytokines du SASP telles que l'IL-6 et l'IL-8 par les cellules sénescentes. Elle permet aussi la mise en place d'une boucle d'amplification positive en augmentant sa propre sécrétion et permettant le maintien et l'activation sa voie de signalisation, produisant alors encore plus de cytokines du SASP. La perte de la voie de signalisation de l'IL-1 α dans les cellules sénescentes, en interférant avec sa production ou l'activité de l'IL1R, réduit de façon significative les taux d'IL-6 et d'IL-8, démontrant que la stimulation de son récepteur est nécessaire à la production du SASP (Freund et al., 2010; Orjalo et al., 2009). De plus, comme décrit précédemment, la rapamycine peut agir sur cette voie en diminuant l'expression et la traduction de l'IL-1 α (Laberge et al., 2015). On peut donc comprendre que l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-IL-1 α serait un bon espoir thérapeutique. Aujourd'hui, les traitements anti-IL1R tels que l'anakinra sont utilisés dans les pathologies inflammatoires. De nombreuses études testent leurs effets dans différentes pathologies et notamment les pathologies cardiovasculaires (Bennett G. Childs, Gluscevic, Baker, Laberge, Marquess, Dananberg, & van Deursen, 2017; Szekely & Arbel, 2018).

b) Autres modes d'action

D'autres voies sont aussi à l'étude, comme l'inhibition du facteur de transcription C/EBP β , par inhibition de la voie de signalisation JAK/STAT. Une molécule inhibitrice de JAK1/2, le ruxolitinib, déjà sur le marché permet la réduction d'une inflammation systémique, améliore la qualité de vie et permet de diminuer les symptômes de fragilité chez des souris âgées (Xu, Tchkonja, et al., 2015).

Il existe aussi la possibilité de moduler des régulateurs épigénétiques, tels que bromodomain-containing protein 4 (BRD4) ou high-mobility group box 2 (HMGB2), connues pour permettre la modulation du SASP, sans action sur le cycle cellulaire (Bennett G. Childs, Gluscevic, Baker, Laberge, Marquess, Dananberg, & van Deursen, 2017; Ovadya & Krizhanovsky, 2018).

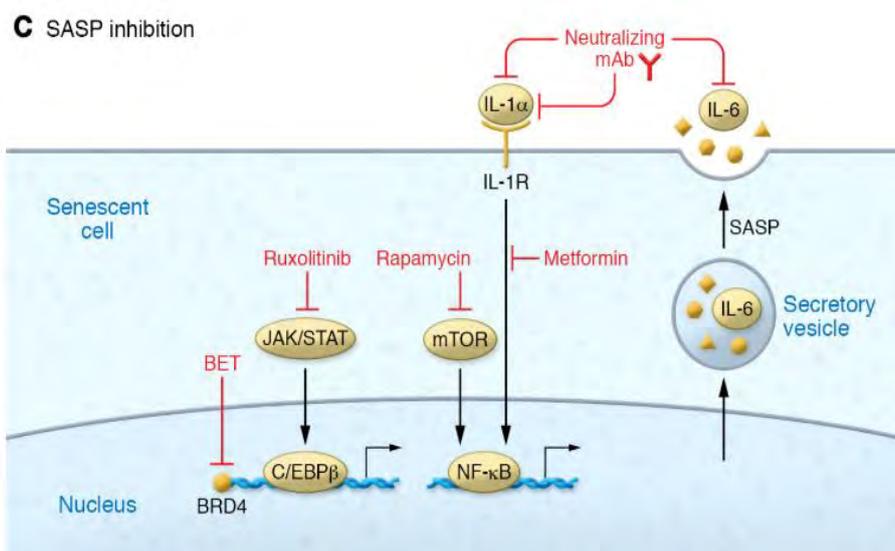


Figure 18 : Mode d'action des sénolytiques par inhibition du SASP (Ovadya & Krizhanovsky, 2018)

III. Les cellules stromales mésenchymateuses cardiaques et leur potentiel angiogénique

A. Les cellules souches

Une cellule souche se définit comme une cellule possédant une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation cellulaire (Van Der Kooy & Weiss, 2000).

L'auto-renouvellement est la capacité à se diviser pendant de longues périodes en donnant naissance à des cellules filles identiques à la cellule mère. Les divisions peuvent être symétriques ou asymétriques. Une division symétrique permet de donner naissance à 2 cellules filles totalement identiques à la cellule mère (ou division homoplastique) ou parfois à des stades de différenciation plus avancés que la cellule mère (division hétéroplastique) (Morrison & Kimble, 2006). Cette division se déroule le plus souvent au stade embryonnaire, mais est aussi parfois retrouvée dans les tissus adultes afin d'assurer un stock durable et permanent de cellules souches.

La division asymétrique quand à elle, aboutit à la génération de 2 cellules filles différentes. La première est le reflet de la cellule mère, la seconde est une cellule plus différenciée. Ce processus permet d'engendrer une diversité cellulaire nécessaire au bon développement des organismes pluricellulaires. Ce mécanisme est très fréquemment retrouvé pour les cellules souches, notamment les cellules souches hématopoïétiques (Morrison & Kimble, 2006).

Par ailleurs, il n'existe pas qu'un seul type de cellule souche. Nous pouvons distinguer 4 groupes en fonction de leur potentiel de différenciation et de leur niveau d'engagement vers la cellule dite différenciée (Spencer, Gimble, & Lopez, 2011) :

- La cellule souche totipotente : la cellule peut à elle seule conduire au développement d'un organisme entier. Ces cellules sont présentes lors des premières divisions de l'œuf fécondé jusqu'à au stade 8 blastomères.
- La cellule souche pluripotente : la cellule pourra donner les cellules d'un des 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme), mais a perdu la capacité à se différencier en cellules des annexes extra-embryonnaires permettant la formation du placenta.
- La cellule souche multipotente : Ces cellules représentent la majorité des cellules souches retrouvées chez un organisme adulte. Elles peuvent donner plusieurs types cellulaires différents, mais appartenant à un même feuillet embryonnaire. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques pourront s'engager dans des voies de différenciation distinctes telles que l'érythropoïèse, la thrombocytopoïèse ou la lymphopoïèse qui permettront la génération et le

renouvellement des globules rouges, plaquettes ou lymphocytes, mais ne donneront pas de cellules non hématopoïétiques comme des cellules musculaires.

- Les cellules souches unipotentes : la cellule ne pourra se différencier qu'en un seul type cellulaire bien distinct, tout en gardant leur potentiel d'auto-renouvellement. Ce sont par exemple, les spermatogonies qui permettent la production de spermatozoïdes chez l'homme adulte ou les cellules souches intestinales qui assurent la capacité de renouvellement de l'épithélium intestinal.

Les cellules souches retrouvées dans le tissu adulte participent au maintien de l'homéostasie tissulaire, permettant le remplacement des cellules mortes par apoptose ou nécrose de façon physiologique ou lors d'une lésion tissulaire. Elles permettent aux tissus de conserver au mieux leurs fonctions tout le long de la vie de l'organisme. Par ailleurs, au cours du vieillissement, les capacités d'auto-renouvellement de ces cellules diminuent, ce qui contribue à la dégénération progressive des organes avec l'âge (López-Otín et al., 2013).

B. Cellules stromales mésenchymateuses cardiaques

1. Les cellules stromales mésenchymateuses

Les cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) ont pour la première fois été identifiées dans le stroma de la moelle osseuse en 1968 par Friedenstein *et al.* (Friedenstein, Petrakova, Kurolesova, & Frolova, 1968). Ils ont découvert des cellules à fort potentiel prolifératif et aux propriétés clonogéniques qu'ils nomment "cellules fibroblastoïdes formatrices de colonies" (CFU-F). Ces cellules possèdent aussi une capacité de différenciation en chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes ou en cellules support de l'hématopoïèse *in vitro* et *in vivo* (Friedenstein, 1980; Friedenstein, Chailakhjan, & Lalykina, 1970; Friedenstein et al., 1974). Plus tard, Caplan les renommait cellules souches mésenchymateuses à cause de leur capacité de différenciation en cellules de la lignée mésodermique (os, tissu adipeux, cartilage,...) (A. Caplan, 1991). Or de nombreuses études ont reporté aussi une capacité de différenciation en cellules des autres feuilletts embryonnaires, tels que des cellules endodermiques (cellules hépatiques, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses), et ectodermiques (neurones) (A. Caplan, 1991; Kurpinski et al., 2010; Oswald et al., 2004; Ulrich, do Nascimento, Bocsi, & Tárnok, 2015; Wu & Tao, 2012), remettant en cause le caractère multipotent de ces cellules qui seraient alors pluripotentes (Figure 19) (A. I. Caplan, 2017). Bien que parfois démontrées *in vitro*, ces capacités de différenciation en certaines lignées ne sont pas universellement acceptées, comme pour la différenciation cardiomyocytaire (Rose, Jiang, et al., 2008; Rose, Keating, & Backx, 2008).

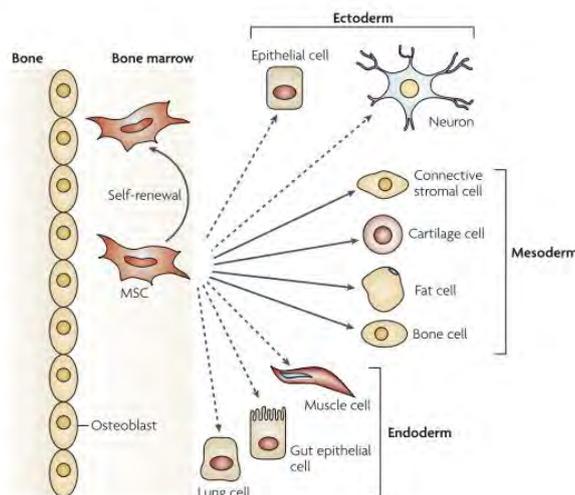


Figure 19 : Multipotence des BM-MSCs (Uccelli, Moretta, & Pistoia, 2008)

Ces cellules sont aujourd’hui largement utilisées dans des études cliniques. En effet, environs 1000 études cliniques à travers le monde utilisent le terme de mesenchymal stem ou stromal cells, et plus de 200 celui de MSCs, répertoriées sur le site clinicaltrials.gov.

Cependant, dans la majorité des cas, le nombre de MSCs injectées retrouvées différenciées dans le tissu reste faible, et la greffe tend à avoir une faible durée de vie, suggérant un autre mécanisme que la différenciation *per se*, par lesquelles MSCs exerceraient leur fonction thérapeutique (Ying Wang, Chen, Cao, & Shi, 2014). En effet, ce serait plutôt par leur capacité de sécrétion de nombreux facteurs, et leur capacité de modulation de leur micro-environnement permettant entre autre une immunorégulation (Uccelli et al., 2008), favorisant l’angiogenèse et la stabilité vasculaire (Watt et al., 2013), ou induisant un remodelage de la matrice extracellulaire (Kramann et al., 2015). Les différentes fonctions thérapeutiques des MSCs sont répertoriées dans la figure 20.

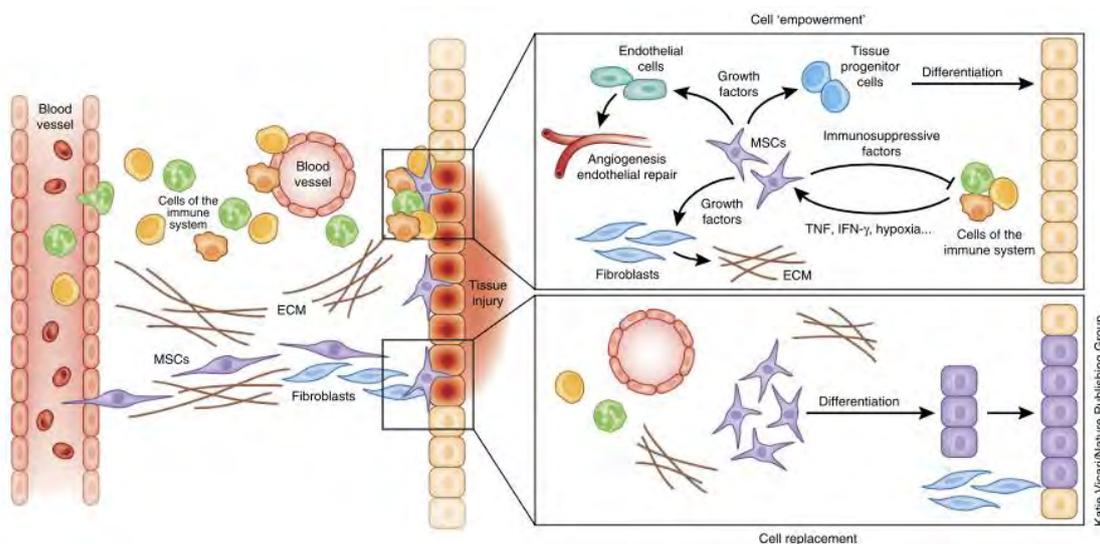


Figure 20 : Mode d’action des MSCs (Ying Wang et al., 2014)

De façon intéressante, des cellules similaires aux BM-MSCs ont été isolées à partir de différents organes et tissus tels que : la moelle osseuse, le tissu adipeux, la peau, les muscles, les tendons, les os, le cerveau, le foie, les reins, les poumons, la rate, le pancréas, le thymus, la membrane sinoviale, le cordon ombilical, le cœur ou les vaisseaux (Chong et al., 2011; Corselli, Chen, Crisan, Lazzari, & Péault, 2010; Crisan et al., 2008; da Silva Meirelles, 2006; Klimczak & Kozłowska, 2016). L'hypothèse de cellules mésenchymateuses circulantes, mobilisables aux sites lésionnels est aujourd'hui encore discutée (da Silva Meirelles, 2006)(Bianconi et al., 2018; Santini, Forte, Harvey, & Kovacic, 2016).

2. Caractérisation des MSCs : Difficultés d'une définition claire

Aujourd'hui les cellules stromales mésenchymateuses issues de la moelle osseuse restent les plus étudiées et les plus connues des cellules souches dérivées du mésoderme. La plupart des caractéristiques des MSCs des autres tissus découlent des connaissances obtenues chez les BM-MSCs. Néanmoins, à cause des différentes procédures d'isolement, des diverses conditions de culture et l'hétérogénéité physiologique des BM-MSCs, notre connaissance sur la biologie de ces cellules reste limitée. En effet, la question de base de la définition des MSCs reste elle-même controversée et discutée. La caractérisation de ces MSCs diffère entre les laboratoires et les espèces. Il n'y a pas de marqueurs spécifiques ou une combinaison de marqueurs identifiant clairement cette population *in vivo* et *in vitro*. C'est pourquoi en 2006, l'ISCT (International Society for Cellular Therapy) met en place différents critères afin d'homogénéiser l'identification des cellules mésenchymateuses tels que (Dominici et al., 2006):

- La capacité d'adhérence au plastique et de formation de CFU-Fs
- La différenciation en chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes *in vitro*
- L'expression de marqueurs de surface : CD105, CD73, CD90 et l'absence de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19, et HLA-DR.

Malgré tout, ces critères bien que convenables, ne sont pas totalement convaincants pour la communauté scientifique, car ils sont basés sur des observations *in vitro*. Comme a déclaré Robey « Nous avons appris à reconnaître des cellules souches, non pas par leur potentiel dans l'organisme dont elles dépendent, mais plutôt par ce qu'on peut en faire au laboratoire » (Robey, 2000). Or, il est aujourd'hui bien admis que le phénotype et le comportement des cellules peuvent être altérés et modifiés au cours de la culture cellulaire *in vitro* (Bara, Richards, Alini, & Stoddart, 2014). De plus, l'expression des marqueurs de surface varie à cause de l'utilisation de différentes techniques d'isolement, mais aussi du fait des variations entre les espèces, de l'origine cellulaire (embryonnaire ou adulte) et du tissu d'origine. Par exemple, les cellules ADSC isolées du tissu adipeux expriment des marqueurs tels que le CD49d (a4 intégrine) le CD34 et le CD106 (qui est un

marqueur d'adhérence vasculaire) qui sont absents dans les BM-MSCs. Par ailleurs, des marqueurs communs aux péricytes peuvent aussi être retrouvés (CD146). Il n'y a donc aujourd'hui aucun marqueur ou combinaison de marqueurs déterminés permettant une purification sans équivoque des MSCs (Spencer et al., 2011). Le défi d'une homogénéisation des critères de définition des MSCs demeure donc, mais cette difficulté pourrait être expliquée si nous considérons que les BM-MSCs ou les MSCs représentent une population hétérogène de cellules progénitrices à différentes étapes de différenciation.

3. Cellules stromales mésenchymateuses cardiaques, Sca1+ PDGFR α +

a) Définition

Récemment, une population de cellules MSC-like a été identifiée dans le cœur chez la souris, caractérisée par l'expression du récepteur au PDGF de type alpha (PDGFR α) et du Sca1. Ces cellules possèdent des qualités de cellules souches comme la clonogénie (CFU), la capacité d'auto-renouvellement et une multipotence *in vitro* et *in vivo* (Chong et al., 2011; Nosedá, Harada, McSweeney, et al., 2015). Ces cellules sont nommées cCFU-F (cardiac colony forming units fibroblast) dans la plupart des publications, de façon cohérente avec la nomenclature des CFU-F dérivées de la moelle osseuse, mais peuvent aussi être retrouvées sous le nom de fibroblastes cardiaques ou voire même de Side Population (SP). Aucun consensus clair aujourd'hui ne définit réellement cette population. Dans le cœur adulte, ces cCFU-F donneraient naissance à diverses variétés de cellules stromales, tels que les cellules périvasculaires, les adipocytes, les myofibroblastes, les cellules endothéliales coronariennes et, de façon controversée, à des cardiomyocytes en situation homéostatique ou pathologique (Asli, Xaymardan, & Harvey, 2014).

Ces cellules PDGFR α auraient une origine épiscopique, et seraient localisées dans les espaces interstitiels, périvasculaires ainsi que les niches adventitielles (Chong et al., 2011, 2013). Les souris génétiquement déficientes pour le PDGFR α spécifiquement au niveau épiscopique (par déplétion avant E13,5) montrent un défaut au niveau de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et une mort des fibroblastes cardiaques (ou cellules stromales dérivées de l'épiscarde), alors que les cellules musculaires lisses, elles-mêmes dérivées de l'épiscarde, ne sont pas affectées (C. L. Smith, Baek, Sung, & Tallquist, 2011).

Par ailleurs, ces cellules expriment des marqueurs typiques des MSCs de la moelle osseuse tels que CD44, CD90, CD29 et CD105 (Chong et al., 2011; Pelekanos et al., 2012), mais aussi certains facteurs de transcription cardiaque tels que GATA4, TBX5, HAND1 et MEF2C suggérant une identité cardiaque ou un engagement en cellules de la lignée cardiaque (Furtado et al., 2015; Nosedá, Harada, McSweeney, et al., 2015).

Le PDGFR α est connu pour jouer un rôle important dans l'organogenèse embryonnaire. En effet, dans un modèle murin, l'absence de ce récepteur induit des défauts de formation du tractus ventriculaire, du

septum, des cavités et des vaisseaux coronaires. Le rôle de la signalisation du PDGF dans la biologie des cCFU-Fs et des cellules stromales n'est pas encore bien connu. En plus d'être nécessaire à la TEM et à la formation de fibroblastes au cours du développement, ce récepteur pourrait jouer un rôle dans le maintien du phénotype des cellules souches (Ball, Worthington, Canfield, Merry, & Kielty, 2014).

Par ailleurs, il est connu qu'une activation anormale ou persistante de la voie de signalisation du PDGF serait impliquée dans la fibrose de multiples organes, dont le cœur (Olson & Soriano, 2009).

Une autre sous population de ces progéniteurs périvasculaires exprimant Gli1 et PDGFR β a été retrouvée dans des modèles murins de pathologies cardiaques (Kramann et al., 2015). Les myofibroblastes (exprimant α SMA) seraient les descendants majoritaires de ces cellules résidentes Gli1 dans des modèles d'hypertension et de surcharge de pression permettant le développement d'une fibrose cardiaque. La déplétion spécifique des cellules Gli1+ au cours d'une surcharge de pression réduit l'apparition de cette fibrose réactionnelle, préservant alors la fonction ventriculaire gauche et l'apparition de l'insuffisance cardiaque.

Pour résumer, les cCFU-F adultes représentent un type de progéniteurs cardiaques permettant le maintien du compartiment stromal, de la matrice et du compartiment vasculaire du cœur durant l'homéostasie. Par ailleurs, ils contribueraient aussi à la fibrose accompagnant certaines pathologies par leur différenciation en myofibroblastes (Kramann et al., 2015). Ces cellules stromales cardiaques agiraient aussi comme des sentinelles du stress cardiaque et des fonctions autocrines, et participeraient au dialogue cellulaire avec les autres cellules cardiaques résidentes dont les cardiomyocytes et les cellules immunitaires par des mécanismes paracrins (Santini et al., 2016)

b) Les cMSCs sont elles des péricytes ?

A cause de leur localisation périvasculaire et dans les niches adventitielles, ainsi que leur capacité de différenciation vasculaire, une origine commune ou le rapprochement avec les péricytes se pose. Les péricytes sont des cellules de soutien du tissu vasculaire, et par leur forte association avec les cellules endothéliales, ont des rôles essentiels dans le maintien des vaisseaux sanguins et dans l'angiogenèse (Díaz-Flores et al., 2009). Ces cellules pourraient aussi jouer un rôle dans le maintien d'une niche pour les cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse (Kunisaki et al., 2013). Ces péricytes sont identifiés par leur localisation mais aussi par l'expression de certains marqueurs tels que CD146, NG2, PDGFR β , et la phosphatase alcaline (ALP) (Crisan et al., 2008). Or certains de ces marqueurs ont été suggérés pour définir plus précisément les MSCs, tels que le CD146 et le PDGFR β (Pontikoglou, Deschaseaux, Sensebé, & Papadaki, 2011). De plus, une origine épicaudique a été décrite pour des cellules Sca1+ (Nosedá, Harada, McSweeney, et al., 2015), cMSCs et possiblement certains progéniteurs cardiaques humains (Antonio P. Beltrami et al.,

2007). Pour finir, les péricytes sembleraient aussi avoir des qualités de cellules progénitrices telles que la clonogénie ou la multipotence (A. I. Caplan, 2008; Crisan, Corselli, Chen, & Péault, 2012).

Ces découvertes ont suscité l'hypothèse que tous les péricytes sont des MSCs, mais également que toutes les MSCs peuvent agir comme des péricytes. Cependant en 2013, Blocki et al, démontrent que toutes les MSCs ne se comportent pas comme des péricytes car seule la sous population de MSCs CD34- CD146+ permet le maintien d'une tubulogénèse *ex vivo*, supposant ainsi que les péricytes pourraient être une sous-population de MSCs (Blocki et al., 2013). De plus, de récentes découvertes suggèreraient que les cellules isolées de différents tissus humains exprimant le CD146 seraient clairement distinctes des BM-MSCs, de par leur capacité de différenciation ou d'un point de vue transcriptomique (Sacchetti et al., 2016)

De façon similaire aux cellules mésenchymateuses, définir les péricytes comme une population homogène reste inexact. En effet, il a été montré que l'expression du CD146 ne peut pas être considéré comme un marqueur universel de cette population cellulaire, car il est également exprimé par les cellules endothéliales, et serait absent des péricytes adventitiels CD34+, n'exprimant pas non plus NG2 et PDGFR β . Ces cellules adventitielles exprimeraient d'avantage des marqueurs de MSCs (CD44, CD73, CD90, et CD105) (Campagnolo et al., 2010; Corselli et al., 2012).

On peut donc voir, que les MSCs et les péricytes à l'heure actuelle possèdent de nombreuses similitudes et semblent fortement liés, mais tendent à avoir certaines caractéristiques propres et complémentaires. L'hétérogénéité de ces 2 types cellulaires montrent bien qu'il est encore aujourd'hui nécessaire d'étudier, de façon plus approfondie ces populations afin d'en mieux les définir, et pouvoir les exploiter au mieux dans des thérapies cellulaires (Antonio Paolo Beltrami & Madeddu, 2017; Melchiorri, Nguyen, & Fisher, 2014; Wong et al., 2015).

C. Les autres progéniteurs cardiaques

Il y a encore quelques années, le cœur était considéré comme un organe à différenciation terminale sans capacité de régénération. Cette hypothèse était basée sur la nature différenciée des cardiomyocytes et leur caractéristique post mitotique. La découverte de différentes populations de progéniteurs cardiaques depuis une vingtaine d'années a fait évoluer cette vision ancrée depuis des décennies, supportée encore plus récemment par la découverte d'une prolifération des cardiomyocytes au cours de vieillissement physiologique (Bergmann et al., 2015; Kimura et al., 2015). Cette évolution de pensée et ces découvertes ont permis d'augmenter les recherches sur la régénération cardiaque et surtout sur les cellules progénitrices résidentes cardiaques. Différentes populations de progéniteurs cardiaques ont pu être décrites dans le cœur adulte de différents mammifères (Homme, souris, rats, ...). Ces populations ont été mises en évidence grâce à différentes approches expérimentales et diffèrent donc sur leurs marqueurs ou leur localisation au sein du

tissu cardiaque, mais gardent un potentiel de différenciation *in vitro* et *in vivo* assez similaire en cellules musculaires lisses, cellules endothéliales voire même en cardiomyocytes. Ces cellules restent très rares *in vivo*, représentant seulement 0.005 à 2% des cellules cardiaques (Santini et al., 2016).

Les différentes cellules progénitrices cardiaques étudiées sont les suivantes (Figure 21):

- Les cellules ISL1+
- Les cellules c-Kit +
- Les cellules Sca1+ (souris),
- Les cellules side population (SP)
- Les cardiosphères

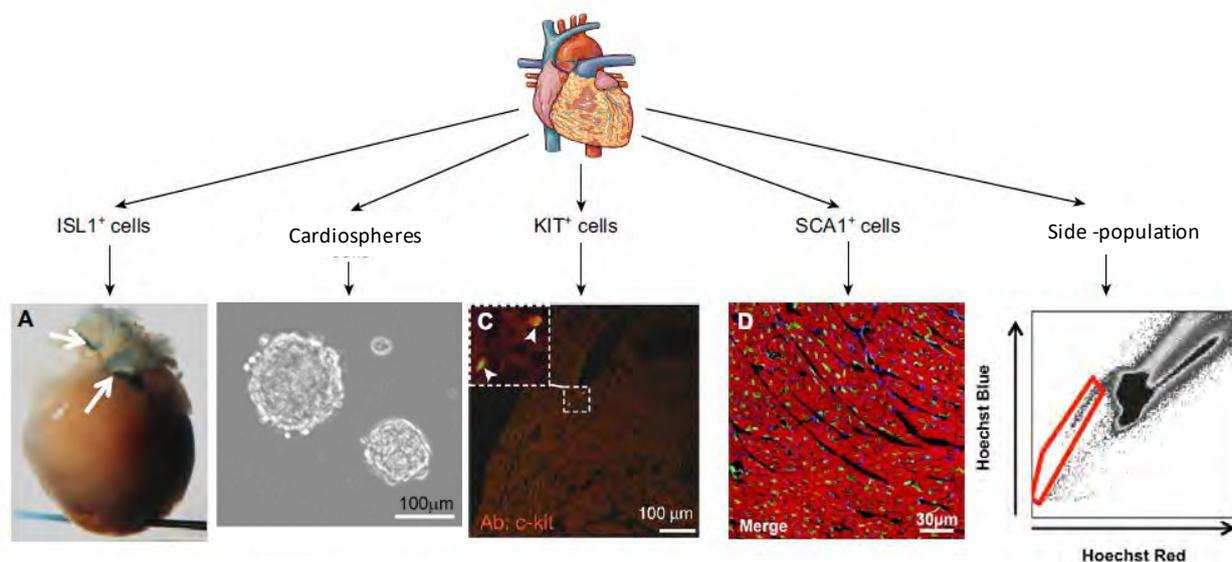


Figure 21 : Différents progéniteurs cardiaques, inspiré de T. Nakamura et al., 2016; Santini et al., 2016; Yellamilli & van Berlo, 2016

1. Cellules c-Kit+

Kit (c-Kit, CD117) est un récepteur tyrosine kinase, récepteur du stem cell factor (scf ou kit-ligand), identifié pour la première fois en 1987 ayant un rôle de proto-oncogène, soit un régulateur positif de la prolifération cellulaire (Yarden et al., 1987). En 2003, l'étude de Beltrami *et al*, a permis d'identifier ce récepteur comme marqueur d'une population résidente de progéniteurs cardiaques (Antonio P Beltrami et al., 2003). Ces cellules sont clonogéniques, capables d'auto-renouvellement et possèdent un potentiel de différenciation en cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et cardiomyocytes *in vitro*. *In vivo*, des cellules c-Kit+ différenciées en cellules musculaires lisses et endothéliales après transplantation sont retrouvées dans l'arbre artériel coronaire de cœurs infarctés (Tillmanns et al., 2008). De plus, lorsqu'elles sont transplantées dans le myocarde infarcté de rat, les progéniteurs c-Kit+ facilitent la régénération du myocarde.

Ces cellules c-Kit⁺ possèdent aussi des facteurs de transcription leur conférant une identité cardiaque tels que NKX2.5, GATA4, et MEF2C, et sont négatives pour les marqueurs du linéage hématopoïétique CD45⁻. La sélection des cellules essentiellement sur l'expression du c-Kit et l'absence du CD45 fait apparaître une population hétérogène. Différentes études ont pu identifier des sous populations de progéniteurs c-Kit avec différentes capacités fonctionnelles. Une équipe américaine a mis en évidence chez l'homme 2 types de cellules c-Kit positives se distinguant sur l'expression du marqueur KDR (VEGFR2) (D'Amario, Fiorini, et al., 2011). D'un côté nous avons les mCSCs (myogeniccardiac stem cells), n'exprimant pas le KDR, retrouvées dans l'interstitium du myocarde (notamment dans atria et l'apex où le stress hémodynamique est le plus faible) et regroupées en niche, d'où elles peuvent établir des connections avec les cardiomyocytes et les fibroblastes. Ces cellules participeraient au renouvellement des myocytes. De l'autre côté nous avons les vCSCs (vasculogeniccardiac stem cells) qui expriment le c-Kit ainsi que le KDR et sont retrouvés au niveau des niches vasculaires distribuées le long de la circulation coronarienne. Elles sont responsables du renouvellement des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales (Bearzi et al., 2009). Le récepteur à l'IGF-1 a aussi été utilisé pour différencier différents types de progéniteurs c-Kit, ceux qui expriment l'IGF1R participeraient de façon plus prononcée à la régénération cardiaque (D'Amario, Cabral-Da-Silva, et al., 2011). Lorsqu'ils sont transplantés dans le myocarde infarci de rats immuno-déprimés, les cellules ckit exprimant l'IGF1R augmentent significativement la régénération tissulaire.

Les pathologies (fibrillation atriale, infarctus du myocarde) ou le genre affectent leur distribution et leur nombre (Gambini et al., 2012; Itzhaki-Alfia et al., 2009). En effet, les femmes auraient plus de progéniteurs c-Kit que les hommes (Itzhaki-Alfia et al., 2009).

Néanmoins, cette population cellulaire bien que largement étudiée reste aujourd'hui très contestée dans la communauté scientifique. En effet, leur capacité de différenciation en cardiomyocytes fait aujourd'hui débat, et plusieurs publications de l'équipe d'Anversa ont été retirées.

2. Cellules ISL1+

ISL1 est un facteur de transcription de l'homéodomaine LIM, qui se lie et contrôle les éléments cis-régulateurs des gènes de l'insuline (Karlsson et al., 1990). En 2003, il a été découvert que ce facteur de transcription était aussi présent dans des progéniteurs cardiaques jouant un rôle crucial dans la formation du ventricule droit, de l'atrium et du tractus efférent ventriculaire (C. L. Cai et al., 2003). La délétion d'ISL1 affecte la survie et la prolifération de progéniteurs cardiaques et leur déploiement dans le tube cardiaque en formation (C. L. Cai et al., 2003; Laugwitz, Moretti, Caron, Nakano, & Chien, 2007). Ces cellules ISL1⁺ sont des progéniteurs multipotents ayant la capacité de se différencier dans les 3 lignées cardiovasculaires : cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et cardiomyocytes *in vitro* et *in vivo*, ce qui pourrait en faire des cellules d'intérêt pour la régénération cardiaque (Bu et al., 2009; Moretti et al., 2006).

Néanmoins, l'expression de ces progéniteurs cardiovasculaires ISL1 est étroitement liée à l'âge. Les tissus néonataux et fœtaux en possèdent des taux abondants tandis que dans les tissus adultes leur nombre reste très faible et sont localisés essentiellement dans le nœud sinoatrial (Fuentes & Kearns-Jonker, 2013; Weinberger et al., 2012).

De plus, il n'est pas encore clairement défini si les cellules ISL1+ représentent une population de cellules souches pouvant être mobilisées pour la réparation tissulaire. Non seulement elles sont rares, mais aucune cellule ISL1+ n'a été retrouvée dans la région infarctée après un infarctus du myocarde (Weinberger et al., 2012) et seulement une expansion localisée a pu être observée après ischémie-reperfusion (Genead et al., 2012). En considérant que ces cellules sont rares dans le myocarde adulte, cela les rend difficile d'utilisation pour des transplantations autologues. Le potentiel des progéniteurs ISL1 pour la thérapie chez l'Homme, existe toujours chez le nouveau-né où elles sont beaucoup plus abondantes. Des études approfondies sont nécessaires pour étudier leur rôle thérapeutique et leur valeur potentielle chez le nouveau-né (Fuentes & Kearns-Jonker, 2013; Santini et al., 2016).

3. Sca1+

Sca1 (stem cell antigen 1) était dans un premier temps un marqueur de surface utilisé pour identifier ou enrichir les cellules souches hématopoïétiques. Cependant, des cellules Sca1+ ont été retrouvées dans le cœur et représentent une population très hétérogène. En effet, ce marqueur permet d'identifier des cellules endothéliales microvasculaires, les cellules progénitrices c-Kit+, les PDGFR α +, les cCFU-F et les cellules stromales, mais aussi d'autres cellules interstitielles et périvasculaires. En outre, cette fraction Sca1+ exprime les facteurs de transcription cardiaques tels que GATA4, MEF2C et TEF1, mais n'exprimerait pas d'autres marqueurs de la lignée cardiomyocytaire dont NKX2-5 (Oh et al., 2003). De façon intéressante, l'analyse transcriptomique comparant différents progéniteurs, cardiaque et de moelle osseuse, montre que la population totale des cellules Sca1+ cardiaques semble être celle se rapprochant le plus des cardiomyocytes, alors que les cellules c-Kit+ sont celles s'en éloignant le plus (Dey et al., 2013). Les cellules Sca1+ cardiaques de la fraction vasculaire/interstitielle de souris et humaines peuvent se différencier en cardiomyocytes *in vitro* en utilisant la 5-azacytidine. Cette différenciation est aussi mise en évidence dans des procédures de transfert chez les souris infarctées, permettant l'amélioration de la fonction cardiaque et sa réparation (Oh et al., 2003; Smits et al., 2009; van Vliet et al., 2008). Deux semaines après l'injection des cellules, environ 18% des cardiomyocytes de la zone infarctée sont dérivés du donneur, bien que la moitié ait été produite par fusion entre les cellules du donneur et les cardiomyocytes préexistants (Oh et al., 2003). De plus, le traçage de la lignée CRE a montré qu'un faible pourcentage de cellules Sca1+ donne naissance à des cardiomyocytes au cours d'un vieillissement normal, la plupart formant des cellules musculaires lisses et potentiellement aussi des cellules endothéliales (Uchida et al., 2013).

Une des limitations à l'utilisation de ce marqueur seul pour identifier les progéniteurs cardiaques est sa non spécificité. En effet, un grand nombre de cellules Sca1+ expriment aussi Pecam1, un marqueur de cellules endothéliales. Par ailleurs, la suppression des cellules Sca1+ au sein du tissu cardiaque induit une diminution de la fonction cardiaque et une réponse hypertrophique chez les souris âgées (Bailey et al., 2012), pouvant être due à la perte des Sca1+ de la fraction stromale et/ou à la réduction de la microcirculation coronarienne. Cependant, sachant que la rétention cellulaire après la prise de greffe des cellules Sca1+ est faible, il reste à déterminer si l'hétérogénéité de cette fraction offre un avantage fonctionnel ou de survie dans les thérapies cellulaires, pour en faire des cellules de choix en thérapie cardiaque (Santini et al., 2016).

4. Side population (SP)

Les cellules SP (Side Population) ont été pour la première fois détectées dans la moelle osseuse. Elles sont identifiées en cytométrie de flux par leur capacité à effluer des marqueurs d'ADN (Hoechst 33342) grâce à l'expression d'un transporteur spécifique, le transporteur ABCG2 (Yellamilli & van Berlo, 2016). Dans le cœur adulte cette population est immature, représente environ 1% des cellules (Pfister, 2005), mais reste très hétérogène et pourrait représenter un mélange de différentes populations de cellules progénitrices. En effet, elles possèdent des marqueurs et des propriétés similaires à la population sca-1+, notamment à la population Sca1+ PDGFR α + (Noseda, Harada, McSweeney, et al., 2015). Elles expriment les facteurs de transcription cardiaques NKX2-5 et GATA4, les marqueurs Sca1+, c-Kit+, CD34 mais pas les marqueurs hématopoïétiques (CD45) ou de cellules endothéliales (CD31) ou de myofilaments (Pfister, 2005). Ces cellules sont des progéniteurs de cellules endothéliales vasculaires, cellules musculaires lisses et des précurseurs de cardiomyocytes. La co-culture des SP avec des cardiomyocytes adultes ou néonataux induit leur différenciation en cardiomyocytes contractiles et présentant des flux calciques (Pfister, 2005), mais peuvent aussi se différencier en cardiomyocytes lorsqu'elles sont cultivées seules, ou avec de la trichostatin A et de l'ocytocine (Oyama et al., 2007). Tout comme pour les cellules Sca1+, l'injection intraveineuse et intramyocardique des cellules SP cardiaques chez la souris suite à une lésion cardiaque, démontre leur potentiel de différenciation cardiomyocytaire, endothélial et en cellules musculaires lisses *in vivo* (Liang, Tan, Gaudry, & Chong, 2010; Oyama et al., 2007). Pour conclure, les cellules SP ont des propriétés progénitrices, mais sont majoritairement composées d'un mélange hétérogène de cellules cardiaques résidentes avec une identité et une origine encore mal connues. (Klimczak & Kozłowska, 2016; Santini et al., 2016)

5. Cardiosphères

Les cardiosphères consistent en une population hétérogène de cellules qui sont exclusivement dérivées du cœur et étudiées sous 3 états : les cardiosphères primaires, les cellules dérivées des cardiosphères CDC, et

les cardiosphères secondaires. Les cardiosphères primaires sont dérivées de biopsies endomyocardiales partiellement digérées, puisensemencées comme des explants dans des puits recouverts de fibronectine. Après quelques jours en culture, des cellules migrent à l'extérieur de l'explant. Une fois à confluence, ces cellules sont récoltées etensemencées dans des boîtes recouvertes de poly-d-lysine en présence d'un milieu permettant la formation de cardiosphères. Les cellules flottent alors dans des structures similaires à celles des sphéroïdes et qui sont nommées cardiosphères primaires (R. R. Smith et al., 2007). Ces cardiosphères possèdent des cellules très hétérogènes qui créent un environnement similaire à celle des niches de cellules souches permettant la prolifération en son cœur de cellules positives pour c-Kit, NKX2.5. A la périphérie de ce noyau, on retrouve des cellules stromales plus différenciées (Davis et al., 2009; T. S. Li et al., 2010). Quand elles sontensemencées en monocouches, les cellules forment des CDCs (cardiosphères derived cells). Exposées à de l'EGF (Epidermal Growth Factor), ces CDCs peuvent reformer des cardiosphères secondaires (Chimenti et al., 2010). *In vitro*, les cardiosphères primaires lorsqu'elles sont cultivées à faible concentration de sérum, sécrètent un panel de facteurs de croissance dont le VEGF, l'HGF et l'IGF1, tandis que les CDCs et les cardiosphères secondaires sécrètent seulement du VEGF (Chimenti et al., 2010). Bien que les cardiosphères semblent avoir des avantages fonctionnels, les CDCs sont plus largement utilisées afin d'éviter la formation de micro-embols lors de l'injection. Des essais cliniques utilisent donc ces CDCs, comme par exemple, l'essai CADUCEUS (Cardiosphere-Derived Autologous Stem Cells to Reverse Ventricular Dysfunction). Les patients reçoivent une injection intracoronaire de CDCs entre 1,5 et 3 mois post infarctus (Makkar et al., 2012). Aucun problème d'innocuité n'a été signalé 6 mois après l'injection et les patients traités ont présentés une réduction de la masse cicatricielle et une augmentation de la masse et de la fonction cardiaque (Makkar et al., 2012). Ces résultats positifs ont menés à un essai clinique de phase II (Allogenic Heart Stem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR)) (Chakravarty et al., 2017)(Santini et al., 2016).

Bien que ces essais soient assez convaincants, il persiste certaines limitations à l'utilisation de ces cellules en régénération cardiaque. En effet, inhérent à la technique d'isolement des cardiosphères, ces cellules sont très hétérogènes et pourraient conduire à des résultats très variés en clinique. Par ailleurs, de façon similaire aux autres progéniteurs cardiaques, l'âge impacte la fonctionnalité de ces cellules. Par exemples, les CDCs néonataux expriment des taux supérieurs de c-Kit, KDR et ISL1 et possèderaient un potentiel de différenciation augmenté. De plus, lorsqu'elles sont transplantées *in vivo* elles entraineraient amélioration plus importante de la fraction d'éjection et sécrèteraient plus de facteurs angiogéniques comparé aux CDCs adultes (Simpson et al., 2012). Il est donc nécessaire de continuer à étudier ces types cellulaires afin d'optimiser les capacités de régénération cardiaque de ces cellules (Fuentes & Kearns-Jonker, 2013).

D. Propriétés angiogéniques des MSCs

Comme développé précédemment, leur localisation histologique dans les niches périvasculaires et leur forte ressemblance avec les péricytes suggèrent que les MSCs pourraient avoir un rôle dans le remodelage vasculaire (Watt et al., 2013). La génération de vaisseaux sanguins peut se produire par différents mécanismes incluant la vasculogénèse (formation de vaisseaux sanguins par des précurseurs endothéliaux ou des angioblastes), l'angiogénèse (formation d'un nouveau réseau vasculaire à partir de vaisseaux préexistants) ou l'artériogénèse (remodelage de vaisseaux collatéraux préexistants, maturation et stabilisation de néo-vaisseaux par les péricytes ou les cellules musculaires lisses) (Jain, 2003). Différentes études, ont pu mettre en évidence une participation de ces MSCs dans chacun de ces mécanismes du remodelage vasculaire.

Les MSCs de différents tissus participent la formation *de novo* de vaisseaux stables par mobilisation de progéniteurs endothéliaux dans des modèles de vasculogénèse *in vitro* et *in vivo* (R. Z. Lin, Moreno-Luna, Zhou, Pu, & Melero-Martin, 2012; Merfeld-Clauss, Gollahalli, March, & Traktuev, 2010; Bob Zhou et al., 2012). L'artériogénèse, un des mécanismes les plus puissants de revascularisation chez l'adulte, conduit à l'augmentation de la lumière de petits vaisseaux collatéraux et leur stabilisation (van Royen, Piek, Schaper, & Fulton, 2009). Cette artériogénèse serait initiée par l'activation des cellules endothéliales par les forces de cisaillement et par un remodelage de la paroi vasculaire par libération de protéases et prolifération cellulaire néointimale. Les MSCs, par libération de facteurs angiogéniques et de protéases, stimuleraient ce processus, comme illustré par exemple dans un modèle d'ischémie de la patte (Lian et al., 2010). L'angiogénèse quant à elle, qui se produit en réponse à une ischémie ou une hypoxie, est caractérisée par la dégradation de la matrice extracellulaire et le détachement de cellules murales (péricytes ou cellules MSCs like) des capillaires et des microvaisseaux (<100µm diamètre), permettant ainsi le bourgeonnement d'un nouveau vaisseau. Les MSCs dérivées de la moelle osseuse murine ou humaine auraient la capacité de réguler la formation de vaisseaux sanguins, leur stabilisation et leur fonction (Melero-Martin et al., 2008; Traktuev et al., 2009). Des effets similaires ont été constatés chez l'Homme et la souris avec des MSCs issues du tissu adipeux, du cordon ombilical, du muscle squelettique ou du cœur (R. Z. Lin et al., 2012 ;X. Cai, Lin, Hauschka, & Grottkau, 2011 ;Roura et al., 2012).

Ces propriétés seraient essentiellement dues au large éventail de cytokines, protéases et facteurs de croissance pro-angiogéniques sécrétés par les MSCs (Angopoiétine, VEGF, FGF, EGF, PDGFAA, IGF-1, SDF1,...). Néanmoins, les MSCs des différents tissus pourraient ne pas avoir exactement le même potentiel angiogénique, par exemple, les MSCs du liquide amniotique induiraient une meilleure vasculogénèse que les BM-MSCs, possiblement par sécrétion d'un plus grand nombre de facteurs pro-angiogéniques (Watt et al., 2013).

L'implication de la différenciation directe des MSCs en cellules endothéliales dans ces processus angiogéniques, bien que démontrée *in vitro* et *in vivo*, reste aujourd'hui encore controversée (Pacini & Petrini, 2014). En effet, la preuve de cette différenciation est limitée à la détection et l'augmentation de l'expression de marqueurs typiques des cellules endothéliales dont le CD31, CD34, les récepteurs au VEGF (VEGFR1 et VEGFR2) et le von Willebrand factor (vWF). Comme la modification phénotypique est insuffisante pour démontrer la différenciation, des tests fonctionnels additionnels ont été réalisés. Ces tests *in vitro* consistent en la formation de tubes en matrigel et la capture de lipoprotéines acétylées de faible densité (Ac-LDL). Mais ces tests fonctionnels ne sont cependant pas toujours spécifiques, par exemple, la capture des Ac-LDL a pu être réalisée par d'autres types cellulaires tels que les macrophages ou les péricytes (Voyta, Via, Butterfield, & Zetter, 1984). Un large effort a été fait afin d'optimiser les protocoles permettant la différenciation endothéliale des MSCs. De nombreuses équipes ont mis en évidence cette différenciation avec des cocktails de différenciation différents mais comprenant systématiquement le VEGFA. Certaines fois, cette différenciation s'accompagne de la formation de structures vasculaires en matrigel (Chong et al., 2011; Jazayeri et al., 2008; Liu et al., 2007; Oswald et al., 2004). A l'inverse, V.D. Roobrouck *et al* en 2011 démontrent que le traitement des BM-MSCs par du VEGFA augmente significativement l'expression du CD34, VEGFR1 et VEGFR2, mais pas celle de Tie-2 du vWF ou de CD31 qui sont eux plutôt diminués, et ces cellules différenciées ne forment pas de tubes en matrigel (Roobrouck et al., 2011).

Néanmoins, plusieurs équipes ont réussi à démontrer cette différenciation vasculaire (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) *in vivo*, avec une augmentation de la densité vasculaire et une amélioration de la fonction cardiaque (Noseda, Harada, McSweeney, et al., 2015; Silva et al., 2005). Malgré tout, on ne peut exclure ici, l'apport de leur fonction paracrine.

Pour conclure, les MSCs bien que limitées en nombre pourraient contribuer aux processus angiogéniques *in vivo*, par leur capacité de différenciation et leur sécrétome pro-angiogénique.

Résultats

I. Introduction

Le vieillissement est considéré comme un facteur de risque majeur pour les pathologies chroniques, dont les pathologies cardiovasculaires (Lazzarini, Mentz, Fiuzat, Metra, & O'Connor, 2013; Niccoli & Partridge, 2012). Avec l'avancement en âge, la fonction et la morphologie cardiaque s'altèrent et conduisent à un cadre clinique caractéristique, l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP) (Abbate et al., 2015). Cette pathologie représente environ 50% des insuffisances cardiaques (Berry et al., 2005). Très souvent, la présence de co-morbidités conduit à une perte progressive de la fonction cardiaque et au développement d'une insuffisance cardiaque dilatée avec une diminution de la fraction d'éjection. De plus, avec le vieillissement le réseau vasculaire lui-même se modifie, et malgré une raréfaction des capillaires et un défaut d'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux), les vaisseaux résiduels possèdent un plus gros calibre (Sadoun & Reed, 2003; Wappler et al., 2013). En outre les vaisseaux s'allongent et deviennent plus tortueux conduisant à une vascularisation moins efficace, ceci pouvant être corrélé à l'apparition de pathologies liées à l'âge, dont la dysfonction ventriculaire ou l'infarctus du myocarde (Han, 2012).

Selon les estimations de l'OMS, entre 2000 et 2050, la population mondiale des plus de 60 ans, passera de 11% à 22%, soit à peu près 2 milliards de personnes. Bien que l'augmentation de la longévité représente un progrès *per se*, il peut devenir un problème médical, économique et social si elle n'est pas associée au maintien de la qualité de vie. C'est pourquoi, une meilleure compréhension des mécanismes menant aux pathologies cardiaques liées à l'âge est nécessaire pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer la qualité de vie des personnes âgées.

Il est clairement admis que le vieillissement est associé à l'accumulation de cellules sénescentes au sein des tissus (Bennett G. Childs, Gluscevic, Baker, Laberge, Marquess, Dananberg, & Van Deursen, 2017; He & Sharpless, 2017b; van Deursen, 2014). À l'échelon cellulaire, la sénescence a été initialement caractérisée comme un arrêt stable du cycle cellulaire associé à des modifications morphologiques et fonctionnelles (Hernandez-Segura et al., 2018; van Deursen, 2014). Ce phénomène implique l'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire tels que les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDKIs) et l'acquisition d'un phénotype sécrétoire nommé Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) (J.-P. Coppé et al., 2010a; Herranz & Gil, 2018). Ce phénotype conduit à l'augmentation de la production de diverses protéases, de facteurs de croissance, cytokines et chimiokines définissant le Senescence Messaging Secretome (SMS). Le SMS, par son action paracrine, conduit à de nombreux processus comme la prolifération cellulaire, l'inflammation et l'angiogenèse, et peut donc affecter le comportement et le phénotype des cellules environnantes (Coppe, 2014). Récemment les travaux de Baker *et al.* ont démontré que l'accumulation de ces cellules sénescentes pouvait rendre compte de l'apparition des pathologies associées à l'âge (D. J. Baker, Childs, Durik, Wijers, Sieben, Zhong, Saltness, et al., 2016). En effet,

l'élimination chez des souris âgées des cellules sénescents exprimant l'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines p16^{INK4A} permet de prévenir l'hypertrophie des cardiomyocytes associée à l'âge et de restaurer partiellement la tolérance au stress (D. J. Baker, Childs, Durik, Wijers, Sieben, Zhong, Saltness, et al., 2016). Cependant, l'identité des cellules sénescents p16^{INK4a} positives, délétères pour la fonction cardiaque reste à déterminer.

Au sein du tissu cardiaque réside des cellules progénitrices aussi nommées cellules stromales mésenchymateuses cardiaques (cMSCs) sont identifiées par l'expression des marqueurs Sca1 et PDGFR α , et l'absence du CD31 (marqueur endothélial) et CD45 (marqueur hématopoïétique) (Nosedá, Harada, Mcsweeney, et al., 2015). Ce type cellulaire a initialement été caractérisé au sein de la moelle osseuse (BM-MSCs) et présente une capacité de différenciation en cellules de la lignée mésodermique (ostéocytes, chondrocytes, adipocytes), une capacité d'adhérence au plastique et l'expression d'une combinaison de marqueurs de surface (CD105, CD73, CD90 et l'absence de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19, et HLA-DR)(Dominici et al., 2006). Depuis, des capacités de différenciation dans d'autres lignées cellulaires et notamment vasculaires (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) ont été décrites pour ces cellules (Uccelli et al., 2008). Aujourd'hui des cellules apparentées à ces BM-MSCs ont été découvertes dans de nombreux tissus tels que le tissu adipeux, le cerveau, les reins, les poumons, le cœur ou les vaisseaux, avec des propriétés de différenciation similaires à celles des BM-MSCs (Chong et al., 2011; Crisan et al., 2008; Klimczak & Kozłowska, 2016). Ces cellules jouent un rôle clé dans l'homéostasie tissulaire par la sécrétion de facteurs paracrines, trophiques et mitotiques, de chimiokines et par leur capacité de différenciation (Mauney, Olsen, & Volloch, 2010; Mias et al., 2009; Bin Zhou et al., 2011). Les MSCs sont aujourd'hui très utilisées en thérapie cellulaire et de nombreuses études cliniques testent le bénéfice de leurs capacités sécrétoires en particulier de facteurs pro-angiogéniques dans divers contextes pathologiques (Watt et al., 2013), comme par exemple l'injection de BM-MSCs chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque d'origine ischémique pour l'essai MESAMI (Guijarro et al., 2016).

Comme nous avons pu voir, les cMSCs possèdent des capacités de différenciation vasculaire, or lors du vieillissement ce réseaux vasculaire est modifié et pourrait contribuer à l'apparition de pathologies, notamment cardiaques.

L'objectif de cette thèse est dans un premier temps de caractériser le vieillissement des cMSCs, par la description du phénomène de sénescence cellulaire, et dans un second temps à un niveau plus fonctionnel, par l'étude des capacités de différenciation vasculaire de ces cellules.

De plus, les cellules cMSCs représentent une population hétérogène de cellules parmi laquelle une sous population est caractérisée par l'expression du CD90. Notre objectif vise donc à caractériser ces deux sous-populations (CD90+ et CD90-), et à évaluer l'impact du vieillissement sur leurs fonctions.

Pour finir, sachant que la sénescence cellulaire contribue à de nombreux processus physiologiques de l'organisme, nous avons étudié quel était le rôle de la voie de signalisation dépendante de p16^{INK4a} dans les capacités de différenciation de ces cellules.

II. Matériels et Méthodes

A. Animaux

L'étude du vieillissement cardiaque est réalisée chez des souris mâles C57Bl/6 jeunes (3 mois) ou âgées (20 à 24 mois) fournies par la société JANVIER.

L'étude de l'implication de p16^{INK4a} dans la différenciation vasculaire a été réalisée chez des souris mâles p16^{INK4a}-Luc déficientes pour l'exon 1α du gène p16^{INK4a} par insertion du gène codant la luciférase (B6.Cg-Cdkn2a^{tm3.1Nesh} Tyr c-2J/Nci) et fournies par le National Cancer Institute (NCI Frederick, Maryland).

Les animaux sont hébergés en zootechnie (INSERM/UPS US006 Service de zootechnie Ranguel, Toulouse, Numéro d'agrément : C31 555 07) dans des conditions EOPS selon un protocole expérimental en accord avec les normes éthiques en vigueur, validé par le comité d'éthique local (US006 : Comité d'éthique US006 CREFRE ; N° d'enregistrement : CEEA-122) et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

B. Isolement des cMSCs et cytométrie de flux

Les cœurs sont perfusés par l'apex par 10 ml de PBS, coupés en morceaux de 2 mm² puis digérés par de la libérase TM (Roche), 2 fois 10 minutes à 37°C. La digestion est arrêtée par ajout de RPMI 10% SVF (R10), le sérum permet d'inhiber l'activité de la libérase. Les cellules sont obtenues après double filtration à 100 et 40µm et lyse des globules par un choc hypotonique.

Les sites de fixation non spécifiques des IgG sont préalablement saturés pendant 20 minutes grâce à une solution de blocking (PBS, 4% SVF, 2mM EDTA, 3% serum de rat, 3% serum de souris, 5 µg/mL anti CD16/CD32 1% antibiotiques). Le marquage cellulaire est ensuite réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-souris couplés à des fluorochromes (voir tableau 4) et les cellules mortes sont exclues de l'analyse grâce à l'utilisation de marqueurs de viabilité (Live dead Aqua, ou Live dead Yellow, Life technologies).

Les cMSCs sont ensuite isolées du stroma cardiaque par tri cellulaire grâce au trieur à haute vitesse Influx (BD Biosciences) ou analysées par cytométrie de flux sur l'analyseur LSR Fortessa (BD Biosciences). L'analyse des données de cytométrie est réalisée grâce au logiciel FlowJo (TreeStar).

C. Différenciation adipocytaire

Les cMSCs sont mises en culture en plaque 48 puits en milieu MEM α 10% SVF. Une fois la confluence atteinte, la différenciation est réalisée à l'aide du milieu d'induction (DMEM High Glucose, 10% SVF, 5% de sérum de lapin, Insuline 10 μ g/ml, IBMX 0.5 mM (1/2000^e), Dexaméthasone 1 μ M (1/1000^e), Indométhacine 100 μ M (1/100) et 1% AB) durant 3 jours suivi d'un jour dans un milieu de maintien (DMEM High Glucose, 10% SVF, 5% de sérum de lapin, Insuline 10 μ g/ml et 1% AB). Le cycle est réalisé 1 à 2 fois en fonction de l'efficacité de la différenciation jusqu'à visualisation de gouttelettes lipidiques.

L'adipogenèse est évaluée par marquage au bodedipyrométhène (Bodipy, invitrogen) et contre coloration des noyaux au DAPI. La différenciation est attestée par la présence de gouttelettes lipidiques marquées au Bodipy en microscopie à fluorescence.

D. Différenciation endothéliale

Les cMSCs sont ensemencées en plaque 24 puits préalablement « coatées » avec de la gélatine à 0,75% pour l'analyse de l'expression génique à 20 000 cellules par puits et 30 000 cellules par puits pour les contrôles. Pour les analyses d'immunofluorescence les cMSCs sont ensemencées à 10 000 cellules par puits en labteck 8 puits. Le milieu de différenciation est composé d'EGM2 (ECGM-MV2 (Promocell) supplémenté par 2% SVF et 1% AB) supplémenté de 10 ng/ml de FGFb et 10 ng/ml de VEGF-A recombinants (Peprtech) et d'anticorps anti TGF- β à 5 μ g/ml (BD Biosciences). Les cMSCs sont traitées pendant 10 jours avec ce milieu de différenciation, avec un changement de milieu tous les 3 jours. Les contrôles sont ensemencés dans le milieu de culture EGM2 sans les facteurs de croissance recombinants ni l'anticorps bloquant.

E. Différenciation léiomyocytaire

Les cMSCs sont ensemencées en plaque 24 puits à hauteur de 20 000 cellules par puits et 30 000 pour les contrôles pour l'analyse de l'expression génique. Pour les analyses d'immunofluorescence les cMSCs sont ensemencées à 10 000 cellules par puits en labteck 8 puits. Le milieu de différenciation est composé de DMEM 10% SVF 1% AB, supplémenté par 50 ng/ml de TGF- β et 50 ng/ml de PDGF-BB recombinants (peprtech) et ajouté aux cMSCs pendant 10 jours, avec un changement de milieu tous les 3 jours. Le milieu contrôle est le même que celui de la différenciation endothéliale.

F. Immunofluorescence

Les immunofluorescences sont réalisées en Lab-Teck 8 puits, après ensemencement de 10 000 cellules par puits. Les cellules sont fixées par un mélange de PBS, 4% PFA et 4% saccharose, 10 minutes à température ambiante. Un blocage des sites non spécifiques est réalisé à l'aide d'un mélange de PBS, BSA 5%, SVF 5% et pour les marquages intracytoplasmiques, avec 0,2% de triton X100 pendant 45 minutes à température

ambiante. Le marquage des différentes cibles est effectué par ajout d'un anticorps primaires spécifiques (voir tableau 4) durant toute la nuit à 4°C. Après différents rinçages au PBS Tween 0,02%, des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes sont ajoutés pendant 1h à température ambiante et une contre-coloration des noyaux au diamidino-phényl-indole (DAPI) est effectuée. Les images sont ensuite réalisées à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss LSM780).

L'analyse des marquages d'immunofluorescence (seuillage, intensité, dénombrement) est réalisée avec le logiciel Image J.

G. Test de clonogenicité

Les tests de clonogenicité sont réalisés en plaque 96 puits par ensemencement de 300 cellules par puits. Les cellules sont maintenues en culture pendant 1 mois en MEM α 10% SVF, avec un changement de 50 % du volume de milieu de culture par semaine. La visualisation de clones est réalisée en microscope à fluorescence après marquage des noyaux cellulaires au DAPI. Un puits est considéré comme positif s'il possède au moins un clone constitué d'au moins 6 cellules. Les résultats sont exprimés en % de puits ayant au moins un clone.

H. RT-PCR

Les ARNs sont extraits à l'aide du kit ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems (Promega) et rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) par la SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Les PCR (Polymerase Chain Reaction) sont réalisées en SYBR Green (SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus) (TAKARA)).

Les primers utilisés lors des différentes expériences sont répertoriés dans le tableau 3

I. Statistiques

Les valeurs sont exprimées sous la forme de la moyenne +/- l'écart type à la moyenne (SEM). Les calculs statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel PRISM. Le test statistique est un test t de Student excepté lorsque les variances sont significativement différentes. Dans ce cas, un test non paramétrique de Mann and Whitney est réalisé.

Une analyse en ANOVA à deux facteurs a été effectuée pour certains marqueurs afin de tester une possible interaction entre la différenciation et l'effet de l'âge, ou de la sous-population.

Les résultats sont pour la plupart issus du cumul de 2 à 3 expériences indépendantes avec au minimum n=4 par groupe. L'étude des sous population CD90+ et CD90- jeunes/vieux *in vitro*, l'analyse génique des différenciations des CD90+ et CD90- ainsi que celle des p16KI/WT sont issus d'une seule expérience avec au minimum n=3 par groupe.

* p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

Primers							
Gène		Séquence		Gène		Séquence	
Sénescence				Gènes CML			
p15	S	AGATCCCAACGCCCTGAAC		Acta2	S	TCCCTGGAGAAGAGCTACGAA	
	AS	CAGTTGGGTTCTGCTCCGT			AS	TATAGGTGGTTTCGTGGATGCC	
p16	S	CCGAACTCTTTCGGTCGTACCC		Cnn1 (calpo)	S	ACGGCTTGTCTGCTGAAGTAA	
	AS	CTGCTACGTGAACGTTGCCCA			AS	TGAGGCCATCCATGAAGTTGT	
p18	S	GGGGGACCTAGAGCAACTTAC		Myocd	S	GTTTCTGCTACCCTGGGATGCACCA	
	AS	CTCCGGATTCCAAGTTTCA			AS	GGCCTGGTTTGAGAGAAGAAACAC	
p53	S	TCCTGGCTGTAGGTAGCGACT		Sm22a	S	ACCAAAAACGATGGAAACTACCG	
	AS	ATCCGACTGTGACTCCTCCAT			AS	CATTTGAAGCCAATGACGTG	
53BP1	S	AAGAAAGCTTCAGATCCTGTGGAGTC		Gènes cMSCs			
	AS	GCAGCTTCTACTGTCACTGCC		Sca1	S	GTTTGCTGATTCTTCTTGTGGCCC	
SASP					AS	ACTGCTGCCTCCTGAGTAACAC	
Cxcl12	S	CTCAACTCCTCAAAGTGTGCC		Pdgfra	S	ACTTTTACTCCGGGTATCGG	
	AS	TTGGGCTGTTGTGCTTACTTG			AS	CTGAGGACCAGAAAAGACCTGG	
Igf1	S	GCTCTTCAGTTCGTCTGTGGAC		Thy1	S	AACTCTTGGCACCATGAACC	
	AS	AGCCTGTGGGCTTGTGAAGTA			AS	AGTCCAGGCGAAGGTTTTG	
Ccl2	S	AAACTGGATCGGAACCAAT		Gènes niche hématopoïétique			
	AS	TACGGGTCAACTTCACATTCAA		Angpt1	S	CAGCATCCTGCAGAAGCAAC	
Vegfa	S	CAGCAGATGTGAATGCAGACCAA			AS	TCCTCCCTTAGCAAAACACC	
	AS	CTTTCTCCGCTCTGAACAAGGC		LepR	S	TGATGTGTCAGAAATTCATGTGG	
Tgfb1	S	ACTATTGCTTCAGTCCACAGAGAA			AS	TGCCAGGTTAAGTGCAGCTAT	
	AS	TGTACAGCTGCCGCACACA		Gènes endothéliaux			
Gènes endothéliaux				Pecam1	S	AGCCAACAGCCATTACGGTTA	
	AS	CTCAAGGGAGGACTTCCAC			AS	CTCAAGGGAGGACTTCCAC	
Cadh5	S	CCCCAAACGTAACGAGGGTAT		Kdr	S	GAACAGTAAGCGAAAGAGCCG	
	AS	TCGTATCGGATAGTGGGGTCT			AS	TGTCTGTCTGGCTGTCATCTG	
vWF	S	TACAGCCCCTGTTTGTATGGG		Fli1	S	AATGTGTGGAATATTGGGGG	
	AS	CTGTCACGGGGCTTTTCTGT			AS	GGACTGATCGTCACTACCA	

Tableau 3 : Liste des primers.

Anticorps Primaires Immunofluorescence		
Cible	Fournisseur	ref
Sénescence		
Ki67	Cell Marque	275R-14
γH2AX	Millipore	05-636

Différenciations		
Tomato lectine	Vector	TL 1176
Isolectine B4	Invitrogen	121413
vWF	Dako	A0082
αSMA	Sigma	A2547
Calponine (Cnn1)	Abcam	ab46794

Autre		
DAPI	Sigma	D9542

Anticorps Cytométrie en flux			
Cible	Clone	Fournisseur	Ref
CD45 APC-Cy7	30-F11	Biolegend	103116
CD31 PerCP-Cy5.5	390	Biolegend	102420
Sca1 BV711	D7	Biolegend	108131
CD140a APC	APA5	Biolegend	135908
CD90 PE-Cy7	5321	Biolegend	140310
CD140a PE	APA5	Biolegend	135905
Sca1 PB	D7	Biolegend	108120
Yellow Dye		Life technologies	L34959
Aqua Dye		Life technologies	L34966

Tableau 4 : Liste des anticorps

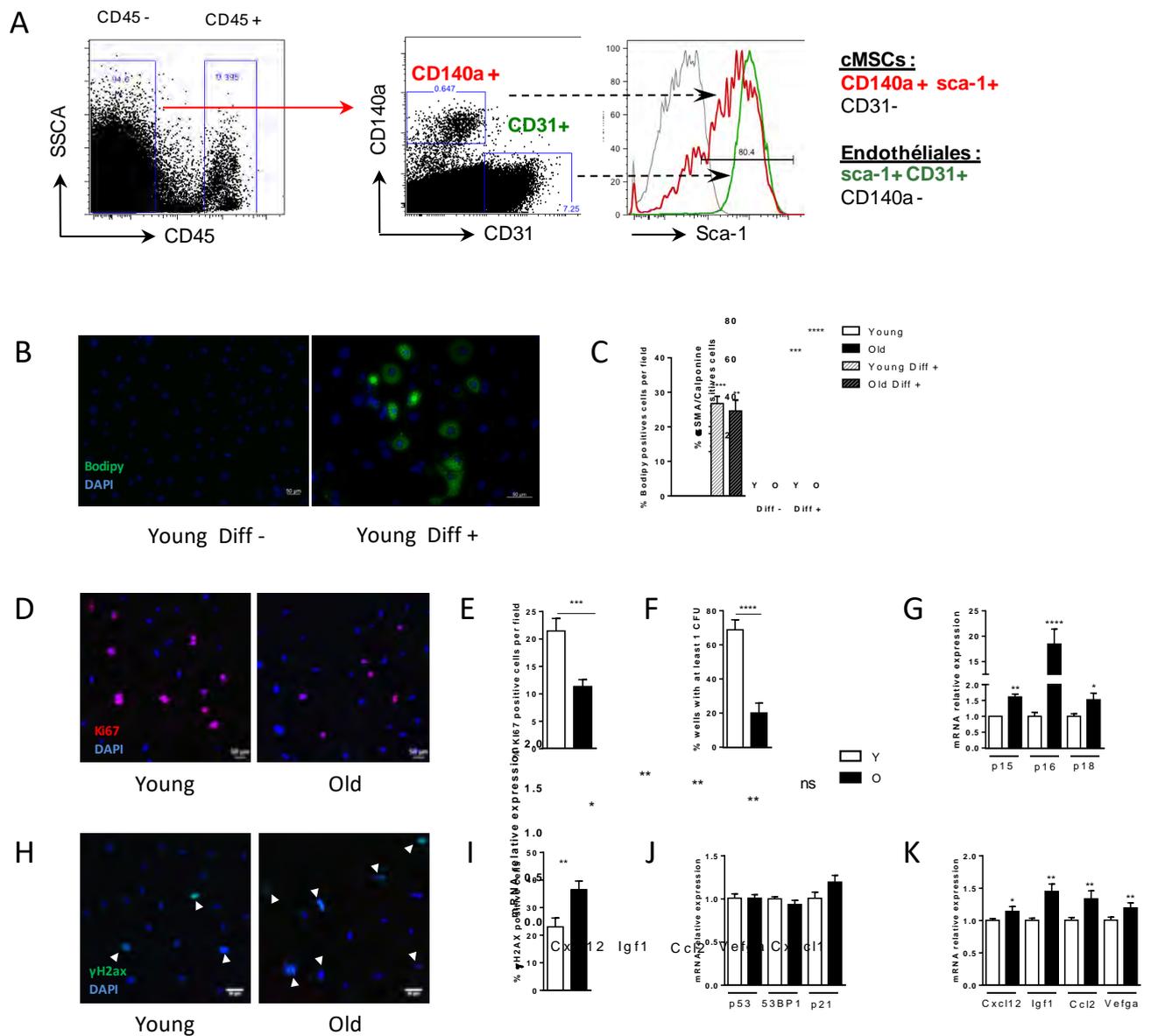


Figure 1 : Apparition d'un programme de sénescence dans les cMSCs âgées.

A : Stratégie d'isolement des cMSCs (CD45-, CD31-, CD140a+, Sca1+) et des cellules endothéliales (CD45-, CD31+, CD140a-, Sca1+) par cytométrie de flux. **B** : Différenciation adipocytaire des cMSCs (Young : 3M, Old : 20M). Visualisation des gouttelettes de lipides par Bodipy (vert) et des noyaux par DAPI (bleu) en microscopie à fluorescence (x20). Barre = 50µm. **C** : Quantification en pourcentage de cellules positives (bodipy) en fonction du nombre de noyaux. **D** : Analyse de la prolifération des cMSCs par marquage KI67 en immunofluorescence par microscopie confocale x20. Barre = 50µm. **E** : Quantification en pourcentage de cellules positives (KI67) en fonction du nombre de noyaux. **F** : Test de clonogenité exprimé en pourcentage de puits avec au moins 1 CFU. **G** : Expression génique relative en $\Delta\Delta$ CT des CDKIs de la famille des INK4 des cMSCs jeunes (Y) et âgées (O). **H** : Analyse des dommages à l'ADN par marquage γ H2AX (vert) et marquage nucléaire par DAPI (bleu) en immunofluorescence par microscopie confocale x20. Les flèches blanches indiquent des cellules positives. Barre = 50µm. **I** : Quantification en pourcentage de cellules positives par noyaux (droite). **J** : Expression génique relative en $\Delta\Delta$ CT de la voie du p53/p21 des cMSCs jeunes (Y) et âgées (O). **K** : Expression génique relative en $\Delta\Delta$ CT de différents gènes du SASP des cMSCs jeunes (Y) et âgées (O).

Le groupe contrôle des expression relatives est la condition cMSCs jeunes (Y).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

III. Résultats

A. Apparition d'un programme de sénescence dans les cMSCs âgées

Afin d'étudier l'impact du vieillissement sur les cMSCs, nous avons mis en place une stratégie de tri cellulaire par cytométrie de flux sur la base de l'expression native de marqueurs de surface avant mise en culture. La combinaison de 4 anticorps couplés à des fluorochromes différents permet dans un premier temps, d'exclure les leucocytes sur la base de l'expression du CD45 en fonction de la granulosité (SSCA) (Fig. 1A). Dans un second temps, dans la population CD45 négative (CD45-), l'expression du PDGFR α (CD140a) en fonction du CD31 (cellules endothéliales) et du Sca1 permet de sélectionner 2 populations : les cMSCs : CD140a+/Sca1+/CD31- et les cellules endothéliales : CD140a-/Sca1+/CD31+. Les cMSCs représentent environ 1 à 3% du total des cellules du stroma cardiaque.

Afin de vérifier que les conditions de digestion et de tri cellulaire permettent d'isoler une population de cellules progénitrices, nous avons réalisé un test classique de différenciation des MSCs de moelle osseuse : la différenciation adipocytaire (Dominici et al., 2006). Cette différenciation apparaît par ailleurs plus physiologique pour le tissu cardiaque que les différenciations ostéogénique ou chondrogénique. La quantification des cellules présentant des gouttelettes lipidiques marquées par le Bodipy montre que les cellules isolées possèdent cette capacité de différenciation adipocytaire, et reste équivalente quel que soit l'âge des animaux dont les cMSCs sont isolées (Fig. 1B, C).

Dans un premier temps, nous avons étudié les capacités prolifératives et clonogéniques des cMSCs en fonction de l'âge. Le marquage Ki67 en immunofluorescence permet de visualiser les cellules en prolifération. Nous pouvons voir que le vieillissement induit une diminution du potentiel prolifératif des cMSCs, passant de 20% de cellules positives à 10% pour les cMSCs âgées (Fig.1D, E). De plus, nous avons pu mettre en évidence une diminution des capacités clonogéniques des cMSCs avec l'âge (Fig.1F). Ce défaut de prolifération peut être relié à l'augmentation de l'expression génique *ex vivo* d'inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDKs) appartenant à la famille INK4 (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}) et régulant négativement le cycle cellulaire par diminution de la phosphorylation de pRB (Fig1.G). L'induction de ces différentes CDKs est fortement liée à l'apparition d'un programme de sénescence (Hernandez-Segura et al., 2018). Pour déterminer si un programme de sénescence est mis en place dans les cMSCs âgées, nous nous sommes intéressés à la présence de dommages à l'ADN, mis en évidence par le marquage γ H2AX. Cette histone phosphorylée reconnaît la présence de cassures doubles brins au niveau de l'ADN pour permettre leur réparation. Nous constatons une augmentation significative du pourcentage de cellules présentant des dommages à l'ADN au sein des cMSCs issues de souris âgées passant de 23% pour les cMSCs jeunes à plus de 40% pour les cMSCs âgées (Fig1.H, I).

Différenciation endothéiale

Différenciation CML

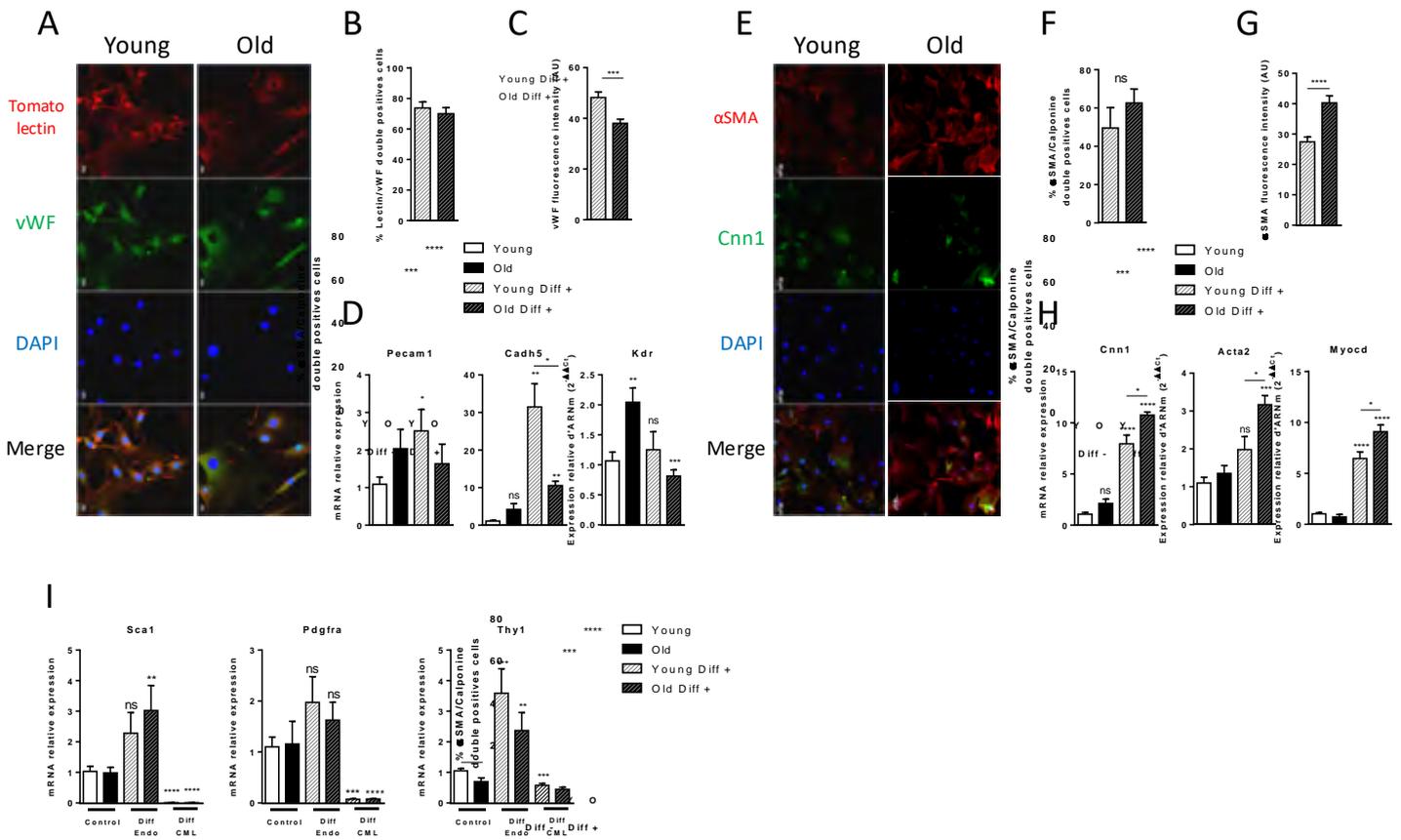


Figure 2 : Différenciation vasculaire des cMSCs jeunes et âgées.

A-D : Différenciation endothéiale des cMSCs jeunes (Young) et âgées (Old), après 10 jours en culture. **A :** Immunofluorescence des cellules avec milieu de différenciation (Diff +). Marquage tomato lectine (rouge), von Willebrand factor (vWF en vert), noyaux (DAPI en bleu). Barre = 50µm. **B :** Pourcentage de cellules différenciées par co-expression tomato-lectine et vWF dans les cellules Diff +. **C :** Intensité de fluorescence du vWF par cellules dans les cellules Diff+. **D :** Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ des gènes associés à la différenciation endothéiale des cMSCs. **E-H :** Différenciation en cellules musculaires lisses (CML) des cMSCs jeunes (Young) et âgées (Old), après 10 jours en culture. **E :** Immunofluorescence des cellules avec milieu de différenciation (Diff +). Marquage α SMA (rouge), calponine (Cnn1 en vert), noyaux (DAPI en bleu). Barre = 50µm. **F :** Pourcentage de cellules différenciées par co-expression α SMA et la calponine dans les cellules Diff+. **G :** Intensité de fluorescence de l' α SMA par cellules dans les cellules Diff+. **H :** Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ des gènes associés à la différenciation CML des cMSCs. **I :** Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ des gènes d'identification des cMSCs au cours des deux différenciations et en fonction de l'âge.

Le groupe contrôle des expression relatives est celui des cMSCs jeunes (Y) sans facteurs de différenciation.

Significativité par rapport aux contrôles au dessus de l'histogramme.

Significativité jeune/vieux signalée par une barre.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

De façon intéressante l'augmentation de ces dommages n'est pas associée à l'induction de l'expression génique de la voie classique de réponse de la DDR, la voie p53/p21^{Cip1} *in vitro* (Fig1.J). Nous ne constatons pas d'augmentation de l'expression génique de p53, 53BP1 ou p21^{Cip1}, suggérant qu'au sein des cMSCs la DDR serait régie par une voie non conventionnelle.

Pour finir de caractériser s'il y a apparition d'un programme de sénescence au sein des cMSCs âgées, nous avons évalué l'expression génique de différents facteurs composant le SASP (J.-P. Coppé, Desprez, Krtolica, & Campisi, 2010b). Au sein des cMSCs âgées, nous retrouvons une augmentation de l'expression de chimiokines (*Cxcl12*, *Ccl2*) et de facteurs de croissance pro-angiogéniques (*Vegfa* et *Igf1*) (Fig1.K).

Ces résultats nous permettent de valider la technique d'isolement de cellules progénitrices cardiaques apparentées aux cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse. De plus, nous montrons que le vieillissement induit au sein des cMSCs l'apparition d'un programme de sénescence caractérisé par un défaut de prolifération associé à l'expression de CDKIs de la famille des INK4, une accumulation de dommages à l'ADN et l'apparition d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) à potentiel inflammatoire et pro-angiogénique.

B. Différenciation vasculaire des cMSCs jeunes et âgées

Les cMSCs sont des cellules progénitrices présentant un potentiel de différenciation dans la lignée mésodermique et également en cellules de la lignée vasculaire, endothéliale et musculaire lisse, mais l'impact du vieillissement sur ces capacités reste aujourd'hui inconnu. Pour cela, nous avons réalisé ces deux types de différenciations à partir de cMSCs issues de souris jeunes (3 mois) ou âgées (20 mois) (Fig2).

Pour la différenciation endothéliale, les cellules sont traitées par un cocktail de protéines recombinantes VEGFA et FGF-b, associé à un anticorps bloquant anti-TGFβ1 (Fig2. A-D). L'efficacité de cette différenciation est étudiée en immunofluorescence et par l'expression génique de marqueurs spécifiques de la lignée endothéliale.

En immunofluorescence, les cellules sont considérées comme différenciées lorsqu'elles sont simultanément positives pour la tomato-lectine (*Lycopersicon esculentum*), protéine se liant aux résidus glycosylés (tétramères de N-acétylglucosamine) spécifiques des cellules endothéliales de rongeur et pour le von Willebrand Factor (vWF), facteur d'hémostase sécrété par les cellules endothéliales (Fig2.A). Nous constatons que le milieu de différenciation permet une différenciation d'environ 70% des cellules quel que soit l'âge des cMSCs (Fig2.B). Lorsque l'intensité de fluorescence par cellules est analysée, nous observons une diminution du niveau d'expression du vWF dans les cellules différenciées issues de cMSCs âgées (Fig2.C). Pour aller plus loin dans la caractérisation de cette différenciation, une analyse de l'expression de gènes spécifiques des cellules endothéliales tels que *Pecam1*, *Kdr* et *Cadh5* a été réalisée par RT-PCR (Fig2.D).

L'expression de *Pecam1* est significativement induite lors de la différenciation endothéliale pour les cMSCs de souris jeunes mais n'est pas modulée par l'ajout du milieu de différenciation pour les cMSCs de souris âgées. L'expression de *Cadh5* est induite lors de la différenciation quel que soit l'âge mais est significativement plus importante pour les cMSCs jeunes ($\times 30$). Une interaction entre l'âge et la différenciation a pu être montrée pour ce gène par un test anova 2 facteurs ($p=0.0073$). Concernant le gène codant pour le Kdr, récepteur principal du VEGFA, les variations de son expression sont principalement dépendantes de l'âge (Fig.2 D). Un test anova à 2 facteur a été réalisé et montre une interaction entre l'âge et la différenciation ($p=0,0032$) pour l'expression de ce marqueur. Les cMSCs contrôles de souris âgées présentent une expression deux fois plus importante de *Kdr* que celles des souris jeunes mais cette expression est fortement réprimée par l'ajout du milieu de différenciation (Fig2.D).

L'analyse par immunofluorescence et par RT-PCR de cette différenciation endothéliale suggère un défaut d'efficacité de cette différenciation au cours du vieillissement. Les cMSCs issues de souris âgées gardent cette capacité de différenciation mais l'acquisition des différents marqueurs restent plus faible que dans les cMSCs jeunes.

Concernant la différenciation en cellules musculaires lisses, les cellules sont traitées par un cocktail de différenciation contenant du TGF β 1 et du PDGFBB recombinant (Fig2.E-H). L'analyse est réalisée comme précédemment par suivi de l'acquisition de marqueurs spécifiques aux cellules musculaires lisses en immunofluorescence et par RT-PCR.

L'analyse par immunofluorescence de l' α SMA et de la calponine montre, la différenciation d'une majeure partie des cellules (50-60% des cellules) par le milieu de différenciation de façon indépendante de l'âge (Fig2.E-F) comme précédemment pour la différenciation endothéliale. L'analyse de l'intensité de fluorescence par cellules de l' α SMA révèle une majoration de l'acquisition de ce marqueur par les cellules différenciées issues de souris âgées (Fig2.G). L'augmentation de la protéine α SMA chez les cMSCs âgées différenciées est corrélée à une augmentation $\times 3$ de l'expression de son transcrite (*Acta2*) (Fig2.H).

De plus, l'analyse de l'expression de 2 autres gènes spécifiques des cellules musculaires lisses, la calponine (*Cnn1*) et le facteur de transcription myocardine (*Myocd*) montre une modulation similaire (Fig2.H). En effet, ces 2 gènes se retrouvent fortement exprimés dans les cellules en présence du milieu de différenciation et cette expression est majorée pour les cMSCs âgées différenciées. Une interaction entre l'âge et la différenciation a pu être mise en évidence pour la myocardine par un test anova 2 facteurs ($p=0.0039$). Le potentiel de différenciation léiomyocytaire serait donc augmenté par le vieillissement.

Dans un second temps, notre étude s'est portée sur l'évolution des marqueurs des cMSCs (*Pdgfra*, *Sca1* et *Thy1*) au cours de ces 2 voies de différenciation (Fig2.I). L'expression du *Pdgfra* et du *Sca1* est presque

totale inhibée lors de la différenciation en cellules musculaires lisses montrant une différenciation presque totale des cMSCs, alors que la différenciation endothéliale serait elle plus partielle, car il n'y a pas de modulation du *Pdgfra* (Fig2.I). Il est important de noter que le marqueur *Sca1* est aussi exprimé par les cellules endothéliales suggérant que son augmentation, observée au cours de la culture, est en faveur d'une différenciation endothéliale.

De façon intéressante, l'étude de l'expression du *Thy1* (CD90) marqueur caractéristique des cMSCs montre une vraie dichotomie entre les deux différenciations (Fig2.I). En effet, son expression est majorée au cours de la différenciation endothéliale (x2,5 et x3,5) et au contraire inhibée au cours de la différenciation en cellules musculaires lisses. Par ailleurs, il est intéressant de noter ici, que son expression est aussi modulée par l'âge avec, en milieu contrôle, une diminution significative des transcrits dans les cMSCs âgées (Fig2.I).

L'étude de la différenciation vasculaire des cMSCs en fonction de l'âge (3M vs 20M) montre une modulation de leurs capacités de différenciation avec une augmentation de l'efficacité de différenciation léiomyocytaire et une diminution de l'efficacité de la différenciation endothéliale chez les cMSCs âgées. De plus, la mise en place de ces deux types de différenciation induit une modulation de l'expression de *Thy1*, un marqueur caractéristique des cMSCs dont le rôle reste aujourd'hui inconnu et dont l'expression semble être diminuée au cours du vieillissement.

C. Propriétés des sous-populations CD90 positives et négatives

Comme montré précédemment, le vieillissement induit une diminution de l'expression du *Thy1* (CD90) marqueur caractéristique des cMSCs. Afin de confirmer cette hypothèse au niveau protéique, une analyse en cytométrie de flux des cMSCs a été réalisée *ex vivo* à partir du stroma cardiaque de souris jeunes ou âgées. Au sein de la population de cMSCs (*Sca1*+, *PDGFR*α+ et *CD31*-, *CD45*-), nous retrouvons, de façon similaire à l'expression génique, une diminution du pourcentage des cellules CD90 positives (Fig3.A). Ce résultat indique que les cellules mésenchymateuses étudiées sont une population hétérogène pouvant être modulée avec le vieillissement.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser ces 2 sous populations CD90+ et CD90-. Nous avons constaté que ces deux populations possèdent les mêmes capacités prolifératives et clonogéniques en culture (Fig3.B-D). De plus, elles possèderaient les mêmes capacités sécrétoires reflétées par un niveau d'expression génique comparable de chimiokines (*Ccl2*, *Cx3cl1*), cytokines (*Tgfb*) et facteur de croissance (*Igf1*) (Fig3.E). De nombreux gènes ont été testés en RT-PCR et très peu semblent différencier ces deux sous populations (résultats non montrés). Cependant, l'analyse de l'expression de gènes de la niche hématopoïétique varie différemment dans ces deux sous populations. En effet, la population CD90+

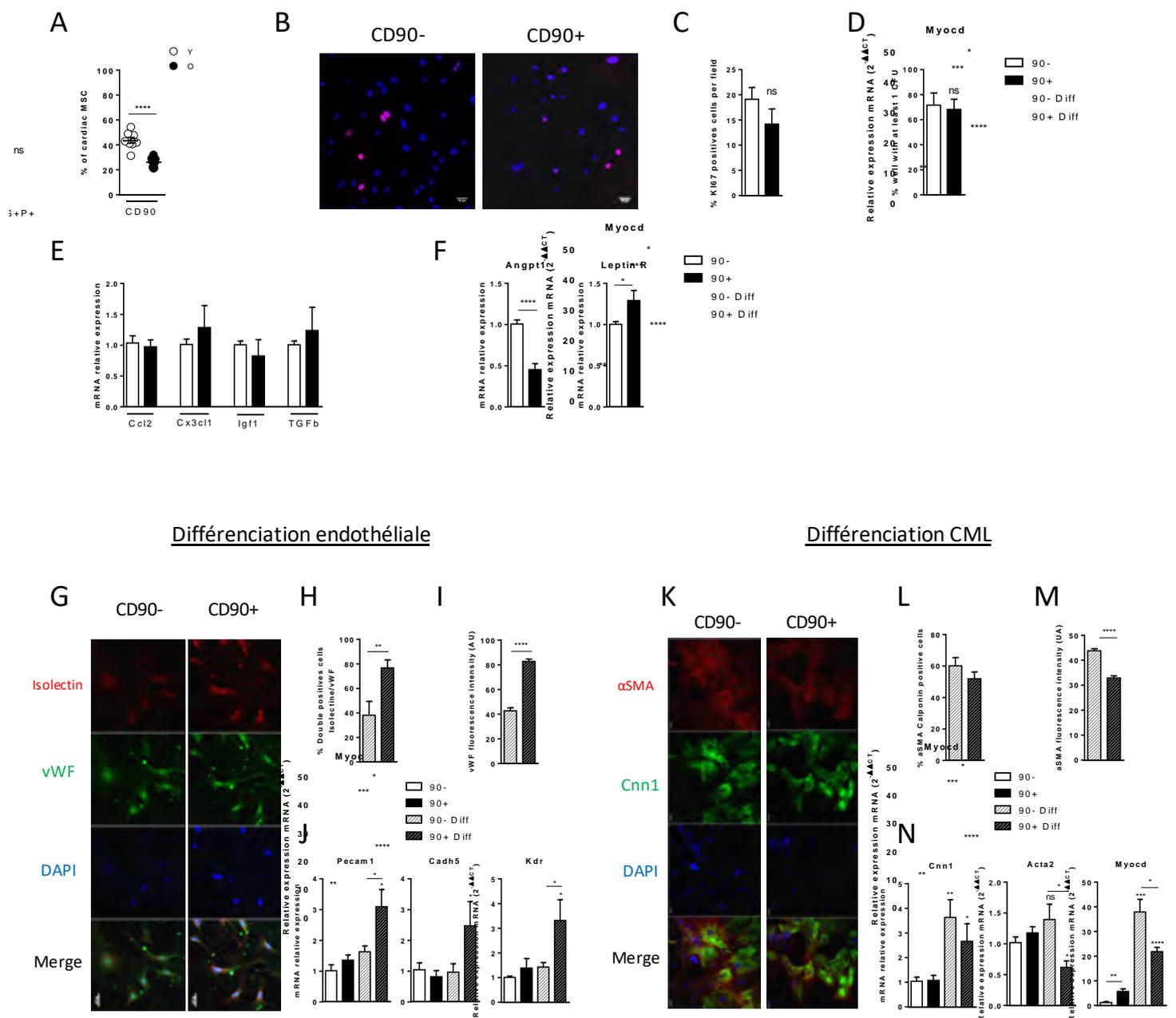


Figure 3 : Propriétés des sous-populations CD90 positives et négatives

A : Analyse par cytométrie de flux de l'expression *ex vivo* du CD90 des cMSCs issues de souris jeunes (Y) et âgées (O). **B** : Analyse de la prolifération des cMSCs CD90+ et CD90- par marquage KI67 (rouge) en immunofluorescence par microscopie confocale (x20). Barre = 50μm. **C** : Quantification en pourcentage de cellules positives (Ki67) en fonction du nombre de noyaux. **D** : Test de clonogenicité exprimé en pourcentage de puits avec au moins 1 CFU. **E** : Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ de différents gènes du SASP des cMSCs CD90+ et CD90-. **F** : Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ de gènes de la niche hématopoïétique des cMSCs CD90+/- . **G-J** : Différenciation endothéliale des cMSCs CD90+ et CD90-, après 10 jours en culture. **G** : Immunofluorescence des cellules avec milieu de différenciation (Diff +). Marquage isolectine (rouge), von Willebrand factor (vWF en vert), noyaux (DAPI en bleu). Barre = 50μm **H** : Pourcentage de cellules différenciées par co-expression d'isolectine et du vWF dans les Diff+. **I** : Intensité de fluorescence du vWF par cellules dans les Diff+. **J** : Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ des gènes associés à la différenciation endothéliale cMSCs CD90+ et CD90-. **K-N** : Différenciation en cellules musculaires lisses (CML) des cMSCs CD90+ et CD90-, après 10 jours en culture. **K** : Immunofluorescence des cellules avec milieu de différenciation (Diff +). Marquage α SMA (rouge), calponine (Cnn1 en vert), noyaux (DAPI en bleu). Barre = 50μm **L** : Pourcentage de cellules différenciées par co-expression de l' α SMA et de la calponine dans les Diff+. **M** : Intensité de fluorescence de l' α SMA par cellules dans les Diff+. **N** : Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ des gènes associés à la différenciation CML cMSCs CD90+ ou CD90-.

Significativité par rapport aux contrôles au dessus de l'histogramme.

Significativité CD90+/- signalée par une barre.

* p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001

l'angiopoïétine 1 (Angpt1) (Fig3.F). La relevance physiologique de ces expressions différentielles reste aujourd'hui inconnue.

Ces deux sous populations, identifiées par le niveau d'expression du CD90, bien que modulées par le vieillissement semblent avoir des caractéristiques très similaires.

Nous avons montré précédemment que l'expression du *Thy1* était régulée différemment selon la voie de différenciation engagée. L'expression de *Thy1* est augmentée lors de la différenciation endothéliale mais elle est diminuée lors de la différenciation en cellules musculaires lisses (Fig2.I). Nous avons donc déterminé si ces 2 populations CD90+ et CD90- possèdent le même potentiel de différenciation vasculaire. Pour cela, nous avons trié les sous populations CD90+ et CD90- de cMSCs et nous avons testé la capacité de différenciation de chacune des sous-populations en cellules endothéliales ou en cellules musculaires lisses (Fig3.G-N).

Nous avons pu constater que l'acquisition de la co-expression de l'isolectine et du vWF ainsi que l'augmentation de l'intensité de fluorescence du vWF en réponse au cocktail de différenciation est plus importante pour les cMSCs CD90+ par rapport aux CD90- (Fig3.G-I).

L'analyse de l'expression des gènes spécifiques des cellules endothéliales *Pecam1*, *Cadh5* et *Kdr* confirme que les cMSCs CD90+ présentent un potentiel de différenciation endothéliale supérieur comparé aux cMSCs CD90- (Fig3.J). Un test anova 2 facteurs montre une interaction entre les sous-population et la différenciation endothéliale pour le marqueur Vecad ($p=0.0304$).

Concernant la différenciation en cellules musculaires lisses, les 2 sous-populations acquièrent l' α SMA et la calponine en immunofluorescence avec environ 50% de cellules différenciées (Fig3.K, L). L'intensité de fluorescence de l' α SMA des cellules différenciées est cependant supérieure pour les CD90- comparé aux CD90+ (Fig3.M). L'expression des gènes associés aux cellules musculaires lisses, (*Acta2* et *Myocd*) est significativement diminuée dans les CD90+ comparé aux CD90- (Fig3.N). Un test anova 2 facteurs montre une interaction entre les sous-populations et la différenciation CML pour *Acta2* ($p=0.0044$) et *Myocd* ($p=0.0003$). Ces résultats montrent que les 2 sous-populations de cMSCs, CD90+ et CD90-, présentent un potentiel de différenciation léiomyocytaire qui est supérieur pour la sous-population CD90-.

A cause de la diminution du pourcentage de CD90+ au sein des cMSCs au cours du vieillissement et du potentiel de différenciation respectif des deux sous-populations : CD90+ en cellules endothéliales et CD90- en cellules musculaires lisses, nous pouvons proposer une nouvelle analyse du biais de différenciation observé au cours du vieillissement. Ce biais de différenciation pourrait être lié à une hétérogénéité des cMSCs et à une modulation des sous populations CD90+ et CD90- au cours du vieillissement plutôt qu'à une perte du potentiel intrinsèque des cMSCs.

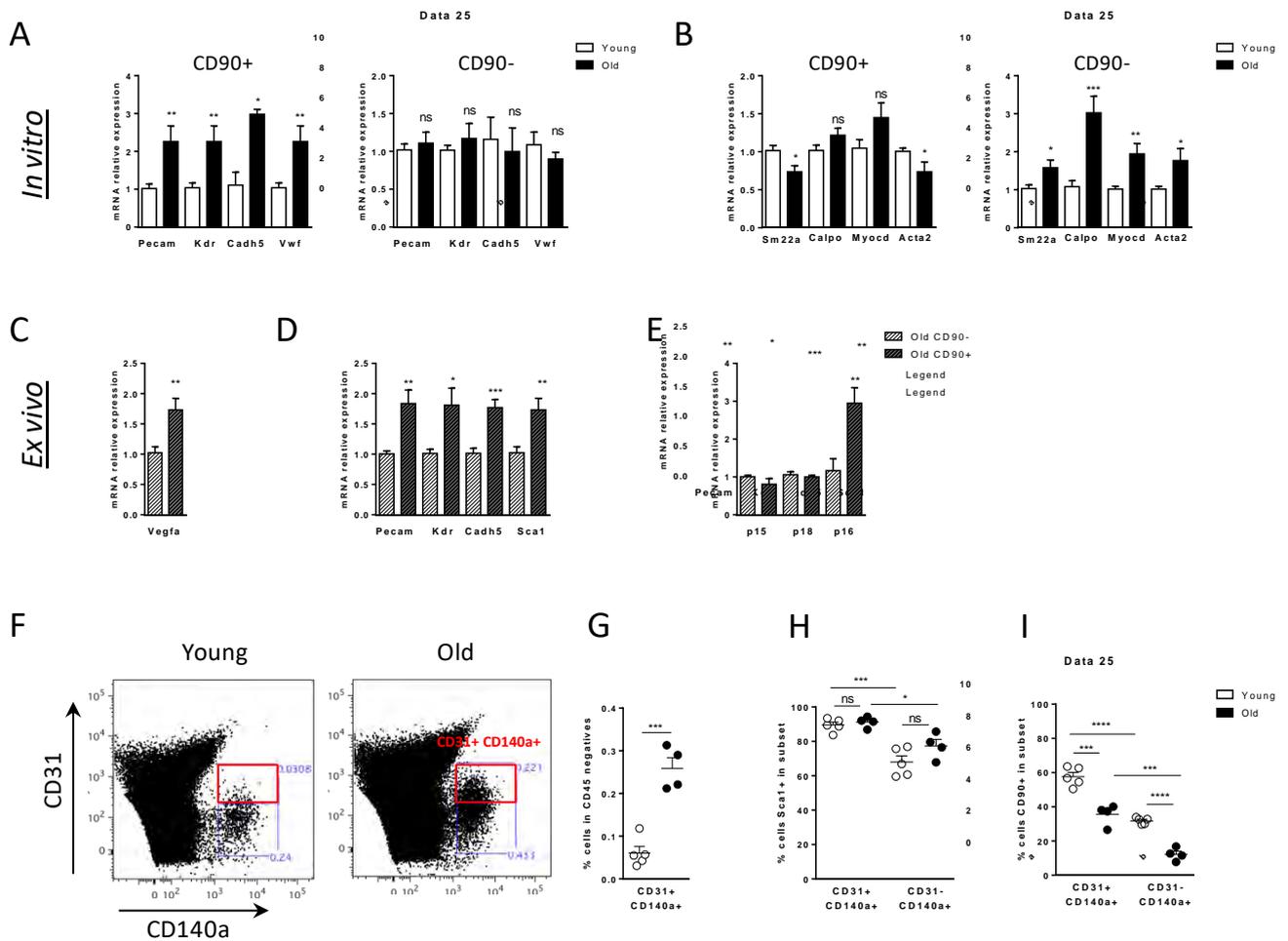


Figure 4 : Impact du vieillissement sur les sous-populations CD90 négatives et positives

A : Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ de gènes endothéliaux dans les sous populations CD90+ et CD90- jeunes et âgées après culture. **B** : Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ de gènes CML dans les sous populations CD90+ et CD90- jeunes et âgées après culture. **C-E** : Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ dans les sous populations CD90+ et CD90- issues de souris âgées *ex vivo*. **C** : Facteur pro-angiogénique Vegfa **D** : gènes endothéliaux. **E** : Cdkis de la famille des INK4. **F-G** : Analyse par cytométrie de flux de la population CD31+ CD140a+ en fonction de l'âge (sur les CD45-), dot plot (F) et histogramme (G). **H-I** : Analyse par cytométrie de l'expression du pourcentage de cellules positives sca1 (H) et CD90 (I) dans les populations CD31+ CD140a+ et CD31- CD140a+ en fonction de l'âge. Significativité en fonction des contrôles au dessus de l'histogramme. Significativité intergroupe signalée par un crochet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

D. Impact du vieillissement sur les sous populations CD90+ et CD90-

Nous avons pu constater que les sous populations CD90+ et CD90- issues de souris jeunes, bien que très similaires sur de nombreux marqueurs, possédaient des capacités de différenciation vasculaire différentes. Par ailleurs, le vieillissement est associé à une raréfaction de la sous-population CD90+. Nous avons souhaité déterminer si le vieillissement pouvait également moduler le potentiel de différenciation de ces 2 sous-populations.

Lorsque les sous-populations CD90+ et CD90- issues de souris jeunes ou âgées sont remises en culture et amplifiées, nous pouvons voir clairement apparaître cette différence de potentiel de différenciation entre les 2 sous populations (Fig.4 A-B). En effet, les cellules CD90+ issues de souris âgées surexpriment les marqueurs des cellules endothéliales de façon spontanée tels que *Pecam1*, *Kdr*, *Cadh5* et *vWF*, alors que leur expression n'est pas modulée dans la population CD90- (Fig4.A). Au contraire, la sous population CD90- issues de souris âgées présente une induction des marqueurs de cellules musculaires lisses (*Sm22a*, *Cnn1*, *Myocd*, et *Acta2*) tandis que ces marqueurs sont inchangés ou diminués avec le vieillissement pour la sous-population CD90+ (Fig4.B).

Ces résultats suggèrent que le vieillissement pourrait participer et/ou induire la différenciation spontanée de ces 2 sous-populations.

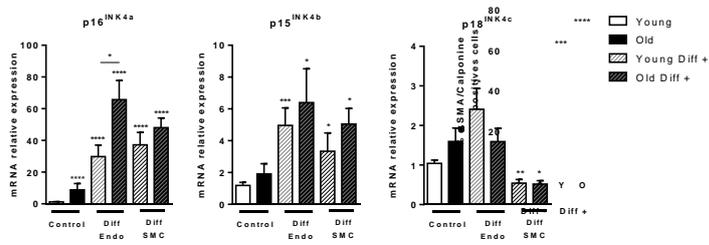
L'étude *ex vivo* des cellules CD90+ issues de souris âgées a montré qu'effectivement, avant remise en culture, elles expriment de façon plus importante le principal facteur pro-angiogénique (*Vegfa*) et différents marqueurs des cellules endothéliales (*Pecam1*, *Kdr*, *Cadh5*, *Sca1*) comparé aux CD90- (Fig4.C-D).

Par ailleurs, l'étude de l'expression des CDKIs de la famille des INK4 dans ces deux sous-populations CD90+ et CD90- chez la souris âgée, montre de façon surprenante une expression différentielle de p16^{INK4a}, surexprimée dans les CD90+, tandis que les autres CDKIs (p15^{INK4b} et p18^{INK4c}) ne sont pas modulées en fonction de la sous-population (Fig4.E). Ce résultat suggère l'hypothèse que p16^{INK4a} pourrait jouer un rôle dans les cMSCs CD90+.

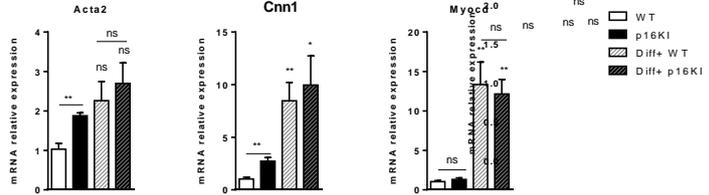
De façon intéressante, grâce à une analyse en cytométrie de flux, nous avons pu caractériser une nouvelle population cellulaire, qui apparaît lors du vieillissement et qui co-exprime CD31 et le PDGFR α (CD140a) (Fig4.F, G). Cette nouvelle population est également positive pour le Sca1 (90%) avec une fréquence de cellules CD90+ supérieure à celle des cellules CD31- PDGFR- α + (Fig4.H). L'expression du CD90 est également diminuée avec le vieillissement dans cette population CD31+ mais reste tout de même plus importante que dans les cellules CD31- PDGFR α + (Fig4.I).

Notre hypothèse serait donc que la sous population CD90+ des cellules mésenchymateuses, au cours du vieillissement se différencie en cellules endothéliale-like en gardant l'expression du PDGFR α et en acquérant le CD31. Des expériences de lignage et de tracking cellulaires seraient nécessaires afin de confirmer ou non cette hypothèse.

A



B



C

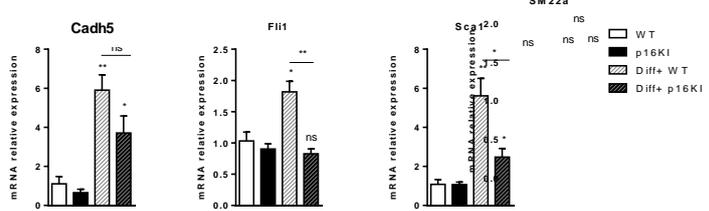


Figure 5 : Influence de p16 dans la différenciation vasculaire des cMSCs

A : Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ des CDKIs (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}) des cMSCs au cours des deux différenciations et en fonction de l'âge. **B-C** : Expression génique relative en $\Delta\Delta CT$ des gènes associés à la différenciation CML (**B**) et endothéliale (**C**) des cMSCs WT ou p16KI, après 10 jours en culture en milieu de différenciation (Diff +).

Significativité par rapport aux contrôles au dessus de l'histogramme.

Significativité WT et p16KI signalée par une barre.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001

E. Influence de p16^{INK4a} dans la différenciation vasculaire des cMSCs

Nous avons pu voir précédemment que le vieillissement pouvait impacter les capacités de différenciation vasculaire des cMSCs en modulant les sous populations CD90+ et – et en engageant les différentes sous populations dans l'une des deux lignées vasculaires.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si les différenciations pouvaient moduler l'expression génique de marqueurs de sénescence. Pour cela, lors de la différenciation vasculaire des cMSCs issues de souris jeunes ou âgées, nous avons testé l'expression de différentes CDKIs (*p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* et *p18^{INK4c}*) (Fig5.A). Nous avons pu constater que la mise en place de programme de différenciation modulait l'expression génique de ces CDKIs. En effet, nous retrouvons une augmentation de l'expression de *p15^{INK4b}* et de *p16^{INK4a}* au cours des 2 différenciations, tandis que pour *p18^{INK4c}*, la modulation de son expression dépend du type de différenciation. L'expression de *p18^{INK4c}* est inhibée lors de la différenciation en cellules musculaires lisses quelque soit l'âge des cMSCs, et augmentée uniquement dans les cMSCs différenciées en cellules endothéliales issues de souris jeunes. Pour le *p15^{INK4b}*, les inductions sont équivalentes quelle que soit la différenciation et sans impact de l'âge. Pour *p16^{INK4a}*, l'induction la plus importante est observée lors de la différenciation endothéliale des cMSCs âgées. La différenciation en cellules musculaires lisses augmente également l'expression de *p16^{INK4a}* mais sans impact de l'âge.

Il apparaît donc que des programmes de sénescence sont induits et associés à la différenciation vasculaire des cMSCs. Afin de déterminer le rôle de *p16^{INK4a}* au cours de la différenciation vasculaire, nous avons réalisé ces deux différenciations à partir de cMSCs issues de souris contrôles (WT) ou de souris déficientes pour la protéine *p16^{INK4a}* (*p16KI*) (Fig5.B-C).

Par l'analyse de l'expression génique des différents marqueurs spécifiques des deux lignées nous avons constaté que l'absence de la protéine *p16^{INK4a}* (*p16KI*) n'avait pas d'impact sur l'efficacité de la différenciation en cellules musculaires lisses et sur l'acquisition de l'expression d'*Acta2*, de la *Cnn1* et de la *Myocd* (Fig5.B). Nous remarquons que l'absence de *p16^{INK4a}* induit de façon significative l'expression d'*Acta2* et du *Cnn1* en l'absence de facteurs de différenciation.

Au contraire, lors de la différenciation endothéliale des cMSCs, nous constatons un défaut de différenciation en l'absence de la protéine *p16^{INK4a}* (Fig5.C). En effet, l'acquisition du *Sca1* et du facteur de transcription *Fli1* est significativement plus importante dans les cMSCs WT que dans les cMSCs *p16KI*. Pour l'expression de la *Cadh5*, bien que la différence ne soit pas significative, il y a une tendance à l'augmentation plus importante de son expression dans les cMSCs WT comparé aux cMSCs déficientes pour *p16^{INK4a}* (Fig5.C).

Grâce à ces résultats préliminaires nous pouvons proposer que l'expression de p16^{INK4a} est nécessaire à la mise en place d'une différenciation endothéliale, mais n'est pas indispensable pour la différenciation en cellules musculaires lisses. Avec le vieillissement, nous émettons l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de p16^{INK4a} puisse favoriser l'engagement des cMSCs CD90+ dans la voie de différenciation endothéliale conduisant à l'apparition d'une nouvelle population, les cellules CD31+ PDGFR α + Sca1+ CD90+.

IV. Conclusion et perspectives

Dans ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence l'apparition, avec le vieillissement, d'un programme de sénescence au sein des cellules stromales mésenchymateuses cardiaques caractérisé notamment par une perte de prolifération cellulaire et l'expression d'inhibiteurs du cycle de la famille des INK4 dont p16^{INK4a}. De plus, nous avons observé au cours du vieillissement une modification de sous-populations de ces cMSCs, suggérant que ce type cellulaire serait en réalité un groupe hétérogène de cellules. Deux sous-populations peuvent être séparées sur la base de l'expression du CD90, le vieillissement induisant une raréfaction de la sous population CD90+. Nous avons pu démontrer que ces deux sous-populations de cMSCs CD90+/-, bien que semblant être très similaires sur l'expression de nombreux gènes, possèdent un potentiel de différenciation vasculaire différent. En effet, les cMSCs CD90+ se différencient préférentiellement en cellules endothéliales, tandis que les cellules CD90- se différencient elles en cellules musculaires lisses. Dans un premier temps, nous avons montré un biais de différenciation vasculaire avec le vieillissement avec une diminution de l'efficacité de la différenciation endothéliale et une augmentation de la différenciation en cellules musculaires lisses des cMSCs âgées. Ce biais de différenciation serait en réalité lié à ces modifications de sous-populations lors du vieillissement et à cette raréfaction de la population CD90+.

Dans un second temps, nous avons mis en évidence que le vieillissement pouvait potentialiser les capacités de différenciation des cMSCs CD90+/-, favorisant particulièrement l'acquisition de marqueurs endothéliaux dans les CD90+ âgées. De plus, nous avons découvert l'apparition d'une nouvelle population de cellules endothéliales-likes qui est caractérisée par l'expression du CD31, du PDGFR α , du Sca1 et du CD90, suggérant qu'elles puissent être issues du pool de cMSCs cardiaques, expliquant la raréfaction des CD90+ au sein des cMSCs CD31 négatives. Des études de linéage cellulaire ou de tracking sont aujourd'hui nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Pour finir, nous avons constaté que les cMSCs CD90+ exprimaient plus fortement la CDKI p16^{INK4a} au cours du vieillissement que la sous-population de CD90-, et qu'au cours de la différenciation endothéliale nous avons une augmentation de l'expression de cette même CDKI. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'expression du p16^{INK4a} était nécessaire à la différenciation endothéliale des cMSCs CD90+. Pour cela, nous

avons réalisé les différenciations vasculaires à partir de cMSCs issues de souris déficientes pour le p16^{INK4a}. Lors de cette expérience, nous avons observé que l'absence du p16^{INK4a} empêchait la différenciation endothéliale des cMSCs, mais n'avait pas d'impact sur la différenciation en cellules musculaires lisses. Ces résultats apportent un argument supplémentaire à l'implication d'un programme de sénescence dans la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses cardiaques.

Il est aujourd'hui nécessaire de réaliser des études de tracking cellulaire ou de linéage de ces sous-populations de cMSCs *in vivo* au cours du vieillissement, afin de les localiser précisément dans le tissu, et de visualiser leur potentielle participation à la formation de vaisseaux. Or les cMSCs ne représentant qu'environ 1 à 3% des cellules du stroma cardiaque, se pose alors la relevance physiologique de ce potentiel de différenciation vasculaire. D'un autre côté nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'expression génique de facteurs pro-angiogéniques au cours du vieillissement de ces cellules cMSCs (*Vegfa*, *Igf1*). Sachant que les cellules mésenchymateuses sont aujourd'hui fortement exploitées pour leur potentiel sécrétoire, plus que pour leurs propriétés plastiques, il serait intéressant d'étudier la composition et l'effet de ce sécrétome dans des phénomènes angiogéniques ou de survie des cellules endothéliales.

Afin d'étudier l'implication physiologique de ces cMSCs au cours du vieillissement, une stratégie d'élimination spécifique pourrait être mise en place sur l'expression du PDGFR α et du Sca1. Des études ont déjà démontrées que l'utilisation du sunitinib, inhibiteurs de tyrosines kinases dont les PDGFR (α et β), induisaient une cardiotoxicité par une dysfonction microvasculaire par déplétion des péricytes (Chintalgattu et al., 2013). De plus, il pourrait être intéressant d'avoir recours à l'utilisation des gènes suicides liées à l'expression de p16^{INK4a} spécifiquement dans notre type cellulaire afin de mettre en évidence l'implication de cette voie dans la différenciation endothéliale *in vivo* des cMSCs.

Pour finir, il serait nécessaire d'approfondir l'étude de cette nouvelle population de cellules endothéliales-like. Nous savons déjà qu'elle exprime les marqueurs endothéliaux (*Pecam1*, *Kdr*, *Cadh5*) de façon moins importante que les cellules endothéliales natives (résultats non montrés). Seraient-elles des cellules endothéliales dysfonctionnelles ou une nouvelle sous population ayant un rôle physiologique différent ?

L'implication physiologique des cMSCs au sein du tissu reste aujourd'hui encore à approfondir et notamment le rôle des différentes sous-populations bien que des faisceaux d'arguments convergent sur une activité pro-angiogénique. De plus, l'implication des voies de sénescence dans la différenciation des cellules progénitrices reste un concept novateur qui pourrait jouer un rôle sur l'apparition des pathologies liées à l'âge.

Discussion

Au cours de cette étude nous avons mis en évidence l'apparition d'un programme de sénescence au sein des cMSCs caractérisé par une diminution de leur prolifération et de leurs capacités clonogéniques, ainsi que par l'expression de CDKIs de la famille des INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}) et d'un SASP pro-inflammatoire (Ccl2) et pro-angiogénique (Igf1, Vegfa). L'induction de ce programme de sénescence est corrélée à l'apparition de dommages à l'ADN (cassures double brins) avec une diminution de la prolifération cellulaire. De façon étonnante, nous ne détectons pas d'induction de l'expression de p21^{Cip1}, classiquement contrôlée par l'activation de p53 (Williams & Schumacher, 2016), suggérant l'implication d'une voie alternative en réponse aux dommages à l'ADN. Récemment, il a été découvert qu'une autre CDKI de la famille des Cip/Kip, p57^{Kip2} pouvait être un effecteur de la DDR permettant un arrêt de la prolifération cellulaire (Jia et al., 2015). De plus, son activation ne dépend pas de la présence de p53, ce qui suggère que p57^{Kip2} et p53 participent à deux voies de réponses différentes. L'expression de p57^{Kip2} est détectée dans les cMSCs mais l'induction de son expression transcriptionnelle en réponse au vieillissement reste modérée (résultats non montrés).

Plusieurs études portant sur l'impact du vieillissement sur les BM-MSCs montrent une diminution du taux de prolifération et des capacités clonogéniques avec l'âge (N. Baker, Boyette, & Tuan, 2015; Sethe, Scutt, & Stolzing, 2006), comme nous avons pu l'observer pour les cMSCs dans cette étude. Cependant, concernant l'impact du vieillissement sur des capacités de différenciation des BM-MSCs, les résultats des études restent contradictoires. Il était admis qu'avec l'âge, les BM-MSCs perdaient leur potentiel ostéogénique et augmentaient leur potentiel adipogénique (Kim et al., 2012). D'autres études remettent en cause ces résultats, ne retrouvant pas d'effet de l'âge sur le potentiel adipogénique (Sethe et al., 2006). Ces résultats contradictoires pourraient être liés aux différentes conditions de culture cellulaire, au nombre de passage des cellules avant différenciation et des études *in vivo* de ces potentiels de différenciation seraient particulièrement intéressantes pour mieux définir les capacités de différenciation des BM-MSCs avec le vieillissement (N. Baker et al., 2015).

Dans notre étude, nous n'avons pas retrouvé de modification du potentiel adipogénique des cMSCs avec l'âge. Par contre, nous avons montré une modulation des capacités de différenciation vasculaire des cMSCs au cours du vieillissement, avec une diminution du potentiel endothélial et une augmentation du potentiel léiomyocytaire. Ces modulations ne seraient pas dues à une modification intrinsèque globale des cMSCs sénescents mais à des modifications des sous-populations de cMSCs sous l'effet du vieillissement. En particulier, la raréfaction de la sous-population de cMSCs CD90+ avec l'âge pourrait rendre compte d'une diminution de potentiel endothélial. D'autres études réalisées chez l'Homme et chez le macaque retrouvent une diminution de la population CD90+ dans les BM-MSCs au cours du vieillissement (Siegel et al., 2013; Yu

et al., 2011). Ceci suggère que la diminution de l'expression du CD90 pourrait être un marqueur du vieillissement des MSCs.

Le CD90 ou Thy1, est une glycosylphatidylinositol (GPI) glycoprotéine d'ancrage, d'abord décrite dans les lymphocytes T puis dans de nombreux autres types cellulaires tels que les cellules souches hématopoïétiques, les cellules cancéreuses, les cellules endothéliales et les MSCs (Rege, 2006). Les fonctions cellulaires dépendantes de CD90 ne sont aujourd'hui pas totalement connues et varieraient en fonction du type cellulaire (Bradley, Ramirez, & Hagood, 2009). L'équipe de Moraes et al, a montré que l'inhibition du CD90 par une stratégie de sh-RNA dans des cellules mésenchymateuses humaines provenant de différents tissus (pulpe dentaire, tissus adipeux et du fluide amniotique) induit une augmentation de la différenciation adipocytaire et chondrocytaire (Moraes et al., 2016). Ce résultat est conforté *in vivo*, chez les souris CD90 KO par une prise de poids plus importante liée à une accumulation du tissu adipeux. De plus *in vitro*, la surexpression de CD90 par les cellules pré-adipocytaire 3T3L1 inhibe leur différenciation adipocytaire (Woeller et al., 2015).

Lors de la caractérisation de ces deux sous populations, CD90+ et CD90-, nous n'avons pas observé de différences majeures concernant leur capacité de prolifération et l'expression de protéines du SASP. En revanche, ces deux sous populations présenteraient des potentiels de différenciation différents, les CD90+ se différencieraient plus en cellules endothéliales et les CD90- en cellules musculaires lisses. Dans la littérature, il a déjà été montré des modulations du potentiel de différenciation entre 2 populations liées à la surexpression ou à l'absence d'expression du CD90. Grâce à l'utilisation de cardiosphères issues de tissu cardiaque humain, l'équipe de Gago-Lopez a pu démontrer que les cellules souches dérivées de ces cardiosphères peuvent être divisées en deux populations, les CD90+ et les CD90-. Il se trouve que les cellules CD90- présentent un potentiel de différenciation en cardiomyocytes matures (>1%) que n'ont pas les CD90+. De plus, dans cette étude les cellules CD90+ expriment après culture plus de vWF que les cellules CD90-, mais il n'y a pas de différence sur l'acquisition des marqueurs de cellules musculaires lisses (Gago-Lopez et al., 2014). Cette première étude corrèle en partie avec nos résultats pour le potentiel endothélial des CD90+. D'un autre côté, il a été démontré que des fibroblastes de poumon négatifs pour le CD90 ont un potentiel de différenciation en myofibroblastes supérieur à celui des CD90+ (Sanders, Kumbala, & Hagood, 2007). Dans cette étude, après traitement au TGF β à une dose équivalente que celle que nous utilisons, ils montrent une augmentation significative de l'expression de la myocardine, de l' α SMA ou du MyoD dans la population CD90 négative comparée à la population CD90 positive. Ces marqueurs sont aussi des marqueurs de différenciation en cellules musculaires lisses et sont cohérents les résultats que nous avons obtenus.

L'équipe de Kovacic a récemment mis en évidence *in vivo* chez l'Homme, la présence de MSCs CD90+ (PDGFR α , CD73, CD105, CD44) définissant une population de cellules adventitielles au sein des gros vaisseaux (aorte et artère thoracique interne) (Michelis et al., 2018). Ils démontrent que cette population

n'exprime pas les marqueurs des CMLs (α SMA, Calponine ou smootheline) ou le CD31, et qu'elle possède des propriétés angiogéniques par sécrétion de VEGF et d'angiogenine. Par ailleurs, sur la base d'une analyse transcriptomique, ils suggèrent que ces cellules pourraient jouer un rôle dans les pathologies vasculaires, notamment dans l'athérosclérose (Michelis et al., 2018).

De façon intéressante, nous avons pu observer que ces différentes capacités de différenciation entre les 2 sous populations CD90+ et -, étaient révélées au cours du vieillissement, sans ajout de facteurs de différenciation. Or au cours du vieillissement, nous avons pu constater la mise en place d'un programme de sénescence avec l'expression de CDKIs de la famille des INK4. Ces résultats nous laissent à penser qu'un programme de sénescence pourrait jouer un rôle dans les phénomènes de différenciation vasculaire des cMSCs. En effet, nous avons pu observer une augmentation de l'expression de certaines de ces CDKIs (p15^{INK4b} et p16^{INK4a}) au cours de cette différenciation vasculaire. De plus, nous montrons qu'en absence de protéine p16^{INK4a}, les cMSCs présentent un défaut de différenciation endothéliale mais maintiennent un potentiel de différenciation en cellules musculaires lisses. On pourrait donc envisager qu'au cours du vieillissement l'expression de p16^{INK4a} participe à la différenciation endothéliale de la population CD90+ permettant l'apparition d'une nouvelle sous population de cellules endothéliales exprimant les marqueurs CD31+, PDGFR α +, Sca1+ et enrichie en CD90, comparée aux cellules endothéliales natives.

D'autres équipes ont pu mettre en avant ce nouveau concept d'implication des voies de sénescence dans les phénomènes de différenciation. En effet, Phillipot *et al* en 2014 ont démontré que la CDKI p16^{INK4a} était surexprimée au cours de la différenciation chondrocytaire dans les BM-MSCs humaines, et que son inhibition induisait un défaut de différenciation terminale de ces cellules en chondrocytes (Phillipot et al., 2014). Par ailleurs, Ubil *et al* en 2014, ont démontré l'importance de p53 dans le phénomène de transition mésenchymateuse-endothéliale au cours d'un infarctus du myocarde. L'absence de p53 chez des souris jeunes diminue la différenciation endothéliale de cellules du stroma cardiaque et impacterait ainsi le phénomène de néovascularisation post-ischémique. Nous avons d'ailleurs pu constater au cours de notre étude une légère augmentation de l'expression du p53 au cours de la différenciation endothéliale (données non montrées).

Définir le processus de sénescence comme essentiellement délétère est aujourd'hui remis en cause. Ce processus lorsqu'il est contrôlé et transitoire participe à de nombreux mécanismes essentiels tels que l'embryogénèse, la réparation tissulaire, la cicatrisation et l'échappement à la tumorigenèse (Demaria et al., 2014; He & Sharpless, 2017b; Daniel Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). L'implication d'un programme de sénescence dans la différenciation cellulaire de cellules progénitrices est encore mal comprise mais cette différenciation dépendante de la sénescence pourrait jouer un rôle critique dans la

réparation tissulaire. Au cours du vieillissement, l'augmentation et le maintien d'un nombre important de cellules sénescentes pourrait perturber l'homéostasie tissulaire en stimulant des voies de différenciation cellulaire inadaptées pour l'organe âgé.

Bibliographie

- Abbate, A., Arena, R., Abouzaki, N., Van Tassell, B. W., Canada, J., Shah, K., ... Voelkel, N. F. (2015). Heart failure with preserved ejection fraction: Refocusing on diastole. *International Journal of Cardiology*, *179*, 430–440. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.11.106>
- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., ... Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, *15*(8), 978–990. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>
- Aird, K. M., & Zhang, R. (2015). Nucleotide metabolism, oncogene-induced senescence and cancer. *Cancer Letters*, *356*(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.017>
- Armanios, M., Alder, J. K., Parry, E. M., Karim, B., Strong, M. A., & Greider, C. W. (2009). Short Telomeres are Sufficient to Cause the Degenerative Defects Associated with Aging. *American Journal of Human Genetics*, *85*(6), 823–832. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.10.028>
- Asli, N., Xaymardan, M., & Harvey, R. (2014). Epicardial Origin of Resident Mesenchymal Stem Cells in the Adult Mammalian Heart. *Journal of Developmental Biology*, *2*(2), 117–137. <https://doi.org/10.3390/jdb2020117>
- Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derks, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., ... de Keizer, P. L. J. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*, *169*(1), 132–147.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.031>
- Bailey, B., Fransioli, J., Gude, N. A., Alvarez, R., Zhan, X., Gustafsson, Å. B., & Sussman, M. A. (2012). Sca-1 knockout impairs myocardial and cardiac progenitor cell function. *Circulation Research*, *111*(6), 750–760. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.274662>
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., ... van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, *530*(7589), 184–189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., ... Van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16 Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, *530*(7589), 1–5. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., ... van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, *479*(7372), 232–236. <https://doi.org/10.1038/nature10600>
- Baker, N., Boyette, L. B., & Tuan, R. S. (2015). Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*, *70*, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.10.014>
- Ball, S. G., Worthington, J. J., Canfield, A. E., Merry, C. L. R., & Kielty, C. M. (2014). Mesenchymal stromal cells: Inhibiting PDGF receptors or depleting fibronectin induces mesodermal progenitors with endothelial potential. *Stem Cells*, *32*(3), 694–705. <https://doi.org/10.1002/stem.1538>
- Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K., & Baudino, T. A. (2007). Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *293*(3). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00514.2007>
- Banito, A., Rashid, S. T., Acosta, J. C., Li, S., Pereira, C. F., Geti, I., ... Gil, J. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes & Development*, *23*(18), 2134–2139. <https://doi.org/10.1101/gad.1811609>
- Bara, J. J., Richards, R. G., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2014). Concise review: bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *32*(7), 1713–1723. <https://doi.org/10.1002/stem.1649>
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., ... Bartek, J. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, *434*(7035), 864–870. <https://doi.org/10.1038/nature03482>
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S., & Nelson, P. S. (2006). The gene expression program of prostate fibroblast

- senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Research*, 66(2), 794–802. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1716>
- Bazarov, A. V., Van Sluis, M., Hines, W. C., Bassett, E., Beliveau, A., Campeau, E., ... Yaswen, P. (2010). p16(INK4a) -mediated suppression of telomerase in normal and malignant human breast cells. *Aging Cell*, 9(5), 736–746. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00599.x>
- Bearzi, C., Leri, A., Lo Monaco, F., Rota, M., Gonzalez, A., Hosoda, T., ... Anversa, P. (2009). Identification of a coronary vascular progenitor cell in the human heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15885–15890. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907622106>
- Beauséjour, C. M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S. W., Yaswen, P., & Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: Roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO Journal*, 22(16), 4212–4222. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417>
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., ... Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114(6), 763–776. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00687-1)
- Beltrami, A. P., Cesselli, D., Bergamin, N., Marcon, P., Rigo, S., Puppato, E., ... Beltrami, C. A. (2007). Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*, 110(9), 3438–3446. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-055566>
- Beltrami, A. P., & Madeddu, P. (2017). Pericytes and cardiac stem cells: Common features and peculiarities. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.023>
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(5), 961–976. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.10.013>
- Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., ... Frisén, J. (2015). Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*, 161(7), 1566–1575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.026>
- Berry, C., Hogg, K., Norrie, J., Stevenson, K., Brett, M., & McMurray, J. (2005). Heart failure with preserved left ventricular systolic function: a hospital cohort study. *Heart (British Cardiac Society)*, 91(7), 907–913. <https://doi.org/10.1136/hrt.2004.041996>
- Bhatia, B., Multani, A. S., Patrawala, L., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Zhou, J., ... Tang, D. G. (2008). Evidence that senescent human prostate epithelial cells enhance tumorigenicity: Cell fusion as a potential mechanism and inhibition by p16INK4a and hTERT. *International Journal of Cancer*, 122(7), 1483–1495. <https://doi.org/10.1002/ijc.23222>
- Bianconi, V., Sahebkar, A., Kovanen, P., Bagaglia, F., Ricciuti, B., Calabrò, P., ... Pirro, M. (2018). Endothelial and cardiac progenitor cells for cardiovascular repair: A controversial paradigm in cell therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 181(August 2017), 156–168. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.08.004>
- Bielak-Zmijewska, A., Mosieniak, G., & Sikora, E. (2017). Is DNA damage indispensable for stress-induced senescence? *Mechanisms of Ageing and Development*, (July), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.004>
- Bielak-Zmijewska, A., Wnuk, M., Przybylska, D., Grabowska, W., Lewinska, A., Alster, O., ... Sikora, E. (2014). A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta. *Biogerontology*, 15(1), 47–64. <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9477-9>
- Bitto, A., Ito, T. K., Pineda, V. V., LeTexier, N. J., Huang, H. Z., Sutlief, E., ... Kaeberlein, M. (2016). Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.16351>
- Blagosklonny, M. V. (2011). Cell cycle arrest is not senescence. *Aging*, 3(2), 94–101. <https://doi.org/10.1093/ajph.2011.01.001> [pii]
- Blagosklonny, M. V. (2003). Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Reports*, 4(4), 358–362. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor806>
- Blasco, M. A. (2007). Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chemical Biology*, 3(10), 640–649. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.38>
- Blocki, A., Wang, Y., Koch, M., Peh, P., Beyer, S., Law, P., ... Raghunath, M. (2013). Not All MSCs Can Act as Pericytes: Functional In

- Vitro Assays to Distinguish Pericytes from Other Mesenchymal Stem Cells in Angiogenesis. *Stem Cells and Development*, 22(17), 2347–2355. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0415>
- Bode, A. M., & Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 793–805. <https://doi.org/10.1038/nrc1455>
- Bodnar, A. G. (1998). Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*, 279(5349), 349–352. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>
- Bradley, J. E., Ramirez, G., & Hagood, J. S. (2009). Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype. *BioFactors*, 35(3), 258–265. <https://doi.org/10.1002/biof.41>
- Brandes, R. P., Fleming, I., & Busse, R. (2005). Endothelial aging. *Cardiovascular Research*. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.12.027>
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., & Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, 377(6549), 552–557. <https://doi.org/10.1038/377552a0>
- Bu, L., Jiang, X., Martin-Puig, S., Caron, L., Zhu, S., Shao, Y., ... Chien, K. R. (2009). Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*, 460(7251), 113–117. <https://doi.org/10.1038/nature08191>
- Bürkle, A. (2017). In memoriam Olivier Toussaint - Stress-induced premature senescence and the role of DNA damage. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2(April), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.06.003>
- Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J., & Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental Cell*, 5(6), 877–889. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00363-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00363-0)
- Cai, X., Lin, Y., Hauschka, P. V., & Grottkau, B. E. (2011). Adipose stem cells originate from perivascular cells. *Biology of the Cell*, 103(9), 435–447. <https://doi.org/10.1042/BC20110033>
- Campagnolo, P., Cesselli, D., Al Haj Zen, A., Beltrami, A. P., Kränkel, N., Katare, R., ... Madeddu, P. (2010). Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential. *Circulation*, 121(15), 1735–1745. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.899252>
- Campbell, J. M., Bellman, S. M., Stephenson, M. D., & Lisy, K. (2017). Metformin reduces all-cause mortality and diseases of ageing independent of its effect on diabetes control: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, 40, 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.08.003>
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Cang, S., Iragavarapu, C., Savooji, J., Song, Y., & Liu, D. (2015). ABT-199 (venetoclax) and BCL-2 inhibitors in clinical development. *Journal of Hematology & Oncology*, 8(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0224-3>
- Caplan, A. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Caplan, A. I. (2008). All MSCs Are Pericytes? *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.08.008>
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Chakravarty, T., Makkar, R. R., Ascheim, D. D., Traverse, J. H., Schatz, R., Demaria, A., ... Henry, T. D. (2017). ALLogeneic Heart Stem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) Trial: Rationale and Design. *Cell Transplantation*, 26(2), 205–214. <https://doi.org/10.3727/096368916X692933>
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R. M., Demaria, M., Campisi, J., ... Zhou, D. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine*, 22(1), 78–83. <https://doi.org/10.1038/nm.4010>
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J., & Ames, B. N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid

- fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4337–4341.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7753808>
- Chen, Q. M., Liu, J., & Merrett, J. B. (2000). Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *The Biochemical Journal*, 347(Pt 2), 543–551. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10749685>
- Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z. A., Niki, M., ... Pandolfi, P. P. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051), 725–730.
<https://doi.org/10.1038/nature03918>
- Chiao, Y. A., Dai, Q., Zhang, J., Lin, J., Lopez, E. F., Ahuja, S. S., ... Jin, Y.-F. (2011). Multi-Analyte Profiling Reveals Matrix Metalloproteinase-9 and Monocyte Chemotactic Protein-1 as Plasma Biomarkers of Cardiac Aging. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(4), 455–462. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.959981>
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*, 15(11), 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>
- Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6311), 472–477.
<https://doi.org/10.1126/science.aaf6659>
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Deursen, J. M. Van. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease : from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, 21(12), 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., & van Deursen, J. M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.116>
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., Dananberg, J., & Van Deursen, J. M. (2017). Senescent cells: An emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(10), 718–735.
<https://doi.org/10.1038/nrd.2017.116>
- Chimenti, I., Smith, R. R., Li, T. S., Gerstenblith, G., Messina, E., Giacomello, A., & Marbán, E. (2010). Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circulation Research*, 106(5), 971–980. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.210682>
- Chintalgattu, V., Rees, M. L., Culver, J. C., Goel, A., Jiffar, T., Zhang, J., ... Khakoo, A. Y. (2013). Coronary microvascular pericytes are the cellular target of sunitinib malate-induced cardiotoxicity. *Science Translational Medicine*, 5(187).
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005066>
- Chong, J. J. H., Chandrakanthan, V., Xaymardan, M., Asli, N. S., Li, J., Ahmed, I., ... Harvey, R. P. (2011). Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin. *Cell Stem Cell*, 9(6), 527–540. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.10.002>
- Chong, J. J. H., Reinecke, H., Iwata, M., Torok-Storb, B., Stempien-Otero, A., & Murry, C. E. (2013). Progenitor Cells Identified by PDGFR-Alpha Expression in the Developing and Diseased Human Heart. *Stem Cells and Development*, 22(13), 1932–1943.
<https://doi.org/10.1089/scd.2012.0542>
- Choo, K. B. ung, Tai, L., Hymavathe, K. S., Wong, C. Y. in, Nguyen, P. N. guyen N., Huang, C. J., ... Kamarul, T. (2014). Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Medical Sciences*, 11(11), 1201–1207. <https://doi.org/10.7150/ijms.8356>
- Chow, M. T., Möller, A., & Smyth, M. J. (2012, February). Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.12.004>
- Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*, 130(2), 223–233.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.003>
- Collado, M., & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), 51–57.

<https://doi.org/10.1038/nrc2772>

- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010a). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Coppé, J.-P., Desprez, P., Krtolica, A., & Campisi, J. (2010b). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 99–118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., ... Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology*, 6(12), 2853–2868. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
- Coppe, J. (2014). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu Rev Pathol*, 99–118. <https://doi.org/10.1146>
- Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Krtolica, A., Beauséjour, C. M., Parrinello, S., ... Campisi, J. (2010). A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PLoS ONE*, 5(2), e9188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009188>
- Coppé, J. P., Rodier, F., Patil, C. K., Freund, A., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2011). Tumor suppressor and aging biomarker p16 INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36396–36403. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257071>
- Correia-Melo, C., Marques, F. D., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., ... Passos, J. F. (2016). Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. *The EMBO Journal*, 35(7), 724–742. <https://doi.org/10.15252/embj.201592862>
- Corselli, M., Chen, C.-W., Sun, B., Yap, S., Rubin, J. P., & Péault, B. (2012). The Tunica Adventitia of Human Arteries and Veins As a Source of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 21(8), 1299–1308. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0200>
- Corselli, M., Chen, C. W., Crisan, M., Lazzari, L., & Péault, B. (2010). Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(6), 1104–1109. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.191643>
- Cory, S., Huang, D. C. S., & Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: Roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22(53), 8590–8607. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207102>
- Crisan, M., Corselli, M., Chen, W. C. W., & Péault, B. (2012). Perivascular cells for regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(12), 2851–2860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01617.x>
- Crisan, M., Crisan, M., Yap, S., Yap, S., Casteilla, L., Casteilla, L., ... Peault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>
- Croce, C. M., & Reed, J. C. (2016). Finally, an apoptosis-targeting therapeutic for cancer. *Cancer Research*, 76(20), 5914–5920. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1248>
- Csiszar, A., Ungvari, Z., Edwards, J. G., Kaminski, P., Wolin, M. S., Koller, A., & Kaley, G. (2002). Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circulation Research*, 90(11), 1159–1166. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000020401.61826.EA>
- D’Adda Di Fagagna, F., Teo, S. H., & Jackson, S. P. (2004, August 1). Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1214504>
- D’Amario, D., Cabral-Da-Silva, M. C., Zheng, H., Fiorini, C., Goichberg, P., Steadman, E., ... Kajstura, J. (2011). Insulin-like growth factor-1 receptor identifies a pool of human cardiac stem cells with superior therapeutic potential for myocardial regeneration. *Circulation Research*, 108(12), 1467–1481. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240648>
- D’Amario, D., Fiorini, C., Campbell, P. M., Goichberg, P., Sanada, F., Zheng, H., ... Anversa, P. (2011). Functionally competent cardiac

- stem cells can be isolated from endomyocardial biopsies of patients with advanced cardiomyopathies. *Circulation Research*, 108(7), 857–861. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.241380>
- da Silva Meirelles, L. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(11), 2204–2213. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>
- Dalle Pezze, P., Nelson, G., Otten, E. G., Korolchuk, V. I., Kirkwood, T. B. L., von Zglinicki, T., & Shanley, D. P. (2014). Dynamic Modelling of Pathways to Cellular Senescence Reveals Strategies for Targeted Interventions. *PLoS Computational Biology*, 10(8), e1003728. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003728>
- Davis, D. R., Zhang, Y., Smith, R. R., Cheng, K., Terrovitis, J., Malliaras, K., ... Marbán, E. (2009). Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One*, 4(9), e7195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007195>
- De Cabo, R., Carmona-Gutierrez, D., Bernier, M., Hall, M. N., & Madeo, F. (2014). The search for antiaging interventions: From elixirs to fasting regimens. *Cell*, 157(7), 1515–1528. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.031>
- de Jaeger, C., & Cherin, P. (2011). Les théories du vieillissement. *Médecine & Longévité*, 3(4), 155–174. <https://doi.org/10.1016/j.mlong.2011.10.001>
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 4(12), 1798–1806. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.191>
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., ... Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, 31(6), 722–733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Dey, D., Han, L., Bauer, M., Sanada, F., Oikonomopoulos, A., Hosoda, T., ... Wu, J. C. (2013). Dissecting the molecular relationship among various cardiogenic progenitor cells. *Circulation Research*, 112(9), 1253–1262. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300779>
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., ... D'Adda Di Fagagna, F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 444(7119), 638–642. <https://doi.org/10.1038/nature05327>
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Madrid, J. F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., ... Díaz-Flores, L. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histology and Histopathology*, 24(7), 909–969. <https://doi.org/10.14670/HH-24.909>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., ... Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Fagagna, F., d'Adda di, Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., ... Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194–198. <https://doi.org/10.1038/nature02118>
- Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., ... Salvioli, S. (2018a). The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Frontiers in Medicine*, 5(March). <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00061>
- Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., ... Salvioli, S. (2018b). The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Frontiers in Medicine*, 5(March). <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00061>

- Freedberg, D. E., Rigas, S. H., Russak, J., Gai, W., Kaplow, M., Osman, I., ... Polsky, D. (2008). Frequent p16-Independent Inactivation of p14ARF in Human Melanoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *100*(11), 784–795. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn157>
- Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in Molecular Medicine*, *16*(5), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.03.003>
- Fridlyanskaya, I., Alekseenko, L., & Nikolsky, N. (2015). Senescence as a general cellular response to stress: A mini-review. *Experimental Gerontology*, *72*, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.09.021>
- Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsh, C., Gottdiener, J., ... McBurnie, M. A. (2001). Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *56A*(3), 146–157. <https://doi.org/10.1093/gerona/56.3.M146>
- Friedenstein, A. J. (1980). Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematology and Blood Transfusion*, *25*, 19–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7021339>
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, *3*(4), 393–403. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5523063>
- Friedenstein, A. J., Deriglasova, U. F., Kulagina, N. N., Panasuk, A. F., Rudakowa, S. F., Luriá, E. A., & Ruadkow, I. A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental Hematology*, *2*(2), 83–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4455512>
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, *6*(2), 230–247. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654088>
- Fuentes, T., & Kearns-Jonker, M. (2013). Endogenous cardiac stem cells for the treatment of heart failure. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S29221>
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Clerici, M., Barozzi, S., Cittaro, D., Kaplunov, J. M., ... d'Adda di Fagagna, F. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology*, *14*(4), 355–365. <https://doi.org/10.1038/ncb2466>
- Furtado, M. B., Costa, M. W., Pranoto, E. A., Salimova, E., Lam, N. T., Park, A., ... Nadia, A. (2015). Cardiogenic Genes Expressed in Cardiac Fibroblasts Contribute to Heart Development and Repair Milena. *Circulation Research*, *114*(9), 1422–1434. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302530>
- Gago-Lopez, N., Awaji, O., Zhang, Y., Ko, C., Nsair, A., Liem, D., ... MacLellan, W. R. (2014). THY-1 receptor expression differentiates cardiosphere-derived cells with divergent cardiogenic differentiation potential. *Stem Cell Reports*, *2*(5), 576–591. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.03.003>
- Gambini, E., Pesce, M., Persico, L., Bassetti, B., Gambini, A., Alamanni, F., ... Pompilio, G. (2012). Patient profile modulates cardiac c-kit(+) progenitor cell availability and amplification potential. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *160*(5), 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.05.009>
- Gavin, T. P., Ruster, R. S., Carrithers, J. A., Zwetsloot, K. A., Kraus, R. M., Evans, C. A., ... Hickner, R. C. (2007). No difference in the skeletal muscle angiogenic response to aerobic exercise training between young and aged men. *Journal of Physiology*, *585*(1), 231–239. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.143198>
- Genead, R., Fischer, H., Hussain, A., Jaksch, M., Andersson, A. B., Ljung, K., ... Grinnemo, K.-H. (2012). Ischemia-Reperfusion Injury and Pregnancy Initiate Time-Dependent and Robust Signs of Up-Regulation of Cardiac Progenitor Cells. *PLoS ONE*, *7*(5), e36804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036804>
- Giaimo, S., & D'Adda di Fagagna, F. (2012). Is cellular senescence an example of antagonistic pleiotropy? *Aging Cell*, *11*(3), 378–383.

<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00807.x>

- Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 43(2 Pt 1), 405–413.
- Guijarro, D., Lebrin, M., Lairez, O., Bourin, P., Piriou, N., Pozzo, J., ... Roncalli, J. (2016). Intramyocardial transplantation of mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia and impaired left ventricular function: Results of the MESAMI 1 pilot trial. *International Journal of Cardiology*, 209, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.016>
- Han, H. C. (2012). Twisted blood vessels: Symptoms, etiology and biomechanical mechanisms. *Journal of Vascular Research*, 49(3), 185–197. <https://doi.org/10.1159/000335123>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458–460. <https://doi.org/10.1038/345458a0>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- He, S., & Sharpless, N. E. Senescence in Health and Disease, 169 Cell § (2017). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
- He, S., & Sharpless, N. E. (2017b). Senescence in Health and Disease. *Cell*, 169(6), 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
- Hernandez-Segura, A., de Jong, T. V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., & Demaria, M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology*, 27(17), 2652–2660.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.033>
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, xx, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
- Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and Functions of cellular senescence, 128(4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1038/nrm856>
- Horn, M. A., & Trafford, A. W. (2016). Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 93, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.11.005>
- Hoshino, A., Mita, Y., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Iwai-Kanai, E., Ueyama, T., ... Matoba, S. (2013). Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nature Communications*, 4(1), 2308. <https://doi.org/10.1038/ncomms3308>
- Hutchins, G. M., Miner, M. M., & Bulkley, B. H. (1978). Tortuosity as an index of the age and diameter increase of coronary collateral vessels in patients after acute myocardial infarction. *The American Journal of Cardiology*, 41(2), 210–215. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(78\)90158-3](https://doi.org/10.1016/0002-9149(78)90158-3)
- Itahana, K., Dimri, G., & Campisi, J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 2784–2791. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358493>
- Itzhaki-Alfia, A., Leor, J., Raanani, E., Sternik, L., Spiegelstein, D., Netser, S., ... Barbash, I. M. (2009). Patient characteristics and cell source determine the number of isolated human cardiac progenitor cells. *Circulation*, 120(25), 2559–2566. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.849588>
- Iwasa, H., Han, J., & Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 8(2), 131–144. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12581156>
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, 9(6), 685–693. <https://doi.org/10.1038/nm0603-685>
- Jazayeri, M., Allameh, A., Soleimani, M., Jazayeri, S. H., Piryaei, A., & Kazemnejad, S. (2008). Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, 32(10), 1183–1192. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.07.020>

- Jeck, W. R., Siebold, A. P., & Sharpless, N. E. (2012). Review: A meta-analysis of GWAS and age-associated diseases. *Aging Cell*, *11*(5), 727–731. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00871.x>
- Jeon, O. H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A. P., ... Elisseeff, J. H. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature Medicine*, *23*(6), 775–781. <https://doi.org/10.1038/nm.4324>
- Jia, H., Cong, Q., Chua, J. F. L., Liu, H., Xia, X., Zhang, X., ... Li, B. (2015). p57Kip2 is an unrecognized DNA damage response effector molecule that functions in tumor suppression and chemoresistance. *Oncogene*, *34*(27), 3568–3581. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.287>
- Johnson, S. C., Rabinovitch, P. S., & Kaeblerlein, M. (2013). MTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature*, *493*(7432), 338–345. <https://doi.org/10.1038/nature11861>
- Jugdutt, B. I. (2003). Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: When is enough enough? *Circulation*, *108*(11), 1395–1403. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085658.98621.49>
- Jun, J.-I., & Lau, L. F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature Cell Biology*, *12*(7), 676–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2070>
- Jung, J. H., Bae, S., Lee, J. Y., Woo, S. R., Cha, H. J., Yoon, Y., ... Lee, J. H. (2011). E3 ubiquitin ligase Hades negatively regulates the exonuclear function of p53. *Cell Death and Differentiation*, *18*(12), 1865–1875. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.57>
- Jung, Y. S., Qian, Y., & Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cellular Signalling*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.013>
- Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tsolou, A., ... von Zglinicki, T. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell*, *11*(6), 996–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x>
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., ... Sherr, C. J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, *91*(5), 649–659. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393858>
- Keller, K. M., & Howlett, S. E. (2016). Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart. *Canadian Journal of Cardiology*, *32*(9), 1065–1073. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.03.017>
- Kim, M. J., Kim, C. W., Choi, Y. S., Kim, M. H., Park, C. J., & Suh, Y. (2012). Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mechanisms of Ageing and Development*, *133*(5), 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2012.03.014>
- Kimura, W., Xiao, F., Canseco, D. C., Muralidhar, S., Thet, S., Zhang, H. M., ... Sadek, H. a. (2015). Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart. *Nature*, *523*(7559), 226–230. <https://doi.org/10.1038/nature14582>
- Klimczak, A., & Kozłowska, U. (2016). Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: Their role in tissue homeostasis. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2016/4285215>
- Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B., & von Zglinicki, T. (2017). Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine*, *21*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.020>
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., & Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- And insult-dependent manner, and follow expression of p16ink4a. *Cell Cycle*, *10*(3), 457–468. <https://doi.org/10.4161/cc.10.3.14707>
- Kramann, R., Schneider, R. K., DiRocco, D. P., Machado, F., Fleig, S., Bondzie, P. A., ... Humphreys, B. D. (2015). Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell*, *16*(1), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.004>
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., ... Lowe, S. W. (2008a). Senescence of activated stellate

- cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134(4), 657–667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., ... Lowe, S. W. (2008b). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*, 134(4), 657–667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(21), 12072–12077. <https://doi.org/10.1073/pnas.211053698>
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes & Development*, 24(22), 2463–2479. <https://doi.org/10.1101/gad.1971610>
- Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., ... Frenette, P. S. (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, 502(7473), 637–643. <https://doi.org/10.1038/nature12612>
- Kurpinski, K., Lam, H., Chu, J., Wang, A., Kim, A., Tsay, E., ... Li, S. (2010). Transforming growth factor- β and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells*, 28(4), 734–742. <https://doi.org/10.1002/stem.319>
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113(20), 3613–3622.
- La régulation du cycle cellulaire : introduction générale | RN' Bio. (n.d.). Retrieved October 5, 2017, from https://rnbio.upmc.fr/bio-cell_cycle-cellulaire_introduction
- Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., ... Campisi, J. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology*, 17(8), 1049–1061. <https://doi.org/10.1038/ncb3195>
- Lähteenvuo, J., & Rosenzweig, A. (2012). Effects of aging on angiogenesis. *Circulation Research*, 110(9), 1252–1263. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246116>
- Lakatta, E. G., & Levy, D. (2003). Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: Aging arteries: A “set up” for vascular disease. *Circulation*, 107(1), 139–146. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000048892.83521.58>
- Lam, C. S. P., Rienstra, M., Tay, W. T., Liu, L. C. Y., Hummel, Y. M., van der Meer, P., ... Hoendermis, E. S. (2017). Atrial Fibrillation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC: Heart Failure*, 5(2), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2016.10.005>
- Larousse. (n.d.). Retrieved November 5, 2017, from <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/vieillessement/81927>
- Laugwitz, K.-L., Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., & Chien, K. R. (2007). Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development*, 135(2), 193–205. <https://doi.org/10.1242/dev.001883>
- Lazzarini, V., Mentz, R. J., Fiuzat, M., Metra, M., & O'Connor, C. M. (2013). Heart failure in elderly patients: Distinctive features and unresolved issues. *European Journal of Heart Failure*, 15(7), 717–723. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft028>
- Lee, A. C., Fenster, B. E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N. S., Hirai, T., ... Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 7936–7940. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075689>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., ... Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x>
- Levenson, J. D., Phillips, D. C., Mitten, M. J., Boghaert, E. R., Diaz, D., Tahir, S. K., ... Souers, A. J. (2015). Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Science Translational Medicine*, 7(279), 1–12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4642>
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Matheu, A., Lynch, C. J., Ca?amero, M., ... Serrano, M. (2012). P27Kip1 directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, 11(6), 845–852. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.014>
- Li, T. S., Cheng, K., Lee, S. T., Matsushita, S., Davis, D., Malliaras, K., ... Marbán, E. (2010). Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for

- myocardial repair. *Stem Cells*, 28(11), 2088–2098. <https://doi.org/10.1002/stem.532>
- Lian, Q., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, H. K., Wu, X., Zhang, Y., ... Tse, H. F. (2010). Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*, 121(9), 1113–1123. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.898312>
- Liang, S. X., Tan, T. Y. L., Gaudry, L., & Chong, B. (2010). Differentiation and migration of Sca1+/CD31- cardiac side population cells in a murine myocardial ischemic model. *International Journal of Cardiology*, 138(1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.08.032>
- Lin, A. W., Barradas, M., Stone, J. C., Van Aelst, L., Serrano, M., & Lowe, S. W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes and Development*, 12(19), 3008–3019. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.3008>
- Lin, R. Z., Moreno-Luna, R., Zhou, B., Pu, W. T., & Melero-Martin, J. M. (2012). Equal modulation of endothelial cell function by four distinct tissue-specific mesenchymal stem cells. *Angiogenesis*, 15(3), 443–455. <https://doi.org/10.1007/s10456-012-9272-2>
- Liotta, L. A., & Kohn, E. C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 411(6835), 375–379. <https://doi.org/10.1038/35077241>
- Liton, P. B., Challa, P., Stinnett, S., Luna, C., Epstein, D. L., & Gonzalez, P. (2005). Cellular senescence in the glaucomatous outflow pathway. *Experimental Gerontology*, 40(8–9), 745–748. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.06.005>
- Liu, J. W., Dunoyer-Geindre, S., Serre-Beinier, V., Mai, G., Lambert, J. F., Fish, R. J., ... Kruithof, E. K. O. (2007). Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(4), 826–834. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02381.x>
- Longo, V. D., Antebi, A., Bartke, A., Barzilai, N., Brown-Borg, H. M., Caruso, C., ... Fontana, L. (2015). Interventions to slow aging in humans: Are we ready? *Aging Cell*, 14(4), 497–510. <https://doi.org/10.1111/acer.12338>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lu, T., & Finkel, T. (2008). Free radicals and senescence. *Experimental Cell Research*, 314(9), 1918–1922. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.01.011>
- Ma, Y., Mouton, A. J., & Lindsey, M. L. (2018). Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Translational Research*, 191, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2017.10.001>
- Macip, S., Igarashi, M., Fang, L., Chen, A., Pan, Z.-Q., Lee, S. W., & Aaronson, S. A. (2002). Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *The EMBO Journal*, 21(9), 2180–2188. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2180>
- Makkar, R. R., Smith, R. R., Cheng, K., Malliaras, K., Thomson, L. E. J., Berman, D., ... Marbán, E. (2012). Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): A prospective, randomised phase 1 trial. *The Lancet*, 379(9819), 895–904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60195-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60195-0)
- Malaquin, N., Martinez, A., & Rodier, F. (2016). Keeping the senescence secretome under control: Molecular reins on the senescence-associated secretory phenotype. *Experimental Gerontology*, 82, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.05.010>
- Manzella, N., Santin, Y., Maggiorani, D., Martini, H., Douin-Echinard, V., Passos, J. F., ... Mialet-Perez, J. (2018). Monoamine oxidase-A is a novel driver of stress-induced premature senescence through inhibition of parkin-mediated mitophagy. *Aging Cell*, (November 2017), e12811. <https://doi.org/10.1111/acer.12811>
- Marqués-Torrejón, M. Á., Porlan, E., Banito, A., Gómez-Ibarlucea, E., Lopez-Contreras, A. J., Fernández-Capetillo, O., ... Fariñas, I. (2013). Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell Stem Cell*, 12(1), 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.001>

- Martin-Montalvo, A., Mercken, E. M., Mitchell, S. J., Palacios, H. H., Mote, P. L., Scheibye-Knudsen, M., ... De Cabo, R. (2013). Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3192>
- Martin, J. A., Brown, T. D., Heiner, A. D., & Buckwalter, J. A. (2004). Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (427 Suppl), S96-103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15480082>
- Martin, N., Beach, D., & Gil, J. (2014). Ageing as developmental decay: Insights from p16INK4a. *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.09.008>
- Martos, R., Baugh, J., Ledwidge, M., O'Loughlin, C., Conlon, C., Patle, A., ... McDonald, K. (2007). Diastolic heart failure: Evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction. *Circulation*, 115(7), 888–895. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638569>
- Matheu, A., Maraver, A., Collado, M., Garcia-Cao, I., Cañamero, M., Borrás, C., ... Serrano, M. (2009). Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell*, 8(2), 152–161. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00458.x>
- Mauney, J., Olsen, B. R., & Volloch, V. (2010). Matrix remodeling as stem cell recruitment event: A novel in vitro model for homing of human bone marrow stromal cells to the site of injury shows crucial role of extracellular collagen matrix. *Matrix Biology*, 29(8), 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2010.08.008>
- Mcmurray, J. J. V., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., ... Ponikowski, P. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European Journal of Heart Failure*, 14(8), 803–869. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfs105>
- Melchiorri, A. J., Nguyen, B.-N. B., & Fisher, J. P. (2014). Mesenchymal Stem Cells: Roles and Relationships in Vascularization. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 20(3), 218–228. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0541>
- Melero-Martin, J. M., De Obaldia, M. E., Kang, S.-Y., Khan, Z. A., Yuan, L., Oettgen, P., & Bischoff, J. (2008). Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord blood-derived progenitor cells. *Circulation Research*, 103(2), 194–202. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178590>
- Merfeld-Clauss, S., Gollahalli, N., March, K. L., & Traktuev, D. O. (2010). Adipose tissue progenitor cells directly interact with endothelial cells to induce vascular network formation. *Tissue Engineering. Part A*, 16(9), 2953–2966. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0635>
- Mias, C., Lairez, O., Trouche, E., Roncalli, J., Calise, D., Seguelas, M. H., ... Cussac, D. (2009). Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells*, 27(11), 2734–2743. <https://doi.org/10.1002/stem.169>
- Michaloglou, C., Vredevelde, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M. A. M., ... Peeper, D. S. (2005). BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436(7051), 720–724. <https://doi.org/10.1038/nature03890>
- Michelis, K. C., Nomura-Kitabayashi, A., Lecce, L., Franzén, O., Koplev, S., Xu, Y., ... Kovacic, J. C. (2018). CD90 Identifies Adventitial Mesenchymal Progenitor Cells in Adult Human Medium- and Large-Sized Arteries. *Stem Cell Reports*, 11, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.06.001>
- Miller, R. A., Harrison, D. E., Astle, C. M., Fernandez, E., Flurkey, K., Han, M., ... Strong, R. (2014). Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex dependent and metabolically distinct from dietary restriction. *Aging Cell*, 13(3), 468–477. <https://doi.org/10.1111/ace.12194>
- Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., ... Komuro, I. (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature Medicine*, 15(9), 1082–1087. <https://doi.org/10.1038/nm.2014>
- Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X., & Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 29(16), 4495–4507. <https://doi.org/10.1128/MCB.01868-08>
- Moiseeva, O., Deschênes-Simard, X., St-Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A. E., ... Ferbeyre, G. (2013). Metformin inhibits

- the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell*, 12(3), 489–498.
<https://doi.org/10.1111/ace.12075>
- Moraes, D. A., Sibov, T. T., Pavon, L. F., Alvim, P. Q., Bonadio, R. S., Da Silva, J. R., ... Oliveira, D. M. (2016). A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s13287-016-0359-3>
- Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J. T., Bernshausen, A., Chen, Y., ... Chien, K. R. (2006). Multipotent Embryonic Isl1+Progenitor Cells Lead to Cardiac, Smooth Muscle, and Endothelial Cell Diversification. *Cell*, 127(6), 1151–1165.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.029>
- Morrison, S. J., & Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, 441(7097), 1068–1074. <https://doi.org/10.1038/nature04956>
- Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., ... Serrano, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104–1118.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(7), 482–496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Muñoz-Espín, D., Rovira, M., Galiana, I., Giménez, C., Lozano-Torres, B., Paez-Ribes, M., ... Serrano, M. (2018). A versatile drug delivery system targeting senescent cells. *EMBO Molecular Medicine*, e9355. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809355>
- Nakamura, A. J., Chiang, Y. J., Hathcock, K. S., Horikawa, I., Sedelnikova, O. A., Hodes, R. J., & Bonner, W. M. (2008). Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics & Chromatin*, 1(1), 6.
<https://doi.org/10.1186/1756-8935-1-6>
- Nakamura, T., Hosoyama, T., Kawamura, D., Takeuchi, Y., Tanaka, Y., Samura, M., ... Guan, J. L. (2016). Influence of aging on the quantity and quality of human cardiac stem cells. *Scientific Reports*, 6, 22781. <https://doi.org/10.1038/srep22781>
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., ... Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703–716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
- Niccoli, T., & Partridge, L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Current Biology*, 22(17), R741–R752.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.024>
- North, B. J., & Sinclair, D. A. (2012). The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circulation Research*, 110(8), 1097–1108. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246876>
- Noseda, M., Harada, M., McSweeney, S., Leja, T., Belian, E., Stuckey, D. J., ... Schneider, M. D. (2015). PDGFR α ; demarcates the cardiogenic clonogenic Sca1+ stem/progenitor cell in adult murine myocardium. *Nature Communications*, 6(May), 1–16.
<https://doi.org/10.1038/ncomms7930>
- Noseda, M., Harada, M., McSweeney, S., Leja, T., Belian, E., Stuckey, D. J., ... Schneider, M. D. (2015). PDGFR α demarcates the cardiogenic clonogenic Sca1+ stem/progenitor cell in adult murine myocardium. *Nature Communications*, 6(May), 1–16.
<https://doi.org/10.1038/ncomms7930>
- Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., ... Schneider, M. D. (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12313–12318. <https://doi.org/10.1073/pnas.2132126100>
- Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M., & Anversa, P. (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circulation Research*, 68(6), 1560–1568. <https://doi.org/10.1161/01.RES.68.6.1560>
- Olovnikov, A. M. (1996). Telomeres, telomerase, and aging: Origin of the theory. *Experimental Gerontology*, 31(4), 443–448.
[https://doi.org/10.1016/0531-5565\(96\)00005-8](https://doi.org/10.1016/0531-5565(96)00005-8)

- Olson, L. E., & Soriano, P. (2009). Increased PDGFR α Activation Disrupts Connective Tissue Development and Drives Systemic Fibrosis. *Developmental Cell*, 16(2), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.12.003>
- Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., Belli, B. A., ... Rosenberg, S. H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 435(7042), 677–681. <https://doi.org/10.1038/nature03579>
- ONU. (2015). World population, ageing. *Suggested Citation: United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). World Population Ageing, United Nat(*(ST/ESA/SER.A/390), 164. <https://doi.org/ST/ESA/SER.A/390>
- Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K., & Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1 is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), 17031–17036. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905299106>
- Orlandi, A., Bochaton-Piallat, M. L., Gabbiani, G., & Spagnoli, L. G. (2006). Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: Implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 188(2), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.01.018>
- Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M., & Werner, C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 22(3), 377–384. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-3-377>
- Ott, C., Jung, T., Grune, T., & Höhn, A. (2017). SIPS as a model to study age-related changes in proteolysis and aggregate formation. *Mechanisms of Ageing and Development*, (July), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.07.007>
- Ovadya, Y., & Krizhanovsky, V. (2014). Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies. *Biogerontology*, 15(6), 627–642. <https://doi.org/10.1007/s10522-014-9529-9>
- Ovadya, Y., & Krizhanovsky, V. (2018). Strategies targeting cellular senescence. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1247–1254. <https://doi.org/10.1172/JCI95149>
- Oyama, T., Nagai, T., Wada, H., Naito, A. T., Matsuura, K., Iwanaga, K., ... Komuro, I. (2007). Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *The Journal of Cell Biology*, 176(3), 329–341. <https://doi.org/10.1083/jcb.200603014>
- Pacini, S., & Petrini, I. (2014). Are MSCs angiogenic cells ? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. *Cell and Developmental Biology*, 2(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00020>
- Palm, W., & de Lange, T. (2008). How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 301–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350>
- Palmero, I., Pantoja, C., & Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*, 395(6698), 125–126. <https://doi.org/10.1038/25870>
- Parízková, J., Eiselt, E., Sprynarová, S., & Wachtlová, M. (1971). Body composition, aerobic capacity, and density of muscle capillaries in young and old men. *Journal of Applied Physiology*, 31(3), 323–325. <https://doi.org/10.1152/jappl.1971.31.3.323>
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., & Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature Cell Biology*, 5(8), 741–747. <https://doi.org/10.1038/ncb1024>
- Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., ... von Zglinicki, T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology*, 6(1), 347. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.5>
- Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., ... Von Zglinicki, T. (2007). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS Biology*, 5(5), 1138–1151. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050110>
- Passos, J. F., Simillion, C., Hallinan, J., Wipat, A., & Von Zglinicki, T. (2009). Cellular senescence: Unravelling complexity. *Age*, 31(4), 353–363. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9108-1>
- Peeper, D. S., Dannenberg, J. H., Douma, S., te Riele, H., & Bernards, R. (2001). Escape from premature senescence is not sufficient for oncogenic transformation by Ras. *Nature Cell Biology*, 3(2), 198–203. <https://doi.org/10.1038/35055110>

- Pelekanos, R. A., Li, J., Gongora, M., Chandrakanthan, V., Scown, J., Suhaimi, N., ... Little, M. H. (2012). Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. *Stem Cell Research*, *8*(1), 58–73. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.08.003>
- Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V., & Kantidze, O. L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*. <https://doi.org/10.1111/ace.12518>
- Pfister, O. (2005). CD31- but Not CD31+ Cardiac Side Population Cells Exhibit Functional Cardiomyogenic Differentiation. *Circulation Research*, *97*(1), 52–61. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000173297.53793.f8>
- Philipot, D., Guérit, D., Platano, D., Chuchana, P., Olivotto, E., Espinoza, F., ... Brondello, J. (2014). p16 INK4a and its regulator miR-24 link senescence and chondrocyte terminal differentiation-associated matrix remodeling in osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, *16*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/ar4494>
- Pontikoglou, C., Deschaseaux, F., Sensebé, L., & Papadaki, H. A. (2011). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cell Reviews and Reports*, *7*(3), 569–589. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9228-8>
- Prieur, A., & Peeper, D. S. (2008). Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, *20*(2), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.007>
- Rayess, H., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer*, *130*(8), 1715–1725. <https://doi.org/10.1002/ijc.27316>
- Rege, T. A. (2006). Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *The FASEB Journal*, *20*(8), 1045–1054. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5460rev>
- Robey, P. G. (2000). Series Introduction : Stem cells near the century mark Find the latest version : Stem cells near the century mark. *The Journal of Clinical Investigation*, *105*(11), 1489–1491.
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, *192*(4), 547–556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Roobrouck, V. D., Carlos Clavel, Jacobs, S. A., Ulloa-Montoya, F., Crippa, S., Sohni, A., ... Verfaillie, C. M. (2011). Differentiation potential of human postnatal mesenchymal stem cells, mesoangioblasts, and multipotent adult progenitor cells reflected in their transcriptome and partially influenced by the culture conditions. *Stem Cells*, *29*(5), 871–882. <https://doi.org/10.1002/stem.633>
- Rose, R. A., Jiang, H., Wang, X., Helke, S., Tsoporis, J. N., Gong, N., ... Keating, A. (2008). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Express Cardiac-Specific Markers, Retain the Stromal Phenotype, and Do Not Become Functional Cardiomyocytes In Vitro. *Stem Cells*, *26*(11), 2884–2892. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0329>
- Rose, R. A., Keating, A., & Backx, P. H. (2008). Do mesenchymal stromal cells transdifferentiate into functional cardiomyocytes? *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.186908>
- Roura, S., Bagó, J. R., Soler-Botija, C., Pujal, J. M., Gálvez-Montón, C., Prat-Vidal, C., ... Bayes-Genis, A. (2012). Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote vascular growth in vivo. *PLoS One*, *7*(11), e49447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049447>
- Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., & Melino, G. (2013). Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*, *32*(43), 5129–5143. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.640>
- Sacchetti, B., Funari, A., Remoli, C., Giannicola, G., Kogler, G., Liedtke, S., ... Bianco, P. (2016). No identical “mesenchymal stem cells” at different times and sites: Human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports*, *6*(6), 897–913. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.011>
- Sadoun, E., & Reed, M. J. (2003). Impaired Angiogenesis in Aging Is Associated with Alterations in Vessel Density, Matrix Composition, Inflammatory Response, and Growth Factor Expression. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *51*(9), 1119–

1130. <https://doi.org/10.1177/002215540305100902>

- Salminen, A., Kauppinen, A., & Kaarniranta, K. (2012). Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling*, *24*(4), 835–845. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.006>
- Sanders, Y. Y., Kumbla, P., & Hagoood, J. S. (2007). Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in thy-1(-) lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *36*(2), 226–235. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0178OC>
- Santini, M. P., Forte, E., Harvey, R. P., & Kovacic, J. C. (2016). Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells. *Development*, *143*, 1242–1258. <https://doi.org/10.1242/dev.111591>
- Schafer, M. J., White, T. A., Iijima, K., Haak, A. J., Ligresti, G., Atkinson, E. J., ... LeBrasseur, N. K. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nature Communications*, *8*, 14532. <https://doi.org/10.1038/ncomms14532>
- Schmitt, R. (2017). Senotherapy: growing old and staying young? *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *469*(9), 1051–1059. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1972-4>
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., & Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nature Cell Biology*, *6*(2), 168–170. <https://doi.org/10.1038/ncb1095>
- Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Milyavsky, M., Zurer, I., Shohat, G., ... Rotter, V. (2001). Change of the Death Pathway in Senescent Human Fibroblasts in Response to DNA Damage Is Caused by an Inability To Change of the Death Pathway in Senescent Human Fibroblasts in Response to DNA Damage Is Caused by an Inability To Stabilize p53. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(5), 1552–1564. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1552>
- Serrano, M., & Blasco, M. A. (2001). Putting the stress on senescence. *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00278-7](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00278-7)
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, *88*(5), 593–602. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9054499>
- Sethe, S., Scutt, A., & Stolzing, A. (2006). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Research Reviews*, *5*(1), 91–116. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.10.001>
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, *410*(6832), 1107–1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, *15*(7), 397–408. <https://doi.org/10.1038/nrc3960>
- Sherr, C. J., & DePinho, R. A. (2000). Cellular Senescence: Minireview Mitotic Clock or Culture Shock? *Cell*, *102*, 407–410. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00046-5)
- Shimizu, I., Yoshida, Y., Katsuno, T., Tateno, K., Okada, S., Moriya, J., ... Minamino, T. (2012). p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. *Cell Metabolism*, *15*(1), 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.006>
- Shinmura, K. (2016). Cardiac senescence, heart failure, and frailty: A triangle in elderly people. *Keio Journal of Medicine*, *65*(2), 25–32. <https://doi.org/10.2302/kjm.2015-0015-IR>
- Siegel, G., Kluba, T., Hermautz-Klein, U., Biedback, K., Northoff, H., & Schafer, R. (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Medicine*, *(11)*, 146.
- Silva, G. V., Litovsky, S., Assad, J. A. R., Sousa, A. L. S., Martin, B. J., Vela, D., ... Perin, E. C. (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*, *111*(2), 150–156. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000151812.86142.45>

- Simpson, D. L., Mishra, R., Sharma, S., Goh, S. K., Deshmukh, S., & Kaushal, S. (2012). A strong regenerative ability of cardiac stem cells derived from neonatal hearts. *Circulation*, *126*(11 Suppl 1), S46-53.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084699>
- Smith, C. L., Baek, S. T., Sung, C. Y., & Tallquist, M. D. (2011). Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling. *Circulation Research*, *108*(12). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.235531>
- Smith, R. R., Barile, L., Cho, H. C., Leppo, M. K., Hare, J. M., Messina, E., ... Marbán, E. (2007). Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*, *115*(7), 896–908.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655209>
- Smits, A. M., van Laake, L. W., den Ouden, K., Schreurs, C., Szuhai, K., van Echteld, C. J., ... Goumans, M.-J. (2009). Human cardiomyocyte progenitor cell transplantation preserves long-term function of the infarcted mouse myocardium. *Cardiovascular Research*, *83*(3), 527–535. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp146>
- Soefje, S. A., Karnad, A., & Brenner, A. J. (2011). Common toxicities of mammalian target of rapamycin inhibitors. *Targeted Oncology*, *6*(2), 125–129. <https://doi.org/10.1007/s11523-011-0174-9>
- Spencer, N. D., Gimble, J. M., & Lopez, M. J. (2011). Mesenchymal stromal cells: Past, present, and future. *Veterinary Surgery*, *40*(2), 129–139. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2010.00776.x>
- Steenman, M., & Lande, G. (2017). Cardiac aging and heart disease in humans. *Biophysical Reviews*, *9*(2), 131–137.
<https://doi.org/10.1007/s12551-017-0255-9>
- Storer, M., Mas, A., Robert-moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Giacomo, V. Di, ... Keyes, W. M. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, *155*(5), 1119–1130.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>
- Strait, J. B., & Lakatta, E. G. (2012). Aging-Associated Cardiovascular Changes and Their Relationship to Heart Failure. *Heart Failure Clinics*. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2011.08.011>
- Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B. A., Li, Y., Liao, R., ... Han, J. (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell*, *128*(2), 295–308. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.050>
- Swanson, E. C., Rapkin, L. M., Bazett-Jones, D. P., & Lawrence, J. B. (2015). Unfolding the story of chromatin organization in senescent cells. *Nucleus*, *6*(4), 254–260. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1057670>
- Szekely, Y., & Arbel, Y. (2018). A Review of Interleukin-1 in Heart Disease: Where Do We Stand Today? *Cardiology and Therapy*.
<https://doi.org/10.1007/s40119-018-0104-3>
- Tchkonia, T., Zhu, Y., Deursen, J. Van, Campisi, J., & Kirkland, J. L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype : therapeutic opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(3), 966–972.
<https://doi.org/10.1172/JCI64098.966>
- Tedgui, A. (1993). Le vieillissement de la paroi artérielle. *Médecine/Sciences*, *9*(10), 1068–1078.
<https://doi.org/10.1017/S0035336100123196>
- Tepper, C. G., Seldin, M. F., & Mudryj, M. (2000). Fas-mediated apoptosis of proliferating, transiently growth-arrested, and senescent normal human fibroblasts. *Experimental Cell Research*, *260*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4990>
- Thore, C. R., Anstrom, J. A., Moody, D. M., Challa, V. R., Marion, M. C., & Brown, W. R. (2007). Morphometric Analysis of Arteriolar Tortuosity in Human Cerebral ... *J Neuropathol Exp Neurol*, *66*(5), 337–345. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3180537147>
- Tillmanns, J., Rota, M., Hosoda, T., Misao, Y., Esposito, G., Gonzalez, A., ... Anversa, P. (2008). Formation of large coronary arteries by cardiac progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(5), 1668–1673.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0706315105>
- Toledo, F., & Wahl, G. M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews Cancer*, *6*(12), 909–923. <https://doi.org/10.1038/nrc2012>

- Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P. J., Cayuela, M. L., Maraver, A., Tejera, A., ... Blasco, M. A. (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*, *135*(4), 609–622. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.034>
- Toussaint, O., Dumont, P., Dierick, J. F., Pascal, T., Fripiat, C., Chainiaux, F., ... Remacle, J. (2000). Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *908*, 85–98. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06638.x>
- Toussaint, O., Medrano, E. E., & Von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00180-7)
- Traktuev, D. O., Prater, D. N., Merfeld-Clauss, S., Sanjeevaiah, A. R., Saadatzadeh, M. R., Murphy, M., ... March, K. L. (2009). Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circulation Research*, *104*(12), 1410–1420. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.190926>
- Triana-Martínez, F., Pedraza-Vázquez, G., Maciel-Barón, L. A., & Königsberg, M. (2016). Reflections on the role of senescence during development and aging. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.04.004>
- Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *8*(9), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>
- Uchida, S., De Gaspari, P., Kostin, S., Jenniches, K., Kilic, A., Izumiya, Y., ... Braun, T. (2013). Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Reports*, *1*(5), 397–410. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.09.004>
- Ulrich, H., do Nascimento, I. C., Bocsi, J., & Tárnok, A. (2015). Immunomodulation in Stem Cell Differentiation into Neurons and Brain Repair. *Stem Cell Reviews and Reports*, *11*(3), 474–486. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9556-6>
- Ungvari, Z., Kaley, G., De Cabo, R., Sonntag, W. E., & Csiszar, A. (2010). Mechanisms of vascular aging: New perspectives. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, *65* A(10), 1028–1041. <https://doi.org/10.1093/gerona/gdq113>
- Utikal, J., Polo, J. M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R. M., ... Hochedlinger, K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*, *460*(7259), 1145–1148. <https://doi.org/10.1038/nature08285>
- Van Der Kooy, D., & Weiss, S. (2000). Why stem cells? *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1439>
- van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, *509*(7501), 439–446. <https://doi.org/10.1038/nature13193>
- van Royen, N., Piek, J. J., Schaper, W., & Fulton, W. F. (2009). A Critical Review of Clinical Arteriogenesis Research. *Journal of the American College of Cardiology*, *55*(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.06.058>
- van Vliet, P., Roccio, M., Smits, A. M., van Oorschot, A. A. M., Metz, C. H. G., van Veen, T. A. B., ... Goumans, M.-J. (2008). Progenitor cells isolated from the human heart: a potential cell source for regenerative therapy. *Netherlands Heart Journal : Monthly Journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*, *16*(5), 163–169. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18566670>
- Vasa, M., Breitschopf, K., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2000). Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circulation Research*, *87*(7), 540–542. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.7.540>
- Velarde, M. C., Demaria, M., & Campisi, J. (2013). Senescent cells and their secretory phenotype as targets for cancer therapy. *Cancer and Aging: From Bench to Clinics*, *38*, 17–27. <https://doi.org/10.1159/000343572>
- Victorelli, S., & Passos, J. F. (2017). Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine*, pp. 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.027>
- von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(7), 339–344. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114022>
- Voyta, J. C., Via, D. P., Butterfield, C. E., & Zetter, B. R. (1984). Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *The Journal of Cell Biology*, *99*(6), 2034–2040. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6501412>

- Wahl, G. M., & Carr, A. M. (2001). The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nature Cell Biology*, 3(12), E277–86. <https://doi.org/10.1038/ncb1201-e277>
- Wang, M., & Shah, A. M. (2015). Age-associated pro-inflammatory remodeling and functional phenotype in the heart and large arteries. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 83, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.004>
- Wang, Y., Chen, X., Cao, W., & Shi, Y. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*, 15(11), 1009–1016. <https://doi.org/10.1038/ni.3002>
- Wang, Y., Sharpless, N., & Chang, S. (2013). p16 INK4a protects against dysfunctional telomere-induced ATR-dependent DNA damage responses. *The Journal of Clinical Investigation*, 123. <https://doi.org/10.1172/JCI69574>
- Wappler, E. A., Antal, P., Várbió, S., Székács, B., Simon, A., Nagy, Z., ... Nádasy, G. L. (2013). Network remodeling of intramural coronary resistance arteries in the aged rat: A statistical analysis of geometry. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(7–8), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.03.002>
- Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N., & Hara, E. (2017). Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Science*, 108(4), 563–569. <https://doi.org/10.1111/cas.13184>
- Watt, S. M., Gullo, F., Van Der Garde, M., Markeson, D., Camicia, R., Khoo, C. P., & Zwaginga, J. J. (2013). The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *British Medical Bulletin*, 108(1), 25–53. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldt031>
- Weinberger, F., Mehrkens, D., Friedrich, F. W., Stubbendorff, M., Hua, X., Muller, J. C., ... Eschenhagen, T. (2012). Localization of Islet-1-Positive Cells in the Healthy and Infarcted Adult Murine Heart. *Circulation Research*, 110(10), 1303–1310. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.259630>
- Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., ... Campisi, J. (2016). Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. *Cell Metabolism*, 23(2), 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011>
- Williams, A. B., & Schumacher, B. (2016). p53 in the DNA-damage-repair process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026070>
- Woeller, C. F., O'Loughlin, C. W., Pollock, S. J., Thatcher, T. H., Feldon, S. E., & Phipps, R. P. (2015). Thy1 (CD90) controls adipogenesis by regulating activity of the Src family kinase, Fyn. *FASEB Journal*, 29(3), 920–931. <https://doi.org/10.1096/fj.14-257121>
- Wong, S. P., Rowley, J. E., Redpath, A. N., Tilman, J. D., Fellous, T. G., & Johnson, J. R. (2015). Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacology and Therapeutics*, 151, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.03.006>
- Wu, X.-B., & Tao, R. (2012). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International : HBPDI*, 11(4), 360–371. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22893462>
- Xu, M., Palmer, A. K., Ding, H., Weivoda, M. M., Pirtskhalava, T., White, T. A., ... Kirkland, J. (2015). Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *ELife*, 4, e12997. <https://doi.org/10.7554/eLife.12997>
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., ... Kirkland, J. L. (n.d.). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>
- Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., ... Kirkland, J. L. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>
- Xu, M., Tchkonja, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E. R., Pirtskhalava, T., ... Kirkland, J. L. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), E6301–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515386112>
- Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q., & Chen, Z. J. (2017). cGAS is essential for cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23), E4612–E4620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705499114>
- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., ... Ullrich, A. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a

new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *The EMBO Journal*, 6(11), 3341–3351.

- Yellamilli, A., & van Berlo, J. H. (2016). The Role of Cardiac Side Population Cells in Cardiac Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00102>
- Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., ... Krizhanovsky, V. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms11190>
- Yu, J. M., Wu, X., Gimble, J. M., Guan, X., Freitas, M. A., & Bunnell, B. A. (2011). Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow. *Aging Cell*, 10(1), 66–79. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00646.x>
- Zhou, B., Honor, L. B., He, H., Qing, M., Oh, J. H., Butterfield, C., ... Pu, W. T. (2011). Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1894–1904. <https://doi.org/10.1172/JCI45529>
- Zhou, B., Tsaknakis, G., Coldwell, K. E., Khoo, C. P., Roubelakis, M. G., Chang, C. H., ... Watt, S. M. (2012). A novel function for the haemopoietic supportive murine bone marrow MS-5 mesenchymal stromal cell line in promoting human vasculogenesis and angiogenesis. *British Journal of Haematology*, 157(3), 299–311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09050.x>
- Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., & Bishop, J. M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes and Development*, 12(19), 2997–3007. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.2997>
- Zhu, Y., Doornebal, E. J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., ... Kirkland, J. L. (2017). New agents that target senescent cells: The flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging*, 9(3), 1–9. <https://doi.org/10.18632/aging.101202>
- Zhu, Y., Tchkonina, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H. M., Ling, Y. Y., Stout, M. B., ... Kirkland, J. L. (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*, 15(3), 428–435. <https://doi.org/10.1111/acer.12445>
- Zhu, Y., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., ... Kirkland, J. L. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 14(4), 644–658. <https://doi.org/10.1111/acer.12344>
- Zoni-Berisso, M., Lercari, F., Carazza, T., & Domenicucci, S. (2014). Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clinical Epidemiology*, 6, 213. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S47385>

RESUME en français :

Le vieillissement est considéré comme un facteur de risque majeur de développement de pathologies chroniques, notamment cardiovasculaires. Plusieurs études ont suggéré que l'accumulation de cellules sénescents pouvait être responsable de l'apparition de ces pathologies liées à l'âge. Au niveau cardiaque, les cellules stromales mésenchymateuses cardiaques (cMSCs), co-exprimant chez la souris PDGFR α et Sca1, participent à l'homéostasie cardiaque par leur différenciation vasculaire (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) et leur activité paracrine.

Dans notre étude, nous nous intéressons à l'impact du vieillissement sur les capacités de différenciation vasculaire des cMSCs.

Nous avons pu mettre en évidence, par comparaison de cMSCs de souris C57Bl/6 jeunes (3 Mois) et âgées (20 Mois), l'apparition d'un programme de sénescence avec le vieillissement caractérisé par une perte de prolifération cellulaire et l'expression d'inhibiteurs du cycle de la famille des INK4 dont p16^{INK4a}. L'analyse par cytométrie en flux a révélé une diminution avec l'âge d'une sous-population de cMSCs exprimant le marqueur CD90. La raréfaction de cette population est associée à un biais de différenciation vasculaire vers la différenciation léiomyocytaire, au détriment de la différenciation endothéliale.

Dans un second temps, nous avons constaté que le vieillissement et l'expression d'un programme de sénescence participe et potentialise ces capacités de différenciation vasculaire. L'expression de p16^{INK4a} serait nécessaire notamment à la différenciation endothéliale de la sous population CD90 positive, et est corrélée à l'apparition d'une nouvelle sous-population de cellules stromales cardiaques (CD31+, Sca1+, PDGFR α + et CD90+).

En conclusion, nos résultats montrent que le vieillissement induit des changements de sous-populations fonctionnels et phénotypiques des cMSCs pouvant jouer un rôle dans l'homéostasie du tissu cardiaque chez le sujet âgé et les dysfonctions cardiaques associées à l'âge.

MOTS-CLES : Vieillissement cardiaque, sénescence, différenciation vasculaire, cellules stromales mésenchymateuses, CD90

RESUME en anglais : Impact of Aging on differentiation potentials of cardiac mesenchymal stromal cells

Aging is a dominant risk factor for developing chronic diseases especially cardiovascular diseases. Senescent cell accumulation within tissues is thought to drive age-related organ dysfunction. Cardiac mesenchymal stromal cells (cMSCs) can modulate cardiac homeostasis through their vascular differentiation potential (endothelial cells and smooth muscle cells) and their paracrine activity.

The aim of our study is to determine the impact of aging on cMSC vascular differentiation potential.

We demonstrated that during aging, cMSCs populations acquired a senescence program characterized by decreased proliferation and by expression of cell cycle inhibitors such as p16^{INK4a}. Aging also induced a rarefaction of the CD90+ subset of cMSCs. CD90+ cMSCs were characterized by their increased potential to differentiate into the endothelial cell lineage and but not into the smooth muscle cell one.

In a second part, we associated aging and the senescence program expression with the improvement of vascular differentiation potential. P16^{INK4a} expression is required for the endothelial differentiation of CD90+ sub-population, which can lead to the apparition of a new subtype of cardiac stromal cells co-expressing CD31 with cMSCs markers, PDGFR α , Sca1 and CD90.

In conclusion, our results showed that aging induced significant changes in cMSC phenotype and functions that could have some impacts on cardiac homeostasis in aged tissue and in age-associated cardiac dysfunction.

KEY WORDS : Cardiac aging, senescence, vascular differentiation, cardiac mesenchymal stromal cells, CD90

DISCIPLINE administrative : Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie,
Mémoire de DES Innovation Pharmaceutique et Recherche (IPR)

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR : Université Paul Sabatier Toulouse III – Faculté des Sciences Pharmaceutiques – 31062
Toulouse Cedex 09

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE : INSERM U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Equipe 6,
1 avenue Jean Poulhès - 31432 Toulouse Cedex 4

Directeur de thèse : Victorine DOUIN-ECHINARD